

THÈSE
pour le
DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX 1

Ecole doctorale des Sciences du Vivant,
Géosciences et Sciences de l'environnement
Spécialité : Science des Aliments

Soutenue publiquement le
25 janvier 2005

par

M^{elle} Esther MARZA

Née le 11 janvier 1977 à Bordeaux

**Structure génique, implications évolutives et
physiologiques, et régulation ontogénique et nutritionnelle
de l'expression des gènes codant pour les apolipoprotéines
B et la grande sous-unité de la « microsomal triglyceride
transfer protein » du poisson zèbre (*Danio rerio*).**

Sous la direction de : Mr Patrick BABIN, Professeur à l'Université Bordeaux 1

Commission d'examen :

Mr Paul HIGUERET, Professeur à l'Université Bordeaux 1

Mme Marie-Elisabeth SAMSON-BOUMA, Chargé de Recherche à l'INSERM

Mr Jose Luis ZAMBONINO INFANTE, Chargé de Recherche à l'IFREMER

Mr Daniel BRETHERS, Chargé de Recherche au CNRS, Bordeaux 2

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Membre invité

A Yaye,

*A ma mère,
A mon frère,
A mon père,*

A Rémi,

**“There are those who look at things the way they are, and ask why...
I dream of things that never were, and ask why not?”**

Robert Kennedy

PUBLICATIONS

- **Marza, E., Barthe, C., André, M., Villeneuve, L., Hérou, C., and Babin, P.J.** Developmental expression and nutritional regulation of a zebrafish gene homologous to mammalian microsomal triglyceride transfer protein large subunit. (2005) *Developmental Dynamics*, **232(2)**, 506-518.

PRESENTATIONS

Communications orales :

Marza, E., André, M., Villeneuve, L., Forgue, J., Barthe, C., Hérou, C., and Babin, P. J. Mise en place des voies métaboliques et contrôle de l'expression des gènes impliqués dans la nutrition lipidique au cours du développement du poisson zèbre. 25-28 Mars 2003. 2^{ème} Rencontres de l'Ichtyologie en France (RIF), Paris, France.

Communications écrites :

Marza, E., André, M., Knoll-Gellida, A., Villeneuve, L., Barthe, C., Hérou, C., and Babin, P. J. Nutritional regulation of zebrafish lipid genes during liver and intestine morphogenesis. 11-14 Juin 2003. 3rd European Conference on Zebrafish and Medaka Genetics and Development, Paris, France.

Marza, E., André, M., Knoll-Gellida, A., Villeneuve, L., Barthe, C., Hérou, C., and Babin, P. J. Apolipoprotein B and the large subunit of microsomal triglyceride transfer protein are markers of the intestinal lipid absorption and lipoprotein secretion in fish. Mai 2001. European meeting on marine biotechnology, Nantes, France.

LISTE DES ABBREVIATIONS

ABL : abétalipoprotéïnémie
ACAT : acyl-CoA:cholesterol acyltransferase
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire
AG : acides gras
AG-CoA : acyl co-enzyme A
apo : apolipoprotéine
apoB : apolipoprotéine B
apoB-48 : apolipoprotéine B 48
apoB-100 : apolipoprotéine B 100
APOBEC-1 : apoB mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide 1
apoC-I : apolipoprotéine C-I
apoC-II : apolipoprotéine C-II
apoC-III : apolipoprotéine C-III
apoD : apolipoprotéine D
apoE : apolipoprotéine E
ARF-1 : ADP Ribosylation Factor 1
Arg : arginine
ARN : acide ribonucléique
ARNm : acide ribonucléique messenger
b : blastomères
bm : blastomères marginaux
CETP : cholesteryl ester transfer protein
CoA : Coenzyme-A
COPII : COat Protein II
CPT : carnitine palmitoyl transferase
cv : cellule vitelline
DAG : diacylglycérol, diglycéride
DAGT : diacylglycerol acyltransferase
dbEST : double strand expressed sequence tag
DHA : acide docosahexanoïque
DIG : digoxigénine
dNTP : désoxyribonucléotides tri-phosphates
DTT : dithiothréitol
e : oesophage
EPA : acide éicosapentanoïque
EF1 α : elongation factor 1 α
efl α : gène codant pour la protéine EF1 α
f : foie
FABP : fatty acid binding protein
FABP_{pm} : fatty acid binding protein plasmatique
FABP-I : fatty acid binding protein intestinale
FABP-L : fatty acid binding protein hépatique
FAT/CD36 : fatty acid translocase
FATP-4 : fatty acid transport protein-4
FDH : familial defective apoB-100
FH : hypercholestérolémie familiale
g : vésicule biliaire
Gln : glutamine
h : heures
HBLF : hypobetalipoproteinemia familiale
HDL : high density lipoprotein

Hsp : heat shock protein
 HYBE : tampon d'hybridation
 Hum : humain
 hpf : heures post-fécondation
 I : intestin
 ia : intestin antérieur
 IDL : intermediate density lipoprotein
 jpf : jours post-fécondation
 kb : kilobases
 kDa : kilo Dalton
 L : foie
 LCAT : lecithin-cholesterol acyl transferase
 LDL : low density lipoprotein
 LLT : large lipid transfer
 LLTP : large lipid transfer protein
 lp : lipoprotéine
 LPD_N : lipoprotein N-terminal domain
 LPL : lipoprotéine lipase
 LRP : LDL receptor-related protein
 LV : lipovitellin
 MAG : monoacylglycérol, monoglycéride
 MTP : microsomal triglyceride transfer protein
mtp : gène codant pour la grande sous-unité de la MTP de poisson zèbre
mttp : gène mammalien codant pour la grande sous-unité de la MTP
mttp^{Δ/Δ} : souris homozygotes dont le gène *mttp* a été supprimé spécifiquement dans le foie
 o : œil
 p : pancréas
 PAF : paraformaldéhyde
 pb : paires de bases
 PBS : phosphate saline buffer
 PCR : réaction de polymérisation en chaîne
 PCTV : pre-chylomicrons transporting vesicule
 PDI : protéine disulfide isomérase
 ph : pharynx
 Pi : îlots pancréatiques principaux
 PTU : phényl-1-thio-2-urée
 RACE : amplification rapide des extrémités des ADNc
 qsp : quantité suffisante pour
 RT : transcription inverse
 RT-PCR : PCR sur des ARN rétro-transcrits
 RT-PCRq : PCR quantitative en temps réel
 SB : vessie natatoire
 SDS : sodium dodécyl sulfate
 sv : syncytium vitellin
 TAE : tris acide acétique EDTA
 TAG : triacylglycérol, triglycéride
 TBE : tris borate EDTA
 TGH : triglycéride hydrolase
 ti : tube intestinal
 Trp : tryptophane
 Tyr : tyrosine
 ufc : unité formant colonies
 VLDL : very low density lipoprotein
 VTG : vitellogénine
 Zeb : poisson zèbre

RESUME

L'absorption des lipides d'origine alimentaire depuis l'intestin jusqu'à la circulation sanguine implique leur incorporation dans des lipoprotéines synthétisées par les entérocytes. Les travaux qui ont été engagés dans le cadre de ce travail ont consisté à étudier, chez un poisson modèle, deux acteurs moléculaires majeurs précédemment identifiés chez les mammifères et impliqués dans la synthèse des lipoprotéines par les entérocytes. Les gènes et les transcrits codant pour la grande sous-unité de la « microsomal triglyceride transfer protein » (MTP) et des apolipoprotéines B (apoB) du poisson zèbre ont ainsi été caractérisés et comparés à leurs homologues mammaliens. Les profils d'expression de ces gènes au cours du développement embryonnaire et larvaire ainsi que chez l'adulte ont été définis. Le gène *mtp* est exprimé de façon transitoire dans le syncytium vitellin dès l'activation de la transcription des gènes zygotiques puis majoritairement dans l'épithélium de l'intestin antérieur et le foie. Une activité MTP a pu être démontrée dans l'intestin antérieur de l'adulte. La quantité de transcrit *mtp* est par ailleurs augmentée significativement dans ce tissu après la prise de nourriture quel que soit le stade de développement. Les trois gènes *apoB α* , *apoB β 1* et *apoB β 2* qui sont présents dans le génome du poisson zèbre codent pour des apoB qui contiennent les éléments structuraux nécessaires à la liaison des lipides et un domaine putatif de liaison au récepteur aux LDL similaire dans la forme α ou différent pour les formes β au domaine présent dans l'apoB-100 des mammifères. Ces trois gènes présentent des profils d'expression distincts au cours du développement et chez l'adulte. Une expression majeure d'*apoB α* et d'*apoB β 1* a été identifiée respectivement dans le foie et dans l'intestin antérieur. L'ensemble des résultats obtenus permet de discuter des similarités et des différences qui peuvent exister dans le métabolisme lipidique et lipoprotéique entre les poissons Téléostéens et les mammifères.

Mots clés : poisson zèbre (*Danio rerio*), lipoprotéines, apolipoprotéine B, microsomal triglyceride transfer protein, MTP, gouttelettes lipidiques, régulation nutritionnelle, évolution moléculaire, abétalipoprotéïnémie, nutrition larvaire, intestin, régulation nutritionnelle.

TABLE DES MATIERES

Chapitre 1 : INTRODUCTION

I. Position phylogénétique des poissons Téléostéens.	1
II. Le poisson zèbre comme modèle d'étude.	1
III. La physiologie de la nutrition du poisson zèbre et des autres poissons Téléostéens.	5
A. Les phases nutritionnelles du poisson zèbre.	5
B. Les réserves vitellines lipidiques et leur utilisation au cours du développement du poisson zèbre.	6
C. L'appareil digestif du poisson zèbre.	7
1- La mise en place de l'appareil digestif.	7
2- La structure de l'appareil digestif du poisson zèbre.	8
D. Le régime alimentaire et les besoins lipidiques.	9
1- Le régime alimentaire.	9
2- Les besoins nutritionnels en lipides des poissons Téléostéens.	10
a- Les besoins en triglycérides.	11
b- Les besoins en phospholipides.	11
c- Les besoins en acides gras.	12
IV. Comparaison du métabolisme des lipides et des lipoprotéines riches en triglycérides dans les entérocytes des poissons Téléostéens et des mammifères.	13
A. La digestion des lipides dans la lumière intestinale.	14
Chez les poissons comme chez les mammifères, les triglycérides sont les lipides majoritaires de l'alimentation. Toutefois, chez les poissons, les phospholipides comportant des acides gras insaturés de la série (n-3) sont plus rapidement digérés que les triglycérides composés des mêmes acides gras (Ackman, 1989).	14
B. L'entrée des acides gras dans les entérocytes.	15
C. Le transport intracellulaire et l'estérification des acides gras en triglycérides.	16
1- Le transport intracellulaire des acides gras.	16
2- L'estérification des acides gras dans la lumière du reticulum endoplasmique lisse.	16
3- La présence de gouttelettes lipidiques cytosoliques dans les entérocytes.	18
D. L'assemblage et la sécrétion des chylomicrons par les entérocytes.	19
1- La MTP des mammifères.	19
a- La structure du complexe MTP.	20
b- Les fonctions de la MTP.	23
c- Le gène <i>mtp</i> codant pour la grande sous-unité de la MTP.	25
2- Les apoB.	26
a- La structure des apoB humaines.	26
b- Le gène codant pour les apoB humaines.	32
3- L'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines riches en triglycérides par les entérocytes de poissons Téléostéens.	32
4- L'assemblage des lipoprotéines riches en triglycérides par les entérocytes de mammifères.	33
a- Le modèle d'assemblage des lipoprotéines riches en triglycérides par le foie des mammifères.	33
b- L'assemblage des chylomicrons par les entérocytes des mammifères.	36
c- Les défauts d'assemblage : l'abétalipoprotéïnémie et l'hypobétalipoprotéïnémie familiale.	36
5- La sécrétion des chylomicrons par les entérocytes de mammifères.	38

a-	Le mécanisme de sécrétion des chylomicrons.	38
b-	La maladie d'Anderson : défaut de sécrétion des chylomicrons.	39
6-	Les modifications post-traductionnelles de l'apoB et la régulation de la sécrétion des lipoprotéines riches en triglycérides.	40
a-	Les modifications post-traductionnelles de l'apoB.	40
b-	La régulation de la sécrétion de l'apoB.	41
E.	Les lipoprotéines circulantes.	42
1-	Les lipoprotéines, les apolipoprotéines et leur classification.	42
2-	Comparaison de la composition des lipoprotéines plasmatiques entre les poissons et les mammifères.	44
3-	Les voies du transport des lipides chez les vertébrés.	46
V.	Les objectifs	51

Chapitre 2 : MATERIEL ET METHODES

I.	L'élevage des poissons zèbres.	53
A.	Les conditions d'élevage.	53
B.	L'obtention d'embryons et de larves.	53
C.	L'obtention de larves dépigmentées.	53
D.	Les expériences de nutrition.	54
E.	Les prélèvements.	54
II.	Les méthodes de biologie moléculaire.	54
A.	Les Souches bactériennes et les plasmides.	54
B.	L'extraction des ARN totaux.	55
C.	Le Northern blot.	55
D.	La transcription inverse ou Rétro-Transcription (RT).	55
1-	La transcription inverse pour les RT-PCR.	55
2-	La transcription inverse pour les amplifications rapides des extrémités des ADNc (RACE-PCR).	56
3-	La transcription inverse pour la RT-PCRq.	56
E.	Les amplifications par RACE-PCR et RT-PCR.	56
1-	Les amplifications rapides des extrémités des ADNc par PCR (RACE-PCR).	58
2-	Les amplifications par RT-PCR.	58
F.	Les PCR.	58
G.	La purification des fragments d'ADN.	59
H.	Les coupures et les enzymes de restriction.	60
I.	La ligation.	60
J.	La transformation bactérienne par électroporation.	61
K.	La sélection colorée des clones et extraction plasmidique.	61
1-	La sélection.	61
2-	L'extraction plasmidique.	61
L.	Le séquençage.	62
M.	Le criblage d'une banque d'ADNc de foie de truite.	62

III. La RT-PCR quantitative en temps réel (RT-PCRq).	64
A. Les gènes de références.	64
B. Les amorces.	64
C. Les réactions PCR.	65
D. Les contrôles.	65
E. Les courbes standard.	66
F. Les analyses statistiques.	66
IV. La détection de l'expression génique par hybridation in situ.	66
A. La synthèse des sondes ARN marquées à la digoxigénine.	67
B. L'hybridation in situ in toto.	68
1- La préparation des échantillons.	68
2- La préhybridation, l'hybridation et les rinçages.	69
3- L'incubation dans l'anticorps anti-DIG et la révélation colorée.	70
4- Le traitement des embryons et larves.	70
C. Les coupes à congélation.	70
D. L'hybridation in situ sur coupes.	71
1- La réalisation des coupes.	71
2- L'hybridation in situ.	71
3- Le montage des lames.	72
E. Les observations.	73
V. Les méthodes biochimiques.	73
A. La préparation des microsomes.	73
B. Le dosage colorimétrique des protéines.	73
C. La mesure de l'activité de transfert de la grande sous-unité de la MTP.	74
VI. Les recherches bio-informatiques.	74
A. Les clones nucléotidiques.	74
B. Les séquences géniques.	74
C. L'analyse du promoteur.	74
D. Les séquences protéiques.	74
E. Les alignements.	75
F. L'analyse phylogénétique.	75
G. Autres.	75

Chapitre 3 : RESULTATS

I. Le gène de poisson zèbre homologue au gène mammalien codant pour la grande sous-unité de la MTP : caractérisation, expression au cours du développement et régulation nutritionnelle.	77
A. Le clonage moléculaire de l'ADNc codant pour la grande sous-unité putative de poisson zèbre.	77

1-	La stratégie.	77
2-	L'analyse de la séquence de l'ADNc.	78
3-	La caractérisation du gène <i>mtp</i> de poisson zèbre.	79
4-	L'analyse de la séquence protéique de la grande sous-unité de la MTP de poisson zèbre et mesure de l'activité de transfert.	81
B.	L'expression du gène <i>mtp</i> au cours du développement du poisson zèbre.	84
1-	Le profil d'expression du gène <i>mtp</i> .	84
2-	La quantification du niveau d'expression du gène <i>mtp</i> au cours du développement embryonnaire.	86
C.	La quantification de l'expression du gène <i>mtp</i> chez l'adulte.	88
D.	La régulation nutritionnelle de l'expression du gène <i>mtp</i>.	89
1-	La présence de gouttelettes lipidiques dans les entérocytes de poisson zèbre après la prise de nourriture.	89
2-	La régulation de l'expression du gène <i>mtp</i> par la prise alimentaire chez la larve.	91
a-	La visualisation d'un effet de la prise alimentaire sur l'expression du gène <i>mtp</i> .	92
b-	La quantification de l'effet de la prise alimentaire sur le niveau d'expression du gène <i>mtp</i> .	92
3-	La quantification de la régulation de l'expression du gène <i>mtp</i> par la prise alimentaire chez le poisson zèbre adulte.	94
II.	<i>Données supplémentaires sur la grande sous-unité de la MTP et la PDI de poisson zèbre.</i>	95
A.	Détermination de la taille du transcrit <i>mtp</i> par northern blot.	95
B.	L'analyse bio-informatique du promoteur du gène <i>mtp</i> de poisson zèbre.	96
C.	L'expression du gène <i>mtp</i> dans les entérocytes de poisson zèbre adulte.	96
D.	Mesure de l'activité de transfert des triglycérides et des esters de cholestérols.	98
E.	Caractérisation de la petite sous-unité de la MTP de poisson zèbre.	99
III.	<i>Les gènes codant pour les apoB de poisson : caractérisation, expression au cours du développement et régulation nutritionnelle.</i>	101
A.	L'identification de plusieurs formes d'apoB chez le poisson zèbre.	101
1-	L'identification des gènes codant pour les apoB de poisson zèbre.	101
2-	La comparaison des séquences protéiques déduites des apoB de poisson zèbre.	107
3-	La structure des apoB d'autres poissons téléostéens.	110
B.	L'expression des gènes apoBα, apoBβ1 et apoBβ2 chez l'embryon, la larve et l'adulte de poisson zèbre.	112
1-	L'expression des gènes apoB α et apoB β 1 au cours du développement embryonnaire et larvaire du poisson zèbre.	112
a-	Le profil d'expression du gène <i>apoBα</i> .	112
b-	Le profil d'expression du gène <i>apoBβ1</i> .	114
c-	La comparaison des profils d'expression des gènes <i>apoBα</i> et <i>apoBβ1</i> .	116
2-	L'expression des gènes apoB α , apoB β 1 et apoB β 2 chez le poisson zèbre adulte.	118
a-	Le suivi de l'expression tissulaire par RT-PCR.	118
b-	La quantification de l'expression du gène <i>apoBβ1</i> dans les tissus de poisson zèbre adulte.	120
c-	L'expression des gènes <i>apoBα</i> et <i>apoBβ1</i> dans l'intestin de poisson zèbre adulte.	122
3-	L'effet de la prise alimentaire sur l'expression du gène apoB α .	124
4-	L'effet de la prise alimentaire sur le niveau d'expression du gène apoB β 1.	126

Chapitre 4 : DISCUSSION

<i>I. Caractérisation des gènes et des transcrits codant pour la grande sous-unité de la MTP et pour les apoB du poisson zèbre. Comparaison avec leurs homologues mammaliens.</i>	130
A. La MTP.	130
1- La grande sous-unité de la MTP de poisson zèbre.	131
2- La petite sous-unité de la MTP de poisson zèbre.	133
3- L'activité de transfert des lipides de la MTP de poisson zèbre.	133
B. Les apoB.	134
1- Caractérisation moléculaire des apoB de poisson zèbre. Comparaison avec les apoB de mammifères.	134
2- Relations phylogénétiques entre les apoB des vertébrés.	139
<i>II. Comparaison des profils d'expression des gènes codant pour la grande sous-unité de la MTP et pour les apoB entre le poisson zèbre et les vertébrés tétrapodes.</i>	141
A. Expression au cours de l'embryogenèse précoce.	141
B. Expression au niveau des structures extra-embryonnaires.	142
C. Expression au niveau de l'intestin et du foie au cours du développement.	144
D. Expression tissulaire chez l'adulte.	146
<i>III. Evaluation de l'effet de la prise de nourriture sur la quantité des transcrits mtp et apoB chez la larve ainsi que dans l'intestin et le foie de l'adulte du poisson zèbre. Comparaison avec les données existant chez les mammifères.</i>	148
<i>IV. De l'accumulation des gouttelettes lipidiques aux différences qui pourraient exister dans la voie de transport exogène des lipides entre les poissons Téléostéens et les mammifères.</i>	150
A. Hypothèses quant à l'accumulation des gouttelettes lipidiques cytosoliques dans les entérocytes des poissons.	150
B. Existe-t-il des différences dans la voie de transport exogène des lipides entre les poissons Téléostéens et les mammifères ?	153

Chapitre 5 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Phylogénie des vertébrés.....	2
Figure 2 : Phylogénie des poissons Téléostéens.....	2
Figure 3 : Dimorphisme sexuel chez le poisson zèbre (<i>Danio rerio</i>).	3
Figure 4 : Les grandes étapes du développement du poisson zèbre.	3
Figure 5 : Les trois phases nutritionnelles au cours du développement du poisson zèbre.	5
Figure 6 : L'appareil digestif du poisson zèbre.	8
Figure 7 : Synthèse des triacylglycérols dans le reticulum endoplasmique lisse des mammifères.	17
Figure 8 : Structure tridimensionnelle de la lipovitelline de lamproie et modélisation de la grande sous-unité de la MTP.	21
Figure 9 : Représentation schématique du modèle pentapartite de l'apoB-100 humaine.	27
Figure 10 : Structure tridimensionnelle de la lipovitelline de lamproie et modélisation de la partie N-terminale des apoB humaines.	29
Figure 11 : Structure schématisée de l'apoB-100 dans les LDL.	31
Figure 12 : Modèles d'assemblage des VLDL dans les hépatocytes.	34
Figure 13 : Mécanisme d'assemblage général des lipoprotéines riches en triglycérides.	35
Figure 14 : Représentation schématique d'une lipoprotéine de type LDL.	42
Figure 15 : Les voies du transport plasmatique des lipides chez l'Homme.	47
Figure 16 : Stratégie utilisée pour l'obtention de l'ADNc codant pour la grande sous-unité de la MTP de poisson zèbre par RT-PCR et RACE-PCR.	78
Figure 17 : Alignement des séquences protéiques de la grande sous-unité de la MTP humaine (Hum) et de poisson zèbre (Zeb).	82
Figure 18 : Comparaison des parties C-terminales comprises entre les hélices αA et αB des séquences protéiques de la grande sous-unité de la MTP de vertébrés.....	83
Figure 19 : Profil d'expression du gène <i>mtp</i> au cours du développement embryonnaire et larvaire du poisson zèbre.	85
Figure 20 : Quantification de l'expression du gène <i>mtp</i> au cours du développement embryonnaire du poisson zèbre par RT-PCRq.	87
Figure 21 : Quantification de l'expression tissulaire du gène <i>mtp</i> chez le poisson zèbre adulte par RT-PCRq.....	89
Figure 22 : Accumulation de gouttelettes lipidiques dans les entérocytes de poisson zèbre.	90
Figure 23 : Régulation nutritionnelle de l'expression du gène <i>mtp</i> chez la larve de poisson zèbre par hybridation <i>in situ in toto</i>	91
Figure 24 : Quantification de l'effet de la prise alimentaire sur l'expression du gène <i>mtp</i> chez la larve de poisson zèbre.....	93
Figure 25 : Quantification de l'effet de la prise alimentaire sur l'expression du gène <i>mtp</i> dans l'intestin antérieur et le foie du poisson zèbre adulte par RT-PCRq.	94
Figure 26 : Détection de l'expression du gène <i>mtp</i> dans le foie et l'intestin antérieur de poisson zèbre par Northern blot.	95
Figure 27 : Expression du gène <i>mtp</i> dans la cavité intestinale du poisson zèbre adulte.....	97
Figure 28 : Mesure des activités spécifiques de transfert des triglycérides et des esters de cholestérol.	98
Figure 29 : Alignement des séquences protéiques de la PDI humaine, de poisson zèbre et de drosophile.	100
Figure 31 : Comparaison de la structure secondaire des apoB humaines et de poisson zèbre.	108
Figure 32 : Comparaison du domaine supposé de liaison au récepteur aux LDL entre l'apoB-100 humaine, l'apoB de saumon et les apoB de poisson zèbre.	109
Figure 33 : Arbre phylogénétique des apolipoprotéines B de vertébrés.....	111
Figure 34 : Expression du gène <i>apoBα</i> au cours du développement embryonnaire et larvaire du poisson zèbre.	113
Figure 35 : Expression du gène <i>apoBβ</i> au cours du développement embryonnaire et larvaire du poisson zèbre.	115

Figure 36 : Quantification de l'expression du gène <i>apoBβ1</i> au cours du développement embryonnaire du poisson zèbre par RT-PCRq.	117
Figure 37 : Expression des gènes <i>apoBα</i> , <i>apoBβ1</i> et <i>apoBβ2</i> chez l'adulte, par RT-PCR.	119
Figure 38 : Quantification de l'expression tissulaire du gène <i>apoBβ1</i> chez le poisson zèbre adulte par RT-PCRq.	121
Figure 39 : Expression des gènes <i>apoBα</i> et <i>apoBβ1</i> dans la cavité intestinale du poisson zèbre adulte.	123
Figure 40 : Régulation nutritionnelle de l'expression du gène <i>apoBα</i> chez la larve de poisson zèbre visualisée par hybridation <i>in situ in toto</i>	125
Figure 41 : Régulation nutritionnelle de l'expression du gène <i>apoBβ1</i> chez la larve de poisson zèbre visualisée par hybridation <i>in situ in toto</i>	127
Figure 42 : Hypothèses relatives à l'origine de la présence des apoBα et apoBβ chez les poissons Téléostéens.	140
Figure 43 : Hypothèses sur la nature du ou des événements géniques permettant l'apparition des différentes formes d'apoB chez les poissons Téléostéens.	141

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques, composition et lieu de synthèse des principales classes de lipoprotéines chez l'Homme.	43
Tableau 2 : Comparaison de la composition des lipoprotéines plasmatiques humaines et de truite.	45
Tableau 3 : Amorces utilisées pour les amplifications par PCR, RT-PCR, RACE-PCR et RT-PCRq.	57
Tableau 4 : Amorces et programmes utilisés pour l'amplification des fragments par RT-PCR.	59
Tableau 5 : Amorces et programmes utilisés pour l'amplification des fragments par PCR. ...	59
Tableau 6 : Amorces et programmes utilisés pour l'amplification des fragments par RT-PCRq.	65
Tableau 7 : Temps de traitement et concentration en protéinase K utilisés afin de perméabiliser les embryons et les larves de poisson zèbre en fonction de leur stade de développement.	69
Tableau 8 : Comparaison de la structure des gènes <i>mtp</i> humain et <i>mtp</i> de poisson zèbre.....	80
Tableau 9 : Numéros d'accèsion des séquences des apoB de poisson zèbre.....	102
Tableau 10 : Comparaison de la structure des gènes <i>apoB</i> humain et <i>apoBα</i> de poisson zèbre.	104

INDEX DES ANNEXES

Annexe 1 : Solutions et tampons.....	163
Annexe 2 : Culture bactérienne.....	165
Annexe 3 : Migration des ADN et des ARN.....	168
Annexe 4 : Extraction de l'ADN plasmidique.....	170
Annexe 5 : Northern blot et criblage de banque.....	172
Annexe 6 : Hybridation <i>in situ</i>	173
Annexe 7 : Alignement des séquences protéiques des apoB-100 humaine, de souris, de poulet avec l'apoB α (Dr_alpha), l'apoB β 1 (Dr_beta1) et l'apoB β 2 (Dr_beta2) de poisson zèbre.	177
Annexe 8 : Alignement des séquences protéiques des apoB de vertébrés.....	188

*« Así es mi vida, mi vida,
Piedra, como tú*

*Como tú
Piedra pequeña, como tú
Piedra ligera, como tú*

*Como tú
Canto que ruedas, como tú
Por las veredas, como tú*

*Como tú
Guijarro humilde, como tú
De las carreteras, como tú*

*Como tú
Que en días de tormenta, como tú
Te hundes en la tierra, como tú*

*Como tú
Y luego centelleas, como tú
Bajo los cascós,
Bajo las ruedas, como tú*

*Como tú
Piedra pequeña, como tú
Como tú
Guijarro humilde, como tú*

*Como tú
Que no sirves para ser ni piedra,
Como tú
Ni piedra de una lonja,
Como tú
Ni piedra de un palacio
Ni piedra de una iglesia
Ni piedra de una audiencia, como tú*

*Como tú
Piedra aventurera, como tú
Que tal vez estas hecha, como tú
Como tú, solo para una honda,
Como tú
Piedra pequeña,
Como tú*

Como tú. »

*« Ainsi est ma vie, ma vie
Pierre, comme toi*

*Comme toi
Petite pierre, comme toi
Pierre légère, comme toi*

*Comme toi
Chant que tu roules, comme toi
A travers les sentiers, comme toi*

*Comme toi
Humble caillou, comme toi
Des routes, comme toi*

*Comme toi
Qui, les jours d'orage, comme toi
T'enfonces dans la terre, comme toi*

*Comme toi
Et qui ensuite scintilles, comme toi
Sous les sabots,
Sous les roues, comme toi*

*Comme toi
Humble caillou, comme toi
Comme toi
Des routes, comme toi*

*Comme toi
Qui ne sers à être ni pierre
Comme toi
Ni pierre d'une esplanade
Comme toi
Ni pierre d'un palais
Ni pierre d'une église
Ni pierre d'un tribunal, comme toi*

*Comme toi
Pierre aventurière, comme toi
Qui peut-être est faite, comme toi
Comme toi, seulement pour une fronde
Comme toi
Petite pierre
Comme toi*

Comme toi. »

A ma grand-mère et à tous ceux qui m'ont soutenu au cours de ces années de thèse.

Leon Felipe, Como tú, adapté par Paco Ibañez.

INTRODUCTION

I. Position phylogénétique des poissons Téléostéens.

Les vertébrés forment un groupe monophylétique (Figure 1) apparu il y a environ cinq cent millions d'années au sein duquel les poissons constituent un groupe paraphylétique réparti en trois grandes entités : les agnathes (poissons sans mâchoire), les Chondrichthyens (poissons cartilagineux) et les Téléostéens (poissons osseux) appartenant aux Osteichthyens. Les agnathes caractérisés par une bouche en forme de ventouse sans mâchoire, comme la lamproie, sont représentatifs des vertébrés les plus anciens. Les poissons cartilagineux comportent environ cinq cent espèces vivantes actuelles dont les raies et les requins. Les poissons osseux se distinguent des Chondrichthyens par la présence d'un endosquelette parfaitement ossifié, d'écaillés qui recouvrent entièrement leur corps et d'une vessie natatoire. Les Osteichthyens sont divisés en deux classes selon l'anatomie de leurs nageoires : les poissons osseux à nageoires charnues (Sarcoptérygiens) et les poissons osseux à nageoires rayonnantes (Actinoptérygiens). Les Sarcoptérygiens dont font partie le coelacanthe et le dipneuste incluent également l'ensemble de tous les vertébrés terrestres actuels et passés. Les Actinoptérygiens sont apparus il y a environ 400 millions d'années. Ils forment le groupe de vertébrés le plus diversifié en terme d'espèces avec près de vingt cinq mille espèce vivantes, soit la moitié environ des vertébrés actuels, dont la quasi-totalité est représentée par les poissons Téléostéens.

II. Le poisson zèbre comme modèle d'étude.

Le poisson zèbre (*Danio rerio*) est un poisson Téléostéen de la famille des cyprinidés (Figure 2) appartenant à l'ordre des Ostariophysii qui comprend environ six mille cinq cent espèces. L'anguille est un poisson plus ancien que le poisson zèbre alors que le *Fugu* est phylogénétiquement plus récent. Le poisson zèbre est un poisson tropical d'eau douce originaire du delta du Gange (Inde et Pakistan) qui possède un optimum thermique à environ 28°C. Il est omnivore, mesure environ 4 cm de long et présente un dimorphisme sexuel à l'âge adulte visible dès l'âge de 3 mois après la fécondation (Figure 3). Sa durée moyenne de vie est de trois ans et demi (Gerhard *et al.*, 2002).

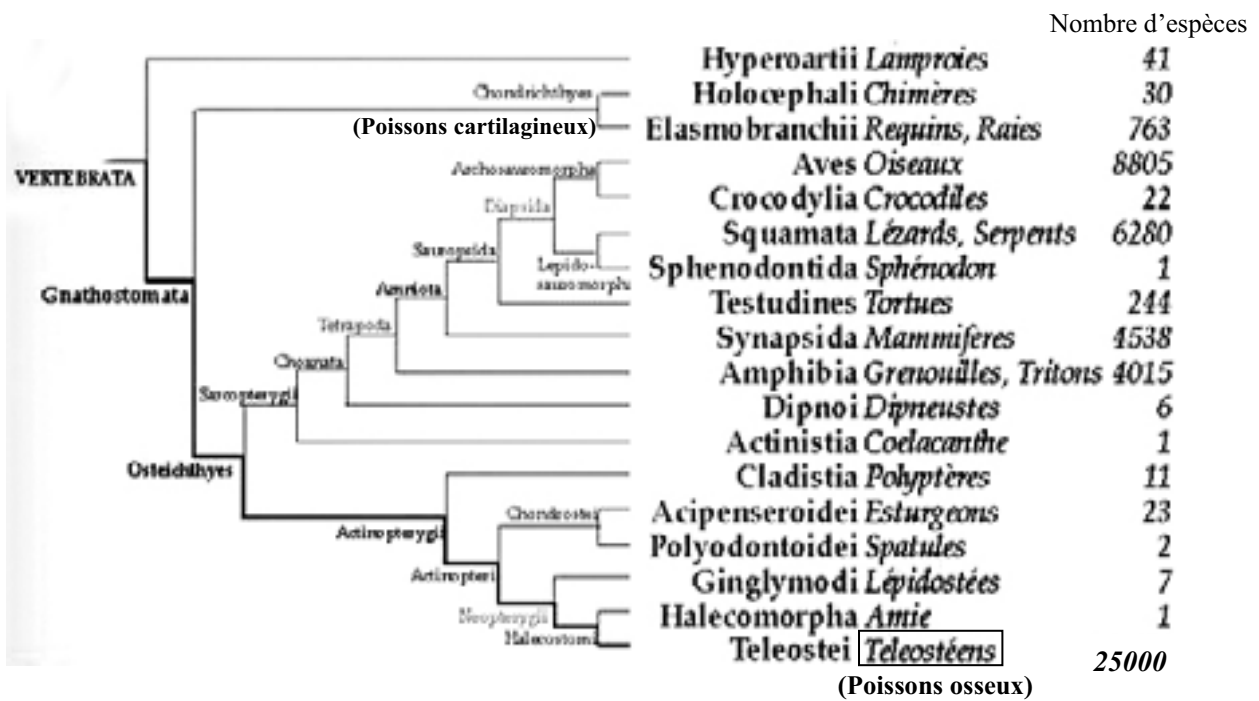


Figure 1 : Phylogénie des vertébrés.

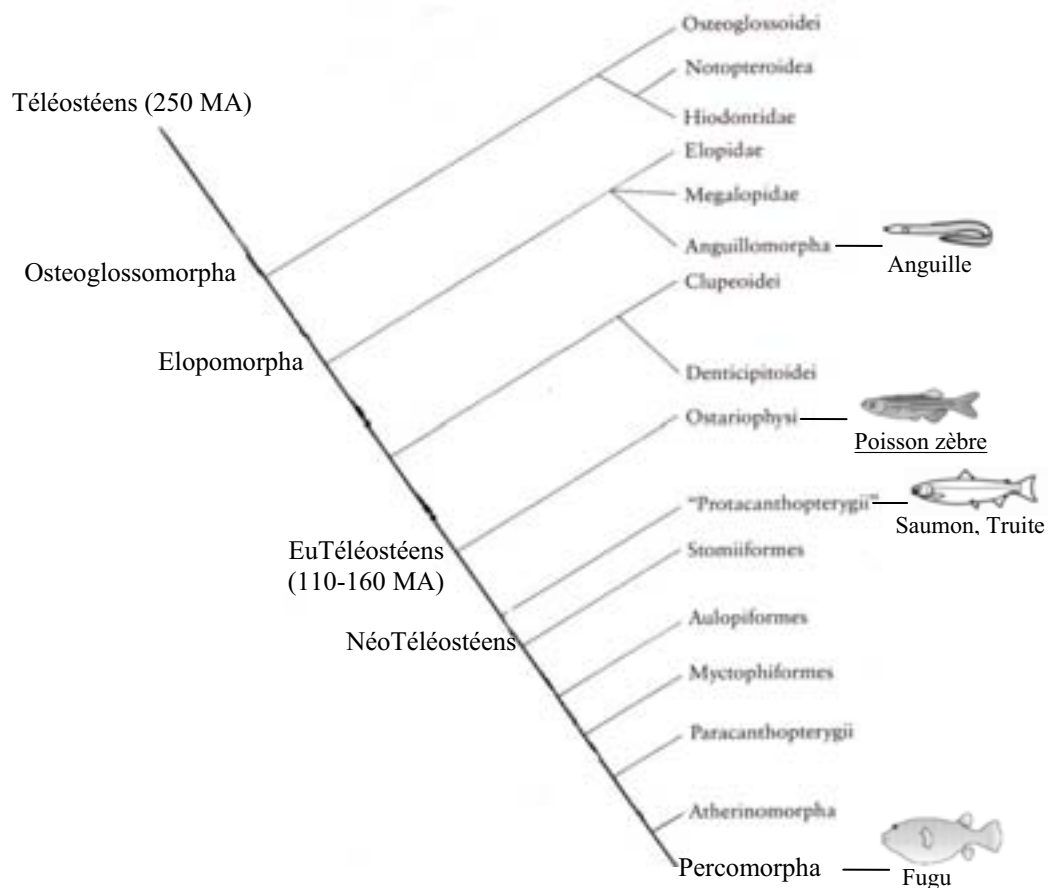


Figure 2 : Phylogénie des poissons Téléostéens.

(d'après Carroll, 1996 et Chen *et al.*, 2004). MA : Millions d'années.



Figure 3 : Dimorphisme sexuel chez le poisson zèbre (*Danio rerio*).

En période de reproduction, le poisson zèbre présente un dimorphisme sexuel qui permet de différencier les mâles des femelles. Les mâles sont fins et légèrement colorés en jaune au niveau du ventre et des nageoires alors que les femelles ont un ventre bombé et sont plus grises. L'échelle représente 1 cm. La tête des poissons est du côté droit.

La table du développement embryonnaire et du développement larvaire précoce du poisson zèbre a été définie en détail (Kimmel et *al.*, 1995). Pour plus de facilité, les stades de développement sont exprimés en nombre d'heures (hpf) ou de jours post-fécondation (jpf). Les principales étapes du cycle de vie de l'animal sont indiquées dans la Figure 4.

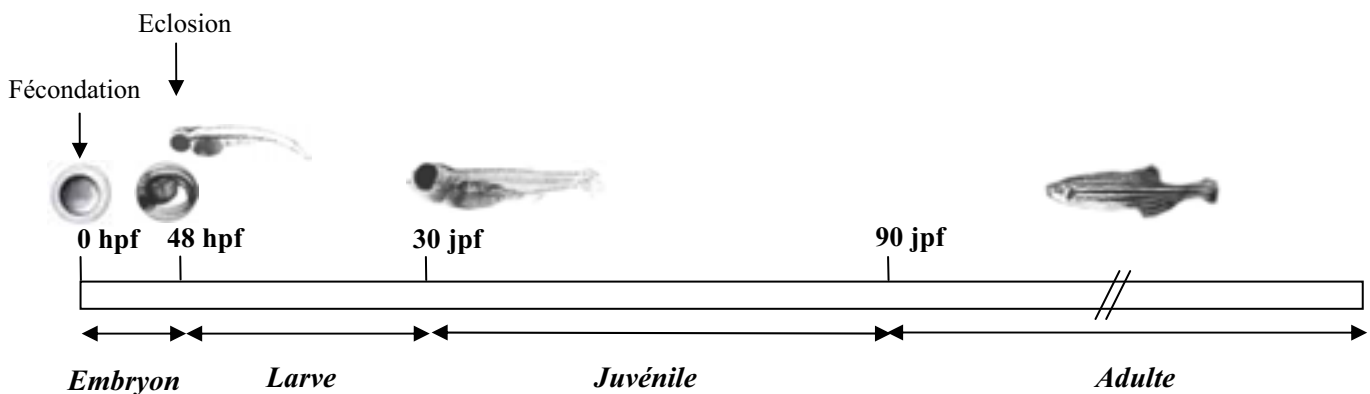


Figure 4 : Les grandes étapes du développement du poisson zèbre.

De la fécondation jusqu'à l'éclosion qui se produit vers 48 hpf, l'embryon de poisson zèbre est entouré du chorion. La larve éclore subit une pseudo « métamorphose » vers 30 jpf et se transforme en juvénile. A partir d'environ 90 jpf, le poisson zèbre devenu adulte est capable de se reproduire. Les photographies correspondent à un œuf fécondé, un embryon de moins de 48 hpf, à une larve de 48 hpf, à un juvénile de 30 jpf et à un poisson zèbre adulte. hpf : heures post-fécondation ; jpf : jours post-fécondation.

Au cours des quinze dernières années, le poisson zèbre est devenu un modèle exceptionnel en génétique moléculaire du développement des vertébrés (Kimmel, 1989). En effet, il présente de nombreux avantages. Son élevage est facile et peu coûteux, il est de petite taille et son temps de régénération est court, de l'ordre de deux à trois mois. C'est un animal ovipare à reproduction externe dont les embryons et les larves sont transparents offrant ainsi la possibilité d'observer la formation et le devenir des cellules et des organes sans avoir nécessairement recours à l'histologie. De plus, le cycle ovarien étant d'environ une semaine, des centaines d'œufs peuvent être obtenus d'une même femelle pour une ponte. Le poisson zèbre est ainsi très souvent utilisé pour étudier les mécanismes liés au développement des vertébrés. Les processus du développement embryonnaire précoce sont beaucoup plus accessibles chez le poisson zèbre que chez la souris, par exemple, dont le développement est intra-utérin. De part sa position évolutive, cet animal apporte des informations relatives au développement qui ne peuvent être obtenues en utilisant la drosophile (*Drosophila melanogaster*) ou le nématode (*Caenorhabditis elegans*) (Dooley et Zon, 2000). Le poisson zèbre a ainsi permis l'identification de nombreux gènes impliqués dans l'embryogenèse ou dans l'organogenèse.

Le génome de ce poisson est en cours de séquençage et de nombreuses informations de séquences sont d'ores et déjà disponibles dans les différentes banques de données (http://www.ensembl.org/Danio_rerio/). L'accès à ces données facilite l'étude des gènes, des transcrits et des protéines.

De plus, le poisson zèbre est facilement manipulable et de nombreux mutants génétiquement modifiés existent et sont disponibles (<http://zfin.org/>). La suppression (« knock-out ») et la régulation négative (« knock-down ») ou positive (surexpression) sont couramment pratiquées. Du fait de la petite taille de ses embryons, des criblages moléculaires ou génétiques de mutants sont réalisés afin de déterminer la nature des gènes impliqués dans tel ou tel phénotype ou d'identifier des drogues permettant de bloquer tel ou tel mécanisme (Patton et Zon, 2001 ; Langheinrich, 2003). Ainsi plus d'une dizaine de milliers de poissons zèbre mutants ont pu être criblés génétiquement afin de connaître l'origine génétique des phénotypes observés (Driever *et al.*, 1996). De nombreux phénotypes identifiés au cours de ces criblages sont semblables à ceux de maladies humaines (Dooley et Zon, 2000) et montrent une conservation de nombreux processus biologiques entre les poissons et les mammifères. Le poisson zèbre est ainsi un modèle reconnu, par exemple, pour l'étude de l'hématopoïèse, de la formation du cœur et des valves cardiaques (Dooley et Zon, 2000 ; Thisse et Zon, 2002 ; Langheinrich, 2003 ; Rubinstein, 2003 ; Bartman *et al.*, 2004), pour la formation des muscles

et l'étude des dystrophies musculaires (Bassett et Currie, 2003 ; Bassett et Currie, 2004), pour les maladies neurodégénératives (Tomasiewicz *et al.*, 2002), pour les cancers (Amatruda *et al.*, 2002 ; Amsterdam *et al.*, 2004) ainsi que pour le métabolisme des lipides (Farber *et al.*, 2001 ; Langheinrich, 2003 ; Rubinstein, 2003).

Les larves du poisson zèbre présentent également un avantage pour les essais pharmacologiques des molécules en permettant une analyse *in vivo* des effets de celles-ci (Langheinrich, 2003). Différentes molécules ont été testées sur le poisson zèbre comme, par exemple, des inhibiteurs du métabolisme du cholestérol (Farber *et al.*, 2001) qui semblent avoir un effet similaire chez le poisson zèbre et les mammifères.

III. La physiologie de la nutrition du poisson zèbre et des autres poissons Téléostéens.

A. Les phases nutritionnelles du poisson zèbre.

Le poisson zèbre, comme les autres poissons Téléostéens, présente trois grandes phases nutritionnelles qui se différencient notamment par l'origine des nutriments utilisés par l'animal en développement (Figure 5).

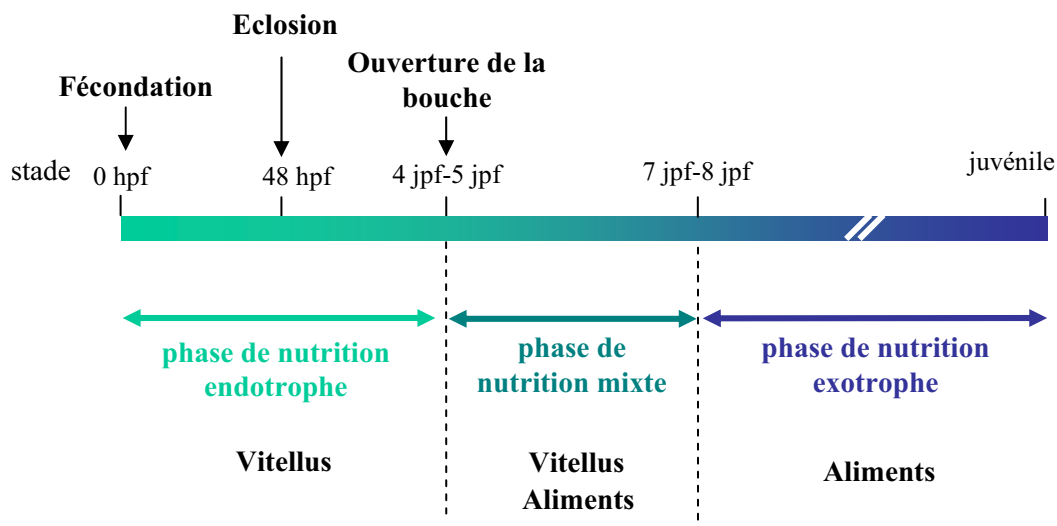


Figure 5 : Les trois phases nutritionnelles au cours du développement du poisson zèbre.

Trois phases peuvent être distinguées. La phase de nutrition endotrophe a lieu depuis la fécondation (0 hpf) jusqu'à l'ouverture de la bouche (4 jpf). L'embryon puis la larve se développent grâce aux réserves endogènes contenues dans le vitellus. Après l'ouverture de la bouche, la larve est capable d'ingérer des aliments exogènes et commence alors la phase de nutrition mixte ou endo-exotrophe. Cette période se termine avec la résorption des réserves vitellines vers 8 jpf. C'est après cet événement que débute la phase de nutrition exotrophe au cours de laquelle la larve utilise exclusivement des aliments exogènes. hpf : heures post-fécondation, jpf : jours post-fécondation.

De la fécondation à l'ouverture de la bouche qui se produit vers 4 jpf, l'embryon puis la larve puisent dans les réserves contenues dans le vitellus. C'est la phase de nutrition endotrophique. Avec l'ouverture de la bouche, la phase de nutrition mixte endo-exotrophique se met en place. La larve est alors capable d'ingérer et de métaboliser des nutriments exogènes tout en continuant à utiliser les réserves vitellines. Lorsque ces réserves sont totalement résorbées, vers 8 jpf, les nutriments exogènes sont la seule source d'énergie et la phase de nutrition exotrophique commence.

B. Les réserves vitellines lipidiques et leur utilisation au cours du développement du poisson zèbre.

Peu d'informations sur le métabolisme nutritionnel des embryons et des larves de poisson zèbre sont disponibles. Néanmoins, nous savons que leur vitellus est dépourvu de globules lipidiques (Selman *et al.*, 1983), comme chez la truite ou le saumon, alors que d'autres espèces marines en possèdent un (turbot) ou plusieurs volumineux (daurade, bar). Selon les espèces, ces globules lipidiques ont une composition différente mais ils sont essentiellement constitués de lipides neutres (Quessada, 1987). Les globules lipidiques ont un rôle énergétique de réserve. Il semblerait que les lipides contenus dans ces réserves ne puissent être utilisés que lorsque l'intestin est formé et lorsque la larve est nourrie. Les larves de turbot, de bar et de daurade meurent du fait d'avoir été trop longtemps mises à jeun tout en conservant des globules lipidiques non totalement résorbés (Yufera *et al.*, 1993 ; Mani-Ponset *et al.*, 1996 ; Poupard *et al.*, 2000). L'absence de globule lipidique dans le vitellus du poisson zèbre a comme conséquence que les lipides endogènes utilisés au cours de la phase de nutrition mixte seraient essentiellement des phospholipides. En effet, bien que la composition du vitellus des embryons et larves de poisson zèbre ne soit pas connue avec précision, il pourrait, à l'image de ce qui existe chez d'autres cyprinidés, être composé des dérivés de la vitellogénine, à savoir de lipovitelline et de phosvitine. Ces molécules sont liées majoritairement à de la phosphatidylcholine et de la phosphatidyléthanolamine contenant majoritairement des acides gras polyinsaturés dont l'acide docosahexanoïque (DHA) (Wiegand, 1996). Ces lipides sont contenus dans le cytoplasme de l'ovocyte.

Au cours du développement, les globules vitellins sont principalement dégradés par une structure extra-embryonnaire spécifique des poissons Téléostéens nommée le syncytium vitellin. Cette structure est constituée d'une couche profonde où s'effectue la dégradation des globules vitellins et d'une couche cytoplasmique dans laquelle s'assemblent des lipoprotéines.

Cette synthèse a été démontrée chez la truite (Sire et Vernier, 1979 ; Walzer et Schönenberger, 1979a ; Walzer et Schönenberger, 1979b) et le turbot (Poupard *et al.*, 2000). Le syncytium vitellin des embryons de truite ou de turbot est capable de former des « Very Low Density Lipoprotein » (VLDL) de 400 à 800 Å de diamètre qui gagnent ensuite la circulation vitelline (Sire et Vernier, 1979 ; Poupard *et al.*, 2000). Le syncytium vitellin du poisson zèbre jouerait un rôle similaire comme le démontre l'expression massive des gènes d'apolipoprotéines (apo) A-I et E au cours du développement (Babin *et al.*, 1997). Cette structure semble être l'équivalent fonctionnel du sac vitellin des mammifères qui assemble et sécrète des lipoprotéines (Jollie, 1990 ; Franke *et al.*, 1992 ; Poupard *et al.*, 2000). Les réserves vitellines résiduelles permettent une survie des larves de carpe ou de poisson zèbre après l'ouverture de la bouche et de l'œsophage pendant quelques jours malgré l'absence d'un apport alimentaire exogène (Fontagné, 2000 ; données non montrées).

C. L'appareil digestif du poisson zèbre.

1- La mise en place de l'appareil digestif.

Les organes digestifs du poisson zèbre sont tous issus du feuillet endodermique (Ober *et al.*, 2003 ; Wallace et Pack, 2003 ; Field *et al.*, 2003). Le pharynx, l'œsophage, le foie et le pancréas se forment à partir du tissu endodermique situé en position rostrale par rapport à celui qui donne naissance à l'intestin (Wallace et Pack, 2003). La mise en place des ébauches de l'intestin et des glandes annexes débute vers 24 hpf (Kimmel *et al.*, 1995 ; Warga et Nüsslein-Volhard, 1999 ; Ober *et al.*, 2003 ; Wallace et Pack, 2003). Vers 36 hpf, le tube digestif est organisé sous la forme d'un cordon de cellules, alors que l'anus et l'œsophage ne sont pas encore formés (Pack *et al.*, 1996). A 52 hpf, une lumière intestinale est observée dans la partie la plus antérieure du tube digestif. La connexion du pharynx au tube intestinal *via* l'œsophage ne se produit que vers 72 hpf (Pack *et al.*, 1996). Des sphincters se mettent en place et créent une régionalisation du tube digestif générant trois fragments qui se différencient morphologiquement et fonctionnellement, à partir de 72 hpf chez le poisson zèbre. Puis, ce tube intestinal se courbe vers la gauche de l'animal (André *et al.*, 2000 ; Horne-Badovinac *et al.*, 2003). Ainsi, avant l'ouverture de la bouche, qui a lieu entre 4 jpf et 5 jpf, le tube digestif est en place. Il pourrait être en partie fonctionnel puisque l'intestin embryonnaire de truite ou de bar est capable de synthétiser des lipoprotéines endogènes de type VLDL d'environ 40 nm de diamètre avant même l'ouverture de la bouche et la première

prise alimentaire (Sire et Vernier, 1979 ; Deplano *et al.*, 1991). L'origine des lipides incorporés n'est pas connue mais plusieurs hypothèses tentent d'expliquer ce phénomène. Ces lipides pourraient provenir des lipides biliaires, des lipides constitutifs des cellules rejetés au cours du recyclage cellulaire ou encore des acides gras plasmatiques. La contribution de la synthèse de lipoprotéines endogènes par l'intestin d'embryons de truite serait faible en comparaison avec celle du syncytium vitellin ou du foie (Sire et Vernier, 1979).

2- La structure de l'appareil digestif du poisson zèbre.

Le système digestif du poisson zèbre est similaire à celui des autres vertébrés (Pack *et al.*, 1996) et il est semblable, au niveau de son plan d'organisation, chez la larve de plus de 5 jpf, le juvénile et l'adulte. En effet, le poisson zèbre possède une bouche dépourvue de dents, un pharynx comportant des dents pharyngiennes renouvelables (Huyseune *et al.*, 1998 ; Van der Heyden et Huyseune, 2000), un œsophage court, une vésicule biliaire, un foie, un pancréas diffus et un intestin (Wallace et Pack, 2003 ; Field *et al.*, 2003). Comme pour tous les cyprinidés et contrairement à certains autres poissons, comme la truite (Bergot, 1981 ; Sire *et al.*, 1981), le poisson zèbre ne possède ni estomac ni caeca pyloriques (Figure 6).

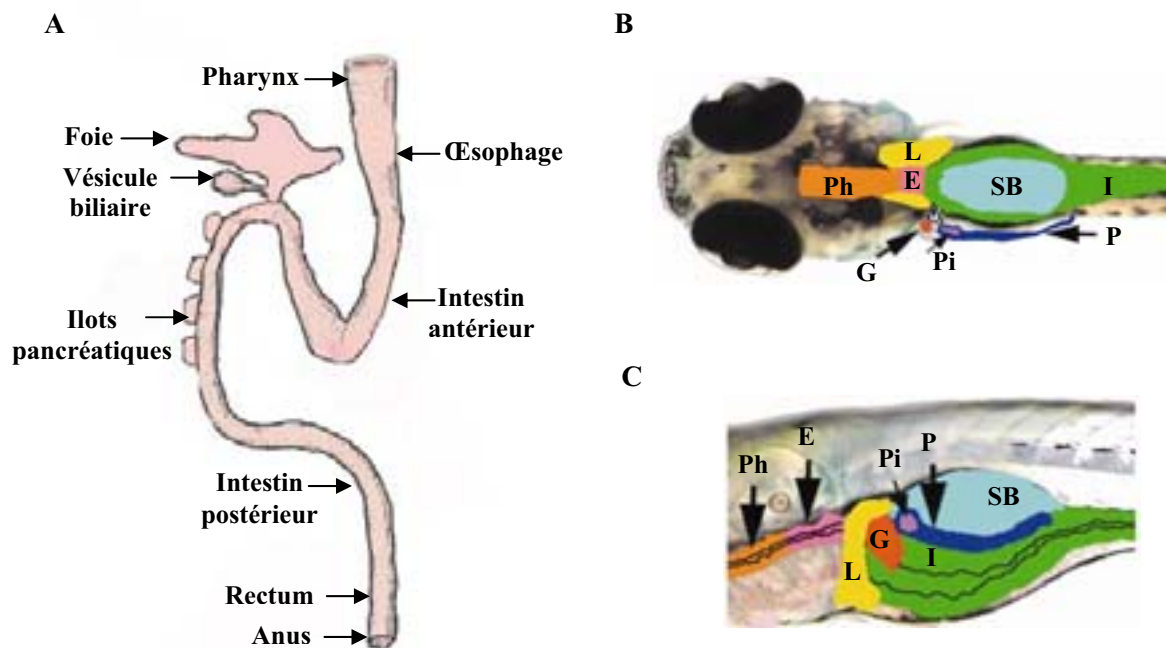


Figure 6 : L'appareil digestif du poisson zèbre.

A : Appareil digestif du poisson zèbre. B-C : Schéma de l'appareil digestif d'une larve de poisson zèbre de 5 jpf (d'après Wallace et Pack, 2003). La tête est à gauche et la queue à droite. B : vue de dessus. C : vue de côté. Ph : pharynx, L : foie, E : œsophage, P : pancréas, SB : vessie natatoire, I : intestin, G : vésicule biliaire, Pi : îlots pancréatiques principaux.

Le tube digestif est continu et présente deux orifices dont l'un est situé au niveau de la bouche et l'autre au niveau de l'anus. Les différents types cellulaires observés dans l'intestin grêle des autres vertébrés (cellules absorbantes (entérocytes), cellules à mucus et cellules endocrines) sont présents dans l'épithélium intestinal du poisson zèbre, à l'exception des cryptes et des cellules de Paneth (Pack *et al.*, 1996 ; Wallace *et al.*, 2005). Le foie des poissons Téléostéens ressemble à celui des autres vertébrés mais ne contient pas de système porte (Pack *et al.*, 1996). Une vésicule biliaire est présente et stocke la bile qui sera déversée dans la lumière du tube digestif par le canal biliaire. Le pancréas du poisson zèbre est composé de plusieurs îlots pancréatiques prédominants localisés au niveau de la partie proximale du canal pancréatique ainsi que d'îlots périphériques diffus situés le long de l'intestin (Pack *et al.*, 1996).

L'intestin antérieur du poisson zèbre et des poissons Téléostéens se distingue de l'intestin postérieur et du rectum aussi bien morphologiquement que fonctionnellement. Peu de données biochimiques ou ultrastructurales existent chez le poisson zèbre. Chez de nombreux poissons Téléostéens, l'intestin antérieur est le site principal de l'absorption des lipides (Sire *et al.*, 1981 ; Rombout *et al.*, 1984 ; Honkanen *et al.*, 1985), comme chez les mammifères. Les entérocytes de la partie postérieure de l'intestin, remplis de vésicules de phagocytoses, participent à l'absorption des protéines sous forme macromoléculaire. Le court segment terminal de l'intestin serait impliqué dans les échanges osmotiques avec le sang et pourrait être l'homologue du côlon des mammifères. Des mouvements péristaltiques sont réalisés par la contraction des muscles lisses internes (circulaires) et externes (longitudinaux) (Pack *et al.*, 1996). Chez le poisson zèbre, la différenciation fonctionnelle de l'intestin est visualisable par le suivi de l'expression de certains gènes comme celui codant pour la « fatty acid binding protein » intestinale (FABP-I) qui ne s'exprime que dans la partie antérieure de l'intestin (André *et al.*, 2000 ; Her *et al.*, 2004a ; Her *et al.*, 2004b).

D. Le régime alimentaire et les besoins lipidiques.

1- Le régime alimentaire.

Les poissons peuvent être classés selon leur régime alimentaire. Les poissons carnivores comme le saumon atlantique (*Salmo salar*) se distinguent des poissons omnivores comme la carpe commune (*Cyprinus carpio*), des poissons détritivores comme la carpe africaine (*Labeo lineatus*) et des poissons herbivores comme la carpe chinoise

(*Ctenopharyngodon idella*). Contrairement à la plupart des mammifères, le régime alimentaire des poissons Téléostéens est généralement très élevé en protéines qui représentent environ 40 % (m/m) de l'alimentation. Les lipides constituent entre 10 % et 20 % (m/m) de ce régime dont la majorité est présente sous la forme de triglycérides (Bone *et al.*, 1995). Contrairement aux poissons carnivores, les poissons omnivores sont capables d'utiliser les glucides comme source d'énergie (Wilson, 1994).

Le poisson zèbre est omnivore. En milieu naturel, son alimentation pourrait donc être comparable à celle du tilapia ou de la carpe commune qui se nourrit d'algues, de phytoplanctons, de zooplanctons dont les rotifères, d'artémies, d'œufs et de larves de copépodes (Bone *et al.*, 1995).

Au laboratoire, les larves sont nourries avec du jaune d'œuf de poule déshydraté dont la composition chimique est d'environ 60 % de lipides (dont environ 10 % d'acide linoléique, 48 % d'acide oléique, 30 % d'acide palmitique et 10 % d'acide stéarique), de 26 % de protéines, de 0,3 % de glucides, de 2 % de cholestérol et de 2 % de cendres. Le jaune d'œuf est également riche en vitamines A, D, E et K ainsi qu'en fer. Les poissons zèbres juvéniles et adultes sont nourris avec des aliments artificiels, sous forme de paillettes TétraMin, contenant 48 % de protéines, 7 % de fibres, 11 % de cendres et 8 % de lipides.

2- Les besoins nutritionnels en lipides des poissons Téléostéens.

Très peu de données existent quant aux besoins nutritionnels du poisson zèbre et des poissons d'ornement en général. Les lipides sont une composante essentielle du régime alimentaire des poissons Téléostéens. L'augmentation de leur teneur dans le régime peut être associée à une amélioration du taux de survie et de la croissance des animaux (Izquierdo *et al.*, 2000).

Les besoins nutritionnels en lipides des jeunes larves de poissons Téléostéens sont encore mal connus. Les tentatives de remplacement des proies vivantes par des aliments de synthèse inertes dont la composition lipidique est modifiée permettent maintenant de déterminer quels sont les besoins nutritionnels des larves de poissons Téléostéens. Ces besoins paraissent distincts d'une espèce à une autre.

Les phospholipides sont d'une importance capitale dans l'alimentation des larves de poissons Téléostéens. D'une part, l'absence de phospholipides alimentaires est associée à des altérations de la morphologie de l'épithélium intestinal (Liu *et al.*, 2002). D'autre part, il existe un optimum dans le rapport de la quantité de phospholipides sur celle de lipides neutres

qui permet d'abaisser les taux de mortalité et de malformation des larves (Cahu *et al.*, 2003). Les besoins nutritionnels en quantité de phospholipides seraient moins élevés chez les juvéniles (Zambonino Infante et Cahu, 1999 ; Zambonino Infante et Cahu, 2001). Ceci pourrait être le fait d'un équipement enzymatique incomplet de l'intestin larvaire lors des premières prises de nourriture en comparaison avec celui des juvéniles (Sargent *et al.*, 1999).

a- Les besoins en triglycérides.

Les triglycérides sont généralement les lipides les plus abondants du régime alimentaire des poissons Téléostéens. La longueur des acides gras estérifiés ainsi que leur degré d'insaturation ont des effets sur la digestion des lipides. Les triglycérides composés d'acides gras à chaîne moyenne, entre 6 et 12 atomes de carbone, augmentent l'activité de la lipase chez les larves de bar et par là même la digestion des lipides alimentaires (Morais *et al.*, 2004). Un apport important en acide caprylique (C8:0) dans l'aliment de larves de carpes communes sous forme de triglycérides est associé à une diminution du taux de survie et de la croissance alors qu'en petite concentration, cet acide gras à chaîne moyenne procure de meilleures performances de survie et de croissance (Fontagné *et al.*, 1998 ; Fontagné *et al.*, 2000)

b- Les besoins en phospholipides.

La teneur en phospholipides de l'aliment est un facteur déterminant pour le développement des larves de poissons Téléostéens (Coutteau *et al.*, 1997). En effet, l'ajout de phospholipides dans l'aliment synthétique est bénéfique sur la croissance et le taux de survie des larves de carpe commune (Radünz-Neto *et al.*, 1994 ; Geurden *et al.*, 1995 ; Fontagné, 2000) ainsi que sur le taux de survie et le pourcentage de malformations des larves de bar (*Dicentrarchus labrax*) (Cahu *et al.*, 2003). Ces effets sont d'autant plus marqués qu'il s'agit des premières prises alimentaires des larves. Les phospholipides alimentaires paraissent moins essentiels au régime alimentaire des poissons juvéniles et adultes. A la différence des juvéniles, les larves auraient une capacité de synthèse des phospholipides insuffisante pour couvrir leur besoin (Geurden *et al.*, 1995).

Il est acquis que l'effet des phospholipides sur les performances de développement des larves ne correspond pas à la simple correction d'une carence en choline, en inositol ou en acides gras essentiels des séries (n-3) et (n-6). Les phospholipides seraient nécessaires à la sécrétion des lipoprotéines par l'intestin des larves de carpe commune et de bar puisqu'une carence en phosphatidylcholine semble être associée à une accumulation de gouttelettes

lipidiques (Fontagné *et al.*, 1998 ; Salhi *et al.*, 1999). Toutefois, toutes les classes de phospholipides n'ont pas le même effet. La phosphatidylcholine est le phospholipide le plus actif sur la croissance des larves alors que le phosphatidylinositol est plus efficace sur le taux de survie et son incorporation entraîne moins de malformations corporelles des larve de carpe commune (Geurden *et al.*, 1998).

c- Les besoins en acides gras.

Parallèlement aux effets propres des triglycérides et des phospholipides, ces lipides sont des vecteurs d'acides gras indispensables au développement des larves et des juvéniles.

Les lipides alimentaires contiennent à la fois des acides gras saturés et insaturés. Les poissons sont incapables, en fonction de l'espèce, de synthétiser *de novo* les acides gras polyinsaturés dits essentiels comme l'acide linoléiques C18:2(n-6) et l'acide linoléique C18:3(n-3) qui doivent alors être apportés par l'alimentation. Les besoins nutritionnels en acides gras sont différents qualitativement et quantitativement selon l'espèce de poissons considérée et trois groupes de poissons Téléostéens ont été définis (Takeuchi, 1996). Les poissons ayant une forte demande en acide gras de la série (n-6), comme le tilapia (*Tilapia zilli*) se distinguent des poissons à besoin égal en acides gras des séries (n-6) et (n-3), comme la carpe commune, ainsi que des poissons à forte demande en acides gras de la série (n-3), comme la truite arc-en-ciel.

Des études de l'effet du rapport de la quantité d'acides gras de la série (n-3) sur celle des acides gras de la série (n-6) sur le taux de croissance de larves de poisson zèbre ont été menées (Meinelt *et al.*, 2000). Plus ce rapport est faible, meilleur est le taux de croissance des larves. Il a également été montré que le taux de fécondation du poisson zèbre est plus élevé lorsque que ce rapport est faible (Meinelt *et al.*, 1999). Le poisson zèbre aurait donc des besoins nutritionnels en terme d'acides gras polyinsaturés semblables à ceux du tilapia avec une plus forte demande en acides gras de la série (n-6).

Une des caractéristiques des poissons Téléostéens est leur forte teneur en acides gras polyinsaturés de la série (n-3) dans leurs filets, faisant de ces animaux un apport essentiel pour la prévention des maladies cardio-vasculaires chez l'Homme. En effet, les acides gras insaturés de la série (n-3) représentent en moyenne 24 % des lipides de la chair de poisson et seulement 4 % des lipides contenus dans la chair de poulet, 2 % des lipides de la viande de bœuf et 1 % des lipides de la viande de porc (Gandemer, 1992). Ces acides gras polyinsaturés de la série (n-3) sont principalement l'acide éicosapentanoïque (C20:5(n-3), EPA) et l'acide docosahexanoïque (C22:6(n-3), DHA). La richesse des poissons marins sauvages en acides

gras polyinsaturés de la série (n-3) vient essentiellement de leur alimentation et notamment du phytoplancton qui est composé de 20 % à 40 % d'acides gras polyinsaturés de la série (n-3) (Sargent, 1997). Les poissons d'eau douce présentent une forte capacité à synthétiser ces acides gras.

Le poisson zèbre est capable de synthétiser les acides gras EPA et DHA à partir des acides gras linoléiques (Tocher *et al.*, 2002). Cette activité de désaturation et d'élongation est régulée par la composition de l'alimentation. Elle est plus forte lorsque le poisson zèbre est nourri avec des huiles végétales en comparaison avec une nutrition à base d'huile de poisson. Cependant, cette augmentation n'est pas suffisante pour compenser le manque d'EPA et de DHA provenant de l'alimentation à base d'huile végétale. Une désaturase présentant à la fois une activité $\Delta 5$ et $\Delta 6$ a été identifiée chez le poisson zèbre (Hastings *et al.*, 2001). Une élongase, nommée ZfELO, a récemment été isolée chez le poisson zèbre (Agaba *et al.*, 2004). L'expression de ce gène dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* a montré que cette protéine est capable de synthétiser l'acide gras polyinsaturé C22:6(n-3) à partir de l'acide linoléique.

IV. Comparaison du métabolisme des lipides et des lipoprotéines riches en triglycérides dans les entérocytes des poissons Téléostéens et des mammifères.

L'hydrolyse des triglycérides alimentaires dans la lumière intestinale, l'absorption par les entérocytes des acides gras ainsi formés, leur estérification intracellulaire et le passage de ces lipides dans la circulation sanguine peuvent être décomposés en trois étapes. Au cours de la première étape, les acides gras issus de l'hydrolyse intraluminale des triglycérides alimentaires sont absorbés par les entérocytes, acheminés jusqu'au reticulum endoplasmique de ces cellules et estérifiés en triglycérides. Chez les mammifères, cette étape est très rapide et n'est pas régulée par les entérocytes. La deuxième étape correspond à l'incorporation des triglycérides dans les chylomicrons en cours d'assemblage dans le reticulum endoplasmique ainsi qu'à leur transfert vers l'appareil de Golgi. La dernière étape est caractérisée par la sécrétion des chylomicrons dans la lymphe depuis l'appareil de Golgi. Elle est très rapide et semble être régulée par les entérocytes (Mansbach et Nevin, 1998).

La digestion, l'absorption et le transfert des lipides d'origine alimentaire est un processus qui serait plus lent chez les poissons que chez les mammifères. En effet, le pic

d'absorption alimentaire des lipides est de quelques heures dans l'espèce humaine alors qu'il peut atteindre plusieurs dizaines d'heures chez certains poissons comme la truite (Wallaert et Babin, 1992 ; Wallaert et Babin, 1994a ; Wallaert et Babin, 1994b).

A. La digestion des lipides dans la lumière intestinale.

Chez les poissons comme chez les mammifères, les triglycérides sont les lipides majoritaires de l'alimentation. Toutefois, chez les poissons, les phospholipides comportant des acides gras insaturés de la série (n-3) sont plus rapidement digérés que les triglycérides composés des mêmes acides gras (Ackman, 1989).

L'hydrolyse des lipides alimentaires a lieu principalement dans la partie antérieure de l'intestin ainsi que dans les caeca pyloriques pour les espèces de poissons Téléostéens qui en possèdent (Bergot, 1981 ; Sire *et al.*, 1981). Le tube digestif du poisson zèbre ne comportant pas de caeca pyloriques, les lipides sont essentiellement digérés et absorbés au niveau de l'intestin antérieur.

Chez les poissons comme chez les mammifères, les lipides du bol alimentaire sont, dans un premier temps, solubilisés par les sels biliaires qui créent une émulsion (Patton et Carey, 1979 ; Green et Riley, 1981 ; Honkanen *et al.*, 1985 ; Farber *et al.*, 2001). De part leur caractère amphiphile, les sels biliaires agissent comme un détergent et augmentent l'accessibilité des triglycérides (Patton et Carey, 1979 ; Honkanen *et al.*, 1985 ; Izquierdo *et al.*, 2000). Cette action est aidée par les mouvements de contraction de l'intestin. Les sels biliaires permettent donc d'augmenter le nombre de triglycérides présents à l'interface eau/lipides les rendant ainsi plus accessibles aux lipases gastriques et pancréatiques. Les sels biliaires participent également à la formation de micelles contenant les produits de la dégradation des triglycérides par ces enzymes (Patton et Carey, 1979 ; Honkanen *et al.*, 1985 ; Izquierdo *et al.*, 2000). Dans la lumière intestinale, l'hydrolyse des lipides est effectuée par la lipase pancréatique ainsi que par la phospholipase A2. La lipase pancréatique du poisson zèbre n'a pas encore été identifiée. La truite comporte une lipase pancréatique capable d'hydrolyser les acides gras situés en position (sn1) et (sn3) des triglycérides ainsi que l'acide gras (sn2) si ce dernier est insaturé (Léger *et al.*, 1977). La lipase mammalienne est incapable d'assurer cette fonction. La lipase n'est active et n'entre en contact avec les triglycérides situés à l'interface eau/lipides des agrégats lipidiques que lorsqu'elle est associée à la colipase. Une colipase a été identifiée chez plusieurs espèces de poissons Téléostéens (Sternby *et al.*, 1984). La colipase serait capable de se lier aux liaisons ester des triglycérides,

rapprochant ainsi la lipase pancréatique de son substrat (Borgström *et al.*, 1979). L'interaction du complexe colipase-lipase pancréatique avec les triglycérides changerait la conformation de la lipase rendant son site actif accessible (Van Tilbeurgh *et al.*, 1993).

Une autre source d'acides gras libres est l'hydrolyse des phospholipides contenus dans le bol alimentaire, dont la phosphatidylcholine. La phospholipase A2 du poisson zèbre a été identifiée (Farber *et al.*, 2001). Cette enzyme hydrolyse la liaison ester située en position (sn2) des phospholipides libérant ainsi un acide gras et un lysophospholipide. L'activité de cette protéine peut être révélée par l'utilisation de phospholipides fluorescents tel le PED6 (Farber *et al.*, 2001).

Par l'action des sels biliaires, les acides gras libres ainsi que les monoglycérides produits sont maintenus sous la forme de micelles complexes favorisant leur absorption par les cellules absorbantes de la muqueuse intestinale, les entérocytes (Narayanan et Storch, 1996). Des patients présentant une obturation des canaux biliaires n'absorbent que très peu de lipides alimentaires qui sont excrétés par les fèces (steatorrhea).

Les acides gras ainsi libérés sont absorbés par les entérocytes où ils pourront être ultérieurement incorporés aux lipoprotéines après estérification.

B. L'entrée des acides gras dans les entérocytes.

Le mécanisme d'entrée des acides gras et des monoglycérides dans les entérocytes est encore sujet à débat. Selon la longueur des chaînes acyl des acides gras et leur concentration, l'entrée dans les entérocytes se ferait par diffusion passive (acides gras à chaîne courte et moyenne) (Naupert et Rommel, 1975 ; Trotter *et al.*, 1996) ou par diffusion facilitée (acides gras à chaîne longue et très longue) grâce à des transporteurs membranaires (Trotter *et al.*, 1996 ; Ho et Storch, 2001 ; Chaves *et al.*, 2003). Chez les mammifères, le mécanisme d'entrée des acides gras par diffusion facilitée n'est pas bien déterminé. Différentes protéines ont été identifiées comme pouvant transférer les acides gras à travers la bordure en brosse des entérocytes telles que la FABP_{pm} (Fatty Acid Binding Protein plasmique) (Stremmel, 1988), la FATP-4 (Fatty Acid Transport Protein-4) (Schaffer et Lodish, 1994 ; Gimeno *et al.*, 2003) ou la FAT/CD36 (Fatty Acid Translocase) (Chen *et al.*, 2001). Ces deux derniers transporteurs sont nécessaires à l'entrée des acides gras à longue et très longue chaîne dans les entérocytes. Aucune de ces protéines n'a été identifiée pour l'instant chez un poisson.

L'entrée du cholestérol dans les entérocytes est mal comprise à la fois chez les poissons et chez les mammifères. Toutefois, chez le poisson zèbre, le cholestérol pourrait entrer dans les entérocytes par le complexe annexine-caveoline (Smart *et al.*, 2004). Chez les rongeurs, la protéine Niemann-Pick C1 like 1 (NPCL) a récemment été identifiée comme un transporteur de cholestérol dans les entérocytes de l'intestin grêle de souris (Altmann *et al.*, 2004).

C. Le transport intracellulaire et l'estérification des acides gras en triglycérides.

1- Le transport intracellulaire des acides gras.

Une fois dans les entérocytes, les acides gras sont pris en charge par les FABP (Fatty Acid Binding Protein) cytosoliques de type intestinale (FABP-I) ou hépatique (FABP-L) qui les transportent depuis la membrane plasmique jusqu'aux organites intracellulaires dont le reticulum endoplasmique lisse (Bass, 1985 ; Bass, 1990 ; Storch et Thumser, 2000 ; Agellon *et al.*, 2002 ; Besnard *et al.*, 2002). Il existe de nombreuses isoformes de FABP nommées selon le tissu où elles ont été initialement identifiées chez les mammifères. Ce sont des petites protéines d'environ 15 kDa qui peuvent s'exprimer dans plusieurs tissus. Dans l'intestin de mammifères, deux isoformes de FABP, la FABP de type intestinale (FABP-I) et la FABP de type hépatique (FABP-L), sont majoritaires. Chez le poisson zèbre, plusieurs FABP ont été isolées dont une FABP de type intestinale (FABP-I) (André *et al.*, 2000 ; Pierce *et al.*, 2000), une FABP de type cerveau (Denovan-Wright *et al.*, 2000a ; Liu *et al.*, 2003a), une FABP de type hépatique (Denovan-Wright *et al.*, 2000b ; Her *et al.*, 2003a ; Her *et al.*, 2003b) et une FABP de type cœur (Liu *et al.*, 2003b). Des études sur le promoteur du gène *fabp2*, codant pour la FABP-I, ont permis d'identifier des régions indispensables à l'expression de ce gène dans l'intestin du mammifère (Cohn *et al.*, 1992) et du poisson zèbre (Her *et al.*, 2004a ; Her *et al.*, 2004b).

2- L'estérification des acides gras dans la lumière du reticulum endoplasmique lisse.

Dans les entérocytes de mammifères, les acides gras sont estérifiés en triglycérides dans la lumière du reticulum endoplasmique lisse (Washington *et al.*, 2003) (Figure 7).

Pour cela, ils doivent être transportés à travers la membrane de cette organelle. Les acides gras libres sont dans un premier temps thioestérifiés par l'acyl-CoA synthase qui catalyse la synthèse d'acyl-CoA. Le groupement acyl des acyl-CoA est ensuite transféré sur la carnitine grâce à l'action de la « carnitine palmitoyl transférase I » (CPT I) localisée dans la membrane du reticulum endoplasmique et dirigée vers le cytoplasme. Les acylcarnitines entrent dans la lumière du reticulum endoplasmique par un transporteur spécifique. Une fois dans cette lumière, le groupement acyl est transféré à une molécule de coenzyme A puis à un diacylglycérol.

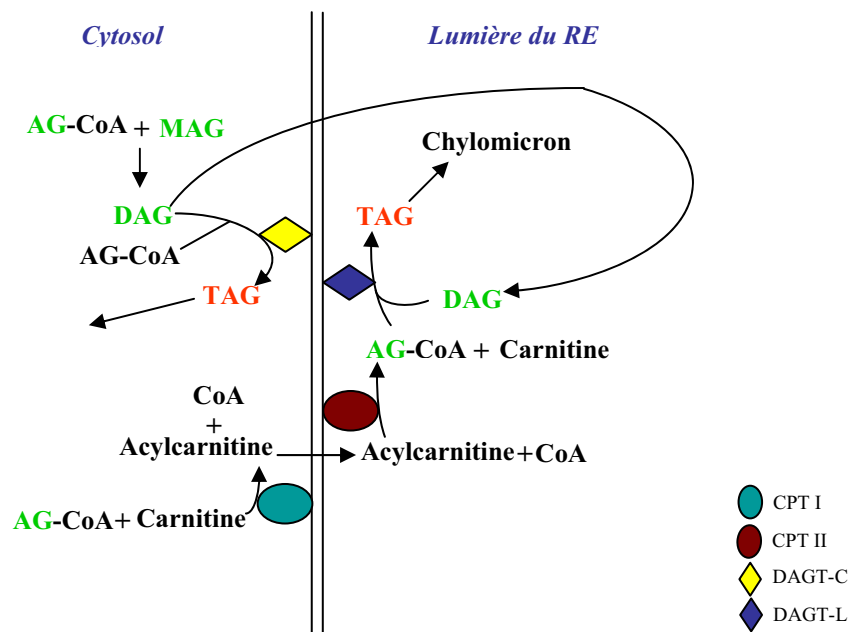


Figure 7 : Synthèse des triacylglycérols dans le reticulum endoplasmique lisse des mammifères.

(D'après Washington *et al.*, 2003). Le groupement acyl des acyl-CoA (AG-CoA) synthétisés à partir des acides gras est transféré à la carnitine par la Carnitine Palmitoyl Transférase I (CPT I) présente à la surface de la membrane du reticulum endoplasmique et dirigée vers le cytosol. Les acylcarnitines sont transportés dans la lumière du reticulum endoplasmique par un transporteur spécifique. Le groupement acyl est transféré sur un Coenzyme A (CoA) par la CPT II présente dans la membrane du reticulum endoplasmique du côté de la lumière. Le groupement acyl des acylCoA est transféré sur les DAG (diacylglycérols) grâce à la DiAcylGlycerol acylTransférase (DAGT-L ou DGAT II) présente dans la membrane du reticulum endoplasmique tournée vers la lumière de cette organelle. Ces TAG produits sont ensuite intégrés dans les chylomicrons. Une DiAcylGlycerol acylTransférase présente dans la membrane du reticulum endoplasmique du côté cytosolique (DAGT-C ou DGAT I) permet l'estérification de monoglycérides (MAG) en diglycérides (DAG) puis en triacylglycérols (TAG) qui seront alors incorporés dans des gouttelettes lipidiques. Ce mécanisme est également présent dans les hépatocytes de mammifères (Abo-Hashema *et al.*, 1999).

Il existe très peu de données relatives à l'estérification des acides gras par le reticulum endoplasmique lisse chez les poissons. Un gène codant pour une protéine de type

CPT I exprimé notamment dans le foie et l'intestin a été identifié chez la truite arc-en-ciel (Gutières *et al.*, 2003).

3- La présence de gouttelettes lipidiques cytosoliques dans les entérocytes.

Des gouttelettes lipidiques cytosoliques ont été observées dans la partie supranucléaire du cytoplasme des entérocytes après la prise alimentaire aussi bien chez la lamproie (*Petromyzon marinus L.*) (Langille et Youson, 1984 ; Langille et Youson, 1985) que chez la larve ou l'adulte de nombreuses espèces de poissons Téléostéens dont la truite (Bergot et Fléchon, 1970 ; Sire *et al.*, 1981), le bar (Diaz *et al.*, 1997), le fondule barré (Vetter *et al.*, 1985) et des cyprinidés (Iwai, 1969 ; Gauthier et Landis, 1972 ; Noaillac-Depeyre et Gas, 1973 ; Noaillac-Depeyre et Gas, 1976 ; Rombout *et al.*, 1984 ; Deplano *et al.*, 1991) dont le poisson zèbre (André *et al.*, 2000 ; Marza *et al.*, 2005). Aucune cinétique de formation, d'accumulation et de disparition des gouttelettes lipidiques des entérocytes de poisson n'a pour l'instant été déterminée. Toutefois, chez la truite, les gouttelettes lipidiques sont abondantes après la prise alimentaire et absentes après trois jours de jeûne (Sire *et al.*, 1981). Les gouttelettes lipidiques cytosoliques sont d'autant plus nombreuses et volumineuses que l'alimentation des poissons est riche en acides gras polyinsaturés (Sire *et al.*, 1981 ; Deplano *et al.*, 1991). Ainsi, chez la truite, elles peuvent atteindre 6 µm de diamètre 12 h après la prise d'un aliment riche en acide linoléique. Leur nombre et leur diamètre varie en fonction du pic d'absorption alimentaire et de la nature des lipides ingérés mais elles sont visibles aussi bien lorsque les poissons sont nourris avec un régime très riche en lipides qu'avec un régime considéré comme standard. Par contre, ces gouttelettes lipidiques sont absentes lorsque les truites sont nourries avec un régime riche en acides gras saturés comme le palmitate (Sire *et al.*, 1981).

Chez les mammifères, lorsque la concentration en triglycérides alimentaires dans la lumière intestinale est importante, comme lors d'un régime hyperlipidémique, les triglycérides reestérifiés en excès dans le reticulum endoplasmique lisse des entérocytes s'accumulent sous la forme de gouttelettes lipidiques cytosoliques, en période post-prandiale (Sabesin et Frase, 1977 ; Mansbach et Nevin, 1998 ; Hussain, 2000 ; Mahmood *et al.*, 2003). Leur observation par microscopie électronique montre qu'elles ne sont pas entourées de membrane et qu'elles peuvent être de grande taille. Ces gouttelettes sont très nombreuses et très volumineuses dans les entérocytes de rats nourris avec de l'huile de maïs (Sabesin et Frase, 1977).

Les gouttelettes lipidiques cytosoliques qui sont observées dans les entérocytes de poissons ou de mammifères au cours du pic d'absorption alimentaire pourraient servir de stockage transitoire des lipides neutres formés dans la cellule du fait d'une plus faible capacité à assembler ou à sécréter des lipoprotéines riches en triglycérides par rapport à la capacité d'entrée et de ré-estérification des acides gras. Ce processus physiologique pourrait être exacerbé dans certaines conditions nutritionnelles plus fréquemment rencontrées chez les animaux d'élevage.

Ceci pose le problème des similarités et des différences qui pourraient exister entre les poissons et les mammifères quant au métabolisme lipidique entérocytaire dans des conditions nutritionnelles considérées comme standard.

D. L'assemblage et la sécrétion des chylomicrons par les entérocytes.

Les entérocytes de poisson et de mammifères sont capables d'assembler et de sécréter des lipoprotéines riches en triglycérides, dont les chylomicrons, à partir des lipides estérifiés dans la membrane du reticulum endoplasmique lisse. Les chylomicrons sont des grosses lipoprotéines sphériques riches en triglycérides qui représentent plus de 80 % de la particule. En terme protéique, ces lipoprotéines riches en triglycérides sont majoritairement composées d'apolipoprotéine B (apoB). L'assemblage de ces lipoprotéines riches en triglycérides fait intervenir la Microsomal Triglycéride transfer Protein (MTP) qui transfère les lipides, et notamment des triglycérides, sur l'apoB.

1- La MTP des mammifères.

La MTP est un complexe hétérodimérique de 150 kDa environ comprenant une grande sous-unité de 88 kDa et une petite sous-unité de 58 kDa. La petite sous-unité de la MTP correspond à la protéine disulfide isomérase ou PDI (Wetterau *et al.*, 1990). Initialement, la MTP a été identifiée comme une protéine intracellulaire appartenant à la fraction microsomale de foie de bœuf capable de transférer des triglycérides et des esters de cholestérol entre des vésicules unilamellaires (Wetterau et Zilversmit, 1984 ; Wetterau et Zilversmit, 1985).

La découverte de l'implication de la grande sous-unité de la MTP dans l'abétalipoprotéïnémie (ABL), maladie caractérisée par un défaut d'assemblage des lipoprotéines riches en triglycérides (Wetterau *et al.*, 1992) a été le point de départ de nombreuses investigations sur ce complexe.

a- La structure du complexe MTP.

- La petite sous-unité de la MTP : la PDI.

La protéine disulfide isomérase (PDI) est localisée dans la lumière du reticulum endoplasmique des cellules où elle participe au repliement des protéines afin de leur donner une conformation adéquate. De part son activité d'oxydoréduction des groupements thiols (SH) des cystéines, la PDI participe aux modifications co- et post-traductionnelles des protéines en catalysant la formation ou la dégradation de ponts disulfures (Edman *et al.*, 1985) ainsi qu'en réarrangeant les ponts disulfures préexistants (Laboissiere *et al.*, 1995).

Au sein du complexe MTP, cette protéine aurait un rôle différent de son activité enzymatique (Wang *et al.*, 1997). Elle permettrait la localisation dans la lumière du reticulum endoplasmique de la grande sous-unité de la MTP qui ne possède pas de motif KDEL de rétention dans cette organelle. Ce motif est présent dans la partie C-terminale de la PDI. Son association avec la grande sous-unité de la MTP empêcherait cette dernière de s'agréger (Wetterau *et al.*, 1991). La PDI jouerait un rôle de chaperone aussi bien de la grande sous-unité de la MTP que de l'apoB en s'opposant à sa dégradation.

- La grande sous-unité de la MTP.

La grande sous-unité de la MTP humaine est une protéine dont le précurseur est constitué de 894 acides aminés. Cette protéine appartient à la superfamille des « Large Lipid Transfer Protein » (LLTP) incluant les précurseurs des apolipoporphines II/I d'insectes (apoLp-II/I), les vitellogénines d'invertébrés et de vertébrés (VTG) et l'apolipoprotéine B humaine (apoB) (Babin *et al.*, 1999). Toutes ces protéines possèdent un motif homologue en partie N-terminale appelé LLT (Large Lipid Transfer) ou LPD_N (Lipoprotein N-terminal Domain), également présent dans la lipovitelline de lamproie. La lipovitelline de lamproie (LV) est une protéine localisée dans les ovocytes qui est naturellement cristallisée dans ces cellules. Sa structure a été déterminée par diffraction des rayons X à une résolution de 2,8 Å (Raag *et al.*, 1988 ; Timmins *et al.*, 1992 ; Anderson *et al.*, 1998) puis de 1,9 Å (Thompson et Banaszak, 2002). Grâce à ces informations et à l'homologie de séquence entre la LV de lamproie et la grande sous-unité de la MTP, la structure de cette dernière a pu être modélisée (Mann *et al.*, 1999 ; Read *et al.* 2000).

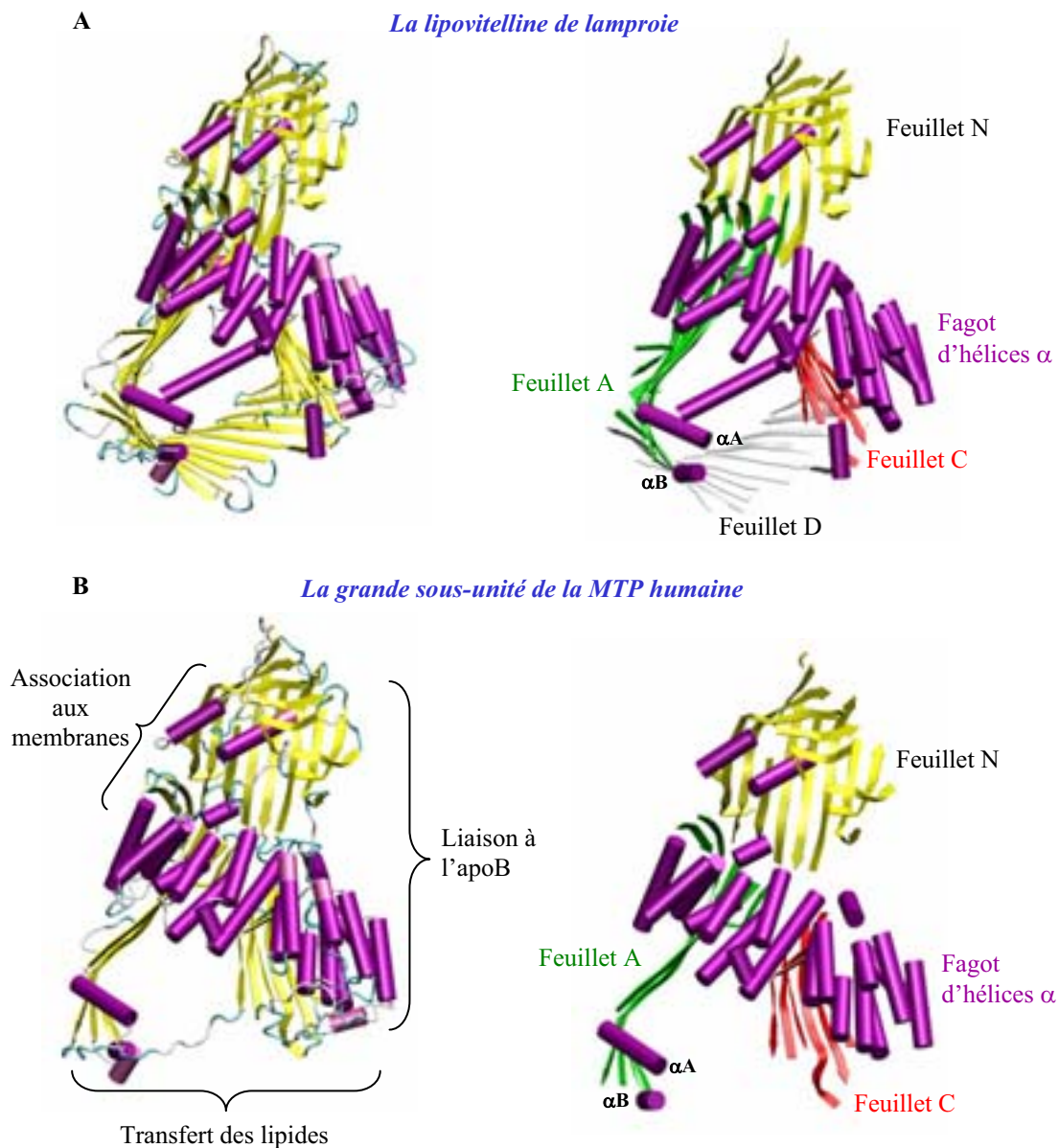


Figure 8 : Structure tridimensionnelle de la lipovitelline de lamproie et modélisation de la grande sous-unité de la MTP.

Les structures de la lipovitelline (LV) de lamproie (A) cristallisée (Anderson *et al.*, 1998) et de la grande sous-unité de la MTP (B) modélisée après alignement avec la LV de lamproie (Mann *et al.*, 1999 ; Read *et al.*, 2000) sont représentées. Dans les représentations de gauche, les hélices α sont colorées en mauves et les brins β en jaune. Dans les représentations de droite, les différents domaines sont indiqués par différentes couleurs. La partie N-terminale de ces protéines appelée feuillet N, est agencée en un tonneau de brins β (en jaune). Les protéines sont ensuite structurées en un fagot d'hélices α (violet) puis en deux feuillets β nommés A (vert) et C (rouge). Les hélices αA et αB de la grande sous-unité de la MTP, importantes pour l'activité de transfert des lipides, sont représentées. La LV de lamproie présente un feuillet de brins β supplémentaire appelé feuillet D (blanc) que ne possède pas la grande sous-unité de la MTP. Les domaines fonctionnels supposés de la grande sous-unité de la MTP humaine sont indiqués (B). Comme pour la LV de lamproie, les feuillets A et C de la grande sous-unité de la MTP pourraient former une cavité capable de lier les lipides et en particulier les triglycérides, les esters de cholestérol et les phospholipides. Les images ont été réalisées à l'aide des logiciels Swiss PDB viewer et Blender.

La grande sous-unité de la MTP serait composée de quatre domaines structuraux, dont trois feuillets β et un domaine en hélices α (Figure 8). Sa partie N-terminale (résidus 22-603), nommée feuillet N, aurait une conformation similaire au tonneau de brins β (β C) formé par les acides aminés 17 à 296 de la LV de lamproie. Le tonneau β de la grande sous-unité de la MTP contiendrait onze brins β ainsi que deux hélices α et le feuillet N comprendrait deux brins β supplémentaires. Cette partie aurait un aspect globulaire du fait de la présence de nombreuses cystéines pouvant former des ponts disulfures. Le domaine central (résidus 304-592) serait homologue à celui constitué par les résidus 297 à 614 de la LV de lamproie et s'agencerait en un fagot d'hélices α comprenant dix-sept hélices. Le feuillet C (résidus 613-722) serait composé de six brins β anti-parallèles ainsi que d'une courte hélice α . Il correspondrait au domaine (β A) formé par les acides aminés 624 à 768 de la LV de lamproie. Le feuillet A (résidus 725-829) inclurait deux hélices α nommées α A (725-736) et α B (781-786) ainsi que quatre brins β . Ce domaine correspondrait aux 126 premiers acides aminés (β B) du feuillet A de la LV de lamproie qui est beaucoup plus long, comprenant un autre feuillet β (β D) et vingt trois brins β au total. Chez la LV de lamproie, les trois feuillets β A, β B et β D forment les parois d'une cavité pyramidale centrale dans laquelle se lient les lipides. La grande sous-unité de la MTP posséderait des domaines de structure homologues aux feuillets β A et β B, autrement dit les deux côtés bordant le haut de la pyramide. La cavité de la grande sous-unité de la MTP serait ouverte, puisque aucun domaine homologue au feuillet β D formant la base de la cavité de la LV de lamproie n'a été identifié.

Les hélices α A et α B se trouveraient à l'entrée de cette cavité, formant un sillon hydrophobe à l'interface eau/lipide. Les acides aminés Leu 734 de l'hélice α A et Val 782 de l'hélice α B faciliteraient l'acquisition et la liaison des triglycérides. L'hélice α A pourrait être un peptide de fusion similaire à ceux des virus, c'est-à-dire capable de déstabiliser les membranes et d'en extraire les lipides (Read *et al.*, 2000). La grande sous-unité de la MTP est liée à la PDI de façon non covalente, grâce à des liaisons ioniques. Cette liaison impliquerait la région comprise entre les résidus 1 et 274 de la PDI et celle contenue entre les résidus 520 et 598 de la grande sous-unité de la MTP. Autrement dit, les hélices α 13 à α 17 de la partie C-terminale du domaine en fagot d'hélices α de la grande sous-unité de la MTP participeraient à l'interaction avec la partie N-terminale de la PDI (Bradbury *et al.*, 1999 ; Mann *et al.*, 1999). Cette liaison ferait intervenir la même région que celle impliquée dans l'homodimérisation de la LV de lamproie.

b- Les fonctions de la MTP.

- L'activité de transfert des lipides.

L'activité du complexe MTP est généralement étudiée *in vitro* par sa capacité à transférer les lipides entre deux petites vésicules unilamellaires dont l'une est donneuse de lipides et l'autre acceptrice. Il a ainsi été montré que la MTP sert de navette aux lipides entre deux membranes grâce à un mécanisme de transfert qui suit une cinétique de type bi-bi ping-pong (Atzel et Wetterau, 1993). La MTP ne transporte pas tous les lipides avec la même affinité. De la plus forte à la plus faible affinité, les lipides transportés sont les triglycérides, les esters de cholestérol, les diglycérides, le cholestérol, les squalènes et les phospholipides (Jamil *et al.*, 1995). La MTP n'aurait aucune affinité pour les monoglycérides puisque aucun transfert de ces molécules n'a été observé. La MTP transfère donc préférentiellement les triglycérides. Pour les phospholipides, aucune différence d'affinité ne semble exister selon leur charge ou leur tête polaire. Les études cinétiques de transfert de lipides marqués suggèrent que la MTP posséderait deux sites de liaison aux lipides distincts dans la vitesse de transfert ainsi que dans la nature des lipides pris en charge (Atzel et Wetterau, 1994). Le site rapide lierait les lipides neutres et les phospholipides alors que le site lent ne pourrait s'associer qu'avec les phospholipides. Il a alors été proposé que le site rapide interviendrait dans le transfert des lipides et que le site lent serait impliqué dans la liaison de la MTP aux membranes (Wetterau *et al.*, 1997 ; Hussain *et al.*, 2003a).

- La liaison et la stabilisation de l'apoB.

Globalement, 5 à 10 % de l'apoB native est associée à la MTP. Par co-immunoprécipitation dans des cellules HepG2 (Wu *et al.*, 1996) et dans des cellules COS (Patel et Grundy, 1996), une interaction entre l'apoB et le complexe MTP a été montrée. Puis, la grande sous-unité de la MTP a été identifiée comme le partenaire de l'apoB (Hussain *et al.*, 1997 ; Mann *et al.*, 1999 ; Bradbury *et al.*, 1999). Ces interactions entre l'apoB et la grande sous-unité de la MTP seraient de nature ionique et hydrophobe. Elles impliqueraient les résidus 1 à 264 de l'apoB avec les résidus 22 à 303 de la grande sous-unité de la MTP d'une part, et les résidus 512 à 721 de l'apoB avec les acides aminés 517 à 603 de la grande sous-unité de la MTP d'autre part (Hussain *et al.*, 1998 ; Bradbury *et al.*, 1999). Les acides aminés 349 à 583 de l'apoB seraient également capables de lier la grande sous-unité de la MTP (Mann *et al.*, 1999). Autrement dit, la grande sous-unité de la MTP interagirait avec différentes régions du domaine $\beta\alpha 1$ de l'apoB contenu à la fois dans l'apoB-100 et l'apoB-48

(voir plus loin la structure de l'apoB). L'affinité entre l'apoB et la grande sous-unité de la MTP serait augmentée par la présence de lipides zwitterioniques comme la phosphatidylcholine alors qu'elle serait diminuée par les lipides chargés négativement tels que la phosphatidylsérine.

L'interaction entre la MTP et l'apoB permet le transfert des lipides depuis les sites de liaison aux lipides de la MTP jusqu'à ceux de l'apoB, assemblant ainsi les lipoprotéines. De plus, cette association stabiliserait l'apoB dans la lumière du reticulum endoplasmique. La MTP faciliterait l'import et le maintien de l'apoB native dans la lumière du reticulum endoplasmique. Elle aurait également une fonction de chaperone empêchant la dégradation de l'apoB. Dans le foie, l'inhibition de la MTP est associée à une dégradation co-translationnelle rapide de l'apoB par le protéasome empêchant son accumulation dans le reticulum endoplasmique (Borchardt et Davis, 1987 ; Wang *et al.*, 1996 ; Benoist et Grand-Perret, 1997 ; Liao *et al.*, 2003b). Cette dégradation ferait intervenir le système ubiquitine, le protéasome et les protéines de choc thermique hsp70 et hsp90 (Gusarova *et al.*, 2001 ; Liao *et al.*, 2003a).

- La formation et la stabilisation de gouttelettes lipidiques dans le reticulum endoplasmique.

La MTP pourrait jouer un rôle dans l'importation des triglycérides ainsi que dans la formation et la stabilisation des gouttelettes lipidiques dans la lumière du reticulum endoplasmique (Bakillah et Hussain, 2001 ; Hussain *et al.*, 2003b). Lorsque le gène *mttp* est conditionnellement supprimé dans le foie des souris *mttp^{Δ/Δ}*, peu de gouttelettes lipidiques sont visibles dans les organelles des hépatocytes alors qu'elles sont massivement présentes dans le cytoplasme (Raabe *et al.*, 1999). De plus, les personnes atteintes d'abétalipoprotéïnémie (ABL), maladie causée par des mutations dans le gène *mttp* humain, présentent des stéatoses hépatiques et intestinales caractérisées par la présence de grosses gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme des cellules de ces organes (Bouma *et al.*, 1990).

Par ailleurs, l'inhibition de l'activité de transfert de la MTP dans les hépatocytes de rats réduit le taux de triglycérides associés ou non à l'apoB contenue dans la lumière du reticulum endoplasmique (Kulinski *et al.*, 2002). L'intervention possible du complexe MTP dans l'entrée des triglycérides dans la lumière du reticulum endoplasmique des cellules hépatiques a été évoquée dès 1999 par Wang et ses collaborateurs qui observèrent que l'ajout d'inhibiteurs de l'activité de transfert de la MTP empêchait l'accumulation de triglycérides dans la lumière de cette organelle en présence d'acide oléique (Wang *et al.*, 1999). Ces expériences suggèrent que la grande sous-unité de la MTP serait impliquée dans la formation

et la stabilisation des gouttelettes lipidiques dans la lumière du reticulum endoplasmique. Elle pourrait également intervenir dans la fusion de ces gouttelettes avec les lipoprotéines primitives de type « HDL-like » (High Density Lipoprotein-like) afin d'en étendre le noyau lipidique et de former des lipoprotéines natives qui seront ensuite sécrétées.

- La localisation intracellulaire de la MTP et les autres fonctions possibles.

En plus de leur localisation dans le reticulum endoplasmique, la grande et la petite sous-unités de la MTP ont été identifiées dans le complexe golgien (Levy *et al.*, 2002 ; Swift *et al.*, 2003). A ce niveau, la MTP contribuerait à la maturation des VLDL et des chylomicrons par le transfert de lipides supplémentaires sur l'apoB (Valyi-Nagy *et al.*, 2002). Elle pourrait également participer au maintien des gouttelettes lipidiques dans le complexe golgien. Une localisation plus surprenante de la MTP a été récemment mise à jour. La grande et la petite sous-unités de la MTP ont été localisées dans la membrane plasmique des bordures en brosse des entérocytes de plusieurs mammifères (Slight *et al.*, 2004). Une activité de transfert des triglycérides a été mesurée dans des vésicules formées à partir de cette membrane, montrant ainsi que la MTP associée à la membrane plasmique est active. L'étendue de la localisation subcellulaire des protéines impliquées dans le complexe MTP suggère l'intervention de ce complexe dans des mécanismes autres que celui de l'assemblage des lipoprotéines qui lui fut initialement attribué. La MTP pourrait, par exemple, intervenir dans le transport des lipides au sein des membranes et agir comme une flippase, autrement dit permettre le transfert des lipides entre les feuillettes interne et externe d'une membrane (Slight *et al.*, 2004).

c- Le gène *mttp* codant pour la grande sous-unité de la MTP.

Le gène *mttp* est essentiel puisqu'il a été montré que la plupart des souris dans lesquelles le gène *mttp* a été supprimé à l'état homozygote meurent majoritairement au cours de leur développement embryonnaire, à 10,5 jours de gestation. Celles qui survivent au-delà de ce stade présentent des anomalies létales du développement du système nerveux central (Raabe *et al.*, 1998). De plus, ces souris sont incapables de synthétiser des lipoprotéines et leur sac vitellin est rempli de gouttelettes lipidiques cytosoliques. La suppression du gène *mttp* spécifiquement dans le foie grâce au système Cre / Flox (souris *mttp*^{Δ/Δ}) a permis d'observer les effets de l'absence de ce gène sur des stades plus tardifs (Chang *et al.*, 1999 ; Raabe *et al.*, 1999 ; Björkegren *et al.*, 2002). Dans ces souris homozygotes *mttp*^{Δ/Δ}, le taux d'apoB-100 plasmatique est quasi nul et celui d'apoB-48 est diminué. Les taux plasmatiques

en cholestérol, triglycérides et phospholipides sont eux aussi nettement plus faibles que la normale. Une stéatose hépatique est également observée dans ces souris homozygotes. De plus, le blocage de la sécrétion des lipoprotéines par le foie du fait de l'absence du gène *mttp* pourrait augmenter la sensibilité de cet organe aux toxines (Björkegren *et al.*, 2002).

Un certain polymorphisme dans les régions promotrices de ce gène, notamment la substitution de la guanine -493 par une thymine, a été observé. Il est souvent rattaché à une baisse du taux de cholestérol et d'apoB contenu dans les lipoprotéines de faible densité, les LDL (Low Density Lipoprotein) ainsi qu'à une sécrétion de VLDL contenant une plus grande quantité de triglycérides (Karpe *et al.*, 1998). Les études sur cette substitution sont contradictoires puisqu'elle a été associée à des troubles comme la stéatose hépatique de type non alcoolique (Namikawa *et al.*, 2004) ainsi qu'à une augmentation des risques de maladies cardio-vasculaires (Ledmyr *et al.*, 2004).

2- Les apoB.

L'apoB a été identifiée, dans un premier temps, comme l'apolipoprotéine majoritaire des LDL et a été nommée apoLDL. Cette protéine a ensuite été associée aux VLDL (Gotto *et al.*, 1972) et la dénomination apoB proposée par Alaupovic (Alaupovic, 1971) a alors été adoptée. En 1980, deux apoB de tailles différentes ont été isolées correspondant à l'apoB-100 et à l'apoB-48. L'apoB-48 est exclusivement retrouvée dans les chylomicrons et représente 48 % de la taille de l'apoB-100 (Kane *et al.*, 1980). Dans le génome humain, ces deux protéines sont codées par le même gène nommé *apoB*. L'apoB-48 est produite par une modification post-transcriptionnelle aboutissant à la conversion d'une base de l'ARNm codant pour l'apoB-100 (Innerarity *et al.*, 1996 ; Anant et Davidson, 2002). Le nucléotide cytidine 6666 de l'ARNm est désaminé en uridine provoquant le changement du codon glutamine (CAA) en codon stop (UAA) à la position 2153 du transcrit *apoB* (Chen *et al.*, 1987 ; Powell *et al.*, 1987).

a- La structure des apoB humaines.

Du fait de sa grande taille et de son caractère très hydrophobe, la structure détaillée de l'apoB est difficile à obtenir. Grâce à des analyses bio-informatiques, un modèle de structure secondaire pentapartite a pu être proposé (Segrest *et al.*, 1994). L'apoB-100 serait donc constituée de 3 domaines en hélices α et de 2 domaines en feuillet β agencés de façon alternée

dans une configuration : NH₂-α1-β1-α2-β2-α3-COOH (Segrest *et al.*, 2001 ; Hussain *et al.*, 2003a ; Richardson *et al.*, 2005) (Figure 9).

Les apoB humaines subissent de nombreuses modifications post-traductionnelles qui sont la formation de ponts disulfures, des glycosylations, des phosphorylations ainsi que des palmitoylations (Havel et Kane, 1995 ; Davis et Vance, 1996). Les acides aminés impliqués dans ces modifications sont indiqués dans la description de l'apoB-100 humaine (Swiss-Prot, numéro d'accèsion : P04114).

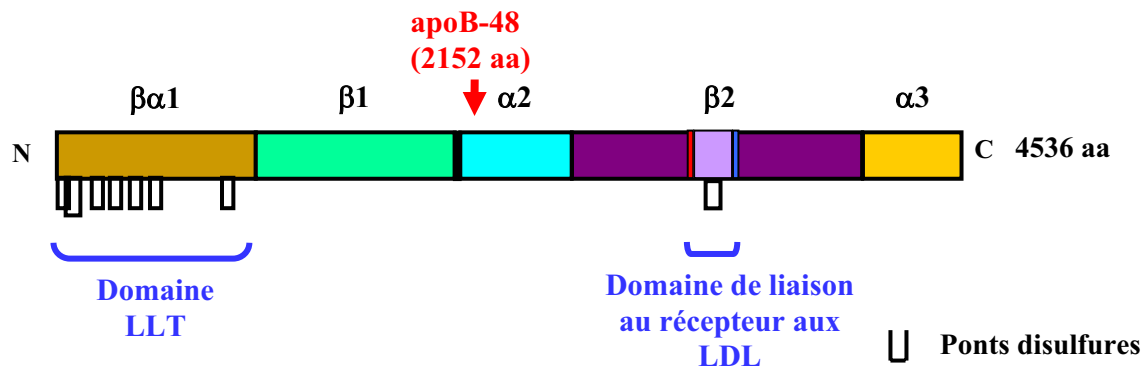


Figure 9 : Représentation schématique du modèle pentapartite de l'apoB-100 humaine.

(D'après Segrest *et al.*, 2001). Les 5 domaines supposés de la structure secondaire de l'apoB-100, qui comprend 4536 acides aminés sans le peptide signal de 28 acides aminés, sont représentés de couleurs différentes. L'apoB-48 ne comprend que les domaines βα1 (acides aminés 1 à 1000) et β1 (acides aminés 827 à 2001) et ne possède que 2152 acides aminés. L'apoB-100 comprend également le domaine α2 (acides aminés 2025 à 2587), le domaine β2 (acides aminés 2571 à 4032) et le domaine α3 (acides aminés 4017 à 4515). Le domaine βα1 est homologue à la lipovitelline de lamproie (LV). Ce domaine LLT (Large Lipid Transfer) est aussi trouvé dans la grande sous-unité de la MTP, dans la vitellogénine et dans le précurseur de l'apolipoporphine II/I d'insectes. Il est formé d'hélices α et de brins β. La région du domaine β2 correspondant au domaine de liaison au récepteur aux LDL est également indiquée. L'apoB-100 comprend 8 paires de cystéines capables de former des ponts disulfures dont 7 sont localisées dans le domaine βα1 et une dans le domaine de liaison au récepteur aux LDL.

L'apoB-100 humaine comprend de nombreuses cystéines dont seize sont capables de former des ponts disulfures (Yang *et al.*, 1990 ; Huang et Shelness, 1997 ; Tran *et al.*, 1998). Sept ponts disulfures sont localisés dans le domaine βα1 de la partie N-terminale de la protéine et sont donc communs à l'apoB-100 et à l'apoB-48. Un autre pont disulfure serait localisé dans le domaine de liaison au récepteur aux LDL et serait essentiel à sa fonction (Tran *et al.*, 1998).

L'apoB-100 humaine est également une protéine glycosylée. Dix neuf sites potentiels de N-glycosylations ont été identifiés sur l'apoB-100 humaine dont sept sont localisés dans le domaine $\beta 2$ qui comprend le domaine de liaison au récepteur aux LDL (Yang *et al.*, 1986).

L'apoB-100 et l'apoB-48 sont des protéines phosphorylées sur les résidus sérines essentiellement mais aussi sur des tyrosines (Sparks *et al.*, 1988 ; Swift, 1996).

Les palmitoylations correspondent à la formation d'une liaison thioester entre une cystéine et un acide palmitique. Huit cystéines de l'apoB-100 humaine, dont les cystéines 1085, 1396, 1478 et 1635, sont palmitoylées (Vukmirica *et al.*, 2003).

Le domaine $\alpha 1$ qui comprenait les acides aminés 58 à 795, a par la suite été étendu aux acides aminés 1 à 1000 et renommé $\beta \alpha 1$ (Segrest *et al.*, 1999 ; Richardson *et al.*, 2005). Ce domaine serait homologue à celui formé par les acides aminés 1 à 1100 de la lipovitelline de lamproie et il serait par là même similaire à la structure de la grande sous-unité de la MTP (Figure 10). Il serait constitué d'un tonneau β (1-267), nommé βC , comprenant dix brins β , séparé d'un domaine en hélices α (300-600) contenant dix-sept hélices α par une grande boucle. Les feuillets βA (600-763) et βB (780-1000) correspondraient aux feuillets A et C de la LV de lamproie, respectivement (Segrest *et al.*, 1999 ; Richardson *et al.*, 2005). Ce domaine $\beta \alpha 1$ semble globulaire puisqu'il contient quatorze cystéines capables de former sept ponts disulfures, dont certains sont essentiels pour l'assemblage des lipoprotéines riches en triglycérides (Yang *et al.*, 1990 ; Huang *et al.*, 1997 ; Tran *et al.*, 1998 ; Richardson *et al.*, 2005). Ces ponts disulfures seraient formés entre les cystéines 12 et 61, les cystéines 51 et 70, les cystéines 159 et 185, les cystéines 218 et 234, les cystéines 358 et 363, les cystéines 451 et 481 et les cystéines 939 et 949. La délétion du domaine $\beta \alpha 1$ a été associée à l'absence de synthèse de lipoprotéines contenant de l'apoB (Gretch *et al.*, 1996). L'homologie de séquence entre la partie N-terminale de l'apoB et la LV de lamproie suggère la présence d'une cavité pouvant lier les lipides. En effet, les feuillets βA et βB de structure supposée similaire aux feuillets de la LV de lamproie pourraient border le haut de cette pyramide. Même si aucun domaine homologue au feuillet βD de la LV de lamproie n'a été identifié, des études récentes suggèrent que cette cavité serait fermée par un troisième côté formé des hélices βA et βB ainsi que des résidus 667 à 746 séparant ces deux hélices par une épingle à cheveux (Manchekar *et al.*, 2004). Une véritable cavité lipidique pyramidale analogue à celle de la LV de lamproie serait donc présente dans la partie N-terminale des apoB humaines qu'il s'agisse de l'apoB-100 ou de l'apoB-48.

Les domaines $\beta 1$ (827-2001) et $\beta 2$ (2571-4032) contiennent des brins β courts amphiphiles. Ils sont essentiels à l'assemblage des lipides et lieraient les lipides de façon irréversible (Segrest *et al.*, 2001). Ils seraient en contact direct avec le cœur lipidique des lipoprotéines riches en triglycérides.

Le domaine de liaison au récepteur aux LDL ainsi que les régions liant les héparines sont contenus dans le domaine $\beta 2$ et font intervenir des résidus chargés positivement. Le domaine de liaison au récepteur aux LDL serait composé de deux régions riches en acides aminés basiques, la région A (acides aminés 3147-3157) et la région B (acides aminés 3359-3367), séparées par un feuillet de brins β amphiphiles riche en prolines (Knott *et al.*, 1986 ; Yang *et al.*, 1986). Les régions A et B seraient donc spatialement proches du fait de la courbure introduites par les prolines. De plus, un pont disulfure peut se former entre les cystéines 3167 et 3298, stabilisant ainsi ce rapprochement.

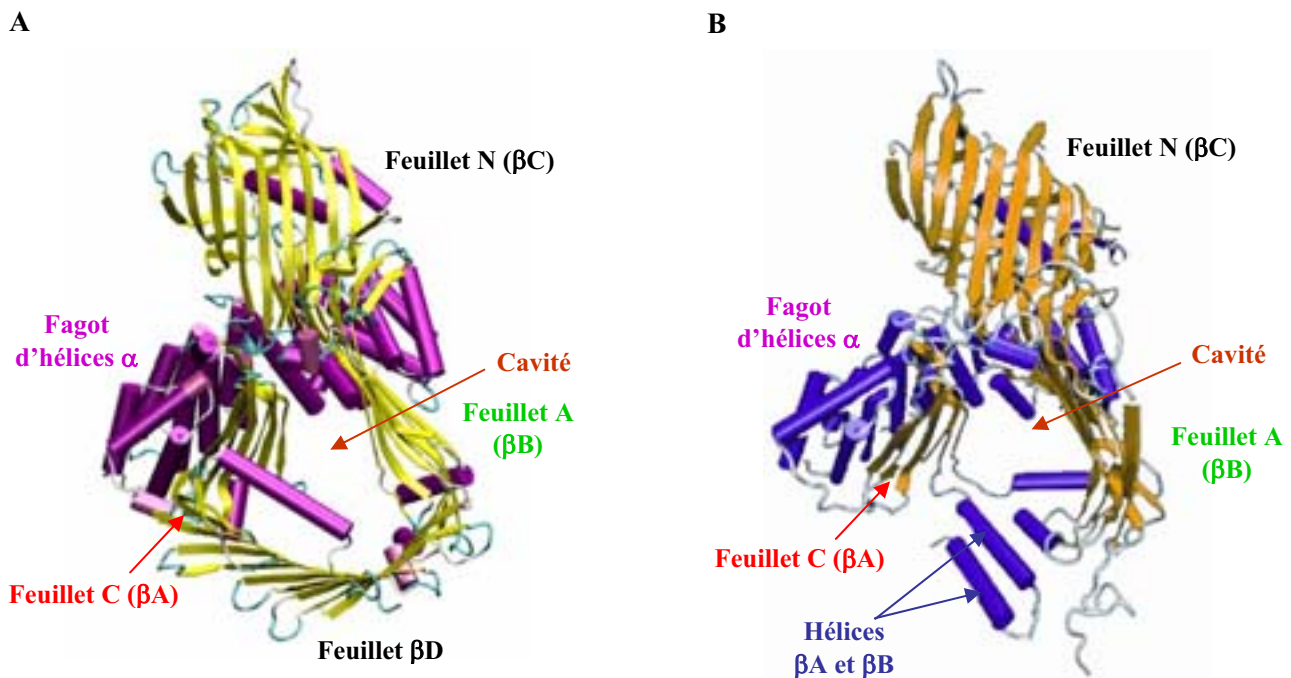


Figure 10 : Structure tridimensionnelle de la lipovitelline de lamproie et modélisation de la partie N-terminale des apoB humaines.

Les structures de la lipovitelline (LV) de lamproie (A) cristallisée (Anderson *et al.*, 1998) et des mille premiers acides aminés de l'apoB humaine (B) modélisée après l'alignement des séquences protéiques de l'apoB et de la LV de lamproie (Manchekar *et al.*, 2004) sont représentées. Les hélices α sont colorées en mauves (LV) ou en bleu (apoB) et les brins β sont en jaune (LV) ou en orange (apoB). Les différents domaines sont indiqués. La partie N-terminale de ces protéines est agencée en un tonneau de brins β et est appelée feuillet N ou βC . Les protéines sont ensuite structurées en un fagot d'hélices α puis en deux feuillets β nommés A ou βB et C ou βA . Les hélices βA et βB de l'apoB sont représentées. La LV de lamproie présente un feuillet de brins β supplémentaire appelé feuillet βD que ne possède pas les apoB humaines. Comme pour la LV de lamproie, une cavité capable de lier les lipides pourrait être formée par les feuillets βB et βA et être fermée par les hélices βA et βB .

Les domaines $\alpha 2$ (2025-2587) et $\alpha 3$ (4017-4515) contiennent des hélices α de type A et Y, retrouvées dans les apolipoprotéines échangeables (Segrest *et al.*, 2001). L'équipe de Segrest a proposé que ces deux régions constituent un domaine de liaison réversible aux lipides.

L'apoB-100 entourerait les LDL (Figure 11) exposant à la surface de la lipoprotéine certaines parties de sa structure et notamment sa partie N-terminale et le domaine de liaison au récepteur aux LDL situé en partie C-terminale (Borén *et al.*, 2001 ; Segrest *et al.*, 2001). La partie C-terminale de l'apoB-100 formerait une boucle dont le positionnement serait crucial pour l'accessibilité du domaine de liaison au récepteur aux LDL (site B). Cette conformation ferait intervenir une interaction entre les acides aminés Arg3500 et Trp4369 essentielle à la liaison de la LDL avec son récepteur. En effet, les mutations Arg3500Gln et Trp4369Tyr s'accompagnent d'une diminution de l'affinité du récepteur pour les LDL. Ceci pourrait s'expliquer par un changement de conformation de la partie C-terminale de l'apoB-100 qui cacherait alors le site de liaison au récepteur (Borén *et al.*, 2001).

La mutation Arg3500Gln, dont la fréquence est estimée entre 1/500 et 1/700 dans les populations caucasiennes d'Amérique du Nord et d'Europe (Rauh *et al.*, 1992), est la première mutation ponctuelle identifiée chez des patients atteints de déficience familiale en apoB-100 (FDB) (Soria *et al.*, 1989). La FDB est une maladie autosomale dominante caractérisée par une hypercholestérolémie qui résulte d'un trouble de la liaison des LDL à leur récepteur (Higgins *et al.*, 1975 ; Innerarity *et al.*, 1987). En effet, les LDL ne sont pas reconnues par leur récepteur et s'accumulent dans les vaisseaux sanguins. Cette maladie se distingue de l'hypercholestérolémie familiale (FH) (Goldstein et Brown, 1974) dans la mesure où les mutations sont localisées dans le gène *apoB* humain. D'autres mutations ponctuelles, les substitutions Arg3531Cys (Pullinger *et al.*, 1995), Arg3500Trp (Gaffney *et al.*, 1995), Arg3480Trp (Borén *et al.*, 2001), Asp3516Lys (Gaffney *et al.*, 2002) et His3543Tyr (Soufi *et al.*, 2004) ont été retrouvées dans le génome de patients atteints de FDB et confortent le modèle de Borén et collaborateurs.

Une délétion des cinq derniers pourcents de l'apoB-100, formant l'apoB-95, augmente l'affinité du récepteur pour son ligand en découvrant le domaine de liaison au récepteur.

La queue C-terminale de l'apoB-100 fonctionnerait comme un élément modulateur. Elle inhiberait l'interaction de l'apoB-100 contenue dans les VLDL avec le récepteur aux LDL alors qu'elle favoriserait celle de l'apoB-100 contenue dans les LDL avec ce même récepteur (Boren *et al.*, 2001). L'interaction de l'arginine 3500 avec le tryptophane 4369 qui

est indispensable à la reconnaissance de l'apoB-100 des LDL par le récepteur aux LDL, aurait lieu lors de la conversion des VLDL en LDL au cours de laquelle l'apoB-100 subit de nombreux changements de conformation (Boren *et al.*, 2001).

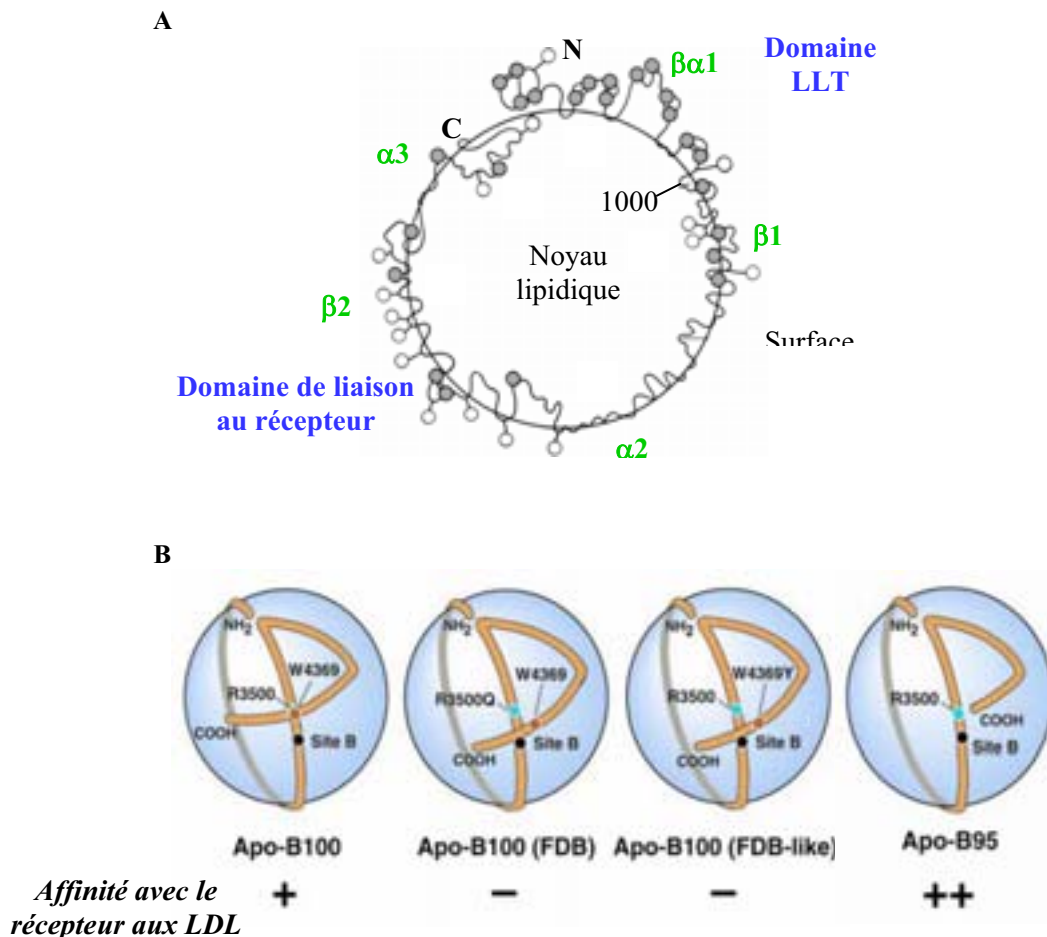


Figure 11 : Structure schématisée de l'apoB-100 dans les LDL.

(A) : Diagramme représentant l'apoB-100 humaine à la surface d'une LDL (d'après Segrest *et al.*, 2001). Les domaines de l'apoB-100 sont positionnés selon leur accessibilité à la trypsine. Les domaines $\beta\alpha 1$ correspondant au domaine LLT (Large Lipid Transfer) et $\beta 2$ comprenant la région liant le récepteur aux LDL sont orientés vers l'extérieur de la particule alors que les domaines $\alpha 2$ et $\alpha 3$ seraient enfouis dans le noyau lipidique. Les boules colorées en gris représentent les résidus cystéine et les blanches correspondent aux résidus N-glycosylés. (B) : Modèle de la conformation de la partie C-terminale de l'apoB-100 dans les LDL (d'après Borén *et al.*, 2001). La partie C-terminale de l'apoB-100 forme une boucle grâce à l'interaction entre les résidus Arg3500 et Trp4369. Le site de liaison au récepteur aux LDL (site B) est accessible. Dans la déficience familiale en apoB-100 (FDB), une mutation engendre la substitution Arg3500Gln. La liaison de l'apoB-100 (FDB) avec le récepteur est altérée. Il en est de même lors de la mutation Trp4369Tyr (ApoB-100 (FDB-like)). Lorsque les 5 % C-terminaux de l'apoB-100 (apoB-95) sont supprimés, la queue raccourcie ne recouvre plus le site de liaison au récepteur qui est alors accessible. Dans ce dernier cas, l'affinité de l'apoB-95 pour le récepteur aux LDL est augmentée du fait d'un moins grand encombrement stérique.

b- Le gène codant pour les apoB humaines.

Ce gène est essentiel au développement embryonnaire (Kim et Young, 1998). En effet, la plupart des souris homozygotes dont le gène *apoB* a été supprimé meurent au stade embryonnaire de 9 jours de gestation (Huang *et al.*, 1995 ; Farese *et al.*, 1995). Une forte mortalité intra-utérine est également observée pour les souris hétérozygotes qui présentent des anomalies du développement du système nerveux central, le tube neural n'étant pas complètement fermé. Les mâles hétérozygotes sont également stériles. Le taux de cholestérol contenu dans les LDL et les VLDL est diminué dans les souris hétérozygotes ayant survécu. Des expériences permettant d'exprimer le gène *apoB* uniquement dans le foie des souris ont montré que ces animaux sont incapables de synthétiser des chylomicrons (Young *et al.*, 1995). Ces souris sont vivantes mais elles présentent un défaut de croissance. Leurs entérocytes sont gorgés d'énormes gouttelettes lipidiques cytosoliques. La création de lignées de souris qui n'expriment soit que l'apoB-100 soit que l'apoB-48 a apporté de nouvelles données. Les deux types de souris se développent normalement, sont en bonne santé et sont fertiles. Ceci suggère que l'expression de l'apoB-48 est suffisante pour permettre le développement normal de l'embryon de souris (Farese *et al.*, 1996).

3- L'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines riches en triglycérides par les entérocytes de poissons Téléostéens.

Chez les poissons Téléostéens, les connaissances relatives à l'assemblage et à la sécrétion des lipoprotéines riches en triglycérides par l'intestin sont très limitées. L'observation et l'analyse de coupes d'entérocytes par microscopie électronique ont permis de visualiser des lipoprotéines dans le reticulum endoplasmique d'entérocytes d'intestin antérieur où elles sont assemblées, dans le complexe Golgien, puis dans l'espace intercellulaire où elles sont sécrétées (Sire *et al.*, 1981 ; Diaz *et al.*, 1997). Elles sont ensuite retrouvées dans le système lymphatique et dans le système sanguin (Henderson et Tocher, 1987). Concernant le poisson zèbre, des lipoprotéines de 40 à 90 nm correspondant à la taille de lipoprotéines de très faible densité (VLDL) ont été observées dans le reticulum endoplasmique, dans le complexe Golgien, dans l'espace intercellulaire ainsi que dans les vaisseaux de la *lamina propria* de larves de 15 jpf, trois heures après la prise de nourriture (André *et al.*, 2000). L'assemblage et la sécrétion de lipoprotéines riches en triglycérides par les entérocytes de l'intestin antérieur de poissons Téléostéens ont été visualisés mais aucun élément sur les partenaires moléculaires intervenant dans ces événements n'est disponible.

Des expériences menées à l'aide d'acides gras marqués au carbone 14 ou à l'aide de leucine tritiée ont permis d'apporter des données sur la cinétique d'absorption et de synthèse des lipoprotéines dans l'intestin de truite (Rogie et Skinner, 1985 ; Sire *et al.*, 1981).

4- L'assemblage des lipoprotéines riches en triglycérides par les entérocytes de mammifères.

Chez les mammifères, les connaissances sur le mécanisme d'assemblage des chylomicrons par les entérocytes sont plus abondantes que chez les poissons Téléostéens bien qu'elles soient encore incomplètes. Le modèle d'assemblage proposé repose sur celui établi pour la synthèse des lipoprotéines riches en triglycérides (VLDL) par le foie toutefois des différences entre ces deux systèmes semblent exister.

a- Le modèle d'assemblage des lipoprotéines riches en triglycérides par le foie des mammifères.

L'assemblage des VLDL par le foie s'effectue dans le reticulum endoplasmique en deux étapes (Hussain *et al.*, 2003a ; Hussain *et al.*, 2003b ; Gibbons *et al.*, 2004). La première correspond à la formation d'une petite lipoprotéine dite « HDL-like » dont la densité serait équivalente à celle d'une lipoprotéine de haute densité (HDL). Au cours de cette étape, les triglycérides, les esters de cholestérol et les phospholipides contenus dans le feuillet interne de la membrane du reticulum endoplasmique rugueux sont transférés sur l'apoB-100 en cours de traduction grâce à la MTP. La façon dont se forme la particule « HDL-like » n'est pas encore clairement établie et deux modèles tentent de l'expliquer. Dans le premier modèle, dit de bourgeonnement d'une particule d'émulsion, l'apoB-100 s'insère dans le feuillet interne du reticulum endoplasmique où elle acquiert essentiellement des triglycérides grâce à l'activité de transfert de la MTP (Schumaker *et al.*, 1994) (Figure 12A). Un bourgeonnement du feuillet interne se forme du fait de sa forte saturation en lipides et une petite particule « HDL-like » riche en triglycérides serait libérée (Spring *et al.*, 1992 ; Shelness *et al.*, 2003). Dans la deuxième hypothèse, la particule « HDL-like » serait pauvre en triglycérides et plus riche en phospholipides (Bakillah et Hussain, 2001 ; Kulinski *et al.*, 2002 ; Manchekar *et al.*, 2004). L'apoB-100 ne s'insérerait que très peu dans le feuillet interne du réticulum endoplasmique et elle serait maintenue dans la lumière du réticulum endoplasmique via son interaction avec la MTP qui transférerait les lipides sur la protéine en cours de traduction (Figure 12B).

Quel que soit le mécanisme de formation de la particule « HDL-like » cette première étape de l'assemblage des VLDL est dépendant de l'activité de transfert des lipides de la MTP.

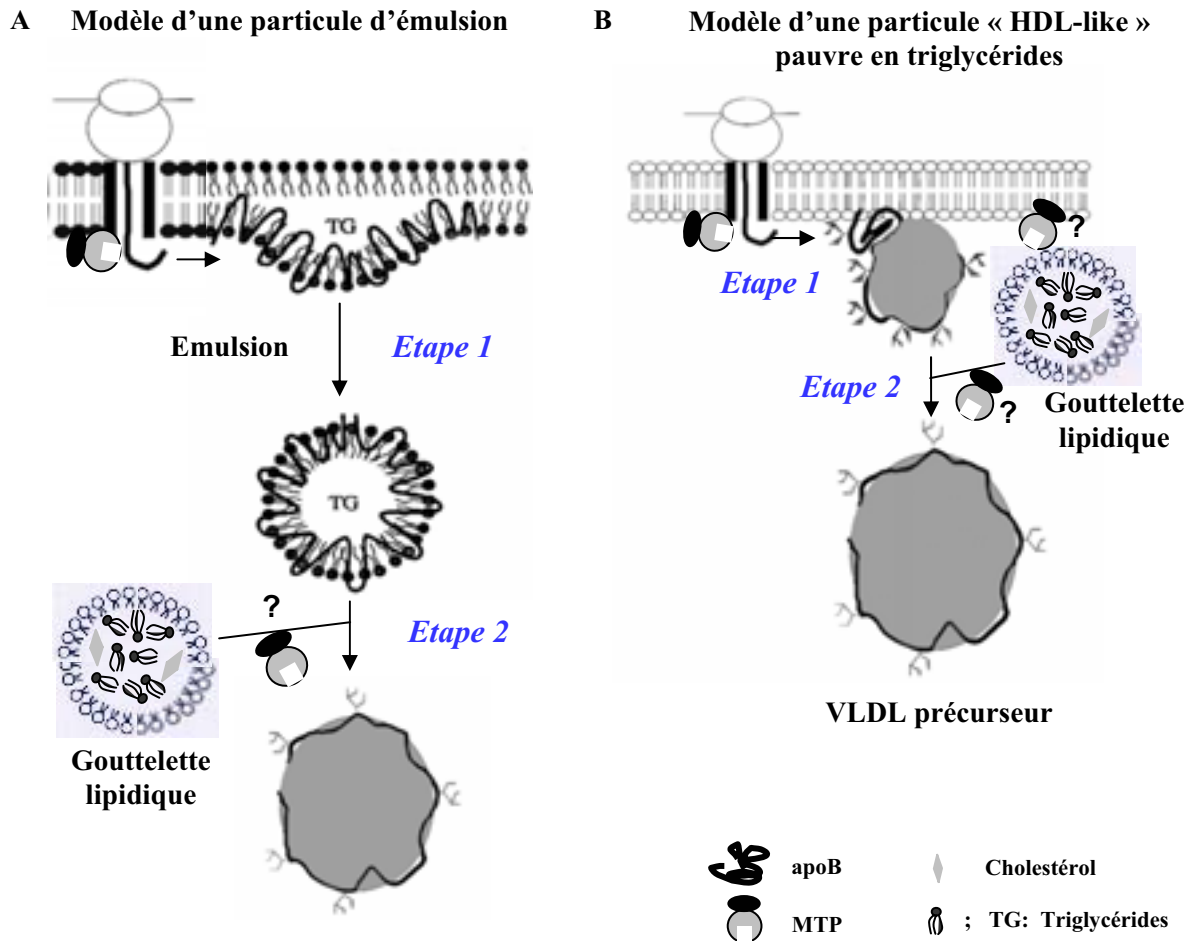


Figure 12 : Modèles d'assemblage des VLDL dans les hépatocytes.

(D'après Rustaeus *et al.*, 1999). La synthèse des VLDL fait intervenir deux étapes dont la première (étape 1) correspond à la formation d'une particule « HDL-like » et la seconde (étape 2) à la fusion d'une gouttelette lipidique avec cette particule. Le mécanisme de formation de la première étape n'est pas clairement défini et deux modèles existent. Dans le modèle de bourgeonnement d'une particule d'émulsion (A), l'apoB en cours de traduction s'insère dans le feuillet interne de la membrane du reticulum endoplasmique (RE) où elle acquiert des triglycérides essentiellement grâce à l'activité de transfert de la MTP. Une émulsion se crée et le feuillet interne saturé en lipides bourgeonne libérant une petite particule dense riche en triglycérides. Dans le modèle passant par une particule « HDL-like » pauvre en triglycérides (B), l'apoB ne s'insère que très peu dans le feuillet interne de la membrane du reticulum endoplasmique. Tout comme dans l'autre modèle, la particule « HDL-like » fusionne avec une gouttelette lipidique riche en triglycérides formant alors une VLDL précurseur. L'intervention de la MTP dans la fusion avec la gouttelette lipidique n'est pas certaine. La MTP pourrait également intervenir dans la stabilisation et le maintien des gouttelettes dans la lumière du reticulum endoplasmique.

La particule « HDL-like » formée va ensuite fusionner avec une gouttelette lipidique contenue dans la lumière du réticulum endoplasmique au cours de la deuxième étape du processus d'assemblage. En effet, des gouttelettes lipidiques résultant de l'émulsion du feuillet interne de la membrane du réticulum endoplasmique lisse s'accumulent dans la lumière de cette organelle (Figure 13). La fusion de ces gouttelettes avec la particule « HDL-like » se produit au niveau des jonctions entre le réticulum endoplasmique lisse et le réticulum endoplasmique rugueux. Dans le foie, cette fusion est médiée par la protéine GTPase nommée ARF-1 (ADP-Ribosyl Factor 1) (Gibbons *et al.*, 2004) et résulte en la formation d'une VLDL précurseur. L'intervention de la MTP dans cette étape n'est pas certaine mais elle pourrait avoir un rôle dans la constitution et dans le maintien des gouttelettes lipidiques dans la lumière du réticulum endoplasmique lisse (Kulinski *et al.*, 2002 ; Pan *et al.*, 2002).

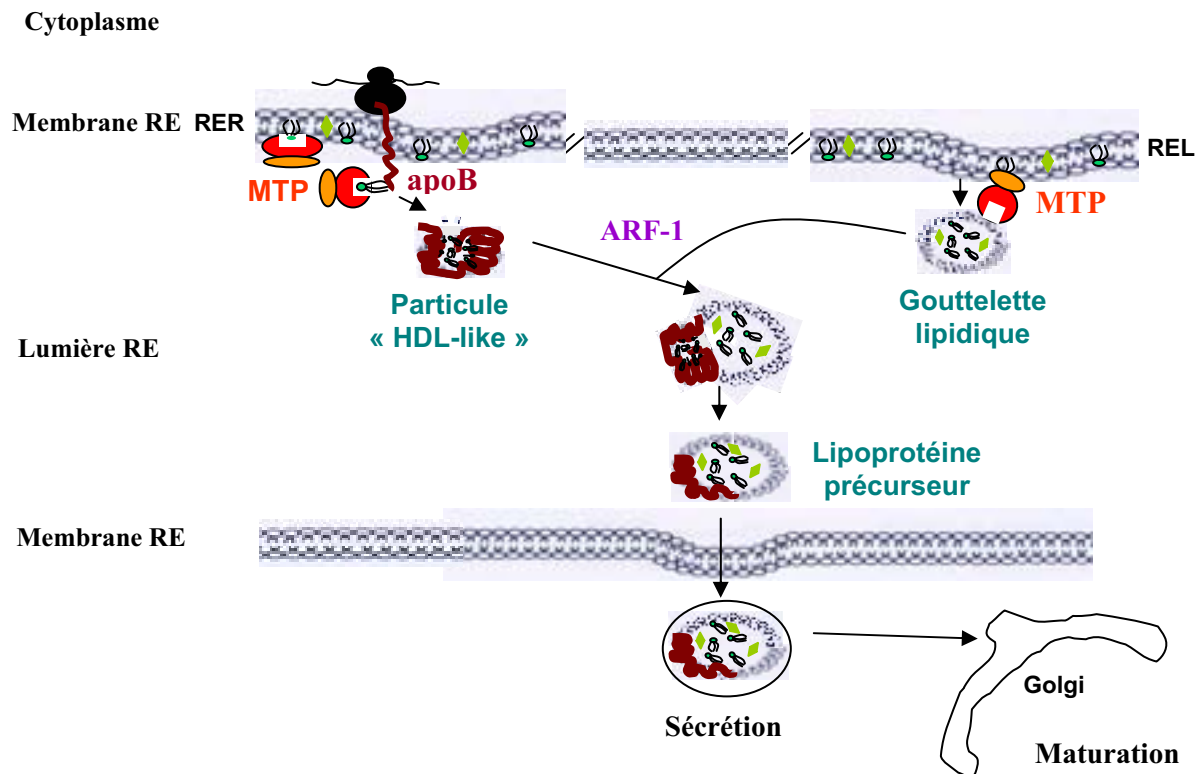


Figure 13 : Mécanisme d'assemblage général des lipoprotéines riches en triglycérides.

(D'après Hamilton *et al.*, 1998). La particule « HDL-like » formée dans la lumière du réticulum endoplasmique rugueux (RER) par le transfert des lipides grâce à l'activité de la MTP sur l'apoB en cours de traduction fusionne avec une gouttelette lipidique contenue dans la lumière du réticulum endoplasmique lisse (REL). Cette fusion ferait intervenir la protéine ARF-1 et se produirait à la jonction entre le RER et le REL. La lipoprotéine précurseur ainsi formée est ensuite sécrétée sous la forme d'une vésicule de sécrétion vers l'appareil de Golgi où elle subira des étapes de maturation supplémentaires à celles effectuées dans le réticulum endoplasmique (RE) avant d'être excrétée dans l'espace interstitiel et de rejoindre les circulations lymphatique puis sanguine.

La lipoprotéine précurseur serait ensuite sécrétée par la voie traditionnelle de sécrétion impliquant le complexe Golgien (Figure 13). Au cours de ce transfert vers l'espace intercellulaire, la lipoprotéine précurseur subit différentes étapes de maturation. L'apoB-100 est glycosylée, palmitoylée et phosphorylée. De plus, une lipidation supplémentaire de la lipoprotéine pourrait avoir lieu dans l'appareil de Golgi dans lequel la MTP est présente. Ces différents mécanismes aboutissent à la formation d'une lipoprotéine mature.

b- L'assemblage des chylomicrons par les entérocytes des mammifères.

L'assemblage des chylomicrons par les entérocytes des mammifères serait relativement similaire à celui des VLDL par les hépatocytes et ferait également intervenir deux étapes (Figure 13). Cet assemblage réalisé dans la lumière du reticulum endoplasmique passerait par la formation d'une particule dite « HDL-like » qui fusionnerait ultérieurement avec une gouttelette lipidique (Cartwright et Higgins, 2001 ; Williams *et al.*, 2004). La particule « HDL-like » serait formée par le transfert des triglycérides, des phospholipides et des esters de cholestérol sur l'apoB-48 en cours de traduction contrairement aux VLDL qui contiennent l'apoB-100. Ainsi, il se formerait une lipoprotéine précurseur nommée pré-chylomicron qui subirait ensuite plusieurs étapes de maturation, notamment dans l'appareil de Golgi lors de son transfert vers l'espace interstitiel (Cartwright et Higgins, 2001 ; Williams *et al.*, 2004).

c- Les défauts d'assemblage : l'abétalipoprotéinémie et l'hypobétalipoprotéinémie familiale.

- L'abétalipoprotéinémie.

L'abétalipoprotéinémie (ABL) est une maladie autosomale récessive rare caractérisée par des concentrations plasmatiques quasi nulles en triglycérides et très faibles en cholestérol (< 70 mg/dl). Elle résulte d'une absence d'assemblage des lipoprotéines riches en triglycérides par le foie (VLDL) ainsi que par l'intestin (chylomicrons) (Levy *et al.*, 1966 ; Ways *et al.*, 1967, Fredrickson, 1969 ; Scanu *et al.*, 1974). Cette maladie est associée à un syndrome de malabsorption des graisses provoquant une carence en vitamines liposolubles, une déformation des globules rouges (acanthocytose), des diarrhées chroniques, des dégénérescences neurologiques et rétinienne pigmentaires qui peuvent aller jusqu'à la cécité. Des biopsies intestinales et hépatiques de patients à jeun atteints d'ABL ont montré la

présence d'une stéatose dans ces deux tissus caractérisée par l'accumulation de grosses gouttelettes lipidiques cytosoliques dans ces organes (Bouma *et al.*, 1990).

Plusieurs types de mutations du gène *mtp*, codant pour la grande sous-unité de la MTP, ont été détectés dans des patients atteints d'ABL. Les plus fréquents entraînent une modification importante de la taille de la protéine (Sharp *et al.*, 1993 ; Shoulders *et al.*, 1993 ; Narcisi *et al.*, 1995 ; Ricci *et al.*, 1995 ; Yang *et al.*, 1999). Seules deux mutations ponctuelles entraînant le changement d'un acide aminé, Arg540His (Rehberg *et al.*, 1996) et Asn780Tyr (Ohashi *et al.*, 2000), ont pu être identifiées. L'arginine 540 est située dans l'hélice α 14 impliquée dans la liaison de la grande sous-unité de la MTP avec la PDI. L'asparagine 780 appartient à l'hélice α B du feuillet A de brins β supposée nécessaire à la liaison avec les triglycérides.

- L'hypobétalipoprotéïnémie familiale.

L'hypobétalipoprotéïnémie familiale (HBLF) est une maladie autosomale co-dominante caractérisée par une faible concentration plasmatique en lipoprotéines contenant de l'apoB. Les cas hétérozygotes ont des concentrations plasmatiques en apoB et en cholestérol contenus dans les LDL qui représentent entre un quart et la moitié des concentrations trouvées chez un sujet sain. Dans les cas homozygotes, ces concentrations sont très faibles voire indétectables. Ces personnes présentent de nombreux troubles proches de ceux des sujets atteints d'abétalipoprotéïnémie (ABL), autrement dit une malabsorption des graisses provoquant des dégénérescences neurologiques, musculaires et rétinienne pigmentaires ainsi qu'une déformation des globules rouges (acanthocytose). Des stéatoses hépatique (Schonfeld *et al.*, 2003) et intestinale (Herbert *et al.*, 1985) sont associées à cette maladie et sont visibles chez les patients atteints. Ce n'est d'ailleurs qu'en 1969, que Mars et ses collaborateurs distinguent la HBLF de l'ABL en se rendant compte que la HBLF est un syndrome dominant (Mars *et al.*, 1969).

De nombreuses mutations non-sens ou du cadre ouvert de lecture dues à des délétions aboutissant à l'apparition d'un codon stop et à une réduction de la taille de l'apoB humaine ont été identifiées chez les patients atteints de HBLF (Linton *et al.*, 1993 ; Hegele et Miskie, 2002 ; Yu *et al.*, 2002 ; Yue *et al.*, 2002 ; Whitfield *et al.*, 2003 ; Lancellotti *et al.*, 2004). La seule mutation ponctuelle n'engendrant pas de changement de taille de la protéine mais celle d'un acide aminé a été observée récemment. Il s'agit de la substitution Arg463Trp (Burnett *et al.*, 2003).

Le gène *apoB* ne semble pas être le seul responsable de la HBLF puisque des mutations dans le fragment chromosomique 3p21.1-22 ont été identifiées pour certains patients atteints (Yuan *et al.*, 2000).

5- La sécrétion des chylomicrons par les entérocytes de mammifères.

a- Le mécanisme de sécrétion des chylomicrons.

Les pré-chylomicrons assemblés dans le reticulum endoplasmique sont ensuite transférés à l'appareil de Golgi par bourgeonnement du reticulum endoplasmique et formation de vésicules nommées PCTV (pre-chylomicron transport vesicles) (Kumar et Mansbach, 1997 ; Kumar et Mansbach, 1999). Ce processus n'est pas bien connu. La possibilité de synthétiser ces vésicules *in vitro* par du reticulum endoplasmique isolé des entérocytes a permis de montrer que les protéines de la famille COPII (COat Protein II), dont font partie la protéine Sar1b, petite GTPase, et les complexes protéiques Sec23/24 et Sec13/31, sont nécessaires à la fusion de ces vésicules avec le complexe Golgien (Siddiqi *et al.*, 2003 ; Shoulders *et al.*, 2004). Le GTP est également indispensable à ce mécanisme. Par contre, le bourgeonnement et la formation des PCTV à partir du reticulum endoplasmique sont indépendants de ces protéines. Ainsi, le rôle de ces protéines dans le mécanisme de sécrétion des chylomicrons est distinct de celui qu'elles possèdent dans le transport antérograde des protéines du reticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi. En effet, les protéines de type COPII sont responsables du bourgeonnement de la membrane du reticulum endoplasmique et de la formation des vésicules de sécrétion (Kuge *et al.*, 1994). L'activité GTPasique de la protéine Sar1 régule le bourgeonnement de la membrane du reticulum endoplasmique (Springer *et al.*, 1999). La protéine Sar1 couplée au GTP est capable de s'associer à la membrane du reticulum endoplasmique. Elle interagit alors avec l'hétérodimère Sec23/24 (Bi *et al.*, 2002) et ce pré-complexe peut ensuite lier l'hétérodimère Sec13/31. La membrane du reticulum endoplasmique se déforme alors et les protéines du manteau se polymérisent. L'hydrolyse du GTP provoque la dissociation des protéines du manteau et la vésicule de sécrétion formée est libérée (Barlowe *et al.*, 1994).

Une fois dans l'appareil de Golgi, les pré-chylomicrons sont maturés et transformés en chylomicrons. Les chylomicrons sont ensuite sécrétés au niveau baso-latéral des entérocytes dans l'espace intercellulaire où ils rejoindront la lymphe. Des études récentes apportent de nouveaux éléments quant à la synthèse des chylomicrons dans les cellules Caco-2 (Morel *et al.*, 2004 ; Château *et al.*, 2004). La particule primordiale « HDL-like »

synthétisée dans le reticulum endoplasmique serait transférée dans la partie apicale des entérocytes, au niveau de la bordure en brosse et du compartiment subapical. L'apoB serait maintenue à ce niveau jusqu'à ce que des micelles mimant celles formées dans la lumière intestinale soient appliquées à la surface des cellules Caco-2. L'apoB chassée disparaît alors du niveau apical des cellules et serait sécrétée au niveau baso-latéral après avoir été enrichie en triglycérides par fusion avec une particule lipidique. La présence de MTP au niveau de la membrane plasmique de la bordure en brosse des entérocytes (Slight *et al.*, 2004) suggère la possibilité d'un transfert supplémentaire de lipides à ce niveau avant que les chylomicrons ne soient sécrétés.

b- La maladie d'Anderson : défaut de sécrétion des chylomicrons.

La maladie d'Anderson, également nommée maladie de rétention des chylomicrons (Chylomicron Retention Disease), a été identifiée pour la première fois en 1961 chez une petite fille âgée de 7 mois (Anderson *et al.*, 1961). Cette maladie autosomale récessive est caractérisée par des diarrhées accompagnées d'une stéatorrhée, par une stéatose intestinale, par un faible taux plasmatique de cholestérol, d'apoB et d'apoA-I, ainsi que par l'absence de chylomicrons dans le plasma. Les entérocytes assemblent les chylomicrons mais sont incapables de les sécréter. En effet, de nombreuses particules de taille similaire à celle des chylomicrons s'accumulent dans l'entérocyte (Bouma *et al.*, 1986 ; Levy *et al.*, 1987 ; Roy *et al.*, 1987 ; Samson-Bouma *et al.*, 1996).

Une mutation dans le gène *Sara2* codant pour la protéine Sar1b impliquée dans la fusion des PCVT avec l'appareil de Golgi a été identifiée dans le génome de ces patients (Jones *et al.*, 2003 ; Shoulders *et al.*, 2004). Cette mutation provoquerait une substitution de la glycine trouvée à la position 37 par une arginine. Ceci résulte en une perte de l'affinité de la protéine Sar1b pour le GTP. En effet, l'hydrolyse du GTP est un événement nécessaire à la fusion des vésicules contenant les pré-chylomicrons avec l'appareil de Golgi. L'identification de ces mutations a permis de montrer que la protéine Sar1b est bel et bien un facteur indispensable à la sécrétion des chylomicrons. Le défaut de sécrétion des chylomicrons pourrait également impliquer d'autres protéines qui interviendraient à un niveau distinct de la protéine Sar1b dans la voie de sécrétion des chylomicrons et qu'il reste à identifier.

6- Les modifications post-traductionnelles de l'apoB et la régulation de la sécrétion des lipoprotéines riches en triglycérides.

La régulation de la sécrétion d'apoB, et donc de lipoprotéines riches en triglycérides, s'effectue de façon post-transcriptionnelle et fait intervenir de nombreux facteurs.

a- Les modifications post-traductionnelles de l'apoB.

Le parfait agencement spatial et les modifications post-traductionnelles de l'apoB sont des éléments indispensables à la sécrétion de l'apoB. Ces modifications post-traductionnelles sont la formation de ponts disulfures, des glycosylations, des phosphorylations ainsi que des palmitoylations (Havel et Kane, 1995 ; Davis et Vance, 1996).

Ainsi, les ponts disulfures essentiellement répartis dans le domaine $\beta\alpha 1$ de la partie N-terminale des apoB-100 et apoB-48 donnent une structure globulaire à ce domaine permettant la reconnaissance de l'apoB par des protéines chaperonnes ainsi que par la MTP. La traduction de l'apoB s'arrête et la protéine peut alors être lipidée. L'absence des ponts disulfures est associée à une dégradation co-traductionnelle de l'apoB par le protéasome, similaire à celle observée lors d'une absence de liaison à la MTP (Borchardt et Davis, 1987; Wang *et al.*, 1996; Benoist et Grand-Perret, 1997; Liao *et al.*, 2003b). Cette dégradation ferait intervenir le système ubiquitine et les protéines de choc thermique hsp70 et hsp90 (Gusarova *et al.*, 2001; Liao *et al.*, 2003a). Ce mécanisme de dégradation co-traductionnelle empêcherait l'accumulation d'une apoB mal repliée dans la lumière du reticulum endoplasmique.

L'ajout des oligosaccharides sur les asparagines aurait lieu dans le reticulum endoplasmique (Hirschberg et Snider, 1987). La substitution des asparagines situées en partie N-terminale de l'apoB, comme l'asparagine 158, par une glutamine est associée à une réduction de la sécrétion de l'apoB. Les oligosaccharides ajoutés à la partie N-terminale de l'apoB joueraient donc un rôle essentiel dans l'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines riches en triglycérides (Vukmirica *et al.*, 2002).

Les phosphorylations seraient réalisées dans l'appareil de Golgi sur des résidus sérine essentiellement mais également sur des tyrosines (Swift, 1996). De part sa conformation, l'apoB-48 serait plus efficacement phosphorylée que l'apoB-100.

L'apoB est également une protéine palmitoylée. Les palmitoylations auraient lieu dans le reticulum endoplasmique ainsi que dans l'appareil de Golgi (Zhao *et al.*, 2000). Elles seraient indispensables à la conformation spatiale de l'apoB ainsi qu'au positionnement de l'apoB dans la voie de sécrétion. En effet, la palmitoylation de la cystéine 1085 serait

nécessaire à l'assemblage du cœur hydrophobe riche en lipides neutres des lipoprotéines (Zhao *et al.*, 2000). Ces acylations permettraient également de réduire l'affinité de l'apoB pour des protéines du reticulum endoplasmique et de faciliter ainsi le transfert des lipoprotéines précurseur du reticulum endoplasmique vers le complexe Golgien (Vilas et Berthiaume, 2004). Elles joueraient donc un rôle indispensable dans la sécrétion de l'apoB et des lipoprotéines riches en triglycérides.

b- La régulation de la sécrétion de l'apoB.

Plusieurs facteurs régulent la sécrétion de l'apoB et des lipoprotéines riches en triglycérides.

Un de ces facteurs est la disponibilité en lipides neutres. En effet, lorsque la quantité de lipides neutres comme substrat est limitée, la sécrétion de l'apoB est diminuée et une grande proportion d'apoB est dégradée (Davis *et al.*, 1990). Par contre, la sécrétion d'apoB est augmentée lorsque la quantité de lipides neutres est plus importante. Cette régulation par la quantité de lipides neutres accessibles pourrait, comme pour les palmitoylations de l'apoB, stimuler le taux d'apoB transportée du reticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi.

Il a été montré que le récepteur aux LDL augmente la dégradation intracellulaire de l'apoB-100 (Twisk *et al.*, 2000 ; Gillian-Daniel *et al.*, 2002). Le récepteur aux LDL présent dans le reticulum endoplasmique est capable de se lier à l'apoB-100 contenue dans les particules denses « HDL-like » (Gillian-Daniel *et al.*, 2002). Cette liaison maintient l'apoB-100 dans cet organite et rendrait cette protéine disponible pour les enzymes de la protéolyse (Gillian-Daniel *et al.*, 2002 ; Larsson *et al.*, 2004). L'affinité du récepteur aux LDL diminue lorsque la particule « HDL-like » a acquis suffisamment de lipides et elle est très faible pour l'apoB-100 contenue dans les VLDL (Larsson *et al.*, 2004). Il a été suggéré que cette fonction de barrière qu'assure le récepteur aux LDL permettrait d'empêcher la sécrétion par le foie de cholestérol contenu dans des lipoprotéines plus denses et qui seraient plus athérogéniques que les VLDL (Larsson *et al.*, 2004).

L'insuline est une hormone qui abaisse le taux de sécrétion des lipoprotéines contenant de l'apoB (Phung *et al.*, 1997). Ce mécanisme ferait intervenir la voie de la phosphoinositol-3 protéine kinase et augmenterait la dégradation intracellulaire d'apoB. L'insuline aurait un effet inhibiteur sur les phosphorylations de l'apoB (Jackson *et al.*, 1990).

Une mauvaise acquisition des lipides, un défaut de conformation ou des modifications post-traductionnelles non réalisées, ont pour effet d'empêcher le transfert de l'apoB depuis le reticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi. Ceci provoque la prise en

charge de l'apoB par le protéasome et sa dégradation par le système ubiquitine et les protéines de choc thermique hsp70 et hsp90 (Gusarova *et al.*, 2001; Liao *et al.*, 2003a). L'accumulation d'apoB dans la lumière du reticulum endoplasmique est ainsi empêchée (Borchardt et Davis, 1987; Wang *et al.*, 1996; Benoist et Grand-Perret, 1997; Liao *et al.*, 2003b). Cette dégradation peut être co-traductionnelle mais également post-traductionnelle après le passage dans l'appareil de Golgi. Dans ce dernier cas, les systèmes mis en jeu pour la dégradation de l'apoB seraient distincts de ceux impliqués dans la dégradation co-traductionnelle de l'apoB.

E. Les lipoprotéines circulantes.

1- Les lipoprotéines, les apolipoprotéines et leur classification.

Les lipoprotéines sont les principaux transporteurs plasmatiques des lipides. Elles sont constituées d'une monocouche périphérique amphiphile composée de phospholipides, de cholestérol non estérifié et d'apolipoprotéines (apo) qui englobe un noyau central hydrophobe formé de triglycérides et d'esters de cholestérol (Figure 14). La monocouche périphérique crée une interface entre la phase aqueuse et le cœur des particules contenant les lipides neutres.

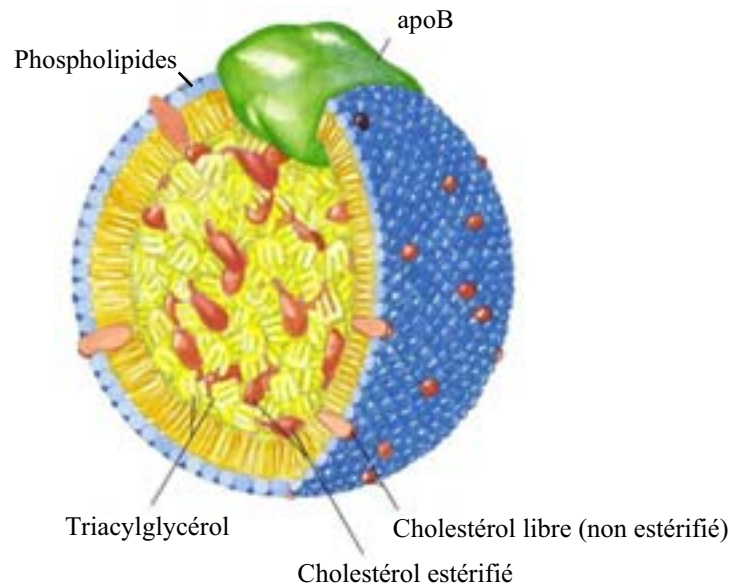


Figure 14 : Représentation schématique d'une lipoprotéine de type LDL.

(d'après Lehninger *et al.*, 1993). Les lipoprotéines sont composées d'une monocouche périphérique de phospholipides dans laquelle du cholestérol libre, non estérifié, est inséré. Cette monocouche englobe un cœur hydrophobe central composé de triglycérides (triacylglycérols) et de cholestérol estérifié. L'apoB ceinture la LDL et présente son site de liaison au récepteur aux LDL à la surface de la lipoprotéine.

Il existe différentes classes de lipoprotéines déterminées en fonction de la technique de séparation utilisée (Puchois *et al.*, 1985 ; Shepherd et Fruchart, 1989). Initialement, elles ont été classées par précipitation différentielle ou selon leur profil de mobilité électrophorétique (Macheboeuf et Rebeyrotte, 1951 ; Noble, 1968). Les lipoprotéines ont ensuite été classées selon leur densité hydratée (De Lalla et Gofman, 1954) (Tableau 1). Une classification plus récente repose sur leur composition en apolipoprotéines (Alaupovic, 1991 ; Alaupovic, 2003). Les lipoprotéines contenant essentiellement de l'apoB (les VLDL, LDL et chylomicrons) sont différenciées de celles majoritairement composées d'apoA-I (les HDL). La classification en fonction de la densité hydratée des lipoprotéines est la plus couramment utilisée.

	Chylomicrons	VLDL	IDL	LDL	HDL
Densité (g/ml)	<0,95	0,95-1,006	1,006-1,019	1,019-1,063	1,063-1,210
Diamètre des particules (Å)	750-12 000	300-800	250-350	180-250	50-120
Masse moléculaire des particules (kDa)	400 000	10 000-80 000	5 000-10 000	2 300	175-360
Composition					
% Triglycérides	84-89	50-65	22	7-10	3-5
% Phospholipides	7-9	15-20	22	15-20	20-35
% Cholestérol estérifié	3-5	10-15	30	35-40	12
% Cholestérol libre	1-3	5-10	8	7-10	3-4
% Proteines	1,5-2,5	5-10	15-20	20-25	40-55
Apolipoprotéines majoritaires	A-I, A-II, A-IV, B-48, C-I, C-II, E	B-100 , C-I, C-II, C-III, E	B-100 , C-III, E	B-100	A-I, A-II, C-I, C-II, C-III, D, E
Lieu de synthèse principal chez l'homme	intestin	foie	dérivent des VLDL	dérivent des VLDL	foie intestin

Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques, composition et lieu de synthèse des principales classes de lipoprotéines chez l'Homme.

(D'après Voet et Voet, 1995). Les lipoprotéines sont classées selon leur densité hydratée. Leur mobilité électrophorétique est indiquée. Les lipoprotéines se distinguent également par leur composition en terme de lipides et d'apolipoprotéines. Les lipoprotéines riches en triglycérides sont les chylomicrons et les VLDL. VLDL : Very Low Density Lipoprotein, LDL : Low Density Lipoprotein, IDL : Intermediate Density Lipoprotein, HDL : High Density Lipoprotein.

Les mammifères ne forment pas un groupe uniforme quant à leur profil lipoprotéique et ils peuvent être séparés en deux (Chapman, 1980). La plupart des mammifères herbivores, à l'exception du chameau et du cochon d'inde, ainsi que la majorité des carnivores ont un profil lipoprotéique de type HDL. Les rongeurs appartiennent à cette classe de mammifères. Ces animaux contiennent plus de 50 % de HDL dans la fraction plasmatique de densité hydratée

inférieure à 1,21 g/ml. Ils se distinguent des mammifères dont le profil lipoprotéique est de type LDL. Ce second groupe comprend, entre autre, la plupart des mammifères omnivores dont l'Homme. Ces animaux sont caractérisés par une concentration de plus de 50 % de LDL dans la fraction de densité hydratée supérieure à 1,21 g/ml.

Il est à noter que, contrairement à l'Homme, le foie des rongeurs, et plus particulièrement celui de la souris et du rat, est capable de synthétiser des lipoprotéines de type VLDL contenant de l'apoB-48. Chez l'Homme adulte, l'apoB-48 n'est synthétisée que par les entérocytes alors que chez le rat, cette forme d'apoB est traduite à la fois par les hépatocytes et les entérocytes.

Les apolipoprotéines (apo) sont les protéines plasmatiques dédiées au transport des acides gras estérifiés en triglycérides, esters de cholestérol et phospholipides sous la forme de lipoprotéines. De nombreuses apolipoprotéines de taille et de structure variables ont été caractérisées dans le plasma des mammifères (Bolanos-Garcia et Miguel, 2003). Elles sont classées selon leur capacité à être échangées d'une lipoprotéine à une autre. On distingue ainsi les apolipoprotéines échangeables (apoA-I, apoA-II, apoA-IV, apoC-I, apoC-II, apoC-III et apoE) des apolipoprotéines non échangeables (apoB). Chez les mammifères, deux types d'apoB, l'apoB-100 et l'apoB-48, ont été identifiés.

2- Comparaison de la composition des lipoprotéines plasmatiques entre les poissons et les mammifères.

Comme chez les mammifères, les lipides dont le cholestérol sont transportés dans le plasma des poissons par différentes classes de lipoprotéines (Skinner et Rogie, 1978 ; Babin, 1987a ; Babin, 1987b ; Chapman, 1980 ; Babin et Vernier, 1989) (Tableau 2). Ces lipoprotéines de type chylomicrons, VLDL, LDL et HDL ont été isolées, chez la truite en particulier, par différentes techniques comme l'ultracentrifugation séquentielle, le gradient de densité ou la précipitation sélective (Tableau 2). La mise en évidence de la présence chylomicrons dans le plasma des poissons Téléostéens a initialement été laborieuse car les premiers auteurs n'avaient pas pris en compte le décalage de plusieurs heures du pic d'absorption des lipides chez les poissons en fonction de leur température d'élevage (Sire *et al.*, 1981 ; Wallaert et Babin, 1994b).

Les HDL sont la classe prédominante des lipoprotéines chez les poissons Téléostéens alors que chez les requins, les lipoprotéines majoritaires sont les LDL (Babin et Vernier, 1989). La concentration en lipoprotéines et en particulier en HDL est environ dix fois plus

élevée chez la truite en comparaison avec les standards utilisés pour l'espèce humaine (Wallaert et Babin, 1994a). Chez le poisson zèbre, il n'existe pas de données publiées quant à son profil lipoprotéique, mais des travaux réalisés au sein de notre laboratoire démontrent l'existence des différentes classes de lipoprotéines ainsi qu'une composition apolipoprotéique similaire aux autres poissons Téléostéens (Babin, données non publiées).

Les poissons Téléostéens sont caractérisés par une concentration plasmatique en lipoprotéines très élevée par rapport aux standards utilisés chez les mammifères (Babin et Vernier, 1989 ; Wallaert et Babin, 1994a). Cette lipoprotéinémie est associée à une protéinémie relativement basse. Les apolipoprotéines constituent ainsi les protéines les plus abondantes du plasma, et en particulier l'apoA-I et les apoB (Babin, 1987). Chez les poissons Téléostéens, les lipoprotéines peuvent être synthétisées par le foie, par l'intestin ainsi que par le syncytium vitellin.

	Chylomicrons	VLDL	IDL	LDL	HDL
Mobilité électrophorétique					
Homme	0	pré-β	pré-β lents	β	α
Truite	0	pré-β	α	α	α
Densité (g/ml)					
Homme	<0,95	0,95-1,006	1,006-1,019	1,019-1,063	1,063-1,210
Truite	< 1,015	< 1,015	1,015-1,040	1,040-1,085	1,085-1,210
Composition					
Homme					
% Lipides	98	92	82	79	45-55
% Proteines	2	8	18	21	45-55
Truite					
% Lipides	95,5	87,2	70,5	70,5	55,3
% Proteines	4,5	12,8	29,5	29,5	44,7
Apolipoprotéines majoritaires					
Homme	A-I, A-II, A-IV, B-48, C-I, C-III, E	B-100, C-I, C-II, C-III, E	B-100, C-III, E	B-100	A-I, A-II
Truite	25 (A-I), B ₂₄₀ , B ₂₆₀ , 76, 13 (A-II), 9-11 (C)			B ₂₄₀ , 76	25(A-I), 13(A-II)

Tableau 2 : Comparaison de la composition des lipoprotéines plasmatiques humaines et de truite.

(D'après Babin et Vernier, 1989). La mobilité électrophorétique, la densité et la composition des lipoprotéines humaines et de truite sont comparées. Les apolipoprotéines majoritaires de chaque type de lipoprotéines sont indiquées. Les apolipoprotéines de truite sont nommées selon leur poids moléculaire et leur correspondance avec les apolipoprotéines humaines est donnée entre parenthèses. VLDL : Very Low Density Lipoprotein, LDL : Low Density Lipoprotein, IDL : Intermediate Density Lipoprotein, HDL : High Density Lipoprotein.

Le saumon et la truite sont les poissons chez qui les apolipoprotéines ont été le mieux caractérisées (Babin et Vernier, 1989). En ce qui concerne les apoB, deux apolipoprotéines faisant 240 kDa et 260 kDa ont été identifiées dans le plasma de truite (*Salmo gairdneri*) ainsi que dans celui d'autres poissons (Babin et Vernier, 1989). Ces apolipoprotéines sont également reconnues par un anticorps dirigés contre l'apoB-100 humaine. D'autre part, un fragment d'un transcrite codant pour une apoB a été cloné chez le saumon (*Salmo salar*). Celui ci présente une délétion au niveau du domaine de liaison au récepteur aux LDL (Babin *et al.*, 1995).

Une apoC-II a également été identifiée chez la truite (*Oncorhynchus mykiss*) (Shen *et al.*, 2000). Chez le poisson zèbre, peu d'apolipoprotéines sont caractérisées. Seule l'apoA-I (Babin *et al.*, 1997) et l'apoE (Babin *et al.*, 1997 ; Monnot *et al.*, 1999) ont été isolées avant ce travail. Un gène codant pour une autre apoE uniquement exprimé dans l'intestin a été caractérisé chez le poisson zèbre (André *et al.*, en préparation). Des transcrits codant pour des protéines homologues à l'apoA-IV ont été isolés chez le poisson zèbre (André *et al.*, résultats non publiés). Chez l'Homme, cette apolipoprotéine est uniquement synthétisée dans l'intestin grêle alors qu'elle est traduite dans le foie et l'intestin grêle de rat. Chez cet animal, l'apoA-IV est tout de même plus abondamment synthétisée par l'intestin comparativement au foie. Cette apolipoprotéine est essentiellement associée aux chylomicrons et elle est considérée chez les rongeurs comme l'apolipoprotéine qui marque l'absorption lipidique (Rodriguez *et al.*, 1997). L'apoA-IV est également impliquée dans le mécanisme de satiété chez l'Homme et le rat (Fujimoto *et al.*, 1992 ; Merrill, 1993). En effet, une partie de l'apoA-IV est dissociée des chylomicrons dans les vaisseaux sanguins et entre dans le système nerveux central où elle participe à la régulation de la satiété.

3- Les voies du transport des lipides chez les vertébrés.

Les lipoprotéines sont essentiellement synthétisées par le foie et par l'intestin. Le foie contrôle la lipidémie et la lipoprotéinémie. En effet, cet organe est à la fois capable de synthétiser et d'endocyter des lipoprotéines grâce à la présence de récepteurs membranaires cellulaires spécifiques aux lipoprotéines. Trois voies principales de transport des lipides dans le système vasculaire ont été caractérisées chez les mammifères (Figure 15).

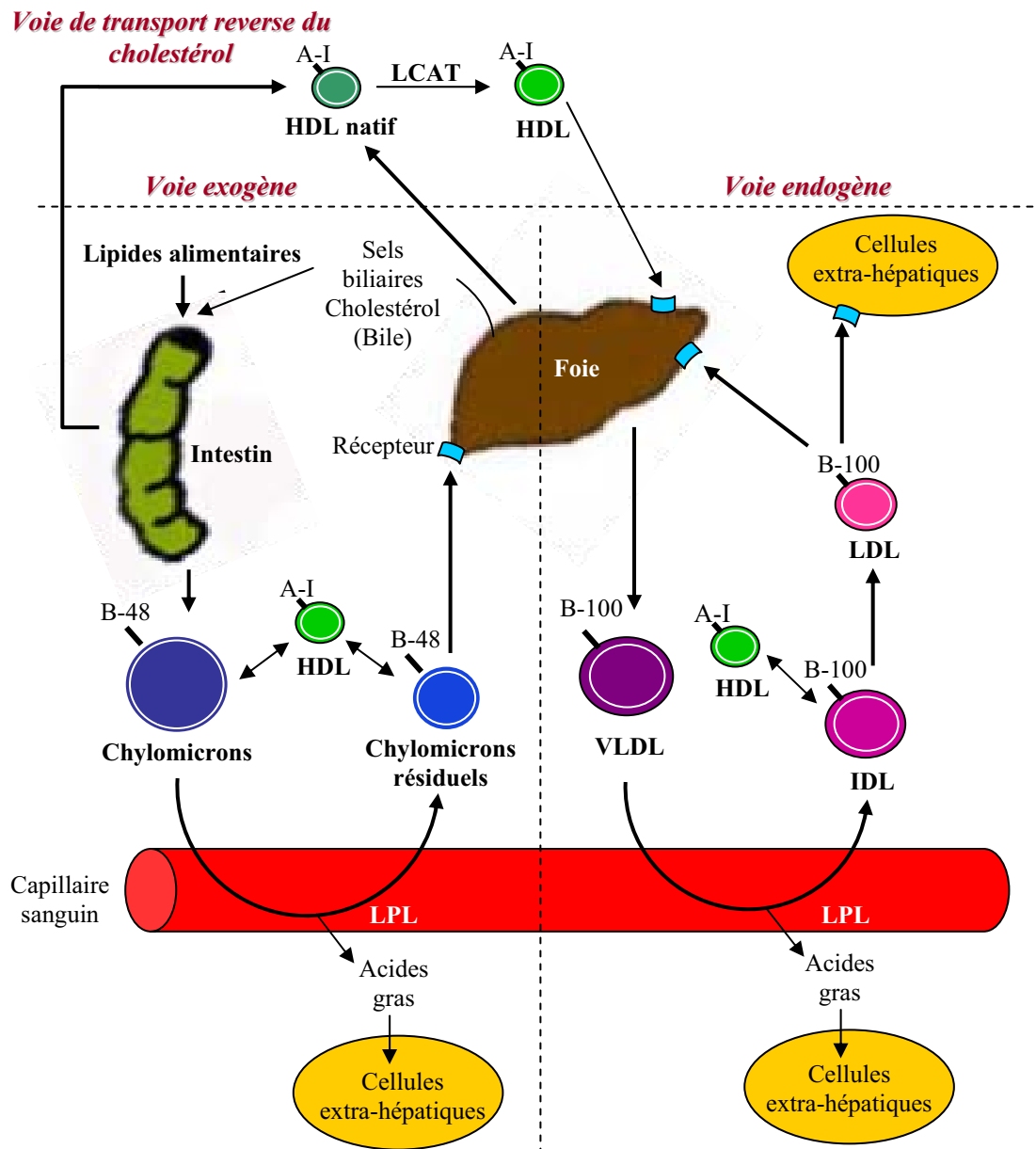


Figure 15 : Les voies du transport plasmatique des lipides chez l'Homme.

(D'après Santamarina-Fojo et Dugi, 1994) Trois voies de transport des lipides existent chez les mammifères et l'Homme en particulier. La voie exogène correspond au transport des lipides d'origine alimentaire incorporés dans les chylomicrons par l'intestin grêle. Une fois sécrétées, ces chylomicrons rejoignent la circulation sanguine où la lipoprotéine lipase (LPL) fixée à la surface de l'endothélium vasculaire hydrolyse les triglycérides en acides gras libres et forme des chylomicrons résiduels qui seront endocytés par le foie grâce à des récepteurs spécifiques. La voie de transport endogène correspond à l'assemblage par le foie de VLDL à partir de lipides endogènes. Dans les capillaires sanguins, ces VLDL sont délipidées par la LPL formant des IDL puis des LDL ultérieurement endocytés par le foie et les cellules extra-hépatiques. Les acides gras libres issus de la dégradation des chylomicrons résiduels ou des VLDL sont absorbés par les cellules extra-hépatiques. La voie de transport reverse du cholestérol a comme origine la synthèse de HDL natives par le foie et l'intestin. Après l'action de la « lecithin-cholesterol acyl transferase » (LCAT), les HDL natives discoïdales deviennent des HDL sphériques qui pourront être absorbées par le foie. Cette voie de transport permet de maintenir l'homéostasie du cholestérol puisque les HDL sont capables d'extraire le cholestérol des membranes cellulaires des tissus extra-hépatiques et de le ramener au foie. Les échanges d'apolipoprotéines entre les HDL et les chylomicrons, et entre les chylomicrons résiduels et les IDL, sont symbolisés par une double flèche.

La voie de transport exogène correspond au transport des lipides et des vitamines liposolubles d'origine alimentaire. Ce transport est effectué par les chylomicrons. Les lipides endogènes sont pour leur part transportés dans la circulation sanguine sous la forme de VLDL synthétisées dans le foie. Ces lipoprotéines sont pauvres en apoC-II et en apoE essentielles à leur dégradation et leur capture par les tissus. Ces apolipoprotéines échangeables sont acquises dans le sang, après leur sécrétion, grâce aux HDL qui constituent un véritable réservoir de cholestérol, d'apoC-I, d'apoC-II et d'apoE. Ces échanges ont également été observés chez les poissons Téléostéens.

Une fois dans les capillaires sanguins, les lipoprotéines sont hydrolysées par la lipoprotéine lipase (LPL) qui est activée par l'apoC-II (Santamarina-Fojo et Brewer, 1994 ; Goldberg, 1996). Une lipoprotéine lipase a été identifiée chez le poisson zèbre (Arnault *et al.*, 1996). Elle est différente de la lipoprotéine lipase humaine dans la mesure où l'exon 10 est traduit. La liaison de la LPL avec la lipoprotéine est renforcée par celle de l'apoE avec les héparanes sulfates situés à la surface des cellules endothéliales. Les acides gras formés par cette hydrolyse sont absorbés par les cellules extra-hépatiques alors que les lipoprotéines sont progressivement transformées en chylomicrons résiduels dans le cas des chylomicrons ou en LDL dans le cas des VLDL. Chez l'Homme, les LDL sont les principaux transporteurs du cholestérol dans la circulation sanguine. Les lipoprotéines issues de cette délipidation sont ensuite endocytées par le foie ainsi que par d'autres organes périphériques dans le cas des LDL grâce à la présence de récepteurs membranaires spécifiques. Les lipoprotéines sont reconnues par ces récepteurs grâce à l'apoB-100 et/ou l'apoE qu'elles contiennent. Ainsi, les récepteurs aux LDL qui possèdent une affinité similaire pour l'apoB-100 et pour l'apoE se différencient des récepteurs apparentés au récepteur aux LDL, nommés LRP (« LDL receptor-related protein ») qui lient uniquement l'apoE (Havel, 1995). Le récepteur aux LDL est une glycoprotéine de 839 acides aminés. Ce récepteur ainsi que les récepteurs apparentés, les LRP, sont constitués de quatre unités structurales et se distinguent par le nombre de répétitions du domaine de liaison (Takahashi *et al.*, 1992 ; Takahashi *et al.*, 2004).

L'apoB-48 ne possède pas le domaine de liaison au récepteur aux LDL et n'est donc pas reconnue par ce dernier. Les chylomicrons résiduels sont endocytés par les cellules hépatiques grâce à leur liaison aux LRP qui s'effectue via l'apoE. Le domaine de liaison au récepteur contenu dans l'apoE a été caractérisé puis cristallisé en 1991 avec une résolution de 2,5 Å (Wilson *et al.*, 1991). Ce domaine est situé en partie N-terminale de l'apoE et il est organisé en hélices α . Les lipoprotéines liées à ces récepteurs sont endocytées par la formation d'une vésicule de clathrine. Une fusion de cette vésicule avec un endosome

provoque un abaissement du pH dans la vésicule et par là même une rupture de la liaison récepteur-ligand. Les récepteurs sont recyclés et transportés à la membrane plasmique afin de fixer de nouvelles lipoprotéines (Davis *et al.*, 1987) alors que les lipoprotéines endocytées sont dégradées par les enzymes lysosomales en acides aminés, en acides gras et en cholestérol libre après la fusion de la vésicule avec des lysosomes (Brown et Goldstein, 1986). L'incapacité de l'apoB-100 à se lier au récepteur aux LDL aboutit à une hypercholestérolémie due à l'accumulation des LDL dans les vaisseaux sanguins. La diminution de l'affinité de l'apoB-100 pour le récepteur aux LDL peut être provoquée par une mutation dans le domaine de liaison au récepteur aux LDL et notamment par celle de l'arginine 3500 (Higgins *et al.*, 1975 ; Innenarity *et al.*, 1987 ; Rauh *et al.*, 1992) .

La troisième voie de transport des lipides est appelée voie de transport réverse du cholestérol. Elle permet le maintien de l'homéostasie du cholestérol. Cette voie correspond à la synthèse des HDL natives, de forme discoïdale, par les hépatocytes et les entérocytes. Ces lipoprotéines sont caractérisées par la présence d'apoA-I comme constituant majoritaire capable d'activer la « lecithin-cholesterol acyl transferase » (LCAT) qui estérifie, dans l'espace plasmatique, les molécules de cholestérol libre et transforme ainsi les HDL natives en HDL matures. Dans le langage courant, les HDL correspondent au « bon cholestérol ». En effet, les HDL sont capables d'extraire le cholestérol des membranes cellulaires des tissus périphériques et de le convertir en esters de cholestérol grâce à la LCAT. Ces esters de cholestérols peuvent être transférés aux VLDL ainsi qu'à d'autres lipoprotéines par l'intermédiaire de la « cholesteryl ester transfer protein » (CETP) (Barter, 2002). L'endocytose des HDL par le foie fait intervenir un récepteur spécifique aux HDL (Graham et Oram, 1987 ; Fidge, 1999) qui participe à la régulation de la cholestérolémie en recyclant le cholestérol contenu dans les cellules extra-hépatiques. Chez le poisson zèbre, des récepteurs aux lipoprotéines ont été caractérisés, comme le récepteur aux HDL (Chen *et al.*, 2003).

Les acides gras formés lors de la dégradation des lipoprotéines peuvent également être pris en charge par l'albumine sérique dans la circulation sanguine. L'albumine sérique est une protéine de 65 kDa qui représente environ 20 % des protéines plasmatiques des poissons Téléostéens (Babin, 1987a ; Babin, 1987b). Chez la truite brune (*Salmo trutta*), l'albumine est glycosylée comme chez les agnathes et les amphibiens et contrairement aux reptiles et aux mammifères (Metcalf *et al.*, 1998). Certains poissons comme la légine antarctique (*Dissostichus mawsoni*) n'ont pas d'albumine dans leur plasma (Metcalf *et al.*, 1999a). Chez ce poisson ainsi que chez certaines anguilles (*Anguilla dieffenbachii* et *Anguilla australis schmidtii*), le transport des acides gras n'est pas réalisé par l'albumine mais par les

lipoprotéines à haute densité, les HDL, qui lieraient les acides gras non estérifiés comme le palmitate dans le sang (Metcalf *et al.*, 1999a ; Metcalf *et al.*, 1999b). Ceci est assez distinct des mammifères puisque les acides gras non estérifiés sont principalement transportés par l'albumine sérique. La concentration en albumine est en moyenne deux fois plus élevée dans le plasma des mammifères que dans celui des poissons (Babin et Vernier, 1989). Elle représente les deux tiers des protéines plasmatiques dans l'espèce humaine (Dugaiczky *et al.*, 1982).

V. Les objectifs

Les acteurs moléculaires du métabolisme des lipoprotéines et plus particulièrement celui de la synthèse et de la sécrétion des lipoprotéines riches en triglycérides sont peu connus chez les poissons. L'étude du métabolisme lipidique est pourtant d'une importance capitale pour la connaissance fondamentale des mécanismes d'utilisation des lipides chez ces animaux. A titre d'exemple, les processus de formation transitoire des gouttelettes lipidiques cytosoliques par les entérocytes de poissons pourraient être élucidés et servir de base pour mieux comprendre un tel processus dans les entérocytes des mammifères. Ces gouttelettes sont régulièrement observées après l'ingestion des aliments chez les poissons et leur présence transitoire a été attribuée à la lenteur de l'absorption des lipides chez ces vertébrés par rapport aux mammifères ou à une composition lipidique du régime alimentaire inadaptée. De plus, une meilleure connaissance du métabolisme lipidique et lipoprotéique chez les poissons Téléostéens permettrait d'apprécier l'évolution d'un tel métabolisme chez les vertébrés. Enfin, la description de ce métabolisme est une étape indispensable à la connaissance des besoins nutritionnels des poissons d'élevage. En aquaculture, elle faciliterait la mise au point d'aliments adaptés et améliorerait les conditions d'élevage (Zambonino-Infante et Cahu, 2001). En effet, les poissons d'élevage adultes sont actuellement nourris à l'aide d'aliments synthétiques essentiellement composés de farine et d'huile de poissons. Face à l'appauvrissement grandissant des réserves halieutiques, un enjeu majeur de l'aquaculture concerne la substitution de ces éléments d'origine marine par des huiles et des protéines végétales. Cette substitution n'est pas sans contrainte puisque, outre les besoins nutritionnels essentiels pour la survie des poissons, l'utilisation d'aliments d'origine végétale apporterait une moins grande quantité d'acides gras polyinsaturés de la série (n-3) connus pour abaisser les risques de maladies cardiovasculaires chez l'Homme. De plus, la phase de nutrition mixte des larves de nombreuses espèces de poissons est un point critique. En effet, une forte mortalité des larves est observée lors des premières prises alimentaires lorsque des aliments synthétiques sont substitués aux proies vivantes, telles les artémies ou les rotifères. Une meilleure connaissance du métabolisme des lipoprotéines et de sa régulation est donc essentielle à l'élaboration d'aliments parfaitement adaptés aux larves et aux adultes des poissons d'élevage.

Au cours de notre travail, nous avons choisi d'utiliser le poisson zèbre comme modèle d'étude de part les nombreux avantages qu'il procure. De plus, ce poisson est

considéré comme un très bon modèle pour l'étude du métabolisme des lipides (Babin *et al.*, 1997). Par exemple, la larve de poisson zèbre achemine les lipides à travers l'intestin et le système hépatobiliaire et répond aux hypocholestérolémiants de façon similaire aux mammifères (Farber *et al.*, 2001).

Nous nous sommes donc concentrés sur les processus moléculaires d'assemblage des lipoprotéines riches en triglycérides du poisson zèbre, totalement méconnus avant de commencer ce travail. Chez les mammifères, les lipoprotéines riches en triglycérides sont composées majoritairement d'apoB. Les triglycérides, les esters de cholestérol et les phospholipides sont transférés sur cette protéine en cours de traduction par la MTP, complexe hétérodimérique composé d'une petite sous-unité, la PDI, et d'une grande sous-unité.

- Dans un premier temps, nous avons voulu savoir si **des transcrits codant pour ces protéines sont exprimés chez le poisson zèbre**. Pour cela, nous avons recherché des séquences codant pour ces protéines chez le poisson zèbre. Puis, à l'aide de ces séquences, nous avons cloné les transcrits correspondants. La caractérisation et l'identification de leurs gènes ont été réalisées.

- Nous nous sommes ensuite demandés si l'**apoB tronquée dans le domaine de liaison au récepteur aux LDL** identifiée chez le saumon (Babin *et al.*, 1995) et chez le poisson zèbre (cette étude) est **spécifique aux poissons**.

- Nous avons ensuite voulu savoir si **l'expression tissulaire de ces gènes est semblable à celle des mammifères**. Ainsi, leur profil d'expression a été suivi chez l'embryon, la larve et l'adulte de poisson zèbre.

- Nous nous sommes demandés si **le niveau d'expression de ces gènes pouvait être régulé par la prise alimentaire et par la composition lipidique de l'aliment**.

- Enfin, nous avons voulu savoir si **la présence des gouttelettes lipidiques** cytosoliques après la prise alimentaire pouvait être expliquée par une capacité limitée de transfert des lipides sur l'apoB. Nous avons alors initié, en collaboration avec le Dr Paul Rava et le Pr Mahmood Hussain à (Brooklyn, USA), des études afin de mesurer l'activité de transfert de la grande sous-unité de la MTP de poisson zèbre.

MATERIEL ET METHODES

I. L'élevage des poissons zèbres.

A. Les conditions d'élevage.

Les poissons zèbres sont élevés, à raison d'une vingtaine d'animaux par bac, en aquarium contenant 36 litres d'eau osmose inverse à laquelle sont ajoutés 0,1 g/l de sels de mer synthétiques (Instant Océan, Aquarium system) et 0,1 g/l de sulfate de calcium (Prolabo). La température de l'eau est maintenue constante à 28°C. Les poissons sont soumis à un cycle photopériodique long alterné de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Femelles et mâles sont séparés et sont nourris quotidiennement avec un aliment complet (TetraMin, Tetra GmbH).

B. L'obtention d'embryons et de larves.

Les embryons sont obtenus en groupant mâles et femelles le soir dans un même bac contenant un filet afin d'empêcher les géniteurs de dévorer les œufs. Les ovocytes pondus en grand nombre par les femelles après émission de la lumière, sont fécondés de façon externe.

Après l'ouverture de la bouche, vers 5 jpf, les larves sont nourries quotidiennement à volonté avec du jaune d'œuf de poulet déshydraté jusqu'à l'âge de 15 jours. Elles sont ensuite nourries avec un mélange de jaune d'œuf et de paillettes TetraMinBaby (Tetra GmbH) puis uniquement avec des paillettes TetraMin (Tetra GmbH).

C. L'obtention de larves dépigmentées.

Afin d'obtenir des larves totalement dépigmentées, les embryons sont élevés dès la fécondation et ceci jusqu'au prélèvement dans de l'eau contenant 0,2 mM de phényl-1-thio-2-urée (PTU) (Sigma), comme préconisé (http://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html).

D. Les expériences de nutrition.

Pour les expériences de suivi de l'effet de la prise alimentaire sur l'expression des gènes, les larves et les poissons adultes sont mis à jeun pendant 18 h puis séparés en deux lots. Le premier lot est maintenu à jeun pendant que le second est nourri pendant 2 h ou 2,5 h selon qu'il s'agisse de larves ou d'adultes. Les prélèvements des lots sont concomitants.

E. Les prélèvements.

Les embryons et les larves sont prélevés selon leurs stades de développement rapportés à la table de développement définie par Kimmel *et al.*, (1995). Pour les expériences d'hybridation *in situ in toto*, les embryons âgés de moins de 48 hpf sont préalablement libérés de leur chorion à l'aide de pinces fines. Les organes adultes sont prélevés après dissection du poisson zèbre préalablement anesthésié dans une solution de 2-phénoxyéthanol 99% (Acros Organics) diluée au 1/2000^{ème} dans de l'eau.

Les embryons, larves et organes utilisés pour les hybridations sont plongés entiers dans une solution de fixation contenant 4% de paraformaldéhyde (Prolabo) dissout dans du PBS 1x (PAF 4%, Annexe 1). Les échantillons sont placés une nuit à 4°C avant d'être rincés 2 fois 10 min dans du PBS 1x (Annexe 1) puis 2 fois 10 min dans du méthanol (Prolabo) dans lequel ils seront conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

Les embryons, larves entières et organes dont seront extraits les ARN totaux sont congelés dans l'azote liquide directement après le prélèvement et y sont conservés jusqu'à leur utilisation. Plus d'une cinquantaine d'embryons ou de larves correspondant à un volume de 50 µl sont prélevés par tube. Les échantillons d'ovaire, de cerveau, de foie et d'intestin sont prélevés sur deux animaux par tube alors que le cœur, les reins et les testicules sont collectés sur dix animaux pour chaque tube.

II. Les méthodes de biologie moléculaire.

A. Les Souches bactériennes et les plasmides.

Le clonage des fragments d'ADN d'intérêt insérés dans le plasmide pGEMT-Easy (Promega) ou pBluescript SK⁻ est effectué par les bactéries *Escherichia coli* MRF' XL1-Blue. La souche bactérienne C600*hflA* a permis l'amplification des bactériophages λgt10 (Annexe 2).

B. L'extraction des ARN totaux.

Les embryons, larves et organes de poissons zèbre adultes prélevés et congelés dans l'azote liquide sont broyés afin d'extraire les ARN totaux. Le kit d'extraction NucleoSpin[®] RNA II (Macherey-Nagel) a été utilisé en suivant les instructions recommandées par le fournisseur. Les ARN totaux sont réhydratés dans 50 µl d'eau dépourvue de nucléase. Un dépôt sur gel Borax (Annexe 3) est effectué afin d'apprécier la qualité et d'estimer la quantité des ARN totaux extraits par comparaison avec l'intensité du marqueur de taille ARN (Promega).

C. Le Northern blot.

La méthode de Reed et Mann (1985) a été utilisée. Des ARN totaux (10 µg) extraits du foie et de l'intestin antérieur de femelles nourries pendant 2,5 h sont séparés par migration dans un gel Borax (Annexe 3) avant d'être transférés sur une membrane en nylon HybondTM-N (Amersham). Le fragment MTP-884pb sert de matrice pour la synthèse de la sonde ADN radioactive marquée par l'incorporation d' α -[³²P]-dATP et réalisée grâce à des amorces nonamériques randomisées. Le kit NonaPrimers Kit I (Qbiogene) est utilisé en suivant les instructions recommandées par le fabricant. L'hybridation est effectuée une nuit à 42°C dans un tampon HYBE (Annexe 5) contenant 50% de formamide (Sigma). L'exposition de la membrane sur le film Kodak X-OMATTM AR dure 5 jours à -80°C puis le film est révélé.

D. La transcription inverse ou Rétro-Transcription (RT).

Les ARN totaux extraits sont rétro-transcrits en ADN complémentaires (ADNc) afin d'effectuer des amplifications par RT-PCR et par RT-PCR quantitative en temps réel (RT-PCRq).

1- La transcription inverse pour les RT-PCR.

Les transcriptions inverses permettant la synthèse des ADNc destinés à l'amplification de séquences par RT-PCR sont réalisées avec 1,5 µg d'ARN totaux, 500 ng d'oligodT (Tableau 3), 1 mM de dNTP (Promega), 10 mM de DTT (Promega), 20 u/µl d'ADN polymérase ARN dépendante M-MLV Superscript II Reverse Transcriptase RNase H Minus (Gibco BRL) et 1x de tampon de transcription correspondant (Gibco BRL). Après une

dénaturation des ARN totaux de 10 min à 70°C, le mélange réactionnel est ajouté et incubé 2 h à 42°C. La réaction est arrêtée par un passage de 10 min à 65°C et les ADNc sont conservés à -20°C.

2- La transcription inverse pour les amplifications rapides des extrémités des ADNc (RACE-PCR).

Afin d'amplifier la partie 5' des ADNc, une transcription inverse est réalisée à l'aide du kit BD SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) avec 1 µg d'ARN totaux, 500 ng d'amorce oligodT, 1 µM d'amorce Smart II (Tableau 3), 1 mM de dNTP (Promega), 10 mM de DTT (Promega), 20 u/µl d'ADN polymérase ARN dépendante M-MLV Superscript II Reverse Transcriptase RNase H Minus (Gibco BRL) et 1x de tampon de transcription correspondant (Gibco BRL).

3- La transcription inverse pour la RT-PCRq.

Les ADNc destinés aux amplifications par RT-PCRq sont synthétisés en utilisant 1 µg d'ARN totaux, 500 ng d'oligodT (Tableau 3), 500 ng d'amorces hexamériques dégénérées (Promega), 1 mM dNTP (Promega), 10 mM DTT (Promega), 20 u/µl d'ADN polymérase ARN dépendante M-MLV Superscript II Reverse Transcriptase (Promega) et 1x de tampon de transcription correspondant (Promega). Les ARN totaux auxquels ont été ajoutés les oligodT et les amorces hexamériques sont placés 10 min à 70°C afin de casser les structures secondaires avant d'être refroidis, ajoutés au reste du mélange réactionnel et incubés 1 h 30 à 42°C. La réaction est arrêtée par un passage de 10 min à 65°C et les ADNc sont conservés à -20°C.

E. Les amplifications par RACE-PCR et RT-PCR.

Toutes les amorces utilisées sont référencées dans le Tableau 3.

<i>Nom</i>	<i>Séquence</i>	<i>Taille (pb)</i>	<i>Tm</i>	<i>Brin</i>	<i>Position</i>
Amorces pour la MTP de poisson zèbre (AJ428850)					
MTP-1	5' GCCTCTGAAGTGCCTCAAGCCTGACTT 3'	27	74°C	(-)	404-431
MTP-2	5' TGGCCTGGAGGAACCCTG 3'	18	68°C	(+)	266-284
MTP-4	5' ATCCACCAGCTGRGGBAG 3' R=A+G, B=G+T+C	18	58°C	(-)	1132-1150
MTP-6	5' CCGCGCAGCTTCTGACGCTC 3'	21	77°C	(+)	1042-1063
MTP-S	5' GAGGCCACGCTGGATTTCAT 3'	20	68°C	(+)	2488-2508
MTP-R	5' TTGGACACCGTCTCTCTGAAG 3'	21	64°C	(-)	2574-2595
Amorces pour les apoB de poisson zèbre					
apoBα-7	5' AACCCAGAGAAGCACACA 3'	18	54°C	(+)	9344-9361
apoBα-2	5' CCATCTTCAGTCCTCTCC 3'	18	56°C	(-)	9975-9992
apoBα-S	5' CCTGGAGTACAACCTTAGATGCAA 3'	23	62°C	(+)	11668-11690
apoBα-R	5' AGCGTATGTCGTGAGGGAC 3'	19	63°C	(-)	11829-11847
apoBβ1-6	5' ACTGACTTCGACCAGGCC 3'	18	58°C	(+)	8959-8976
apoBβ1-8	5' CGTACGAGTTCCTTCGCC 3'	18	58°C	(-)	9460-9477
apoBβ1-S	5' GATCTTGACAGGTCCATGAGTTCTA 3'	25	64°C	(+)	10045-10069
apoBβ1-R	5' AGTGAAGTCCTGATGTGTAAGTACA 3'	25	64°C	(-)	10107-10131
apoBβ2-S	5' GAGATTGGCATGGAGGGTAAGGG 3'	23	70°C	(+)	1585-1607
apoBβ2-R	5' AACGCAAAGTCCCCCATGCCT 3'	21	72°C	(-)	2109-2129
Amorces pour l'apoBβ de saumon (X81856)					
BP-34	5' GATTCCAAGATCCTGTACCAGA 3'	22	61°C	(+)	1312-1334
BP-39	5' TGCCTCAACAGCCAGGTTCTC 3'	21	68°C	(-)	2014-2035
Amorces pour les standards EF1α (L23807) et β-actine (NM 131031)					
EF1α-S	5' CGTCTGCCACTTCAGGATGTG 3'	21	68°C	(+)	798-819
EF1α-R	5' ACTTGCAGGCGATGTGAGCAG 3'	21	70°C	(-)	1153-1174
β-actine-S	5' ATGGATGAGGAAATCGCTGCCCTGGTC 3'	27	77°C	(+)	53-80
β-actine-R	5' CTCCCTGATGTCTGGGTCGTCCAAC 3'	25	74°C	(-)	155-180
Autres amorces					
oligodT	5' GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTT TTT 3'	35	74°C	(-)	-
Smart II	5' AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG 3'	29	80°C	(+)	-
UPM	5' CTAATACGACTCACTATAGGGC (AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT) 3'	22 (45)	79°C	(+)	-
T7	5' GTAATACGACTCACTATAGGGC 3'	22	56°C	(+)	-
Sp6	5' ATTAGGTGACACTATAGAATAC 3'	23	50°C	(-)	-

Tableau 3 : Amorces utilisées pour les amplifications par PCR, RT-PCR, RACE-PCR et RT-PCRq.

Les séquence, taille, température de fusion (Tm), orientation (Brin) et position des différentes amorces utilisées sont indiquées. La position est comptabilisée à partir du premier nucléotide de la séquence ADN du clone identifié dans les banques de données NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>) et dont le numéro d'accension est noté entre parenthèses. Les amorces sens (+) et antisens (-) sont orientées par rapport à la séquence 5'-3' du clone ayant servi à leur choix. L'amorce UPM (Universal Primer Mix) est un mélange de 2 séquences ayant une partie commune et une partie supplémentaire indiquée entre parenthèses.

1- Les amplifications rapides des extrémités des ADNc par PCR (RACE-PCR).

Les extrémités 5' et 3' (MTP-5' et MTP-3') de l'ADNc codant pour la MTP sont obtenues en effectuant des RACE-PCR. Pour cela, le kit Advantage[®] 2 PCR (Clontech) est utilisé avec 0,5 µM d'amorce, 200 µM de dNTP Mix, 1x de mélange Advantage[®] 2 ADN polymérase, 1x de tampon Advantage[®] 2 PCR et 4 µl d'ADNc. Pour le fragment MTP-5', les amorces MTP-1 et UPM (Universal Primer Mix) capable de s'hybrider sur la séquence inverse complémentaire de l'amorce SMART II ayant servi lors de la transcription inverse des ARN totaux sont utilisées. Le programme de PCR comporte une étape de dénaturation de 2 min à 94°C suivie de 5 cycles (94°C – 30 s, 72°C – 3 min) puis de 5 cycles (94°C – 30 s, 70°C – 30 s, 72°C – 3 min) et de 25 cycles (94°C – 30 s, 68°C – 30 s, 72°C – 3 min). Une étape de 2 min à 72°C termine la réaction.

Pour le fragment MTP-3', les amorces MTP-6 et oligodT sont utilisées avec un programme PCR contenant une étape de dénaturation de 2 min à 94°C suivie de 5 cycles (94°C – 30 s, 69°C – 30 s, 72°C – 2 min) et de 25 cycles (94°C – 30 s, 66°C – 30 s, 72°C – 2 min). Une étape d'élongation finale de 5 min à 72°C termine la réaction.

2- Les amplifications par RT-PCR.

Quel que soit le fragment à amplifier, les RT-PCR sont réalisées sur 4 µl d'ADNc avec 0,5 µM d'amorces, 2,5 mM de MgCl₂ (Promega), 250 µM de dNTP (Promega), 0,1 u/µl d'ADN polymérase Taq (Promega) et 1x de tampon correspondant (Promega) (Tableau 4).

F. Les PCR.

Les fragments d'ADN insérés dans un vecteur sont amplifiés par PCR en utilisant quelques nanogrammes de plasmide, 0,5 µM d'amorces, 2,5 mM de MgCl₂ (Promega), 250 µM de dNTP (Promega), 0,1 u/µl d'ADN polymérase Taq (Promega) et 1x de tampon adéquat (Promega). Les programmes utilisés sont similaires à ceux des RT-PCR (Tableau 5).

Fragment amplifié	Taille de l'amplifiat	Amorces utilisées	Programmes PCR
MTP-884pb	884 pb	MTP-2 MTP-4	94°C – 2 min 30 x (94°C – 30 s, 56°C – 20 s, 72°C – 30 s) 72°C – 2 min
apoBα-613pb	613 pb	apoB α -7 apoB α -2	94°C – 3 min 30 x (94°C – 30 s, 56°C – 30 s, 72°C – 45 s) 72°C – 2 min
apoBα-181pb	181 pb	apoB α -S apoB α -R	94°C – 3 min 30 x (94°C – 30 s, 60°C – 30 s, 72°C – 20 s) 72°C – 2 min
apoBβ1-496pb	496 pb	apoB β 1-6 apoB β 1-8	94°C – 3 min 30 x (94°C – 30 s, 58°C – 30 s, 72°C – 45 s) 72°C – 2 min
apoBβ1-87pb	87 pb	apoB β 1-S apoB β 1-R	94°C – 3 min 30 x (94°C – 30 s, 60°C – 30 s, 72°C – 20 s) 72°C – 2 min
apoBβ2-545pb	545 pb	apoB β 2-S apoB β 2-R	94°C – 3 min 30 x (94°C – 30 s, 60°C – 30 s, 72°C – 50 s) 72°C – 2 min
EF1α-376pb	376 pb	EF1 α -S EF1 α -R	94°C – 3 min 30 x (94°C – 30 s, 60°C – 30 s, 72°C – 20 s) 72°C – 2 min
β-actine-127pb	127 pb	β -actine-S β -actine-R	94°C – 3 min 30 x (94°C – 30 s, 66°C – 30 s, 72°C – 15 s) 72°C – 2 min

Tableau 4 : Amorces et programmes utilisés pour l'amplification des fragments par RT-PCR.

La taille de l'amplifiat, les amorces et les programmes de PCR utilisés sont indiqués pour chaque fragment d'ADN amplifié.

Fragment amplifié	Taille de l'amplifiat	Matrice	Amorces utilisées	Programmes PCR
MTP-RT-PCRq	107 pb	Clone MTP-3'	MTP-S MTP-R	94°C – 2 min 30 x (94°C – 30 s, 66°C – 30 s, 72°C – 30 s) 72°C – 2 min
apoBβ-saumon	613 pb		BP-34 BP-39	94°C – 3 min 30 x (94°C – 30 s, 60°C – 30 s, 72°C – 45 s) 72°C – 2 min

Tableau 5 : Amorces et programmes utilisés pour l'amplification des fragments par PCR.

La taille de l'amplifiat, la matrice, les amorces et les programmes de PCR utilisés sont indiqués pour chaque fragment d'ADN amplifié.

G. La purification des fragments d'ADN.

La qualité des produits d'amplification obtenus par PCR, RT-PCR, RACE-PCR et RT-PCRq est vérifiée par migration dans un gel TBE (Annexe 3). Afin de purifier les fragments d'ADN d'intérêt, une migration dans un gel TAE (Annexe 3) est effectuée. Les bandes de gel contenant les fragments d'ADN de taille attendue sont découpées puis purifiées.

Deux techniques de purification ont été utilisées. La première est l'utilisation de l'enzyme AgarACE® (Promega) permettant la digestion de l'agarose du gel TAE. La bande de gel est placée 10 min à 70°C afin de faire fondre l'agarose puis 5 min à 45°C avant d'ajouter 1,5 u pour 200 mg de gel d'AgarACE®. Le mélange est incubé 1 h à 45°C puis précipité ou non selon la quantité d'ADN. La seconde est l'utilisation du kit NucleoSpin® Extract (Macherey-Nagel) en suivant les instructions recommandées par le fournisseur. La quantité du fragment d'ADN purifié est estimée par migration dans un gel TBE et comparaison avec l'intensité du marqueur d'ADN (Eurogentec).

H. Les coupures et les enzymes de restriction.

Les principales endonucléases utilisées sont les enzymes de restriction *EcoRI*, *NotI*, *XhoI* et *XbaI* (Promega). La digestion du fragment d'ADN est réalisée à 37°C pendant 1 h 30 avec 0,4 u/μl d'enzyme, 1x de tampon correspondant (Promega) et 0,05 μg/μl de sérum albumine de bœuf (SAB, Promega). Le produit de digestion est ensuite migré dans un gel TBE (Annexe 3) afin de vérifier le fonctionnement de la coupure et d'estimer la quantité du fragment digéré par comparaison avec l'intensité du marqueur de taille ADN (Eurogentec).

I. La ligation.

Les vecteurs pGEMT-Easy et pBluescript SK⁻ (Annexe 2) ont été utilisés pour lier les fragments d'ADN. L'insertion des fragments PCR amplifiés par l'ADN polymérase ADN dépendante Taq dans le plasmide pGEMT-Easy est effectuée sans passer par une étape de digestion enzymatique. Quel que soit le vecteur utilisé et le fragment d'ADN, 0,1 u/μl d'enzyme T4 DNA ligase (Promega), 1x de tampon correspondant (Promega), 50 ng de plasmide et au moins 50 ng d'insert sont mélangés et incubés soit 2 h à température ambiante soit la nuit à 4°C. L'enzyme est inhibée par passage à 70°C pendant 5 min. Le produit de ligation est précipité en ajoutant ½ volume d'acétate d'ammonium 5M, pH 7,5 (Annexe 1) et 3 volumes d'éthanol 100% (Prolabo). Après 30 min d'incubation à -30°C et centrifugation à 12000 g pendant 20 min, le culot est rincé 2 fois en éthanol 75%, séché et dissout dans 10 μl d'eau.

J. La transformation bactérienne par électroporation.

La transformation bactérienne est effectuée par choc électrique d'après la technique décrite (Sambrook *et al.*, 1989). Les bactéries électrocompétentes sont préparées par des rinçages successifs en eau froide afin d'éliminer les sels contenus dans le milieu de culture. Le mélange de 5 µl de produit de ligature avec 50 µl de bactéries électrocompétentes est incubé 5 min dans la glace avant d'être transféré dans une cuve d'électroporation (Eurogentec). Le choc électrique est produit par un électroporateur Easyject (Eurogentec). Les bactéries sont récupérées dans du tampon SOC (Annexe 2) et incubées 1 h à 37°C avant d'être étalées sur milieu solide NZY agar (Annexe 2) contenant 50 µg/ml d'ampicilline (Sigma) et placées une nuit à 37°C.

K. La sélection colorée des clones et extraction plasmidique.

1- La sélection.

Les bactéries transformées sont étalées sur milieu solide NZY agar (Annexe 2) contenant 50 µg/ml d'ampicilline (Sigma), 8 mmol d'isopropylthio-β-D-galactoside (IPTG) (Sigma) et 2 mg de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (X-Gal) (Interchim) (Horwitz *et al.*, 1964). Les clones sont sélectionnés selon leur couleur grâce à l'α-complémentation de la β-galactosidase (Ullmann *et al.*, 1967). Les bactéries ayant incorporé un plasmide vide seront bleues puisqu'elles traduiront l'intégralité de la β-galactosidase et pourront libérer le composé chromogène contenu dans le X-gal. Celles ayant incorporé un plasmide contenant un insert seront Lac^Z et formeront des colonies blanches du fait de la création, par l'introduction de l'insert, d'un déphasage du cadre ouvert de lecture dans la séquence codant pour la partie N-terminale de la β-galactosidase.

Les colonies blanches sont sélectionnées et mises en culture liquide NZY contenant 50 µg/ml d'ampicilline (Sigma).

2- L'extraction plasmidique.

Une extraction plasmidique est dans un premier temps réalisée comme cela est décrit dans l'Annexe 4. Puis, pour les clones ayant un insert de la taille attendue, le plasmide est extrait grâce au kit NucleoSpin[®] Plasmid (Macherey-Nagel) avant d'être coupé par l'enzyme de digestion *EcoRI* (Promega) afin de le quantifier. Le plasmide est ensuite séquencé.

L. Le séquençage.

Le séquençage des clones est réalisé par l'entreprise Genome Express (<http://www.genomex.com>).

M. Le criblage d'une banque d'ADNc de foie de truite.

Le criblage d'une banque d'ADNc de foie de truite *Oncorhynchus mykiss* a été effectué d'après la technique décrite par Sambrook *et al.* (1989). La banque utilisée a une titration de 10^8 ufp/ml et les ADNc sont insérés au site *EcoRI* des bactériophages λ gt10. Les cellules qui ont servi à l'amplification des bactériophages sont les bactéries C600*hflA*.

Un volume de bactéries à DO_{600} de 0,5 est ajouté à $\frac{1}{2}$ volume de bactériophages dilués dans du tampon SM (Annexe 5). Ce mélange est incubé 10 min à température ambiante avant d'être placé 15 min à 37°C. Dix volumes de NZY contenant 0,7% d'agarose (Eurogentec) chaud (50°C) sont ajoutés et le tout est étalé sur milieu solide NZY agar (Annexe 2). La pousse bactérienne et la formation des plages de lyse se font à 37°C pendant une nuit. Pour le criblage primaire, une confluence suffisante des plages de lyse est obtenue avec $5 \cdot 10^5$ ufp. Ainsi, pour un étalement sur milieu solide NZY agar coulé dans des boîtes de 145 mm de diamètre, 2,5 μ l de bactériophages de la banque sont ajoutés à 300 μ l de tampon SM, 600 μ l de bactéries et 6 ml de NZY agarose (Annexe 2). Pour le criblage secondaire, les phages contenus dans les clones primaires positifs sont dilués 10^5 fois dans du tampon SM afin d'obtenir une centaine de plages de lyse par boîte de 90 mm. Ainsi, 100 μ l de phages dilués dans du tampon SM (Annexe 5) sont ajoutés à 200 μ l de bactéries et à 3 ml de NZY agarose avant d'être étalés sur milieu solide NZY agar.

La sonde ADN radioactive marquée par l'incorporation d' α -[32 P]-dATP est synthétisée à l'aide du NonaPrimers Kit I (Qbiogene S.A., France), en suivant les instructions recommandées. Des amorces nonamériques randomisées et 90 ng du fragment d'ApoB β -saumon servant de matrice ont été utilisés.

Pour le Southern blot, la technique décrite par Reed et Mann (1985) a été utilisée. Les membranes de nitrocellulose (Membrane Qbiogene Neutral, Qbiogene) sont déposées à sec sur les plages de lyse pendant 2 min puis sont placées 2 fois 5 min dans une solution contenant 0,5 N de NaOH (Annexe 1) et 1,5 M de NaCl (Annexe 1), 2 fois 10 min dans une solution contenant 0,5 M de Tris-HCl pH 7,5 (Annexe 1), 1,5 M de NaCl et 1 mM d'EDTA (Annexe 1) et enfin 10 min dans du SSC 5x (Annexe 1). Les membranes sont ensuite séchées

2 h à 80°C avant d'être utilisées pour l'hybridation. La préhybridation et l'hybridation sont réalisées dans des conditions hétérologues, c'est-à-dire à 37°C dans un tampon d'hybridation HYBE (Annexe 5) contenant 35% de formamide (Sigma). Ces étapes durent respectivement 1 h et la nuit. Après l'hybridation, les membranes sont rincées dans une solution de SSC 2x contenant 0,5% de sodium dodécyl sulfate (SDS) (Sigma) une fois rapidement puis 15 min et 30 min à température ambiante et enfin 10 min à 37°C. Elles sont ensuite exposées sur un film Kodak X-OMAT™ AR 5 jours à -80°C avant le développement de ce dernier.

Les clones primaires et secondaires positifs sont collectés et placés une nuit à 4°C dans 150 µl de tampon SM (Annexe 5) contenant 3% de chloroforme (Sigma) afin de dissocier les bactériophages de l'agar. Les bactériophages dissociés des clones secondaires positifs sont titrés par étalement à 2 dilutions, 10^{-2} et 10^{-1} , afin d'être extraits. Un étalement à confluence des bactériophages est réalisé sur milieu solide NZY supplémenté de 1,3% d'agarose (Eurogentec) coulé dans des boîtes de 145 mm afin d'obtenir la plus grande quantité possible de bactériophages. Ils sont extraits en ajoutant 12 ml de λ -diluant (Annexe 5) sur les plages de lyse sous agitation pendant 2 h à température ambiante. Le λ -diluant est recueilli et centrifugé 10 min à 4000 g à 4°C afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est conservé une nuit à 4°C après ajout de 0,3% de chloroforme (Sigma) afin de dissocier les bactériophages de l'agarose. Une nouvelle centrifugation est effectuée afin d'éliminer les possibles débris cellulaires restants et 3 u/ml de RNase A (Amresco®) sont ajoutées au surnageant avant qu'il soit placé 30 min à 37°C. L'ADN bactérien est ensuite dégradé par l'ajout de 0,1 u/ml de DNase RQI (Promega). Le mélange est incubé 15 min à 37°C. Un volume de tampon contenant 20% de polyéthylène glycol (Sigma) et 2 M de NaCl (Sigma, Annexe 1) dissous dans du λ -diluant est ajouté et le tout est incubé 1 h à 4°C avant d'être centrifugé 30 min à 12000 g à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot est séché avant d'être repris dans du tampon Tris EDTA (Annexe 5). Une étape de digestion des protéines est effectuée pendant 5 min à 37°C par addition de 10 µg/ml de protéinase K (Roche). Le mélange est centrifugé 2 min à 10000 g et 0,5% de SDS est ajouté au surnageant qui est alors incubé 10 min à 68°C avant l'addition de 50 mM de NaCl (Sigma). Une extraction phénol (Sigma) suivie d'une extraction phénol/chloroforme (Amresco) et de 2 extractions avec du chloroforme (Sigma) seul sont réalisées. Le mélange est précipité pendant 30 min à -80°C après l'addition d'un volume d'isopropanol (Sigma) et centrifugé 20 min à 10000 g. Le culot est lavé 2 fois avec 75% d'éthanol (Prolabo) puis repris en tampon Tris EDTA 0,5x.

La quantité de bactériophage est estimée par migration dans un gel TBE (Annexe 3) par comparaison avec l'intensité du marqueur de taille ADN (Eurogentec). Afin de connaître la taille de l'insert contenu dans le bactériophage et de le cloner, une coupure enzymatique par l'endonucléase *EcoRI* est réalisée. Le produit de cette coupure est chauffé 5 min à 65°C afin de séparer les 2 bras du bactériophage avant la migration dans un gel TAE (Annexe 3). La ou les bandes correspondant à l'insert sont découpées, purifiées et ligaturées dans le plasmide pBluescript SK⁻ préalablement coupé au site *EcoRI*. Les bactéries XL1-blue sont transformées, les clones blancs sont récoltés, une extraction plasmidique est réalisée et les inserts sont séquencés.

III. La RT-PCR quantitative en temps réel (RT-PCRq).

La RT-PCRq (Higuchi *et al.*, 1993) est une technique qui permet de quantifier de façon relative ou absolue un ADN présent dans un échantillon en suivant en temps réel son amplification. Le SYBR[®] Green (Morrison *et al.*, 1998) a servi de fluorochrome.

La quantification de l'expression du gène codant pour la grande sous-unité de la MTP a été suivie grâce à l'utilisation de l'iCycler iQ Real-Time PCR Detection System (BIO-RAD) au laboratoire de Biogenèse Membranaire, UMR-CNRS 5544, Université Victor Segalen, Bordeaux. Les données pour le gène *apoBβ1* ont été obtenues avec un appareil Mx3000P (Stratagene).

A. Les gènes de références.

Afin de normaliser l'expression des gènes codant pour la grande sous-unité de la MTP et pour l'*apoBβ1*, la quantification de l'expression des gènes codant pour le facteur d'élongation EF1 α et pour la β -actine sert de référence.

B. Les amorces.

Les amorces sont désignées spécifiquement pour la PCR quantitative (Tableau 3) avec l'aide du logiciel Primer3 (http://labtools.stratagene.com/PCRDes/Primer3/PRIMER3_0.php) afin que pas ou peu d'amorces ne s'hybrident entre elles et ne forment de dimères. L'amorce MTP-S est choisie à cheval sur les exons 17 et 18 afin d'éviter une amplification d'ADN génomique pouvant contaminer les échantillons. L'amorce MTP-R est située sur l'exon 18. L'amorce *apoBβ1*-S est choisie à cheval sur les exons 24 et 25 du gène *apoBβ1*, l'amorce

apoB β 1-R étant localisée sur l'exon 25. Les amorces EF1 α -S et EF1 α -R sont désignées sur l'exon 5 et l'exon 7, respectivement. Les amorces β -actine-S et β -actine-R sont localisées sur le même exon.

C. Les réactions PCR.

Les amplifications sont réalisées avec 4 μ l d'ADNc dilué au 1/20, 0,5 μ M d'amorces et 1x d'iQ SYBR Green Supermix (BIO-RAD). L'efficacité de la PCR et le coefficient de corrélation sont supérieurs à 95% et à 0,95 pour chaque cible. Les programmes de RT-PCRq utilisés sont indiqués dans le Tableau 6. La courbe de fusion est obtenue en pratiquant une augmentation de la température de 0,5°C tous les 2 cycles et ceci pendant 80 cycles.

Fragment amplifié	Taille de l'amplifié	Amorces utilisées	Programmes RT-PCRq
MTP-RT-PCRq	107 pb	MTP-S MTP-R	95°C – 10 min 35 x (95°C – 30 s, 62°C – 30 s) 95°C – 1 min 55°C – 30 s Courbe de fusion
apoBβ1-RT-PCRq	87 pb	apoB β 1-S apoB β 1-R	95°C – 10 min 30 x (95°C – 30 s, 63°C – 30 s, 72°C – 30 s) 95°C – 1 min 55°C – 30 s Courbe de fusion
EF1α-RT-PCRq	376 pb	apoB α -S apoB α -R	95°C – 10 min 30 x (95°C – 30 s, 63°C – 30 s, 72°C – 30 s) 95°C – 1 min 55°C – 30 s Courbe de fusion
β-actine-RT-PCRq	127 pb	β -actine-S β -actine-R	95°C – 10 min 30 x (95°C – 30 s, 65°C – 30 s) 95°C – 1 min 55°C – 30 s Courbe de fusion

Tableau 6 : Amorces et programmes utilisés pour l'amplification des fragments par RT-PCRq.

La taille de l'amplifié, les amorces et les programmes de RT-PCRq utilisés sont indiqués pour chaque fragment d'ADN amplifié.

D. Les contrôles.

Les contrôles utilisés sont des transcriptions inverses négatives (RT⁻) et les contrôles sans matrice (NTC). Les RT⁻ sont synthétisées en parallèle des transcriptions inverses mais l'ADN polymérase ARN dépendante est omise. Elles sont un contrôle de la transcription

inverse et permettent de révéler une amplification d'ADN génomique contaminant. Les NTC sont les contrôles négatifs de la PCR et correspondent à l'ajout d'eau à la place de l'ADNc. Aucune amplification n'a été observée pour les contrôles négatifs NTC et RT⁻.

E. Les courbes standard.

Une courbe standard d'amplification pour chaque cible est réalisée en utilisant des dilutions sériées de 2.10^7 à 2.10^2 molécules de plasmide contenant l'insert cible. Ces courbes représentent le cycle seuil (C_T) en fonction du logarithme du nombre de copies du plasmide. Les valeurs de C_T obtenues pour les échantillons sont alors reportées sur cette droite et le nombre de copies de la cible est déterminé.

F. Les analyses statistiques.

Les amplifications sont réalisées sur 3 échantillons indépendants dans le cas du suivi de l'expression au cours du développement et de la distribution tissulaire chez l'adulte. Pour les expériences d'effet de la prise alimentaire sur le niveau d'expression, 7 échantillons indépendants ont été utilisés. Les valeurs obtenues sont exprimées en tant que la moyenne \pm la déviation standard (SD) du rapport (nombre de copies du gène cible/nombre de copies du gène de référence) x 100.

Une analyse de variance (One way ANOVA) suivi d'un test multiple Tukey-Kramer ont été employés pour déterminer si les différences d'expression au cours du développement et la distribution tissulaire des transcrits sont statistiquement significatives. Un test Mann-Whitney (GraphPad InStat v 3.5, GraphPad Software) est utilisé dans les expériences d'effet de la prise alimentaire sur l'expression du gène codant pour la grande sous-unité de la MTP. La valeur choisie pour qu'une différence soit considérée comme significative est $p \leq 0,05$.

IV. La détection de l'expression génique par hybridation *in situ*.

L'hybridation *in situ* est une technique qui permet de localiser l'expression d'un gène cible par l'utilisation de sondes ARN marquées à la digoxigénine complémentaires de l'ARNm de ce gène. La présence et la localisation de ces ARNm sont identifiées par révélation colorée de la sonde hybridée.

Afin de déterminer le profil d'expression spatio-temporel des gènes codant pour la grande sous-unité de la MTP et les apoB, l'hybridation *in situ in toto*, autrement dit sur l'animal entier, a été utilisée au cours du développement du poisson zèbre. Le suivi de l'expression de ces gènes chez l'adulte a été réalisé par hybridation sur coupes contenant les organes d'intérêt.

A. La synthèse des sondes ARN marquées à la digoxigénine.

Les clones MTP-884pb, apoB α -613pb et apoB β 1-496pb ont été utilisés comme matrice afin de synthétiser les sondes ARN d'hybridation correspondantes. Les sondes ARN sont marquées par l'incorporation de dUTP couplés à la digoxigénine lors de leur transcription par des ARN polymérases ADN dépendantes. Elles sont synthétisées à partir d'un fragment de l'ADNc du transcrit étudié inséré entre les promoteurs T7 et Sp6 du plasmide pGEMT-Easy afin d'utiliser les ARN polymérases ADN dépendantes T7 et Sp6.

Afin d'identifier quelle ARN polymérase ADN dépendante permettra de transcrire la sonde antisens ou sens, les fragments sont orientés par rapport aux promoteurs T7 et Sp6 par séquençage. Cette orientation est la même pour la grande sous-unité de la MTP et les apoB. L'ARN polymérase T7 est utilisée pour la synthèse des sondes antisens et l'ARN polymérase Sp6 pour celle des sondes sens (Annexe 6). Le fragment contenu entre les promoteurs Sp6 et T7 est dans un premier temps amplifié par PCR en utilisant les amorces Sp6 et T7 (Tableau 3) comme décrit précédemment. Le programme PCR utilisé comporte une étape de dénaturation de 2 min à 94°C suivie de 30 cycles (94°C – 30 s, 56°C – 30 s, 72°C – 45 s) et se termine par une élongation de 2 min à 72°C. Le produit PCR est ensuite purifié et sa quantité est estimée après migration dans un gel TBE (Annexe 3).

La synthèse des sondes est effectuée en 20 μ l avec 200 à 500 ng de fragment PCR Sp6/T7, 1 u/ μ l de RNase Inhibitor (Promega), 2 mM de DTT (Promega), 2 μ l de « Dig labeling mix » (Roche), 1 u/ μ l d'ARN polymérase ADN dépendant T7 ou Sp6 (Promega), 1x de tampon adéquat (Promega) et de l'eau. La réaction de transcription est réalisée à 37°C pendant 3 h avec ajout de 10 unités supplémentaires d'ARN polymérase à mi-parcours. Elle est arrêtée par incubation à 65°C pendant 10 min. Les sondes sont ensuite purifiées grâce au kit NucleoSpin[®] RNA II (Macherey-Nagel) en suivant les instructions du fournisseur. Leur qualité et leur quantité sont estimées par migration dans un gel Borax (Annexe 3) en comparant l'intensité de la bande avec celle du marqueur ARN (Promega).

B. L'hybridation in situ in toto.

Afin de localiser l'expression des gènes codant pour la grande sous-unité de la MTP et les apoB au sein d'un animal entier, des hybridations *in situ in toto* ont été réalisées d'après la technique décrite par Thisse *et al.* (1993) (http://zfin.org/zf_info/zfbook/chapt9/9.82.html).

1- La préparation des échantillons.

Les embryons et larves conservés dans du méthanol 100% sont réhydratés par passage de 5 min dans des bains décroissants de méthanol (75%, 50%, 25%) dilué dans du PBS 1x puis ils sont rincés 4 fois 5 min dans du tampon PBST (Annexe 6). Ils sont ensuite placés, afin d'être perméabilisés, dans une solution de PBST contenant de la protéinase K (Roche) (Ebeling *et al.*, 1974) à 10 µg/ml pour les embryons et larves de moins de 48 hpf et de 20 µg/ml pour les larves de plus de 48 hpf. Le temps de traitement à la protéinase K varie selon le stade de développement (Tableau 7).

Après rinçage de 5 min en tampon PBST, les échantillons sont fixés 20 min dans une solution de PAF 4% (Annexe 1). Ils sont ensuite trempés dans 2 bains de tampon PBST de 10 min puis rincés rapidement en eau avant d'être déposés 5 min dans un tampon triéthanolamine (Annexe 6) seul puis 2 fois 5 min dans du tampon triéthanolamine contenant 0,25% d'anhydride acétique (Sigma). Suivent deux rinçages de 5 min dans du tampon PBST. Parallèlement aux échantillons destinés à l'hybridation, un certain nombre d'embryons et de larves sont traités de la même manière avant d'être incubés une nuit à 4°C dans une solution de blocage (Annexe 6) contenant 1/500^{ème} de fragments Fab d'anticorps anti-DIG couplés à la phosphatase alcaline (anti-digoxigenin-AP Fab Fragments, Roche). Le mélange est ensuite centrifugé 3 min à 4000 g afin de récupérer le surnageant contenant la solution de fragments de Fab anti-DIG diluée au 1/500^{ème}. Cette opération permet de diminuer la fixation non spécifique ultérieure de l'anticorps.

<i>Stade de développement</i>	<i>Temps de traitement</i>	<i>Concentration finale en Protéinase K</i>
< 3 hpf	30 s	10 µg/ml
4-6 hpf	1 min	10 µg/ml
7-8 hpf	2 min	10 µg/ml
9-10 hpf	5 min	10 µg/ml
12 hpf	10 min	10 µg/ml
16 hpf	15 min	10 µg/ml
24-48 hpf	20 min	10 µg/ml
72 hpf	20 min	20 µg/ml
4-5-6 jpf	25 min	20 µg/ml
8 jpf	30 min	20 µg/ml
15 jpf	35 min	20 µg/ml

Tableau 7 : Temps de traitement et concentration en protéinase K utilisés afin de perméabiliser les embryons et les larves de poisson zèbre en fonction de leur stade de développement.

Deux concentrations en protéinase K ont été utilisées selon le stade de développement des embryons et des larves. Le temps de perméabilisation varie également en fonction de l'âge des embryons et des larves. Les stades de développement sont décrits en heures post-fécondation (hpf) et en jours post-fécondation (jpf).

2- La préhybridation, l'hybridation et les rinçages.

La température de préhybridation et d'hybridation varie selon le stade de développement et les sondes. Ainsi, pour le suivi de l'expression du gène codant pour la grande sous-unité de la MTP, les hybridations ont été réalisées à 62°C pour les embryons et larves de moins de 4 jpf et à 60°C pour les larves de plus de 5 jpf. Les hybridations révélant l'expression des gènes codant pour les apoB ont été faites à 61°C pour les embryons et larves de moins de 48 hpf et à 60°C pour les larves de plus de 3 jpf.

Les échantillons sont placés 2 à 4 h dans du tampon d'hybridation HB (Annexe 6) à la température d'hybridation puis les sondes sens et antisens sont ajoutées à raison de 100 ng/ml de tampon HB après avoir été dénaturées pendant 5 min à 70°C et refroidies sur la glace. L'hybridation s'effectue la nuit à la température d'hybridation. Les embryons et larves sont maintenus à la température d'hybridation pendant les premiers rinçages afin d'éliminer le maximum de sonde hybridée de façon aspécifique.

3- L'incubation dans l'anticorps anti-DIG et la révélation colorée.

Les échantillons sont ensuite incubés dans la solution de blocage (Annexe 6) 1 h à 4°C avant que ne soient ajoutés les fragments Fab anti-DIG de telle sorte que leur dilution finale soit au 1/5000^{ème}. Les échantillons sont laissés une nuit à 4°C en présence de l'anticorps. L'excès d'anticorps est éliminé par des rinçages en tampon TNT (Annexe 6) 2 fois 10 min puis 6 fois 30 min, à température ambiante. Les échantillons sont ensuite placés dans du tampon chromogène (Annexe 6) 3 fois 5 min avant d'être mis dans la solution de coloration (Annexe 6) à température ambiante pendant environ 5 h puis la nuit à 4°C. La réaction de coloration est arrêtée par abaissement du pH, en plaçant les échantillons 15 min à température ambiante dans une solution de 10 mM de Tris-HCl pH 7,5 (Annexe 1) contenant 10 mM d'EDTA (Annexe 1). Les embryons et larves sont rincés 2 fois 5 min dans du tampon PBST (Annexe 6) avant d'être de nouveau fixés 2 h dans une solution de PAF 4% (Annexe 1).

4- Le traitement des embryons et larves.

Les échantillons sont montés en glycérol par des bains de plus en plus concentrés. Après 2 rinçages en tampon PBS 1x de 15 min, des bains de 25%, 50%, 75%, 90% et 100% de glycérol dilué dans du PBS 1x sont réalisés. Les échantillons sont conservés à 4°C avant d'être observés et photographiés grâce à un microscope Eclipse E1000 (Nikon).

C. Les coupes à congélation.

Afin d'affiner la localisation du signal, certaines larves hybridées sont sélectionnées et coupées au cryostat. Les larves sont préalablement rincées dans des bains de 20 min de glycérol (Acros) en concentration décroissante 90%, 75%, 50%, 25% de glycérol dilué dans du PBS 1x (Annexe 1). Les larves sont ensuite rincées 2 fois 15 min dans du PBS 1x et placées une nuit à 4°C dans une solution de PBS 1x contenant 25% de saccharose (Sigma). Les larves sont imprégnées 12 h à 37°C de gélatine (Sigma) 7,5% dissoute dans une solution de PBS 1x contenant 25% saccharose puis incluent une nuit à 4°C dans 20% de gélatine dissoute dans du PBS 1x. Des blocs de gélatine 20% contenant les larves sont découpés, entourés de tissue-tek (OCT Ornithine Carbamoyltransferase, SAKURA) de sorte à former des blocs rectangulaires dans des moules en papier aluminium dans lesquels la larve est orientée. Ces blocs sont congelés dans de l'isopentane (Prolabo) à -80°C pendant 10 min et

conservés à cette température jusqu'à leur découpe. Des coupes à congélation sériées de 12 µm d'épaisseur sont tranchées dans les blocs d'inclusion contenant les larves à -20°C au cryostat (Microm HM500M) et disposées sur des lames gélatinées Superfrost® Plus (Menzel-Gläser®). Après séchage à 4°C, les lames sont montées en glycérol et lutées afin d'être observées au microscope, comme décrit plus bas.

D. L'hybridation in situ sur coupes.

L'hybridation *in situ* sur coupes permet d'affiner la localisation de l'expression d'un gène au sein d'un organe. La technique décrite par Bogerd *et al.* (2000) a été utilisée. La cavité intestinale comportant l'intestin dans son entier, le foie, le pancréas, la rate ainsi que les organes génitaux est prélevée de femelles de 8 mois 2,5 h après la prise de nourriture.

1- La réalisation des coupes.

Après une nuit de fixation et passage en méthanol, la cavité est plongée dans 2 bains d'EtOH 100% de 15 min puis dans 2 bains de toluène (J.T. Baker) de 15 min à température ambiante. La cavité est ensuite incubée dans du paraplast (Labosi) 2 fois 1 h à 60°C puis elle est incluse dans des moules adaptés à température ambiante. Le bloc de paraplast contenant la cavité est coupé à l'aide d'un microtome (RM2125, Leica) réalisant un ruban de 7 µm d'épaisseur. Des parties du début, du milieu et de la fin du ruban sont déposées sur chaque lame. La qualité des lames est vérifiée par une coloration au Trichrome de Masson.

2- L'hybridation in situ.

Le paraplast présent sur les lames doit tout d'abord être éliminé. Pour cela, les lames sont entreposées 30 min dans une étuve à 60°C avant d'être plongées 3 fois 5 min dans du toluène. Les lames sont ensuite baignées à température ambiante dans de l'éthanol 100% 2 fois 3 min puis placées dans des solutions décroissantes d'éthanol dilué dans du tampon PBS 1x (Annexe 1) : 2 fois 3 min dans du 95%, 3 min dans du 70%, 3 min dans du 50% et 3 min dans du 30%. Un rinçage de 3 min dans une solution de NaCl 9‰ précède une étape de fixation de 20 min dans du PAF 4% (Annexe 1) suivie de 2 passages de 5 min dans du tampon PBS 1x. Les coupes sont ensuite perméabilisées 7 min à 37°C dans une solution contenant 2 mM de CaCl₂ (Annexe 1), 20 mM de Tris-HCl, pH 7,4 (Annexe 1) et 2 µg/ml de protéinase K (Roche). Après un rinçage rapide en eau à 4°C, les lames sont plongées 2 fois 5 min dans un

bain de triéthanolamine (Annexe 6) seul suivi d'un bain de triéthanolamine contenant 1,25% d'anhydride acétique. Une nouvelle fixation de 15 min dans une solution de PAF 4% suit un rinçage de 5 min dans du PBS 1x et précède 3 bains de PBS 1x de 5 min. Les lames sont alors égouttées avant d'être rangées à plat dans une chambre humide afin d'ajouter sur les coupes 150 µl de tampon d'hybridation HBc (Annexe 6) et de les disposer 15 min à 60°C. Les sondes sens et antisens (100 ng/ml) préalablement dénaturées 5 min à 70°C sont ajoutées à 50 µl de tampon HBc et déposées sur chaque lame. Une lamelle est positionnée et les lames sont incubées une nuit à 60°C. Les lamelles sont ensuite décollées en plongeant les lames 20 min à 60°C dans une solution de SSC 2x (Annexe 1) contenant 0,1% (m/v) de CHAPS (Amersham). Suit alors un bain de 30 min à 60°C dans une solution contenant 50% de SSC 2x et 50% de formamide (Sigma) afin d'éliminer le surplus de sonde hybridée de façon aspécifique. La température est ensuite abaissée à 37°C et les lames sont placées 30 min dans une solution SSC 2x comportant 0,1% de CHAPS puis 30 min dans du tampon SSC 0,2x contenant 0,1% de CHAPS. Les lames sont rincées à température ambiante 2 fois 5 min dans du tampon SSC 0,2x, 1 fois 5 min dans une solution contenant 50% de SSC 0,2x et 50 % de TN (Annexe 6) puis 2 fois 5 min dans du tampon TN. Les lames sont égouttées puis 200 µl de solution de blocage (Annexe 6) y sont déposés. Elles sont ainsi laissées 1 h à température ambiante avant que ne soient ajoutés les fragments Fab anti digoxigénine (Roche) dilués au 1/2500^{ème}. Les lames sont disposées une nuit à 4°C. Elles sont ensuite rincées 5 min puis 3 fois 20 min dans du tampon TN. La solution de TN est remplacée par le tampon chromogène (Annexe 6) et 3 bains de 5 min sont réalisés. Les lames sont ensuite égouttées et les coupes entourées d'un trait de stylo indélébile. La réaction de coloration est réalisée en déposant 200 µl de solution de coloration (Annexe 6) sur les coupes et est arrêtée après 4 jours de réaction à température ambiante en plongeant les lames dans une solution contenant 10 mM d'EDTA (annexe 1) et 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5 (Annexe 1). La coloration est fixée 20 min dans une solution de PAF 4%. Les lames sont rincées 2 fois 5 min en PBS 1x et montées en glycérol.

3- Le montage des lames.

Les lames sont progressivement imprégnées de glycérol. Des dépôts de 5 min chacun de PBS 1x (Annexe 1) contenant successivement 25%, 50% et 75% de glycérol sont effectués. Du glycérol 100% est ensuite déposé sur les coupes et une lamelle est placée.

E. Les observations.

Les embryons, larves et coupes montées en glycérol 100% sont observés à l'aide d'un microscope (Eclipse E1000, Nikon).

V. Les méthodes biochimiques.

A. La préparation des microsomes.

La préparation des microsomes a été effectuée au laboratoire de Jean Velours, à l'IBGC, Bordeaux. Des fractions microsomales d'intestin antérieur, de foie et de muscle de poisson zèbre ainsi que de duodénum et de foie de souris sont obtenues d'après la méthode de Tsai et Gaylor (1966). Ces organes sont collectés sur au moins 10 poissons 4 h après la prise alimentaire et sur 1 souris pour chaque tube. Les tissus sont homogénéisés à l'aide d'un broyeur en verre (Labosi) dans 2 ml/g de tissu d'une solution contenant 20 mM de phosphate de potassium (Sigma), 0,25 M de saccharose (Sigma), 1 mM d'EDTA (Sigma) et un cocktail de protéases (Complete, Roche). Une centrifugation de 20 min à 10 000 g à 4°C est réalisée et le surnageant est conservé. Le culot est de nouveau homogénéisé et centrifugé. Les surnageants sont groupés et centrifugés 15 min à haute vitesse à 105 000 g à 4°C. Le culot est suspendu dans du tampon, homogénéisé et soumis à une nouvelle ultracentrifugation. Le culot est repris dans environ 100 µl de tampon.

Après dosage des protéines, ces échantillons ont été envoyés à Brooklyn, aux Etats-Unis, dans le laboratoire du professeur Mahmood Hussain, afin d'en mesurer l'activité de transfert des esters de cholestérol et des triglycérides.

B. Le dosage colorimétrique des protéines.

La technique utilisée est celle décrite par Lowry et *al.* (1951). Une gamme étalon est réalisée avec des quantités croissantes de sérum albumine de bœuf (SAB) permettant la détermination de la concentration protéique de l'échantillon.

C. La mesure de l'activité de transfert de la grande sous-unité de la MTP.

Les expériences de mesure de l'activité de transfert des esters de cholestérols et des triglycérides ont été menées dans le laboratoire du Pr Mahmood Hussain à Brooklyn par Paul Rava d'après la technique décrite par Athar *et al.* (2004). Deux inhibiteurs (BMS 197637 et BMS 200150 (Jamil *et al.*, 1996)) spécifiques de l'activité de transfert de la MTP sont également utilisés.

VI. Les recherches bio-informatiques.

A. Les clones nucléotidiques.

La recherche de clones ADN (dbEST, double brin Expressed Sequence Tag) est réalisée par saisie du nom ou par analogie de séquences sur le site NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>) et sur le site TIGR (<http://tigrblast.tigr.org/tgi>).

B. Les séquences géniques.

Les séquences géniques du poisson zèbre sont identifiées par saisie du nom ou par analogie de séquence sur le site Sanger Institute Ensembl Genome Data Resources (http://www.ensembl.org/Danio_rerio/) hormis pour le gène codant pour EF1- α obtenu dans GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>).

C. L'analyse du promoteur.

Une analyse *in silico* du promoteur du gène codant pour la grande sous-unité de la MTP a été effectuée à l'aide du logiciel MatInspector (Quandt *et al.*, 1995) afin d'identifier de possibles sites de reconnaissance de facteurs de transcription.

D. Les séquences protéiques.

Les séquences protéiques utilisées sont issues de la banque de donnée disponible sur le site NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>).

E. Les alignements.

Les alignements nucléiques et protéiques sont réalisés par traitement informatique en utilisant le programme ClustalW (<http://www.infobiogen.fr/services/analyseq/>) avec une correction manuelle quand cela est nécessaire. Les substitutions conservatives entre les acides aminés sont définies comme suit : A, G; S, T; E, D; R, K, H; Q, N; V, I, L, M; Y, F; W; P; C.

F. L'analyse phylogénétique.

L'analyse phylogénétique a été effectuée en utilisant les programmes inclus dans MEGA 2 (Kumar et Gadagkar., 2000) (<http://www.megasoftware.net>). Les arbres et la longueur des branches ont été obtenus selon l'algorithme «neighbor-joining» (NJ) basé sur le nombre de substitution par site (correction de Poisson par la méthode de distance, délétion par paires pour les sites absents). La solidité de la topologie de l'arbre de NJ a été évaluée à l'aide d'une analyse de «bootstrap» (Efron *et al.*, 1996) avec 5000 répliquions.

G. Autres.

La probabilité de présence d'une séquence de clivage du peptide signal est calculée avec le programme SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).

RESULTATS

Afin d'étudier l'expression des gènes codant pour la grande sous-unité de la MTP et pour les apolipoprotéines B (apoB) du poisson zèbre, l'identification et la caractérisation de leurs transcrits a dans un premier temps été nécessaire. Puis, le profil d'expression de ces gènes a été suivi chez l'embryon, la larve et l'adulte de poisson zèbre. Enfin, la comparaison de la quantité de ces transcrits entre des animaux nourris et non nourris nous a permis d'évaluer l'effet de la prise de nourriture sur le niveau d'expression de ces gènes.

I. Le gène de poisson zèbre homologue au gène mammalien codant pour la grande sous-unité de la MTP : caractérisation, expression au cours du développement et régulation nutritionnelle.

Dans le but de déterminer si le poisson zèbre exprime un gène codant pour la grande sous-unité de la MTP, l'ADNc correspondant a été entièrement séquencé après identification de séquences double brin d'ADN (dbEST) dans les banques de données (Genbank et TIGR).

Ces résultats ont donné lieu à une publication (Marza *et al.*, 2005, annexe).

A. Le clonage moléculaire de l'ADNc codant pour la grande sous-unité putative de poisson zèbre.

1- La stratégie.

L'ADNc entier codant pour la grande sous-unité de la MTP de poisson zèbre a été isolé en trois fragments chevauchants (MTP-5', MTP-884bp et MTP-3') par RT-PCR et RACE-PCR sur des ARN totaux extraits de l'intestin antérieur de poissons zèbres femelles nourries. La stratégie utilisée est décrite dans la Figure 16.

Lorsque ce travail a commencé, un seul clone nucléotidique codant pour la grande sous-unité de la MTP du poisson zèbre était disponible dans la banque de donnée Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) sous le numéro d'accèsion AA542502. Un oligonucléotide, nommé MTP-2, a été désigné sur cette séquence.

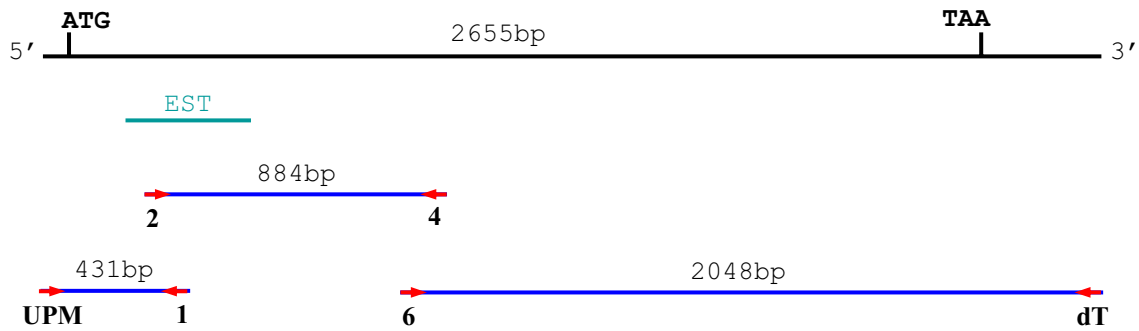


Figure 16 : Stratégie utilisée pour l'obtention de l'ADNc codant pour la grande sous-unité de la MTP de poisson zèbre par RT-PCR et RACE-PCR.

Un seul clone dbEST (numéro d'accèsion : [AA542502](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi)), représenté en vert, est identifié comme codant pour la grande sous-unité de la MTP de poisson zèbre dans la base de donnée Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>). L'amorce MTP-2 (2) a été désignée en partie 5' de ce clone. L'amorce dégénérée MTP-4 (4) a été choisie dans une région conservée entre les séquences nucléotidiques disponibles codant pour la grande sous-unité de la MTP humaine (région 1066 pb-1083 pb après le codon d'initiation), bovine (région 1047 pb-1061 pb après le codon d'initiation) et de drosophile (région 1089 pb-1107 pb après le codon d'initiation). Un fragment de 884 pb (MTP-884pb) est amplifié par RT-PCR en utilisant ces 2 amorces. Les extrémités 5' (431 pb) et 3' (2048 pb) de l'ADNc codant pour la MTP de poisson zèbre ont été obtenues par RACE-PCR grâce à l'utilisation des amorces internes MTP-1 (1) et MTP-6 (6) respectivement avec l'amorce universelle UPM et l'oligonucléotide oligodT (dT). Echelle : 1 cm = 218 bp.

Afin d'obtenir un premier fragment codant pour la grande sous-unité de la MTP de poisson zèbre plus long que celui du clone identifié, une amorce dégénérée, appelée MTP-4, a été synthétisée. Cette amorce a été choisie dans une région conservée entre les séquences nucléotidiques codant pour la grande sous-unité de la MTP humaine (région 1066 pb-1083 pb après le codon d'initiation), bovine (région 1047 pb-1061 pb après le codon d'initiation) et de drosophile (région 1089 bp-1107 pb après le codon d'initiation). Le fragment de 884 pb, MTP-884bp, contenu entre les deux amorces MTP-2 et MTP-4, a été amplifié par RT-PCR. Grâce à ce fragment, les oligonucléotides MTP-1 et MTP-6 ont été synthétisés et les fragments MTP-5' et MTP-3' ont été obtenus par amplification rapide des extrémités des ADNc (RACE-PCR). Chaque fragment est inséré dans un plasmide, cloné et séquencé.

2- L'analyse de la séquence de l'ADNc.

L'ADNc codant pour la grande sous-unité de la MTP que nous avons obtenu contient 3054 pb. Une phase ouverte de lecture de 2652 pb a été identifiée avec un codon d'initiation

ATG à la position 74 et un codon stop TAA au nucléotide 2726. Cet ADNc est incomplet et ne comporte pas la queue polyA. Par analogie de séquence, des clones nucléotidiques qui chevauchent et prolongent la partie 3' non traduite de l'ADNc ont été ultérieurement déposés dans la banque de donnée Genbank. Leurs numéros d'accèsion sont [CN172225](#), [CN015783](#), [AI974191](#) et [BF718005](#). En considérant ces séquences, le transcrit codant pour la grande sous-unité de la MTP de poisson zèbre comprend 4327 pb dont une queue polyA de 28 résidus. La séquence complète de cet ADNc est rentrée dans la banque de donnée Genbank sous le numéro d'accèsion [AJ428850](#). Le fragment MTP-3' que nous avons obtenu était incomplet du fait de l'hybridation de l'oligodT dans une région riche en adénine présente en amont de la véritable queue polyA.

3- La caractérisation du gène *mtp* de poisson zèbre.

Le génome du poisson zèbre est en cours de séquençage et les données issues de ce programme sont disponibles sur le site du Sanger Institute (http://www.ensembl.org/Danio_rerio/).

Le gène *mtp* correspondant à l'ADNc codant pour la grande sous-unité de la MTP a été identifié par saisie du nom et par analogie de séquence. Son numéro d'accèsion est ENSDARG00000008637. Ce gène est situé sur le chromosome 12 et contient 18 exons dans la phase du cadre ouverte de lecture. Ces exons ont des tailles similaires à ceux contenus dans le gène *mtp* humain codant pour la grande sous-unité de la MTP humaine. Dans la phase ouverte de lecture, les gènes humain et de poisson zèbre contiennent 17 introns de même type, à l'exception de l'intron 13 (Tableau 8). La taille de ces introns est différente entre ces deux gènes. L'intron 15 du gène du poisson zèbre est particulièrement grand. Ces introns sont positionnés au même endroit pour les 2 gènes hormis les introns 13, 16 et 17 qui sont décalés d'un codon dans la séquence génique du poisson zèbre. Les nucléotides présents aux jonctions entre les exons et les introns correspondent au consensus GT/AG des sites d'épissage des introns, à l'exception de l'intron 13. La comparaison avec la structure du gène de drosophile codant pour l'homologue de la grande sous-unité de la MTP (numéro d'accèsion [gb/CG9342/](#)) montre que 3 des 5 introns contenus dans ce gène sont situés à la même position que les introns 7, 16 et 17 du gène *mtp* du poisson zèbre.

Exon	Espèce	Taille de l'exon (pb)	Séquence des jonctions exons/intron		Taille de l'intron (pb)	Type de l'intron	
			Site donneur 5'	Site accepteur 3'			
1	Humain Poisson zèbre	147	TCTGTTAAAG	gtaagtttgt...ctttatgcag	GTACACAAAC	6934	1
		61	TCAGCTCTTG	gtgagccaat...ctgttctcag	GTGCTGGACC	1730	1
2	Humain Poisson zèbre	188	CAAATAACG	gtgggcattt...gttactccag	ATGAAGGATG	1281	0
		182	GCAAGTACAG	gtaaagggac...ctgttctcag	ATTTCAAATA	1746	0
3	Humain Poisson zèbre	144	CCATGGAAAG	gtaaaggggc...tcccaccag	GTCAAAGAGT	6125	0
		144	GATGGGCAAG	gtaagaaacg...tgtcatttag	ATCAGAAGCC	94	0
4	Humain Poisson zèbre	108	CACCAATGAG	gtaacttacc...ttcttttttag	GTAGATATCT	1484	0
		108	GATGTCAGAG	gtaagacca...taatccatag	GCTGATGCTT	78	0
5	Humain Poisson zèbre	117	CCCAAATCAG	gtagataga...atttattttag	GTCTGGGTG	299	0
		117	TCACAGTCCA	gtaagaccat...tttgtctccag	TTCTGGGCAT	564	0
6	Humain Poisson zèbre	140	TAGTATCGAA	gtaagataat...tattatgcag	GCAGAAATTA	2942	2
		140	TCTTATCCAG	gtaatccaaa...tttccctcag	GCAGTCACTG	93	2
7	Humain Poisson zèbre	151	ATGTCCTTCT	gtaagtgcag...tgtttttgcag	CTCTCGGAGC	2183	0
		151	ATGCCCAAT	gtaagctact...tgtgcatttag	CTGATGGAAA	81	0
8	Humain Poisson zèbre	158	AGGAAGTATT	gtaagttccc...ttttttatag	ACCTCAGCTG	3340	2
		158	AGACGGCACT	gtaagaccaa...gtgtttgcag	ACCTCAGCTG	163	2
9	Humain Poisson zèbre	169	AGCCCTCATT	gtaagtcaaa...tggtaatag	AGTAAGTTCA	873	0
		169	ATCCCTGCTG	gtaagatcac...tccattgtag	GAAGTGTCTC	550	0
10	Humain Poisson zèbre	108	CAAACCTAAA	gtaagtgc...gatttttcag	GCAGTAGTGG	5033	0
		108	TGATCTACCA	gtgagctct...ctttgcacag	GCTGTGCTGA	2298	0
11	Humain Poisson zèbre	213	AACTGATGAG	gtaaaatctc...ttatgaacag	GTGAAGAAGA	1805	0
		213	CACAGCAGAG	gtaatccaca...ccgtccacag	GTGAAAAAAG	70	0
12	Humain Poisson zèbre	212	TGCCTGCAAG	gtataataca...tatgtttgcag	CAAATTTGTC	2165	2
		212	TGCCAGCCTA	gtgagtcacg...tggttttgcag	TAAATTTGTA	109	2
13	Humain Poisson zèbre	98	TACATAGAAC	gtagtgcac...gtgtcatcag	GTAGTCCCCG	91	2
		98	TTCATGGCAG	gtaagtgcagc...tatccatcaa	AAACCGTGGA	2639	1
14	Humain Poisson zèbre	122	CGGTAGCCAG	gtaactcact...ttttatccag	GTGGTTATTG	1459	0
		122	TGGCTGCAG	gtaactgtcaa...tgtttttccag	GTGACGATTG	85	0
15	Humain Poisson zèbre	228	TCATTCTCAG	gtatattgat...ttttcttcag	GAACTTCAGT	5833	0
		228	CCACTCACAG	gtttgactca...tgactgaag	GTGATTCTCTC	94707	0
16	Humain Poisson zèbre	125	TGAAAAATAG	gtaagtgttt...aaatgttttag	GGTGAAGTGTG	1962	2
		125	TCAACAACAG	gtaggatacct...tgtgttttag	GGGAGCGCTG	3326	2
17	Humain Poisson zèbre	171	CTCCATTTCAG	gtaagatgca...tgtgttacag	GCAATTTGAG	1445	2
		171	TCCCTTCAG	gtaatctatcc...tgctcttcag	AGAGACGGTG	913	2
18	Humain Poisson zèbre	172		...ATGGTTTGA			
		148		...GGCCTGGTAA			

Tableau 8 : Comparaison de la structure des gènes *mtp* humain et *mtp* de poisson zèbre.

La taille des exons ainsi que la taille et le type des introns sont indiqués pour les gènes *mtp* humain et *mtp* de poisson zèbre. Les introns de type 0 sont localisés entre deux codons alors que les introns de type 1 et de type 2 s'insèrent respectivement entre les bases 1 et 2, et les bases 2 et 3 d'un même codon (Breathnach et Chambon, 1981). Les nucléotides écrits en majuscule appartiennent à un exon alors que ceux contenus dans les introns sont inscrits en minuscules. Au centre du tableau, les extrémités 3' de l'exon précédant et 5' de l'exon suivant encadrent les extrémités 5' et 3' de l'intron inclus entre ces deux exons.

4- L'analyse de la séquence protéique de la grande sous-unité de la MTP de poisson zèbre et mesure de l'activité de transfert.

La séquence protéique déduite de l'ADNc codant pour la grande sous-unité de la MTP de poisson zèbre comprend 884 acides aminés (Figure 17). La probabilité de coupure d'un peptide signal est grande entre les acides aminés 21 et 22. Le poids moléculaire théorique calculé de la protéine immature est de 97 kDa et le pHi prédit de 8,51.

L'alignement de la grande sous-unité putative de la MTP de poisson zèbre avec la séquence protéique de la grande sous-unité de la MTP humaine montre une forte conservation avec 54% d'identité et 66% de similarités. La séquence de poisson zèbre possède également 55% d'identité avec la grande sous-unité de la MTP de poulet (numéro d'accèsion [XP_420662](#)), 65% d'identité avec les séquences de *Fugu* (numéro d'accèsion [SINFRUT00000149051](#)) et de tétraodon (numéro d'accèsion [CAG03740](#)) et 22% d'identité avec la séquence protéique de l'homologue fonctionnel de drosophile (numéro d'accèsion [NP_610075](#)).

Les régions les plus conservées correspondent aux séquences équivalentes à celles du domaine prédit en hélice α (de $\alpha 1$ à $\alpha 17$; 58,6% d'identité et 69% de similarité), au feuillet de brins β appelé « C-sheet » (du brin C- $\beta 1$ à C- $\beta 6$; 70,6% d'identité et 79,8% de similarité) et au feuillet de brins β nommé « A-sheet » (de l'hélice αA au brin A- $\beta 4$; 68,6% d'identité et 78,4% de similarité) de la partie C-terminale de la protéine. Les acides aminés essentiels pour l'activité de transfert des triglycérides, des esters de cholestérol et des phospholipides sont conservés. Ainsi une arginine est présente à la position correspondant à l'arginine 540 de la séquence humaine. Les acides aminés correspondant à la leucine 731, la leucine 734, la glycine 746, l'asparagine 780 et la cystéine 878 sont également conservés. Par contre, une glycine est retrouvée à la position correspondant à la valine 782 de la séquence humaine. Cet acide aminé ferait partie de l'hélice αB (781-786) du feuillet A de brins β . La substitution de la valine 782 par une alanine, acide aminé analogue à la glycine, est associée à une baisse de l'activité de transfert de 70% de la protéine humaine (Read *et al.*, 2000).

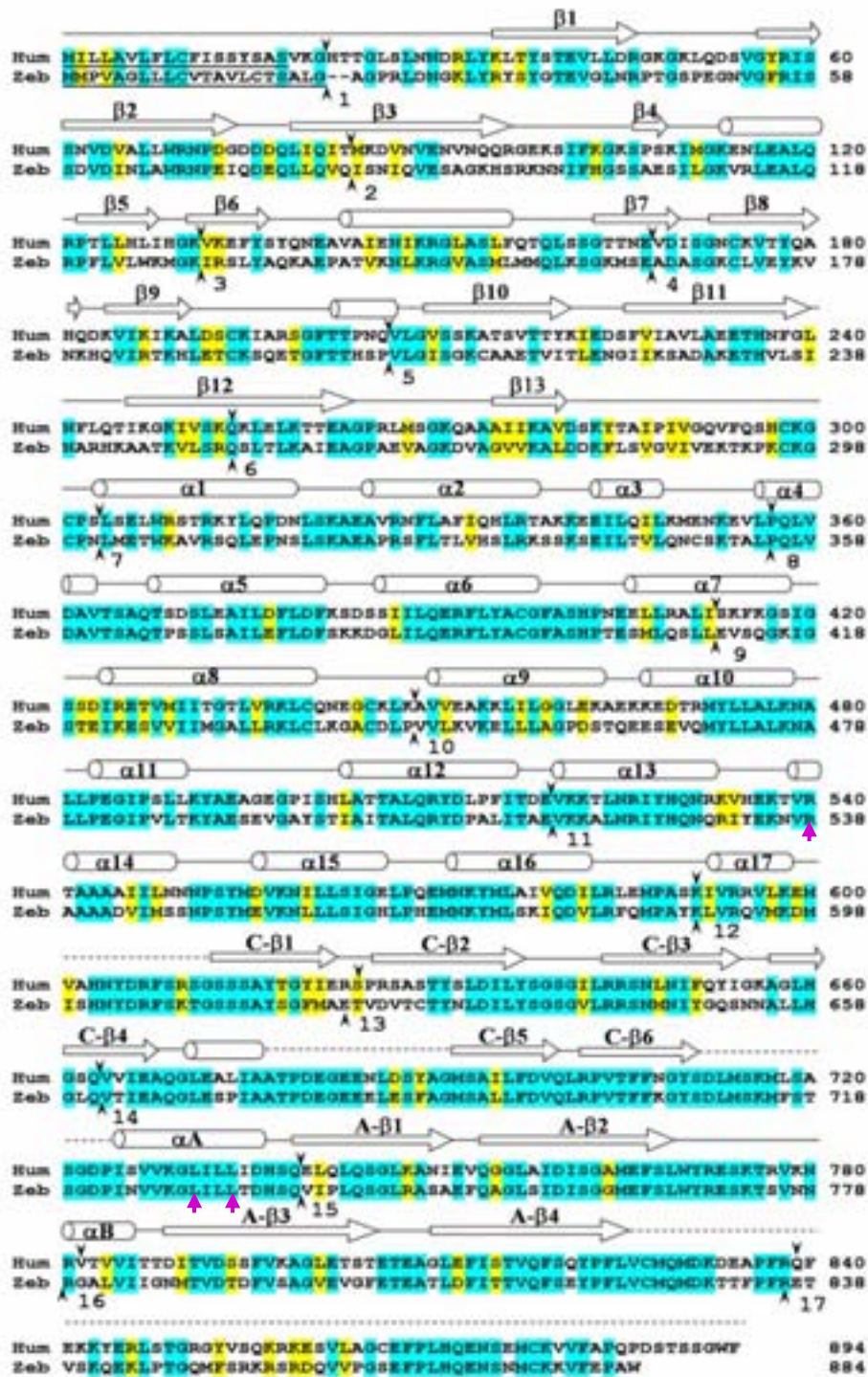


Figure 17 : Alignement des séquences protéiques de la grande sous-unité de la MTP humaine (Hum) et de poisson zèbre (Zeb).

Les séquences correspondant au peptide signal sont soulignées. Le positionnement des introns est indiqué par des flèches, les supérieures et les inférieures correspondant respectivement aux positions dans le gène humain et dans le gène de poisson zèbre. Les prédictions de structures de la grande sous-unité de la MTP humaine sont schématisées sous la forme de flèches pour les brins β , de cylindres pour les hélices α , de traits pleins pour les boucles et de pointillés pour les positions indéterminées (Mann *et al.*, 1999 ; Read *et al.*, 2000). Les flèches mauves indiquent les acides aminés impliqués dans l'abetalipoprotéinémie. Les acides aminés identiques et similaires entre les deux séquences sont respectivement surlignés en bleu et en jaune. Les substitutions conservatives utilisées sont : A, G, S, T, E, D, R, K, H, Q, N, V, I, L, M, Y, F, W, P, C.

Des séquences codant pour la grande sous-unité hypothétique de la MTP chez d'autres poissons, comme la truite et le *Fugu*, ainsi que chez le *Xénope* ont été identifiées. Les parties C-terminales de ces séquences ont été alignées avec celles d'Homme, de porc, de souris, de poulet et de poisson zèbre (Figure 18). La leucine 734 de la séquence humaine est conservée dans toutes ces séquences. Cet acide aminé essentiel à l'activité de transfert de la MTP est localisé dans l'hélice αA du feuillet A de brins β . La valine 782 n'est pas conservée dans les séquences de truite, de *Fugu*, de poisson zèbre et de *Xénope* pour lesquelles une glycine ou une alanine est retrouvée à cette position. La séquence de poulet quant à elle présente une isoleucine à cet emplacement, acide aminé ayant des caractéristiques physico-chimiques semblables à celles de la valine. La substitution de la valine 782 par une glycine ou une alanine semble donc être spécifique aux poissons et au *Xénope*. Elle pourrait s'accompagner d'une activité de transfert des triglycérides et des esters de cholestérols plus faible que celle de la grande sous-unité de la MTP de mammifère.

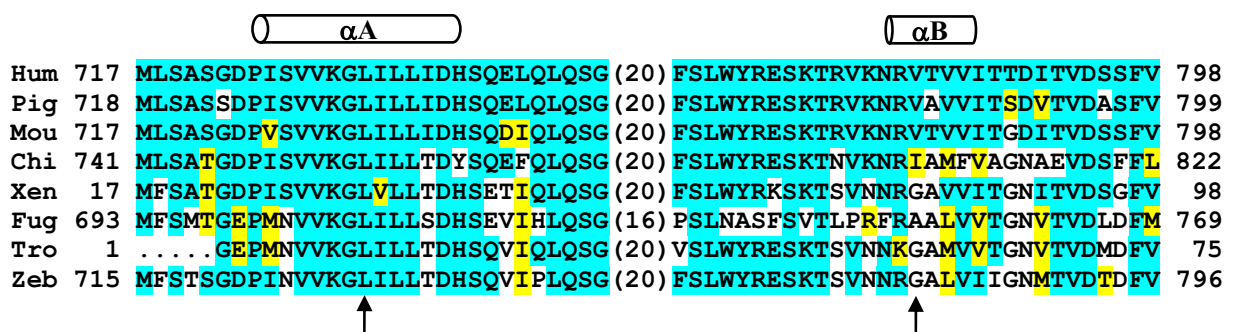


Figure 18 : Comparaison des parties C-terminales comprises entre les hélices αA et αB des séquences protéiques de la grande sous-unité de la MTP de vertébrés.

Les séquences sont numérotées à partir du codon d'initiation pour les séquences humaines (Hum, P55157), de porc (Pig, AAO61497), de souris (Mou, O08601), de poulet (Chi, BU122717 + contig 3.1104.11477.928.13791, http://pre.ensembl.org/gallus_gallus), du *Fugu* (Fug, SINFRUP00000088005) et de poisson zèbre (Zeb, AJ428850). Les séquences de *Xénope tropicalis* (Xen, gb/AL868859/) et de truite (Tro, gb/BX860503/) sont numérotées à partir du premier acide aminé des séquences protéiques déduites des ADNc disponibles. Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre d'acides aminés omis entre les deux hélices. Les points présents dans la séquence de truite symbolisent des acides aminés manquants. Les flèches indiquent la leucine 734 et la valine 782. Les acides aminés identiques et similaires sont respectivement colorés en bleu et en jaune. Les substitutions conservatives utilisées sont : A, G; S, T; E, D; R, K, H; Q, N; V, I, L, M; Y, F; W; P; C.

B. L'expression du gène mtp au cours du développement du poisson zèbre.

1- Le profil d'expression du gène mtp.

Le profil d'expression du gène codant pour la grande sous-unité de la MTP au cours du développement embryonnaire et larvaire du poisson zèbre a été suivi par hybridation *in situ in toto* en utilisant comme sonde antisens la séquence inverse complémentaire du fragment MTP-884pb et comme contrôle, une sonde dite sens de même séquence que ce fragment (Figure 19). La présence des transcrits est ensuite révélée par une coloration bleu foncé.

Des embryons et des larves à différents stades de développement ont été utilisés. Aucune coloration n'a été décelée dans les embryons et les larves hybridées avec la sonde sens, montrant qu'il existe peu ou pas de bruit de fond. L'hybridation de la sonde antisens montre qu'aucune coloration n'est observée dans des embryons de moins de 2 heures post-fécondation (hpf). Un faible signal d'hybridation est détecté à partir de 4 hpf dans les blastomères marginaux. Cette période, appelée transition blastuléenne, correspond à l'activation du génome du zygote. Le fait que des transcrits codant pour la grande sous-unité de la MTP ne soient détectés qu'à partir de 4 hpf suggère que ces transcrits ne sont pas d'origine maternelle mais zygotique. Plus tard au cours du développement, de 9 hpf jusqu'à 24 hpf, un signal d'hybridation est visible dans le syncytium vitellin (sv) alors qu'aucune structure embryonnaire ne semble exprimer ce gène. Ce n'est que vers 48 hpf, lorsque le tube intestinal (ti) et les structures hépatiques embryonnaires (f) commencent à se différencier qu'un signal d'hybridation est détecté dans ces structures tout en persistant faiblement dans le syncytium vitellin. Après ce stade, lorsque la larve a éclos, plus aucune coloration n'est visible dans des structures extra-embryonnaires et un signal est détecté uniquement dans le foie (f) et l'intestin antérieur (ia), comme cela est visible pour une larve de 4 jours post-fécondation (jpf). C'est au cours de cette période que le tube intestinal adopte une courbure dans sa partie antérieure et forme à ce niveau une protubérance sur le côté gauche de la larve. Le signal d'hybridation obtenu dans une larve de 6 jpf dépigmentée est localisé dans les deux lobes hépatiques présents de part et d'autre de l'axe central de l'animal ainsi que dans l'intestin antérieur situé sur le côté gauche de la larve. A ce stade ainsi qu'aux stades ultérieurs, le signal d'hybridation est uniquement visible dans le foie et l'intestin antérieur.

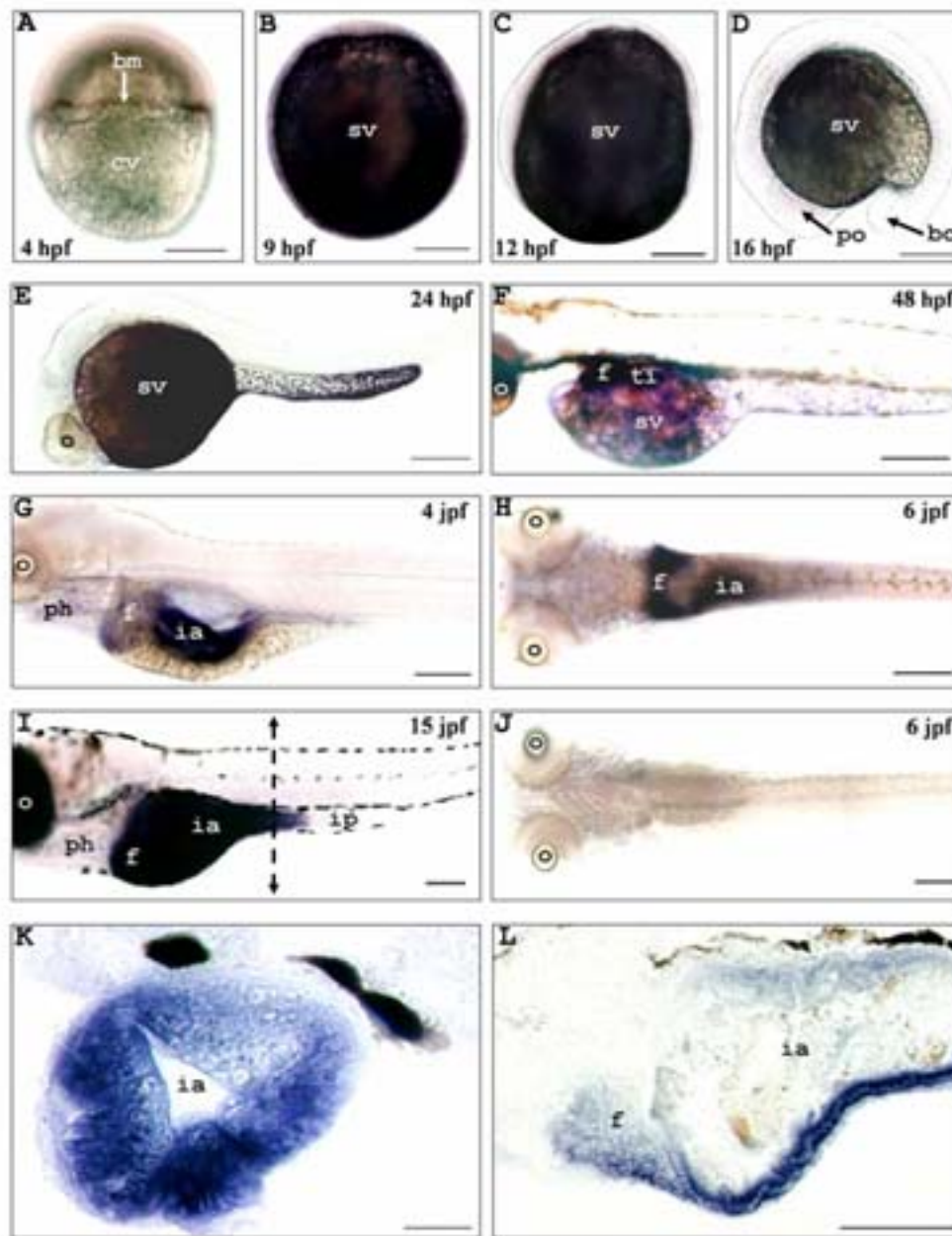


Figure 19 : Profil d'expression du gène *mtp* au cours du développement embryonnaire et larvaire du poisson zèbre.

Le profil d'expression du gène *mtp* a été suivi par hybridation *in situ in toto* sur des embryons et des larves de différents stades de développement. Les sondes antisens et sens marquées à la digoxigénine ont été synthétisées en se servant du fragment MTP-884pb comme matrice. Une révélation colorée bleu foncé permet de visualiser le signal d'hybridation de ces sondes. Un signal d'hybridation de la sonde antisens n'est détecté qu'à partir de 4 hpf (A), dans les blastomères marginaux (bm). Ce signal est localisé dans le syncytium vitellin (sv) des embryons de 9 hpf (B), 12 hpf (C), 16 hpf (D) et 24 hpf (E). Une coloration est observable dans le foie (f) et l'intestin antérieur (ia) des larves de 48 hpf (F), de 4 jpf (G), de 6 jpf (H) et de 15 jpf (I). Des coupes à congélation transversale (K) et sagittale (L) de larves de 15 jpf préalablement hybridées avec la sonde antisens montrent que le signal est localisé dans l'épithélium de l'intestin antérieur et dans les cellules hépatiques. Aucun bruit de fond n'a été décelé dans les échantillons hybridés avec la sonde sens (résultat montré pour la larve de 6 jpf (J)). Dans certains cas (G, H, J), les larves utilisées ont été dépigmentées par élevage dans une eau contenant 0,2 mM de PTU. ph : pharynx, po : primordium optique, ti : tube intestinal, bc : bourgeon caudal, o : œil. Echelle (A-D, F-L) : 100 µm. Echelle (E) : 500 µm.

Des coupes à congélation d'une larve de 15 jpf hybridée avec la sonde antisens confirme que la coloration est localisée dans l'épithélium intestinal et plus précisément dans les entérocytes, ainsi que dans les hépatocytes. La coloration moins intense observée dans la partie dorsale du foie et de l'épithélium intestinal peut être attribuée à une pénétration difficile de la sonde et donc à une moins grande quantité de sonde ayant atteint les parties les plus internes de la larve. Aucun bruit de fond dû à l'accrochage de la sonde sur la nourriture contenue dans la lumière intestinale n'est visible.

2- La quantification du niveau d'expression du gène *mtp* au cours du développement embryonnaire.

L'analyse du profil d'expression du gène codant pour la grande sous-unité de la MTP par hybridation *in situ in toto*, montre une baisse du signal dans le syncytium vitellin entre les stades 9 hpf et 16 hpf correspondant à la somitogenèse.

Afin d'étudier les possibles variations de l'expression du gène *mtp* au cours du développement embryonnaire du poisson zèbre, une quantification relative du taux de transcrits codant pour la grande sous-unité de la MTP a été réalisée par RT-PCRq sur des ARN totaux extraits à différents stades de développement (Tableau 7, matériel et méthodes). Pour cela, la quantification de l'expression du gène *ef1 α* codant pour le facteur d'élongation EF1 α et celle du gène *β -actine* ont servi de références. Ces quantifications ont été réalisées sur trois échantillons d'ARN rétro-transcrits par stade de développement afin qu'une analyse statistique soit effectuée. La même tendance de variation de l'expression du gène *mtp* a été obtenue avec les deux gènes de référence. Un très faible taux de transcrits *mtp* par rapport aux transcrits de référence est obtenu pour les embryons de moins de 2 hpf. Une augmentation significative du rapport ($mtp / ef1\alpha$) x 100 de $0,26 \pm 0,08$ à $13,23 \pm 3,99$ ($p < 0,001$) se produit entre les embryons de moins de 2 hpf et de 5 hpf. Ce rapport reste élevé à 6 hpf ainsi qu'à 9 hpf avec des valeurs respectivement de $8,51 \pm 1,82$ et de $10,22 \pm 1,28$ ($p < 0,01$ en comparaison avec les embryons de moins 2 hpf, et $p < 0,05$ en comparaison avec les embryons de 12 hpf, 16 hpf, 24 hpf et 48 hpf). A partir de 12 hpf, le rapport ($mtp / ef1\alpha$) x 100 chute de façon significative ($p < 0,05$) à $2,05 \pm 0,27$ puis reste faible à des valeurs inférieures à 1,3 jusqu'à la fin de l'embryogenèse qui a lieu vers 72 hpf.

Cette variation de la quantité de transcrits *mtp* est également obtenue lorsque le gène β -actine est utilisé comme référence. La valeur du rapport (mtp / β -actine) x 100 est significativement plus élevée ($p < 0,05$) à 9 hpf qu'aux autres stades embryonnaires. La chute de ce rapport paraît moins brutale qu'en utilisant le gène *efl α* comme référence avec une valeur transitoire pour les embryons de 12 hpf.

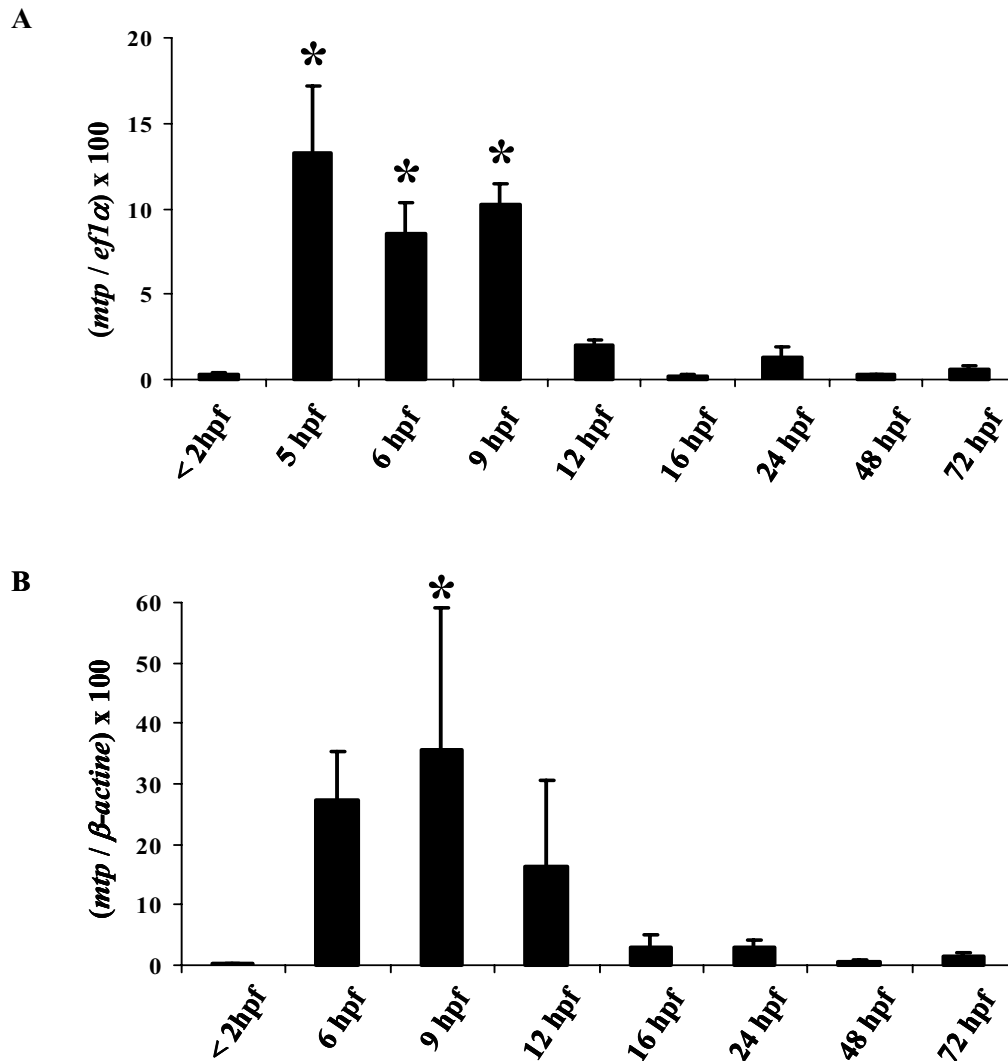


Figure 20 : Quantification de l'expression du gène *mtp* au cours du développement embryonnaire du poisson zèbre par RT-PCRq.

Pour chaque stade de développement, la quantification des transcrits *mtp*, *efl α* et β -actine a été réalisée par RT-PCRq sur 3 échantillons indépendants. Une analyse statistique a été effectuée avec le test ANOVA suivi d'une évaluation de type Tukey-Kramer. Les astérisques symbolisent les différences significatives ($p < 0,05$). La variation des rapports ($mtp / efl\alpha$) et (mtp / β -actine) reflète la même tendance d'augmentation de la quantité des transcrits *mtp* dans les stades 5 hpf, 6 hpf et 9 hpf. Ce rapport décroît ensuite plus ou moins brutalement selon le gène de référence utilisé et se maintient bas jusqu'à 72 hpf. hpf : heures post-fécondation.

C. La quantification de l'expression du gène *mtp* chez l'adulte.

Le niveau d'expression du gène *mtp* a été quantifié par RT-PCRq chez le poisson zèbre adulte (Figure 21). Pour cela, les ARN totaux extraits du cœur, du cerveau, du foie, de l'intestin antérieur, de l'intestin postérieur, du rein, du testicule et de l'ovaire ont été rétro-transcrits en ADNc. Le foie a été prélevé uniquement sur des poissons zèbres mâles nourris afin d'éliminer le biais possible introduit par la forte expression du gène codant pour la vitellogénine dans le foie des animaux femelles. L'expression de ce gène chez des femelles en vitellogenèse est importante et pourrait modifier le taux de transcrits relatif des autres gènes. Les intestins antérieur et postérieur ont été également prélevés sur des mâles nourris afin de pouvoir comparer le niveau d'expression du gène *mtp* dans ces organes par rapport à celui obtenu pour le foie. Pour chaque lot indépendant de foie, d'intestin antérieur, d'intestin postérieur et d'ovaire trois animaux ont été utilisés alors qu'une dizaine de poissons zèbres ont été nécessaires pour les échantillons de rein, de testicule, de cœur et de cerveau du fait de la petite taille de ces organes et de leur faible concentration en ARN. Trois échantillons indépendants ont été quantifiés pour permettre une analyse statistique.

La mesure de l'expression du gène *ef1 α* a été réalisée afin de servir de référence et de comparer de façon relative la quantité de transcrits *mtp* dans les différents organes testés. Le rapport ($mtp / ef1\alpha$) x 100 de la quantité de transcrits *mtp* sur la quantité de transcrits *ef1 α* a été calculé et est présenté en fonction de l'organe (Figure 21). Ce rapport est élevé dans l'intestin antérieur (21,00 \pm 11,98), le foie (6,51 \pm 3,07) et l'intestin postérieur (6,28 \pm 2,34) comparativement au rein (0,74 \pm 0,82), au testicule (0,65 \pm 0,28), au cerveau (0,52 \pm 0,46), au cœur (0,19 \pm 0,19) et à l'ovaire (0,007 \pm 0,002). Dans ces deux derniers organes, le taux d'expression du gène *mtp* peut être considéré comme ne dépassant pas le niveau d'expression basal des cellules.

Des analyses statistiques montrent que le rapport ($mtp / ef1\alpha$) x 100 dans l'intestin antérieur est significativement plus élevé que dans les autres organes ($p < 0,05$ en comparaison avec le foie et l'intestin postérieur et $p < 0,001$ en comparaison avec les autres organes), confirmant la différence de signal obtenu par Northern blot entre le foie et l'intestin antérieur de femelles adultes.

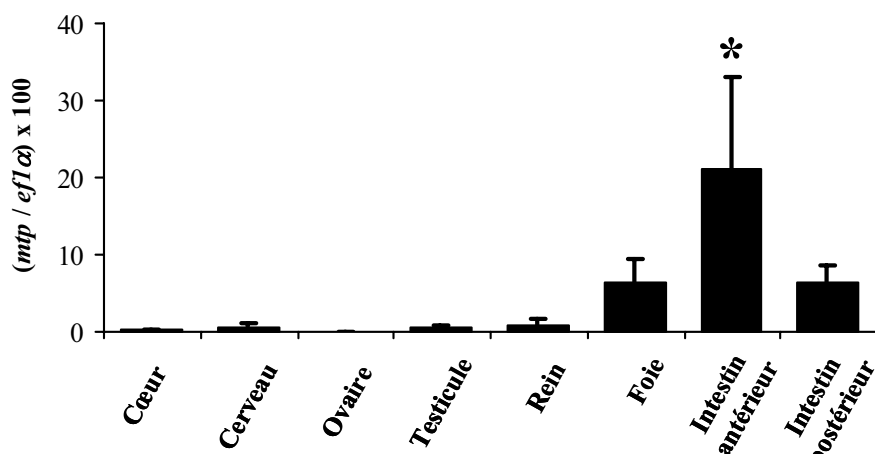


Figure 21 : Quantification de l'expression tissulaire du gène *mtp* chez le poisson zèbre adulte par RT-PCRq.

La quantité relative de transcrits *mtp* par rapport à celle des transcrits du gène de référence *eflα* a été mesurée par RT-PCRq sur 3 échantillons indépendants de chaque tissu. Le foie, l'intestin antérieur et l'intestin postérieur ont été prélevés sur des mâles nourris. Pour ces tissus ainsi que pour l'ovaire, trois poissons ont été utilisés par échantillon. Le cœur, le cerveau, les testicules et les reins ont été prélevés sur une dizaine d'animaux nourris par échantillon. Une analyse statistique a été effectuée à l'aide du test ANOVA suivi d'une évaluation par le test Tukey-Kramer. L'astérisque symbolise une différence significative ($p < 0,05$). Le rapport $(mtp / efl\alpha) \times 100$ est significativement plus élevé dans l'intestin antérieur que dans les autres organes. Un rapport élevé est également obtenu pour les échantillons de foie et d'intestin postérieur.

D. La régulation nutritionnelle de l'expression du gène *mtp*.

1- La présence de gouttelettes lipidiques dans les entérocytes de poisson zèbre après la prise de nourriture.

Les conditions d'étude de l'effet de la prise de nourriture sur l'expression du gène *mtp* ont été définies après la détermination de la présence de gouttelettes lipidiques dans les entérocytes de l'intestin antérieur de larves et de poissons zèbres adultes.

La présence de gouttelettes lipidiques a été vérifiée par coloration histologique au noir soudan de coupes semi-fines d'intestin antérieur de larve de 15 jpf (André *et al.*, 2000) et d'adulte de poisson zèbre deux heures après la prise de nourriture. Les entérocytes de l'intestin antérieur sont gorgés de gouttelettes lipidiques (Figure 22).

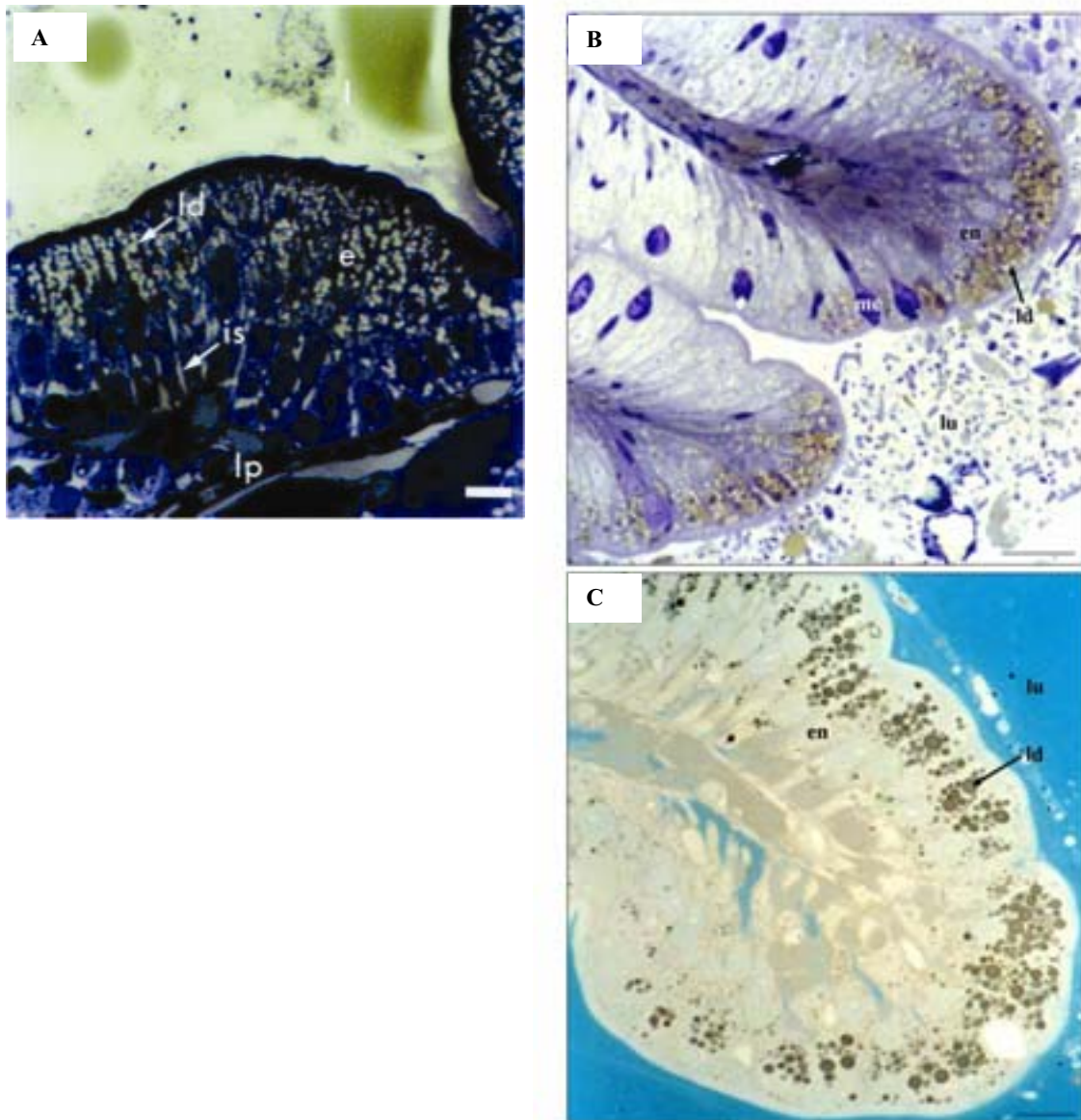


Figure 22 : Accumulation de gouttelettes lipidiques dans les entérocytes de poisson zèbre.

Sur des coupes histologiques semi-fines colorées, une forte accumulation de gouttelettes lipidiques est visible, 2 h après la prise alimentaire, dans les entérocytes de l'intestin antérieur de larves de 15 jpf (A) (Andre *et al.*, 2000) ainsi que chez l'adulte (B-C) (Marza *et al.*, en annexe).

2- La régulation de l'expression du gène *mtp* par la prise alimentaire chez la larve.

L'effet de la prise de nourriture sur le niveau d'expression du gène *mtp* chez la larve a été analysé par des expériences d'hybridation *in situ in toto* et par RT-PCRq pour le gène *mtp*. Afin d'étudier cet effet, trois stades de développement larvaire correspondant à la première ingestion d'aliments exogènes (5 jpf), à la fin de la phase de nutrition mixte (8 jpf) et à la phase de nutrition exotrophe (15 jpf) ont été choisis. Les larves ont été mises à jeun pendant 18 h et nourries ou non pendant 2 h avant d'être prélevées et fixées. La présence de nourriture dans l'intestin des larves a été vérifiée avant de réaliser l'hybridation *in situ in toto*.

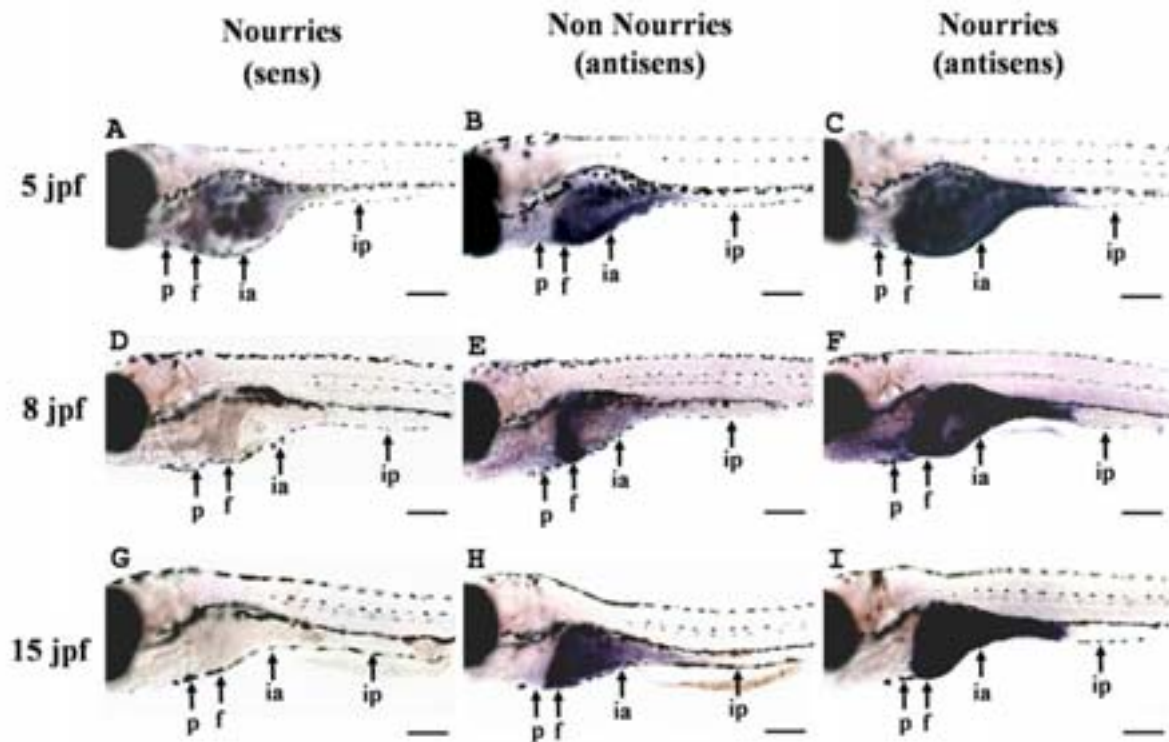


Figure 23 : Régulation nutritionnelle de l'expression du gène *mtp* chez la larve de poisson zèbre par hybridation *in situ in toto*.

Des larves de 5 jpf (A, B, C), 8 jpf (D, E, F) et 15 jpf (G, H, I) ont été mises à jeun pendant 18 h et nourries (A, C, D, F, G, I) pendant 2 h ou non (B, E, H) avant d'être fixées. L'hybridation des sondes ARN sens (A, D, G) et antisens (B-C, E-F, H-I) marquées à la digoxigénine a été réalisée à 60°C. Un signal d'hybridation de la sonde antisens est observé dans l'intestin antérieur (ia) et dans le foie (f) quelque soit l'état nutritionnel et l'âge de la larve. L'intensité de ce signal semble augmenter lorsque les larves sont nourries (C, F, I) en comparaison avec les larves non nourries (B, E, H). Aucun signal n'est observé dans le pharynx (p) ou dans l'intestin postérieur (ip). Les larves hybridées avec la sonde sens ne présentent aucun bruit de fond. jpf : jours post-fécondation. Echelle : 500 µm.

a- La visualisation d'un effet de la prise alimentaire sur l'expression du gène *mtp*.

L'expression du gène *mtp* dans les larves de 5 jpf, 8 jpf et 15 jpf nourries et non nourries est présentée dans la Figure 23. Comme décrit précédemment, le signal d'hybridation de la sonde antisens est visible dans le foie et l'intestin antérieur des larves quelque soit le stade de développement, même avant la première prise alimentaire. A chaque stade de développement testé, ce signal est plus intense dans l'intestin antérieur (ia) des larves nourries en comparaison avec les larves non nourries. Le signal détecté dans le foie (f) semble également être plus foncé dans les larves nourries par rapport aux larves non nourries. Quelque soit l'état nutritionnel de la larve, aucune coloration n'est visible dans l'intestin postérieur (ip) ou dans le pharynx (p). L'hybridation de la sonde sens montre qu'il n'existe pas de bruit de fond lié à la présence de nourriture dans l'intestin des larves.

La prise alimentaire semble donc augmenter l'expression du gène *mtp* dans l'intestin antérieur et dans une moindre mesure dans le foie et ceci dès la première prise de nourriture des larves.

b- La quantification de l'effet de la prise alimentaire sur le niveau d'expression du gène *mtp*.

L'effet de la prise alimentaire sur le niveau d'expression du gène *mtp* a été suivi par RT-PCRq en utilisant le gène *efl α* comme référence. Sept échantillons indépendants ont été quantifiés pour chaque stade larvaire correspondant à 5 jpf, 8 jpf et 15 jpf. Le rapport ($mtp / efl\alpha$) x 100 de la quantité de transcrits *mtp* sur la quantité de transcrits *efl α* a été calculé (Figure 24) pour les larves nourries et non nourries. Ce rapport augmente de façon significative ($p = 0,037$) entre les larves de 5 jpf non nourries ($0,63 \pm 0,23$) et les larves de 5 jpf nourries ($1,16 \pm 0,56$) d'un facteur 1,8. Une augmentation significative ($p = 0,035$) du rapport ($mtp / efl\alpha$) x 100 d'un facteur 2,3 est également observée entre les larves de 8 jpf non nourries ($0,97 \pm 0,16$) et les larves de 8 jpf nourries ($2,23 \pm 1,39$). Une augmentation non significative de $1,64 \pm 0,57$ à $2,33 \pm 0,95$ est observée pour les larves de 15 jpf nourries et non nourries. Le fait que cette augmentation ne soit pas significative à 15 jpf alors qu'elle l'est aux deux autres stades peut s'expliquer par l'utilisation de larves entières et par une diminution de l'abondance relative des cellules qui expriment le gène *mtp* dans la larve en croissance somatique rapide.

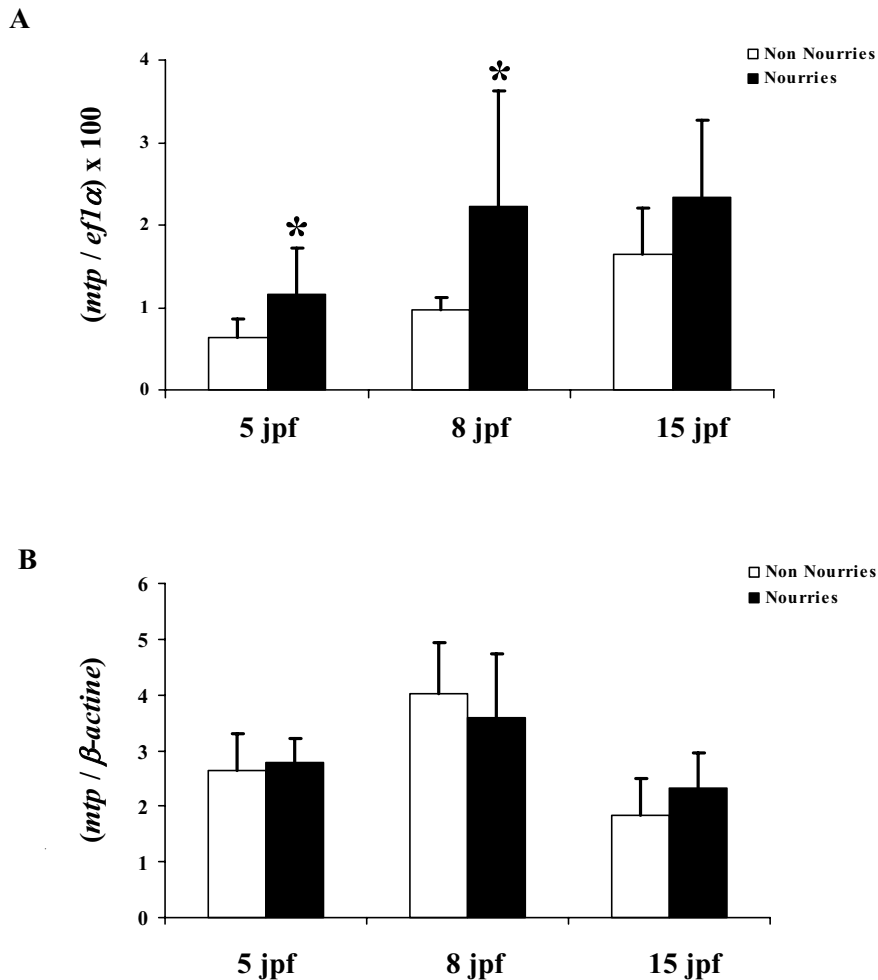


Figure 24 : Quantification de l'effet de la prise alimentaire sur l'expression du gène *mtp* chez la larve de poisson zèbre.

Des larves à différents stades de développement, 5 jpf, 8 jpf et 15 jpf, ont été nourries ou non pendant 2h après un jeûne de 18h. La quantité relative de transcrits *mtp* par rapport à celle de transcrits des gènes de référence *eflα* (A) et β -actine (B) a été mesurée par RT-PCRq sur sept échantillons indépendants pour chaque stade de développement. Une analyse statistique a été effectuée avec le test Mann-Whitney. Les astérisques symbolisent les différences significatives ($p < 0,05$). Une augmentation significative du rapport $(mtp / efl\alpha) \times 100$ est observée pour la première prise alimentaire à 5 jpf ainsi que pour les larves de 8 jpf nourries en comparaison avec les larves non nourries. Aucune différence significative de la quantité de transcrit n'est cependant décelée lorsque le gène β -actine sert de référence. jpf : jours post-fécondation.

La prise alimentaire accroît donc la quantité de transcrits du gène *mtp* d'un facteur 2 environ dans les larves entières, lorsque le gène *eflα* est utilisé comme référence.

La quantification de l'expression du gène β -actine a également été effectuée sur les larves nourries et non nourries de 5 jpf, 8 jpf et 15 jpf. Le rapport $(mtp / \beta$ -actine) a été calculé et est présenté (Figure 24). Lorsque le gène β -actine est utilisé comme référence, il semble que l'expression du gène *mtp* ne soit pas modifiée par la prise alimentaire. Aucune différence significative n'existe entre les larves nourries et non nourries de 5 jpf, 8 jpf et 15

jpg. Les valeurs du rapport ($mtp / \beta\text{-actine}$) x 100 sont de $2,77 \pm 0,43$ pour les larves de 5 jpf nourries, de $2,63 \pm 0,67$ pour les larves de 5 jpf non nourries, de $3,58 \pm 1,16$ pour les larves de 8 jpf nourries, de $4,01 \pm 0,93$ pour les larves de 8 jpf non nourries, de $2,32 \pm 0,64$ pour les larves de 15 jpf nourries et de $1,84 \pm 0,66$ pour les larves de 15 jpf non nourries.

3- La quantification de la régulation de l'expression du gène *mtp* par la prise alimentaire chez le poisson zèbre adulte.

L'effet de la prise alimentaire sur l'expression du gène *mtp* dans le foie et l'intestin antérieur de poissons zèbres adultes a été quantifié par RT-PCRq en utilisant le gène *efl α* comme référence (Figure 25). Sept échantillons indépendants ont été quantifiés pour chaque organe dans des conditions où le poisson zèbre a été nourri ou non avant le prélèvement.

Le rapport ($mtp / efl\alpha$) x 100 a été calculé et est présenté selon l'organe et l'état nutritionnel de l'animal (Figure 25). Ce rapport est significativement ($p = 0,028$) augmenté, dans l'intestin antérieur, par la prise alimentaire d'un facteur 2,6 puisqu'il est de $12,17 \pm 1,38$ dans des conditions non nourries et de $31,22 \pm 7,69$ dans des conditions nourries. Dans le foie, l'augmentation de ce rapport n'est pas significative ($p = 0,078$) bien qu'il passe de $5,61 \pm 1,48$ dans des conditions non nourries à $14,9 \pm 5,3$ dans des conditions nourries.

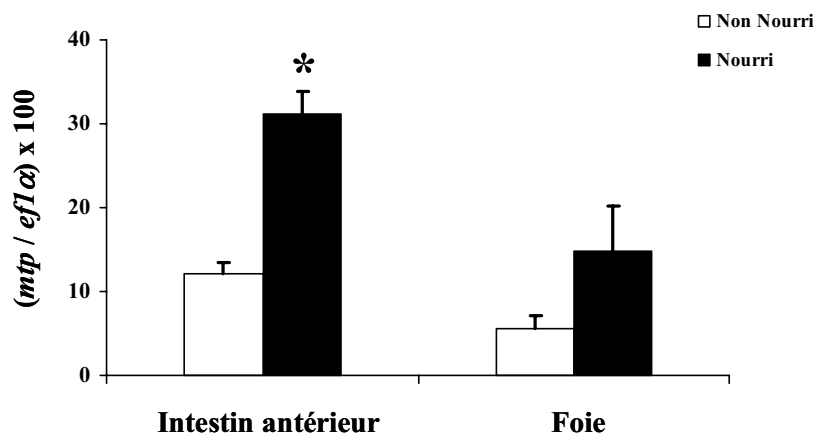


Figure 25 : Quantification de l'effet de la prise alimentaire sur l'expression du gène *mtp* dans l'intestin antérieur et le foie du poisson zèbre adulte par RT-PCRq.

Des poissons zèbres adultes mâles ont été nourries ou non pendant 2,5 h avec des paillettes commerciales après un jeûne de 18h. La quantité relative de transcrits *mtp* par rapport à celle des transcrits du gène de référence *efl α* a été mesurée par RT-PCRq. Une analyse statistique a été effectuée à l'aide du test Mann-Whitney. L'astérisque symbolise une différence significative entre l'état nourri et non nourri ($p < 0,05$). Une augmentation significative d'un facteur 2,6 du rapport ($mtp / efl\alpha$) x 100 est observée dans l'intestin antérieur des animaux nourris par rapport à celui des animaux non nourris.

II. Données supplémentaires sur la grande sous-unité de la MTP et la PDI de poisson zèbre.

A. Détermination de la taille du transcrit *mtp* par northern blot.

La taille du transcrit codant pour la grande sous-unité de la MTP a été déterminée par northern blot. Pour cela, des ARN totaux ont été extraits du foie et de l'intestin antérieur de poissons zèbres femelles préalablement nourries. Une sonde synthétisée avec des amorces nonamériques aléatoires à partir du fragment MTP-884bp a servi pour l'hybridation de la membrane. Un seul transcrit d'environ 4200 pb a été détecté parmi les ARN totaux de foie et d'intestin antérieur (Figure 26). La taille de ce transcrit est similaire à celle de la séquence obtenue par clonage. Le signal obtenu est plus intense dans l'intestin antérieur que dans le foie confirmant les résultats obtenus par RT-PCRq.

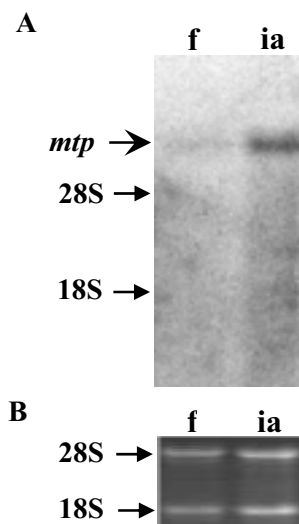


Figure 26 : Détection de l'expression du gène *mtp* dans le foie et l'intestin antérieur de poisson zèbre par Northern blot.

Des ARN totaux (10 µg) de foie (f) et d'intestin antérieur (ia) de femelles nourries ont été transférés sur une membrane en nylon après migration par électrophorèse dans un gel Borax. La membrane a été hybridée avec une sonde marquée de façon radioactive au P^{32} et synthétisée à partir du fragment MTP-884pb. (A) : Révélation du film autoradiographique. Un seul transcrit d'environ 4,2 kb est révélé dans l'intestin antérieur et dans le foie. L'expression du gène *mtp* semble plus importante dans le foie que dans l'intestin antérieur. (B) : Photographie du gel borax après la migration des ARN totaux et avant le transfert. La coloration au bromure d'éthidium des ARN 18S et 28S montre la quantité semblable des ARN de foie (f) et d'intestin antérieur (ia) déposée dans les deux puits.

B. L'analyse bio-informatique du promoteur du gène *mtp* de poisson zèbre.

Les 2000 nucléotides en amont du codon d'initiation méthionine du gène *mtp* de poisson zèbre ont été soumis à une analyse par le programme bio-informatique MatInspector afin d'identifier des séquences similaires à des sites de liaison de facteurs de transcription. Les régions (-1876 pb à -1856 pb), (-1561 pb à -1541 pb) et (-878 pb à -858 pb) ont une similarité de 82%, 83% et 85% avec la séquence de reconnaissance de l'homéodomaine du facteur de transcription pancréatique et intestinal PDX1 (IDX1/IPF1). Deux autres régions (-1321 pb à -1311 pb et -539 pb à -523 pb) ont une forte similarité de 93% et 85% avec la séquence de liaison du facteur de transcription hépatique nucléaire HNF1.

C. L'expression du gène *mtp* dans les entérocytes de poisson zèbre adulte.

La différence de quantité de transcrits *mtp* entre l'intestin antérieur et l'intestin postérieur du poisson zèbre adulte suggère l'existence d'un gradient d'expression de ce gène le long de tractus intestinal, comme cela est le cas chez les mammifères. Pour étudier ce point, des expériences d'hybridation *in situ* sur coupes de cavité intestinale de femelles adultes nourries ont été réalisées (Figure 27).

L'intestin de poisson zèbre adulte est replié sur lui-même et forme deux boucles dans la cavité digestive (Figure 27A). Lorsque la cavité est tranchée transversalement, plusieurs anneaux correspondant à différentes régions de l'intestin peuvent être présents sur la même coupe. Ainsi, les sections utilisées contiennent une partie très proximale d'intestin antérieur (ia), une portion plus caudale de cet intestin antérieur (ia 2) et fragment d'intestin postérieur (ip), permettant le traitement simultané de ces différentes régions d'intestin. La localisation du signal d'hybridation de la sonde antisens (Figure 27B) montre qu'il existe un gradient d'expression du gène *mtp*. En effet, ce signal est très intense dans la partie la plus proximale de l'intestin antérieur (ia), un peu plus pâle dans une région plus caudale de l'intestin antérieur (ia 2) et très faible dans l'intestin postérieur (ip). L'observation de ce signal à plus fort grossissement permet de le localiser plus précisément dans les entérocytes (en) de l'épithélium de l'intestin antérieur, alors que les cellules à mucus (cm) ne sont pas colorées. L'hybridation de la sonde sens (Figure 27C) n'a révélé aucun bruit de fond.

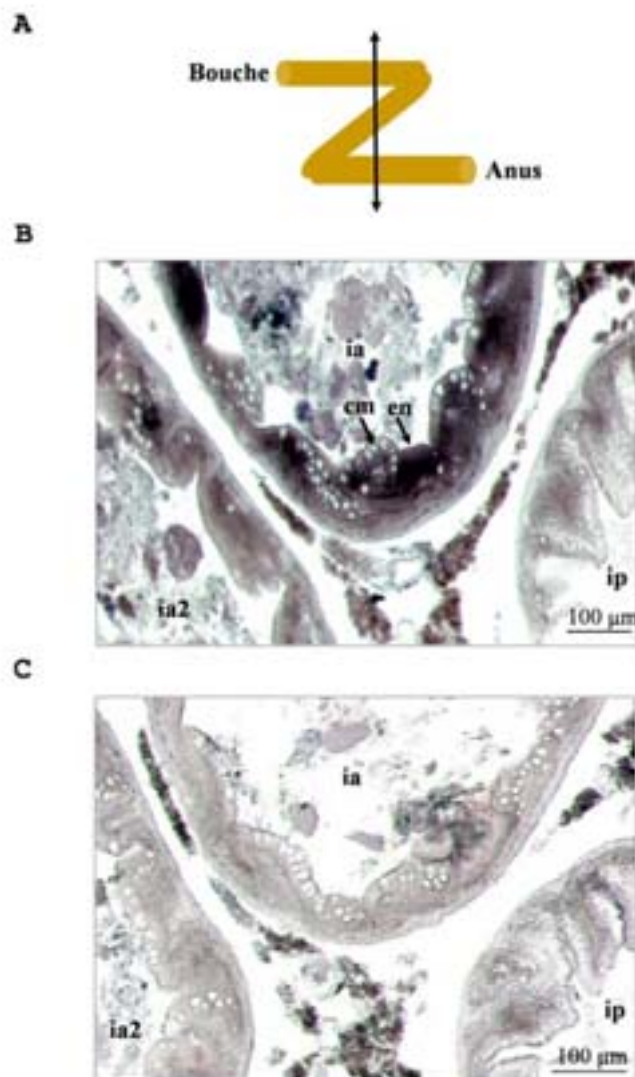


Figure 27 : Expression du gène *mtp* dans la cavité intestinale du poisson zèbre adulte.

La cavité intestinale de poissons zèbres femelles de 8 mois nourries pendant 2,5 h a été prélevée et sectionnée transversalement en coupes de 7 µm d'épaisseur. Comme l'intestin est replié sur lui-même au sein de la cavité (A), les coupes transversales rendent possible l'obtention de différentes régions de cet organe sur une même section. Trois anneaux sont présents sur les coupes et correspondent à de l'intestin antérieur proximal pour l'anneau 1 (ia), à de l'intestin antérieur plus distal pour l'anneau 2 (ia2) et à de l'intestin postérieur (ip) facilement reconnaissable par l'intense vacuolarisation présente dans les cellules. L'expression du gène *mtp* a été suivie par hybridation *in situ* en utilisant les mêmes sondes que pour l'hybridation *in situ in toto*. Un signal d'hybridation de la sonde antisens (B) est visible dans les anneaux correspondant à de l'intestin antérieur (ia et ia2) alors que l'anneau d'intestin postérieur (ip) reste clair. Ce signal est plus précisément localisé dans les entérocytes (en) alors que les cellules à mucus (cm) ne sont pas colorées. Aucun signal n'est détecté lors de l'hybridation de la sonde sens (C).

D. Mesure de l'activité de transfert des triglycérides et des esters de cholestérols.

L'activité spécifique de transfert des triglycérides et des esters de cholestérols a été mesurée dans des fractions microsomales préparées à partir d'intestin antérieur, de foie et de muscle de poisson zèbre (Figure 28).

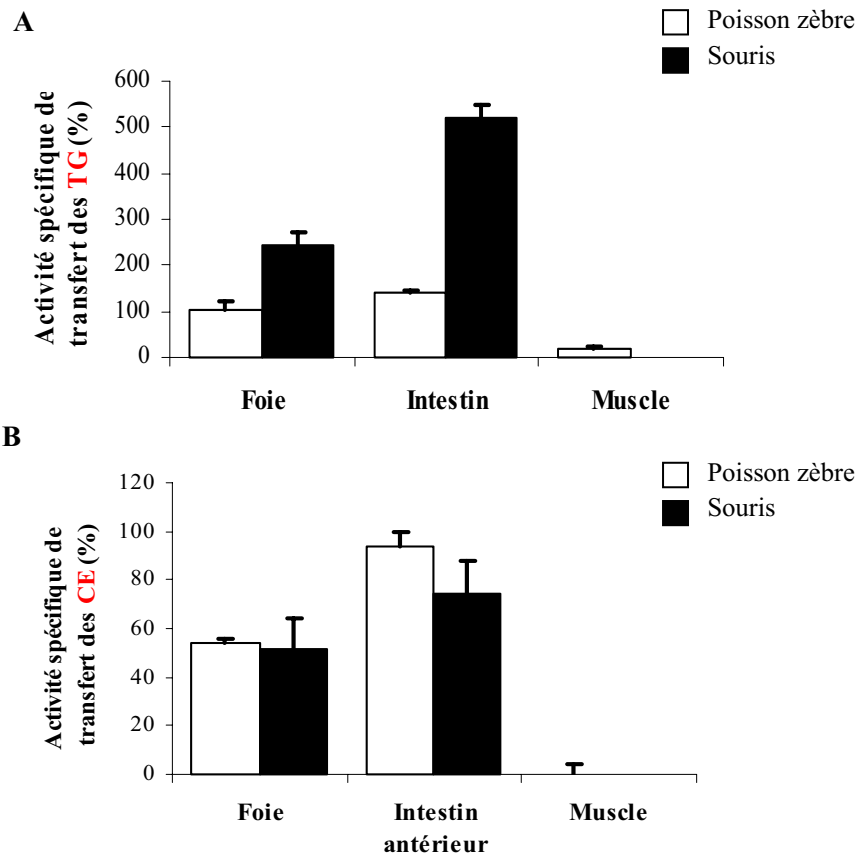


Figure 28 : Mesure des activités spécifiques de transfert des triglycérides et des esters de cholestérol.

L'activité de transfert des triglycérides (TG) (A) et celle des esters de cholestérol (CE) (B) par mg de protéines totales et par minute ont été mesurées sur des fractions microsomales extraites de foie, d'intestin antérieur et de muscle de poissons zèbre nourris (blanc) ainsi que sur des fractions microsomales préparées à partir de foie et de duodénum de souris (noir). Cette mesure a été effectuée par le Dr Paul Rava dans le laboratoire du Pr M Hussain à partir d'échantillons biologiques envoyés par nos soins. La technique utilisée est décrite par Athar *et al.* (2004). L'activité spécifique de transfert des triglycérides (A) présente dans le foie et l'intestin antérieur de poisson zèbre est très inférieure à celle détectée chez la souris alors que l'activité spécifique de transfert des esters de cholestérol (B) est similaire. Aucune activité spécifique de transfert des triglycérides et des esters de cholestérol n'est détectée dans le muscle de poisson zèbre. Des inhibiteurs de la MTP (BMS 200150 et BMS 197637) abaissent ces valeurs jusqu'à une activité presque nulle.

Ceci a été effectué en parallèle avec la mesure de cette activité dans des fractions microsomales extraites de foie et de duodénum de souris. Des fractions microsomales ont été utilisées afin d'augmenter la concentration de protéine MTP. L'activité spécifique de transfert des triglycérides présente dans l'intestin antérieur et dans le foie de poisson zèbre est significativement inférieure à celle obtenue pour les tissus de souris respectifs. En effet, elle est de $104,5\% \pm 15,9\%$ dans le foie de poisson zèbre et de $241,6\% \pm 29,2\%$ dans le foie de souris. Dans l'intestin antérieur de poisson zèbre elle est de $140\% \pm 6,5\%$ contre $522,2\% \pm 27\%$ dans le duodénum de souris. Cette différence d'activité spécifique de transfert des triglycérides est de 57% dans le foie et de 73% dans l'intestin. Par contre, l'activité spécifique de transfert des esters de cholestérol est semblable entre les fractions microsomales issues de tissus de souris et celles de poisson zèbre. Une très faible activité spécifique de transfert des triglycérides et des esters de cholestérol a été détectée dans les microsomes de muscle de poisson zèbre. Des inhibiteurs de la MTP (BMS 200150 et BMS 197637) ont servi de contrôle et ont montré une baisse de l'activité spécifique de transfert des triglycérides ainsi que des esters de cholestérol qui atteint un niveau quasi nul (résultats non montrés).

E. Caractérisation de la petite sous-unité de la MTP de poisson zèbre.

Des séquences de poisson zèbre codant pour l'homologue de la PDI impliquée dans le complexe MTP humain ont été recherchées par analogie de séquence avec la PDI humaine (P07237) dans la banque de données Genbank. Aucun ADNc entier n'y est présent mais des clones dbEST (numéros d'accèsion Genbank : BF158119, CO914922, BI890770, BI887648) chevauchants nous ont permis d'obtenir la séquence entière supposée de ce transcrit. La séquence protéique déduite contiendrait 509 acides aminés et partagerait 75% d'identité avec la PDI humaine et 55% d'identité avec la PDI de drosophile (P54399) (Figure 29). Un gène de poisson zèbre est associé à ce transcrit avec le numéro d'identifiant ENSDARG00000014703. Cette protéine se distingue du précurseur PDI-P5 qui a été identifié chez le poisson zèbre (Hoshijima *et al.*, 2002).

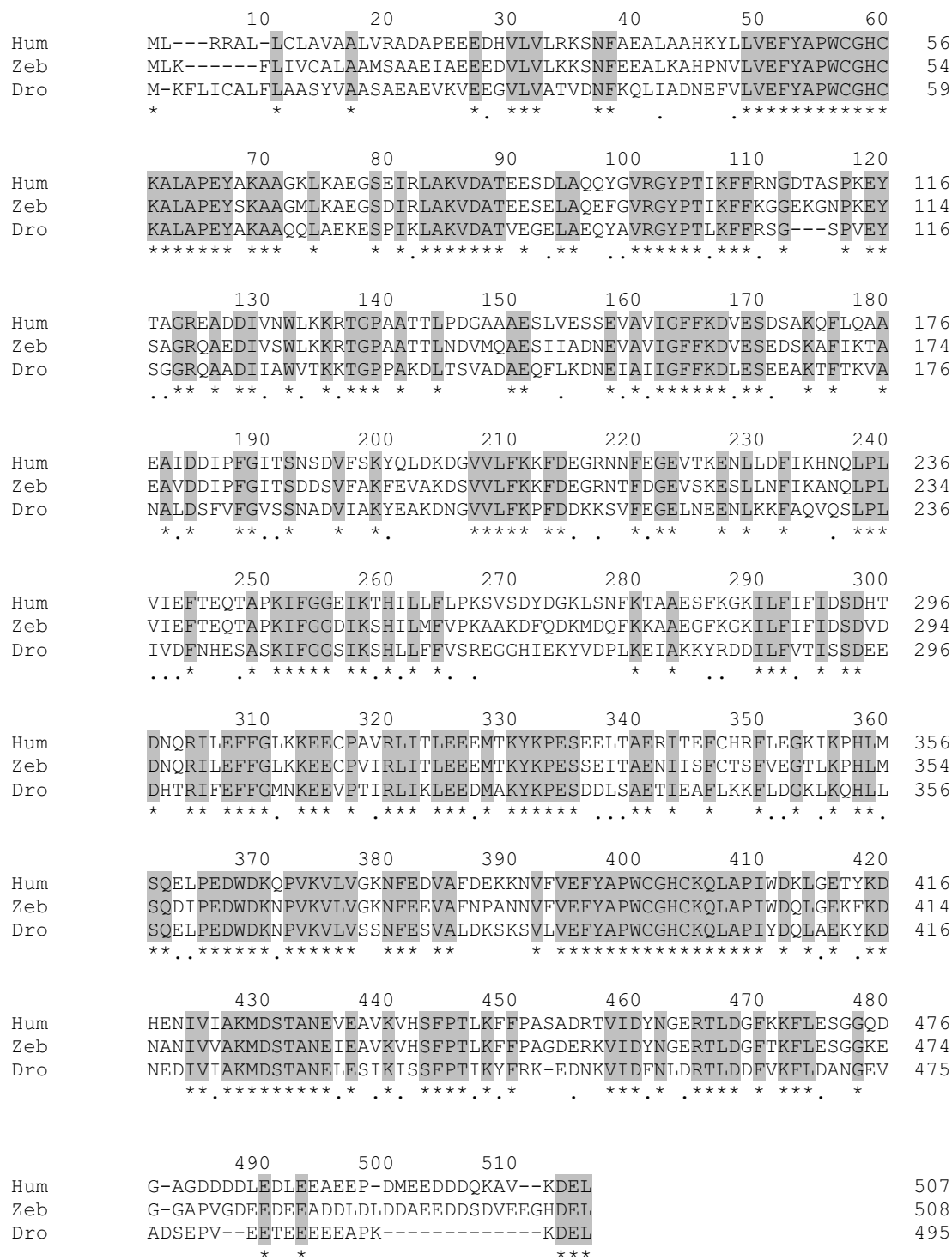


Figure 29 : Alignement des séquences protéiques de la PDI humaine, de poisson zèbre et de drosophile.

Les séquences protéiques de la PDI humaine (Hum, P07237), de poisson zèbre déduite à partir de clones dbEST (Zeb, BF158119, CO914922, BI890770, BI887648) et de drosophile (Dro, P54399) ont été alignées à l'aide du logiciel ClustalW et réajustées manuellement. Les acides aminés identiques sont surlignés en gris et sont indiqués par un astérisque. Les acides aminés similaires sont indiqués par un point. Les substitutions conservatives utilisées sont : A, G; S, T; E, D; R, K, H; Q, N; V, I, L, M; Y, F; W; P; C.

III. Les gènes codant pour les apoB de poisson : caractérisation, expression au cours du développement et régulation nutritionnelle.

Par définition, les séquences d'apolipoprotéine B contenant l'intégralité du domaine de liaison au récepteur aux LDL seront appelées apoB α . Celles qui possèdent un domaine de liaison au récepteur tronqué seront nommées apoB β .

A. L'identification de plusieurs formes d'apoB chez le poisson zèbre.

L'alignement des séquences nucléotidiques des clones dbEST disponibles dans les banques de données, référencées comme étant similaires à l'apoB humaine ou de saumon a permis de révéler l'existence de deux transcrits différents. L'un de ces transcrits, nommé apoB α , contient l'intégralité du domaine de liaison au récepteur aux LDL formé des régions A et B et du feuillet β riche en prolines. Ce transcrit est plus proche de la séquence humaine que de la séquence de saumon. L'autre transcrit, nommé apoB β 1, possède un domaine de liaison au récepteur aux LDL tronqué et est plus proche de la séquence de saumon. Les clones appartenant à ces deux formes d'apoB de poisson zèbre sont référencés dans le Tableau 9.

Afin de vérifier l'existence de ces transcrits, des amorces spécifiques de l'une ou de l'autre des deux formes, choisies au niveau des régions A et B, ont été utilisées et ont permis l'amplification de deux fragments, apoB α -613bp et apoB β 1-496bp.

1- L'identification des gènes codant pour les apoB de poisson zèbre.

Les gènes codant pour des apoB de poisson zèbre sont rassemblés dans la famille ENSF0000000516, identifiée par interrogation de la base de donnée du génome du poisson zèbre (http://www.ensembl.org/Danio_rerio/) par saisie du nom et par analogie de séquence. Cette famille comporte quatre gènes distincts dont les gènes ENSDARG00000018876 et ENSDARG00000022767 qui sont identiques. Ces deux gènes ont strictement la même séquence et le même environnement génique. Il s'agit donc du même gène. Trois gènes distincts codant pour des apoB de poisson zèbre ont ainsi été identifiés.

Nom des transcrits	Séquences nucléotidiques des transcrits		Gènes
	Régions (pb)	Numéro d'accension des clones	
apoBα 13462 pb	7-731 1134-1715 2947-3451	<i>zfish</i> TC265724 (AI558723, AL925421). AI964937 . <i>zfish</i> TC241668 (AI943057, AL924582, CK703279, CK674719, AI558478). AI943291 . <i>zfish</i> TC266721 (AI722872, AI415977). <i>zfish</i> TC238656 (BG799159, AI436865, AI437461, AW018680, AW019100, AW778226, BF717430, CB352149, CB365965, CN508988, CK678335, CK706557, BI473540, BG884597, AI959194, AI958481, AI958556, CK872131, CN501218, AI722334, AI959554, AI959561, AI584905, AI437351).	ENSDARG00000013010 Chromosome 17
	9310-9736 9695-10343 10567-13462	AF096505 . CK147233 ; AI437260 ; <i>zfish</i> TC258126 (CN315749, BI875851, BI877720, AI626679, AI601593, BF157788, CK148553, AI558953, AI558299, AI353955, AW421939, CK677140, CK705546, AI626413, AI601555, AI416273, AI522358, CF266135, AW018510, AW019037, BM860179, BM859937, CN315791, BM265745, BM265430, CF265757, CK018798, AI883357, AI437296, AI444485, AI882944, AI877788, AI793681, AW344319, AW342639, CN316623, CK018508, CB354624, CB353168, AW421880, AW342851, CD757394, AI959401, CF594887, CK670100, CB359572, AW422693, AI959062, AI545778, BQ077474, CK126352, CB353245, CB362670, AI396774, CB363234, CB364281, AI436918, AI415830, AI943325, CN316025, CB363624, AI497368, AI416248, AI522511, CB359205, CK864775, CK871428, CB362742, CN318560, CK868357, CK669257, BQ284231, CN167465, CK870771, CK142214, CB365619, BF158562, BG304300, CK141984, CB360432, CK669391, AI618140, CB352649, CB362975, BM776877, BM776581, CB366553, CK867108, CK871063, CK866987, CB359069, CK025611, CK017249, BM183611, BM183927, CK866686, CB357847, AI616730, CK713149, AI629134, AI601310, AI437240, AI444532, CB352290, CF243274, CB354873, CK865690, CB363265, CB357694, CK714539, CB356754, CB355460, CB355527, CN316331, CK714580, CK870813, CK142193, CB351975, CB358300, CB361059, AI585161, BQ169323, BQ076446, CB365502, CB362645, CK669346, CN173325, CK713135, CN331225, CK711898, CB364682, CK714613, AI496992, AI437000, AI415913, AI444251, AI461308, AI416135, AI397480, CK669486, CB354837, CN169780, CK711701, BM858071, CK713872, AI626528, CK711585, CF594742, CK713448, CN174297, CK712668, CB360005, CB365784, CK708974, AI545353, AI496963, AI497438, AI722752, AI721692, CN317347, CK711640, CN322352, CN327728, CB353189, CK714624, BE693167, BQ260902, CK015623, BM156724, BI878016, BI878881, BM155602, BQ077270, BQ615092, AW116452, BM154513, BM154221, BM574704, BQ077343, BQ093352, BQ076307, BM155636, BM154636, BM183033, BM858214, BQ076788, BQ076539, BM154775, BQ077468, BQ075981, BM265816, BQ076725, BQ075355, BQ078129, BM778758, BM574751, BQ075306, BM778850, BQ093344, BQ077001, BM315290, BM266007, BM182996, BM858235, BQ077289, BQ076039, BQ077593, BM530805, BQ077949, BM265864, BQ076723, BQ075801, BM266025, BM181389, BQ093319, BQ093433, BM265989, BM155570, BM812289, BQ078053, BM572549, BM182922, AI444466, BQ078070, BQ077572, CF999579, AW777991, AW777352, AI544709, CN167738, AI416016, CN167900, CN172206)	ENSDARG00000018876 Chromosome 20
apoBβ2 7727 pb	4675-5421 5967-7002 7449-8027	<i>zfish</i> TC255035 (CK016989, AI617417). <i>zfish</i> TC253856 (CF998727, CK028450, CK699426). AI959738	ENSDARG0000001027 Position non déterminée

Tableau 9 : Numéros d'accension des séquences des apoB de poisson zèbre.

Des clones nucléotidiques dbEST issus des banques de données TIGR (en italique et commençant par *zfish*) et Genbank ont été identifiés pour les formes apoB α , apoB β 1 et apoB β 2. Les numéros d'accension écrits entre parenthèses correspondent aux clones issus de la banque Genbank. Les régions du transcrit, dont la taille est donnée en dessous de son nom, recouvertes par les séquences des clones sont inscrites devant leur numéro d'accension. Le numéro d'accension des gènes et leur localisation dans le génome du poisson zèbre sont également indiqués (http://www.ensembl.org/Danio_riero/).

Le gène ENSDARG00000013010 correspond au transcrit codant pour l'apoB α de poisson zèbre. Il est actuellement localisé sur le chromosome 17. Son annotation n'est pas terminée mais d'après les données existantes, ce gène contiendrait 28 introns dans la phase codante, tout comme le gène humain (Tableau 10). Le gène du poisson zèbre ne possède pas d'intron équivalent à l'intron 9 du gène *apoB* humain. Par contre, il présente un intron supplémentaire entre les introns 27 et 28 du gène humain. Les introns du gène humain et du gène *apoB α* sont de même types mais ils sont de taille différente. Dans les deux séquences, un exon de grande taille, de 7572 pb pour le gène humain et 7584 pb pour le gène de poisson zèbre, est retrouvé à la position 26 pour le gène humain et 25 pour le gène *apoB α* . Les autres exons ont des tailles similaires.

Le gène ENSDARG00000018876 (ou ENSDARG00000022767) correspond au transcrit codant pour l'apoB β 1 de poisson zèbre. Il est situé sur le chromosome 20 et serait constitué de 28 exons dont un, le numéro 25, de 5976 pb.

Le gène ENSDARG00000001027 ne correspond à aucun des deux transcrits identifiés. Il coderait pour une protéine de type apoB mais de séquence et de taille différente des apoB α et apoB β 1. Cette troisième forme d'apoB de poisson zèbre a été nommée apoB β 2 du fait de la présence d'une délétion entre les régions A et B du domaine de liaison au récepteur aux LDL. L'annotation du gène *apoB β 2* n'est pas terminée. Ce gène apparaît tronqué en deux fragments du fait d'une erreur de positionnement d'un intron. En effet, le cadre ouvert de lecture annoté se termine par un codon stop suivi d'une autre phase de lecture correspondant au deuxième fragment. Un intron qui n'aurait pas été identifié par le programme informatique utilisé pour déterminer la structure des gènes du poisson zèbre existerait entre ces deux ORF, éliminant le codon stop du premier fragment. Le transcrit correspondant à ce gène comprend 8027 nucléotides. Le gène *apoB β 2* contiendrait au moins 21 exons. Très peu de clones dbEST correspondant à ce transcrit ont été identifiés (Tableau 9). Un fragment, apoB β 2-545bp, localisé en partie 5' de ce transcrit a été amplifié par RT-PCR grâce aux amorces apoB β 2-S et apoB β 2-R sur des ARN totaux extraits de foie de poissons zèbre mâles nourris confirmant l'expression de ce gène.

Exon	Espèce	Taille de l'exon (pb)	Séquence des jonctions exons / intron		Taille de l'intron (pb)	Type de l'intron	
			Site donneur 5'	Site accepteur 3'			
1	Humain	210	GCCAGGGCCG	gtgagtgctgc...tgtcttacag	AAGAGGAAAT	312	1
1	Poisson zèbre	52	TTATTGCCAG	gtaagacttt...gtttctaaag	GAAGCACTAG	631	1
2	Humain	39	GTCTGTCCAA	gtaaggtcatc...cccacgttag	AAGATGCGAC	1036	1
2	Poisson zèbre	51	AAATGCCCAT	gtaagcaacc...actttttaag	TTTTTAAGTG	357	1
3	Humain	116	CAATGCAAG	gtatggagga...gaattctcag	GTTGAGCTGG	1277	0
3	Poisson zèbre	113	CTCTGCCAG	gtacaaaaac...cgctcatcag	GTTGAAATTG	379	0
4	Humain	146	CCATGTCCAG	gtaagtcatg...tctgggacag	GTATGAGCTC	2826	2
4	Poisson zèbre	146	CTATGGAGAA	gtatgtggag...cctttttcag	GAACACCCTC	121	2
5	Humain	154	GTTGTTTCTG	gtgaggattt...tctctcatag	GATACCGTGT	702	0
5	Poisson zèbre	148	TGAAAGATG	gtgagataaa...ttcttttttag	AGCACAAATC	318	0
6	Humain	156	CAAAGGCATG	gtaagtecca...tctttcatag	ACCCGCCCTT	1391	0
6	Poisson zèbre	153	GCCTGGGCTG	gtacgacaca...tcttttgca	AATGGACTTT	100	0
7	Humain	125	TCTCCTACAA	gtagggtcatg...tggttaccag	GAATAAGTAT	682	2
7	Poisson zèbre	125	TCTCACATGA	gtgcgttatc...ttctctatag	GGGGCAGTAT	1294	2
8	Humain	86	TTTGGTGAAG	gtaagagttt...catcttccag	GTACTAAGAA	1297	1
8	Poisson zèbre	89	AACAAGATG	gtaagaattc...ttataaccag	ATACTCTTGA	171	1
9	Humain	220	AGGTGTCCAG	gtatctaatag...ttctttctcag	CCCCATCACT	717	2
-	Poisson zèbre	-	-	-	-	-	-
10	Humain	228	CGGTCAACAA	gtgagtttcc...tattctgtag	CTATCATAAG	2338	2
9	Poisson zèbre	448	CAGTGAAACA	gtaagtgtct...tattttgcag	GCTTCTCAA	116	2
11	Humain	118	GATTCTGCCG	gtaatctcag...ttcaatgcag	GTCATTGGAA	112	0
10	Poisson zèbre	115	AACATTAAGG	gtaaatgtgt...tgtgttacag	GTCATTGGTG	80	0
12	Humain	147	TAAAGACAAG	gtaaagtcca...ttgactgcag	GACCAGGAGG	1100	0
11	Poisson zèbre	144	GGATTTCAGAT	gtaaataaat...ttgtttctag	GTGAGAAGTG	383	0
13	Humain	212	ATATCCAAGA	gtaagtaaga...tcttatctag	TCTGAAAAG	261	2
12	Poisson zèbre	206	ACCTGAGCAT	gtacgtacaa...atgttttttag	AGCAAAGGAC	665	2
14	Humain	238	CCTCATCGAG	gtaagtgtga...tctttctcag	ATTGGCTTGG	863	0
13	Poisson zèbre	205	AATACTGGAG	gtactctaca...tttttttcag	ATTGGTCTTG	104	0
15	Humain	177	ACATGAGCAG	gtgtgtatct...aaactctcag	GATATGGTAA	1663	0
14	Poisson zèbre	180	GAAAAGACAG	gtaagaacat...acctccttag	GTTCTCTAAG	79	0
16	Humain	192	CCCCAGATG	gtaagtcagc...gggtctcag	ATTGGAGAGG	1240	0
15	Poisson zèbre	204	GTCTTTGAAT	gtaagtgttt...gtgattgcag	TTTATGGGAA	87	0
17	Humain	168	AGTAGCCAAC	gtaagattct...tgacttatag	ATGCAGGCTG	482	0
16	Poisson zèbre	168	CCGATGATG	gtaattaatt...ctattcacag	CAACAGCTCT	76	0
18	Humain	212	TCAGTGGAGG	gtaattcttt...tcttcaccag	CAACACATTA	2925	2
17	Poisson zèbre	206	TCAGTGTCCAG	gtgggtctat...tcaacaacag	CAACAAAATA	568	2
19	Humain	183	GGGACACCAG	gttagagatg...atgtcttttag	ATTAGAGCTG	609	2
18	Poisson zèbre	183	GCGAGACAAG	gtgagaatgt...tcttttacag	GCTCGCTCTG	1732	2
20	Humain	122	CAAGCAGAAG	gtgagtatct...actcgtccag	GTGCGAAGCA	2342	1
19	Poisson zèbre	131	AAGGTGAGG	gtaggtctc...ttattttaag	GTGCTGAGCC	1064	1
21	Humain	211	GCCACCTAAG	gtaaagaagg...tttaccatag	TTGTGACACA	893	2
20	Poisson zèbre	211	GACACGCCAG	gtaagata...ttctgagtag	GTTGGAGTCT	142	2
22	Humain	176	TGGCATTATG	gtatgtgtct...gtattttcag	ATGAGAGAA	109	1
21	Poisson zèbre	173	CTCAGATACG	gtaatgatgg...tactttgcag	ATAATAACAA	83	1
23	Humain	188	ATTAATAGTT	gtaagtatga...cattttgtag	GCAATGAGCT	479	0
22	Poisson zèbre	176	AGGGTTAGAG	gtatgtcgat...ttgtctctag	GCTGTGAATA	89	0
24	Humain	146	TCTTAAAAAG	gtaaaagaag...ttcattttcag	CGATGGCCGG	914	2
23	Poisson zèbre	122	ATCTTAAATC	gtaagtgaca...ttatgtttcag	TGATGCACTG	1250	2
25	Humain	374	AAATGTGCAAG	gtgagctatg...tttatgttag	GATCTGGAGA	508	1
24	Poisson zèbre	374	AAAATTTGAAG	gtaagaatca...cttcacatag	GTATGGGAAT	187	1
26	Humain	7572	GAACTAAATG	gtaagaaata...tctctacacag	TTTTGGGAAC	404	1
25	Poisson zèbre	7584	AACTTAGATG	gtaagcttta...acatttttag	CAATTGCCAC	79	1
27	Humain	115	AAGGACTTCA	gtatggagct...ctgctttcag	GGAATGGGAA	108	2
26	Poisson zèbre	112	AGAACTAAG	gtaataaaat...gtttttccag	AATGAAGCGC	86	2
-	Humain	-	-	-	-	-	-
27	Poisson zèbre	30	CAGTTTCCCG	gtaatttctc...tactccacag	TCCCTCACGA	90	2
28	Humain	184	CAGCCTCAG	gtaaatacca...ctctgttttag	TCCTCTCCAG	934	0
28	Poisson zèbre	187	CAGATATTTG	gtaagtgggt...gtttatccag	TCAACATCTG	82	0
29	Humain	1906			...CATCCTCTAA		
29	Poisson zèbre	122			...CATGGCATAG		

Tableau 10 : Comparaison de la structure des gènes *apoB* humain et *apoB α* de poisson zèbre.

La taille des exons ainsi que la taille et le type des introns des gènes *apoB* humain (Blackhart *et al.*, 1986) et *apoB α* de poisson zèbre sont donnés. Les introns de type 0 sont localisés entre deux codons alors que les introns de type 1 et de type 2 s'insèrent respectivement entre les bases 1 et 2, et les bases 2 et 3 d'un même codon (Breathnach et Chambon, 1981). Au centre du tableau, les extrémités 3' de l'exon (en majuscules) précédant et 5' de l'exon suivant (en majuscules) encadrent les extrémités 5' et 3' de l'intron (en minuscules) inclus entre ces deux exons. Les (-) représentent l'absence de l'intron.

L'environnement génomique de chacun des gènes codant pour les apoB de poisson zèbre a été analysé et comparé à celui du gène *apoB* humain (Figure 30). Le gène *apoB* humain est placé à plus de 1500 kb en amont du gène NM_021925 codant pour la protéine FLJ21820 lui-même situé en amont du gène NM_022460. En aval du gène *apoB* se trouve le gène Q9UHZ5. Sur le brin anti-parallèle est localisé le gène codant pour le facteur de croissance GDF7 («growth differentiation factor 7»). Tout comme pour le gène humain, le gène *apoB α* de poisson zèbre est directement placé en amont du gène *ENSDARG00000006504* codant pour une protéine homologue de la protéine humaine FLJ21820. Le gène de poisson zèbre *gdf7* homologue du gène *gdf7* humain est également situé sur le brin inverse complémentaire de celui contenant le gène *apoB α* . Les autres gènes localisés dans l'environnement proche du gène *apoB α* sont différents de ceux trouvés à proximité du gène *apoB* humain.

Les gènes situés à proximité des gènes *apoB β 1* et *apoB β 2* sont distincts. Le gène *apoB β 1* est directement en amont du gène *ENSDARG00000015869* codant pour l'homologue du transporteur de cations SLC22A16 humain et en aval du gène *pdip5* codant pour une protéine similaire au précurseur 5 de la PDI humaine (PDIP5). Le gène *apoB β 2* quant à lui est localisé en amont du gène *ENSDARESTG00000018582* codant pour une protéine analogue à la protéine du point de contrôle mitotique, BUB1, et en aval du gène *ENSDARG00000009458* codant pour l'homologue du facteur d'épissage PRP17. L'environnement génomique des gènes *apoB β 1* et *apoB β 2* est totalement distinct alors que les gènes *apoB α* et *apoB* humain présentent un groupe de syntenie parfaitement conservé.

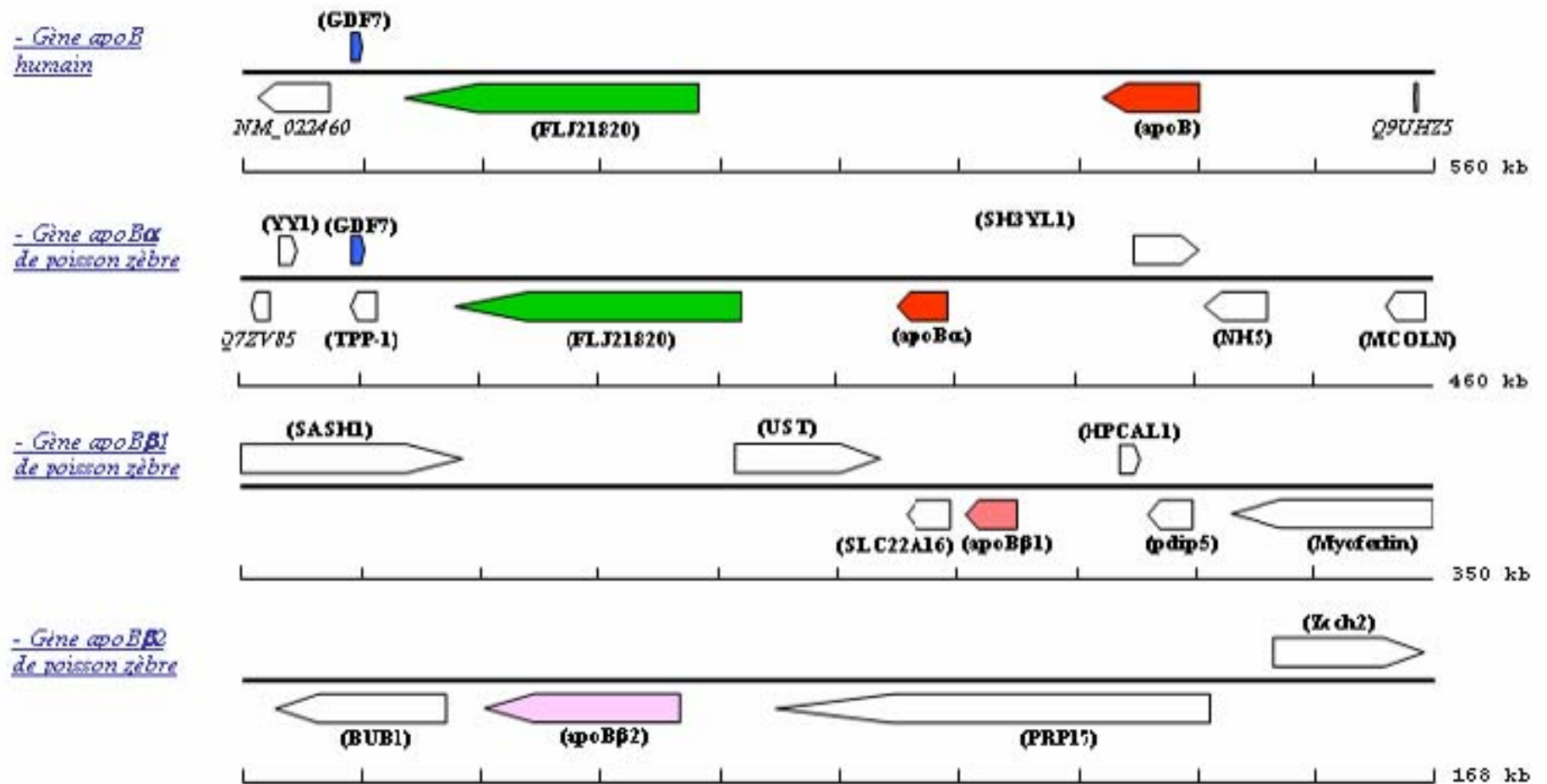


Figure 30 : Comparaison de l'environnement génomique du gène *apoB* humain et de celui des gènes *apoB* du poisson zèbre.

Les gènes situés en amont et en aval des gènes *apoB* humain, *apoBα* (chromosome 17), *apoBβ1* (chromosome 20) et *apoBβ2* (position *Zv4_NA3475*) ainsi que ceux situés sur le brin inverse complémentaire sont schématisés. Les noms indiqués entre parenthèses sont ceux des protéines codées. Les noms écrits en italiques sont ceux des gènes lorsqu' aucune protéine identifiée ne leur est attachée. Les numéros d'accèsion des gènes proches du gène *apoB* humain sont : est *NM_021925* (FLJ21820), *gdf7* (GDF7), *NM_022460*, *Q9UHZ5*. Les numéros d'accèsion des gènes proches du gène *apoBα* sont *ENSDARG00000018213* (TPP-1), *gdf7* (GDF7), *ENSDARG00000006504* (FLJ21820), *ENSDARG000000030370* (NHS), *zgc:55310* (MCOLN) et *ENSDARG00000029734* (SH3YL1). Les numéros d'accèsion des gènes entourant le gène *apoBβ1* sont : *ENSDARG00000007179* (SASH1), *ENSDARG00000006044* (UST), *zgc:63695* (HPCAL1), *ENSDARG00000020207* (Myoferlin) et *ENSDARG00000015869* (SLC22A16). Les numéros d'accèsion des gènes situés à proximité du gène *apoBβ2* sont : *ENSDARESTG00000018582* (BUB1), *ENSDARG00000009458* (PRP17) et *ENSDARG00000033778* (Zch2). Une échelle en nombre de bases est indiquée en dessous de chaque fragment

2- La comparaison des séquences protéiques déduites des apoB de poisson zèbre.

La protéine apoB α déduite est la plus longue des trois apoB de poisson zèbre et comprend 4412 acides aminés. Son poids moléculaire et son pHi théoriques calculés sont respectivement de 494,74 kDa et de 5,42. La probabilité de présence d'un site de coupure d'un peptide signal est forte entre les acides aminés 17 et 18. Elle possède une identité de 32% avec l'apoB-100 humaine (NP_000375). La protéine apoB β 1 déduite contient 3739 acides aminés. Elle a un poids moléculaire et un pHi théoriques calculés de 413,65 kDa et 5,02 respectivement. La probabilité de présence d'un site de coupure d'un peptide signal est très forte entre les résidus 20 et 21. L'apoB β 1 possède 29% d'identité avec l'apoB-100 humaine. La protéine apoB β 2 est constituée de 2570 acides aminés. Son poids moléculaire et son pHi théoriques calculés sont 283,16 kDa et 5,66, respectivement. L'existence d'un site de coupure d'un peptide signal est probable entre les acides aminés 20 et 21. Les protéines apoB β 1 et apoB β 2 partagent 44% d'identité de séquence alors que l'apoB α possède respectivement 36% et 25% d'identité de séquence avec l'apoB β 1 et l'apoB β 2.

Les séquences protéiques des trois formes d'apoB de poisson zèbre ont été alignées avec celles de l'apoB-100 humaine, de l'apoB de souris et de l'apoB de poulet (Annexe 7). Certains acides aminés identifiés essentiels sont conservés entre l'apoB humaine et les apoB de poisson. Ainsi, l'arginine 531 de l'apoB humaine (ou 558 en comptant le peptide signal) impliquée dans la maladie d'hypobétalipoprotéïnémie familiale est conservée dans les 3 formes d'apoB. L'arginine 3500 (ou 3527 avec le peptide signal) dont la mutation induit une déficience familiale en apoB-100, est conservée dans les apoB α et apoB β 1 de poisson zèbre. Une lysine est retrouvée à cette position dans la séquence apoB β 2 de poisson zèbre.

Les régions les plus conservées entre ces séquences sont situées en partie N-terminale et dans le domaine de liaison au récepteur aux LDL. La partie N-terminale de ces protéines correspond au domaine $\beta\alpha$ 1 qui contient le motif LPD_N (Lipoprotein N-terminal, [SM00638](#)) ou LLT (Large Lipid Transfer). Cette région analogue au domaine $\beta\alpha$ 1 de la protéine humaine se situe entre les acides aminés 1 et 983 pour l'apoB α , entre les positions 1 et 959 pour l'apoB β 1 et entre les résidus 1 et 928 dans l'apoB β 2. Dans la protéine apoB-100 humaine, ce domaine est situé entre les acides aminés 1 et 1001. Les apoB de poisson zèbre comportent des délétions en comparaison avec la protéine apoB-100 humaine (Figure 31).

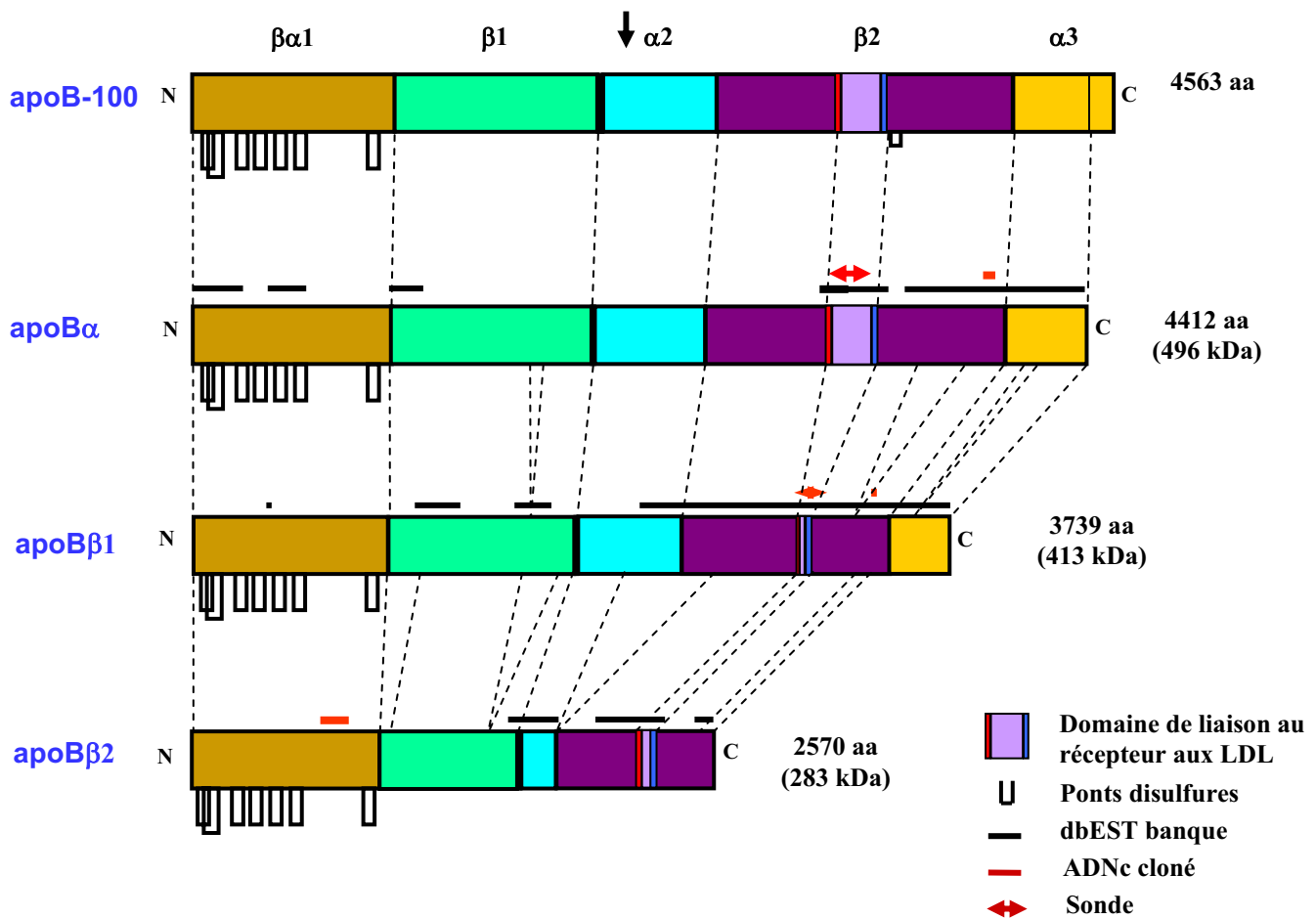


Figure 31 : Comparaison de la structure secondaire des apoB humaines et de poisson zèbre.

Les domaines $\beta\alpha 1$, $\beta 1$, $\alpha 2$, $\beta 2$ et $\alpha 3$ de la protéine apoB-100 humaine prédite (Segrest *et al.*, 2001) sont schématisés par des boîtes de différentes couleurs. La région liant le récepteur aux LDL est incluse dans le domaine $\beta 2$. Leurs correspondances en acides aminés dans l'apoB α , l'apoB $\beta 1$ et l'apoB $\beta 2$ de poisson zèbre sont indiquées par des traits en pointillés reliant les protéines les unes aux autres. Les traits noirs au dessus de l'apoB α et en dessous de l'apoB $\beta 1$ et de l'apoB $\beta 2$ symbolisent les parties identiques aux séquences des clones dbEST trouvés dans les banques de données. Les traits rouges représentent les séquences que nous avons amplifiées dont celles distinguées par une double flèche qui ont servi de sondes pour l'hybridation in situ. La flèche noire symbolise l'arrêt de l'apoB-48. Le nombre d'acides aminés de chacune des protéines est donné en incluant le peptide signal. Echelle : 1 cm équivaut à 349 acides aminés.

La partie C-terminale de l'apoB-100 humaine (acides aminés 4443 à 4563) n'est présente dans aucune des apoB de poisson zèbre. L'apoB α , proche de la protéine humaine, possède quelques très courtes délétions dans chaque domaine structural par comparaison à l'apoB-100 humaine. L'apoB $\beta 1$ présente des délétions plus importantes par rapport à l'apoB α essentiellement réparties dans les domaines $\beta 1$, $\beta 2$ et $\alpha 3$. L'apoB $\beta 2$ est la protéine qui comporte le plus grand nombre de délétions. Dans cette protéine de poisson zèbre, le domaine $\alpha 3$ est absent, moins de la première moitié du domaine $\alpha 2$ est présente, le début du domaine $\beta 2$ est manquant ainsi que des parties du domaine $\beta 1$ (Annexe 7).

Une autre différence notable entre les trois formes d'apoB de poisson zèbre réside dans la région supposée intervenir dans la liaison au récepteur aux LDL (Figure 32).

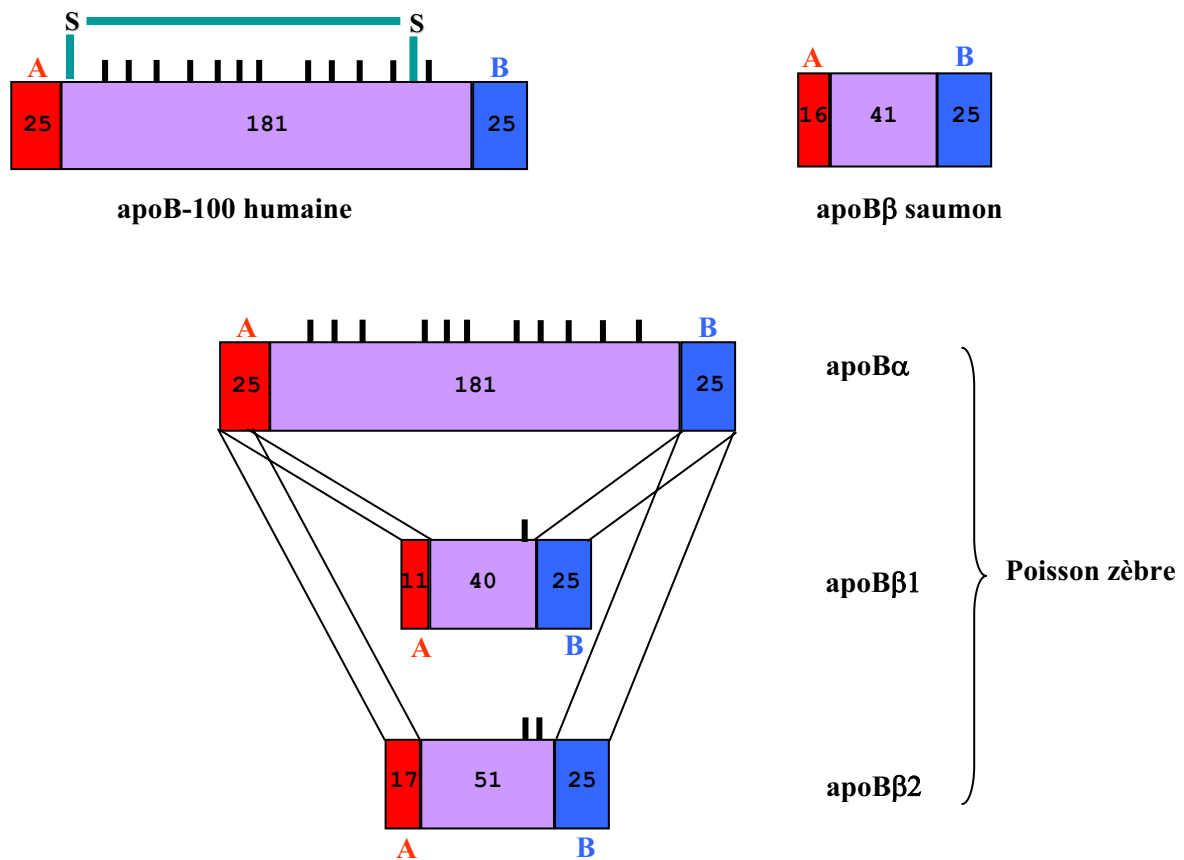


Figure 32 : Comparaison du domaine supposé de liaison au récepteur aux LDL entre l'apoB-100 humaine, l'apoB de saumon et les apoB de poisson zèbre.

Une partie des domaines de liaison au récepteur aux LDL de l'apoB-100 humaine (acides aminés 3169 à 3399) (Knott *et al.*, 1986), de l'apoBβ de saumon (Babin *et al.*, 1995), de l'apoBα (acides aminés 3111 à 3342), de l'apoBβ1 (acides aminés 2980 à 3056) et de l'apoBβ2 (acides aminés 2016 à 2109) de poisson zèbre sont schématisés. La séquence B est de taille identique dans toutes les apoB. La séquence A est plus courte dans l'apoBβ de saumon, l'apoBβ1 et l'apoBβ2 en comparaison avec l'apoB-100 et l'apoBα. Les acides aminés séparant ces 2 régions forment un feuillet de brins β amphiphiles riche en proline dans l'apoB-100 humaine. Le nombre de ces acides aminés est différent selon les formes d'apoB de poisson zèbre. Le domaine de liaison au récepteur aux LDL pour l'apoBα est de taille identique à l'apoB-100 humaine alors que celui des apoBβ1 et apoBβ2 est de taille similaire au domaine de liaison au récepteur des LDL de l'apoBβ de saumon.

Chez l'homme, la liaison de l'apoB à son récepteur fait intervenir les acides aminés 3130 à 3630 et notamment un domaine comprenant la séquence A (de l'acide aminé 3169 à 3193 en comptant le peptide signal) dont la région A fait partie et la séquence B (de l'acide aminé 3375 à 3399 en comptant le peptide signal) qui inclut la région B (Annexe 7). Ces séquences sont séparées par un feuillet de brins β amphiphiles qui contient onze prolines.

Dans l'apoB α du poisson zèbre, les séquences A (de l'acide aminé 3111 à 3136) et B (de l'acide aminé 3317 à 3342) ainsi que le feuillet les séparant sont de taille identique à celles de l'apoB-100 humaine. Autrement dit, les séquences A et B contiennent 25 acides aminés et la région intermédiaire comporte 181 acides aminés dont dix prolines. Ces régions sont très bien conservées puisque le pourcentage d'identité entre le domaine de l'apoB α de poisson zèbre (acides aminés 3111 à 3342) et celui de l'apoB-100 humaine (acides aminés 3169 à 3193) est de 46%. L'apoB β 1 et l'apoB β 2 possèdent un domaine de liaison au récepteur aux LDL tronqué contenant respectivement 76 et 93 acides aminés. Leur séquence B contient 25 acides aminés tout comme l'apoB α et l'apoB-100 humaine. La séquence A (de l'acide aminé 2980 à 2991) de l'apoB β 1 n'est formée que de 11 acides aminés. Cette protéine possède une délétion importante dans la région intermédiaire ne comportant plus que 40 acides aminés et une seule proline. L'apoB β 2 a une séquence A (de l'acide aminé 2016 à 2033) de 17 acides aminés et une région intermédiaire de 51 acides aminés contenant deux prolines. Le domaine de liaison au récepteur des apoB β 1 et apoB β 2 est similaire à celui présent dans l'apoB de saumon qui ne contient que 82 acides aminés. Le pourcentage d'identité de ce domaine est respectivement de 21% entre l'apoB β 1 et l'apoB-100 humaine et de 17% entre l'apoB β 2 et l'apoB-100 humaine. Cette identité est de 58% entre l'apoB de saumon et l'apoB β 1 et de 37% entre l'apoB de saumon et l'apoB β 2.

3- La structure des apoB d'autres poissons téléostéens.

Des séquences correspondant aux formes apoB α , apoB β 1 et apoB β 2 ont été recherchées pour d'autres poissons afin d'étendre nos observations à l'ensemble des téléostéens.

Le criblage d'une banque d'ADNc de foie de truite arc-en-ciel a été réalisé afin d'obtenir une partie du transcrit codant pour une apoB β . La sonde utilisée a été synthétisée à partir d'un fragment d'apoB de saumon contenant le domaine de liaison au récepteur aux LDL. Ainsi, un fragment d'apoB de truite ayant un domaine de liaison au récepteur aux LDL tronqué a été identifié. Des séquences d'apoB de truite arc-en-ciel et d'anguille amplifiées par PCR ont été obtenues par collaboration avec le Dr Seeichi Ando (Université de Kagoshima, Japon). Une recherche par analogie de séquences dans les banques de données a permis d'identifier d'autres séquences de truite, de *Fugu* et de tétraodon contenant le domaine de liaison au récepteur aux LDL. L'alignement des séquences protéiques déduites de poissons

dont celles de poisson zèbre avec les séquences protéiques des apoB-100 de poulet, de *Xénope*, de souris et humaine (Annexe 8) a permis la réalisation d'un arbre phylogénétique (Figure 33).

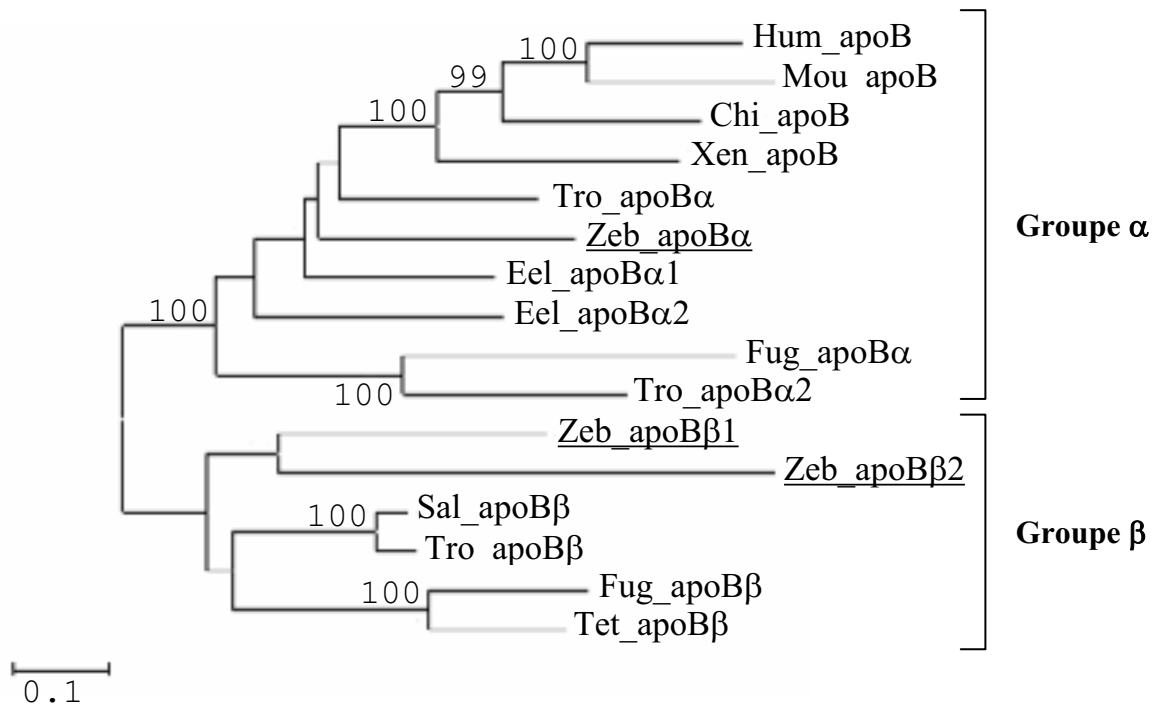


Figure 33 : Arbre phylogénétique des apolipoprotéines B de vertébrés.

Cet arbre est réalisé sur la région comprise entre les acides aminés 3096 à 3451 de l'apoB-100 humaine après l'alignement des séquences contenant le domaine de liaison au récepteur aux LDL. Les chiffres indiqués sont des pourcentages des valeurs « bootstrap » obtenues. Ces valeurs représentent la fiabilité statistique des embranchements de l'arbre. Les numéros d'accès des séquences sont [NP_000375](#) pour l'apoB humaine (Hum_apoB), [XP_137955](#) pour l'apoB de souris (Mou_apoB), [XP_419979](#) pour l'apoB de poulet (Chi_apoB), [xenopus|TC227219](#), [xenopus|TC220865](#) et [xenopus|TC220409](#) pour l'apoB de *Xenopus laevis* (Xen_apoB), [r_trout|TC54764](#) pour l'apoB α 1 de truite (Tro_apoB α 1), [r_trout|TC46671](#) pour l'apoB β de truite (Tro_apoB β), [fugu|TC1583](#) pour l'apoB α de *Fugu* (Fug_apoB α), [CAA57449.1](#) pour l'apoB de saumon (Sal_apoB β), [CAG03661](#) pour l'apoB β de tétraodon (Tet_apoB β), [zfish|TC238656](#) pour l'apoB α de poisson zèbre (Zeb_apoB α), [zfish|TC238656](#) pour l'apoB β 1 de poisson zèbre (Zeb_apoB β 1), [zfish|TC253856](#) pour l'apoB β 2 de poisson zèbre (Zeb_apoB β 2) et [SINFRUT00000170294](#) pour l'apoB β de *Fugu* (Fug_apoB β). Les séquences d'anguille (Eel_apoB α 1 et Eel_apoB α 2) et la séquence apoB α 2 de truite (Tro_apoB α 2) sont indiquées bien qu'elles ne soient pas encore déposées dans la base de donnée Genbank. L'analyse phylogénétique a été effectuée en utilisant les programmes inclus dans MEGA 2 (Kumar et Gadagkar., 2000) avec l'algorithme «neighbor-joining» basé sur le nombre de substitution par site (correction par la méthode de distance et de délétion par paires pour les sites absents). La solidité de la topologie de l'arbre a été évaluée à l'aide d'une analyse de «bootstrap» (Efron *et al.*, 1996) avec 5 000 répliques.

Cet arbre confirme qu'il existe bien deux groupes d'apoB chez les poissons. Le groupe des apoB dites α est proche des apoB de mammifères, de *Xénope* et de poulet. L'autre

groupe comprend les apoB de type β . Aucune apoB de type β n'a pu être identifiée chez les vertébrés tétrapodes. Au sein des apoB α de poissons, deux sous-groupes sont distinguables. L'apoB α 2 de truite est très proche de l'apoB α de *Fugu* alors qu'elle est plus éloignée de l'apoB α de poisson zèbre et de l'apoB α 1 de truite. Dans les séquences apoB α 2 de truite et apoB α de *Fugu*, une délétion de 590 acides aminés est trouvée après la séquence B (Annexe 8). Cette absence est également présente dans la séquence apoB α 2 d'anguille qui pourtant n'a pas été placée dans le même groupe que l'apoB α 2 de truite. La région manquante dans ces protéines correspond aux acides aminés 3452 à 4043 de l'apoB-100 humaine. Les arginines 3500 et 3571 ne sont donc pas présentes dans ces formes d'apoB α . Pour les apoB β , les séquences appartenant aux salmonidés (truite et saumon) sont regroupées ainsi que celles des tetradontoidés (*Fugu* et tétraodon).

B. L'expression des gènes apoB α , apoB β 1 et apoB β 2 chez l'embryon, la larve et l'adulte de poisson zèbre.

1- L'expression des gènes apoB α et apoB β 1 au cours du développement embryonnaire et larvaire du poisson zèbre.

Le profil d'expression des gènes *apoB α* et *apoB β 1* codant pour deux des trois apoB identifiées chez le poisson zèbre a été suivi par hybridation *in situ in toto* au cours du développement embryonnaire et larvaire du poisson zèbre. Les sondes sens et antisens pour chacun de ces gènes ont été synthétisées à partir des fragments respectifs apoB α -613pb et apoB β 1-496pb. Le profil d'expression du gène *apoB β 2*, plus récemment identifié, n'a pu être effectué avant la rédaction de ce manuscrit.

a- Le profil d'expression du gène apoB α .

Le profil d'expression du gène *apoB α* obtenu par hybridation *in situ in toto* est présenté dans la Figure 34. Un signal d'hybridation de la sonde antisens est détecté dans des stades embryonnaires précoces, puisqu'une coloration bleu clair est visible dans les blastomères d'embryons de moins de 2 hpf. Ceci suggère la présence de transcrits *apoB α* d'origine maternelle. En effet, le génome du zygote n'est activé qu'après la transition blastulénne qui a lieu vers 3 hpf.

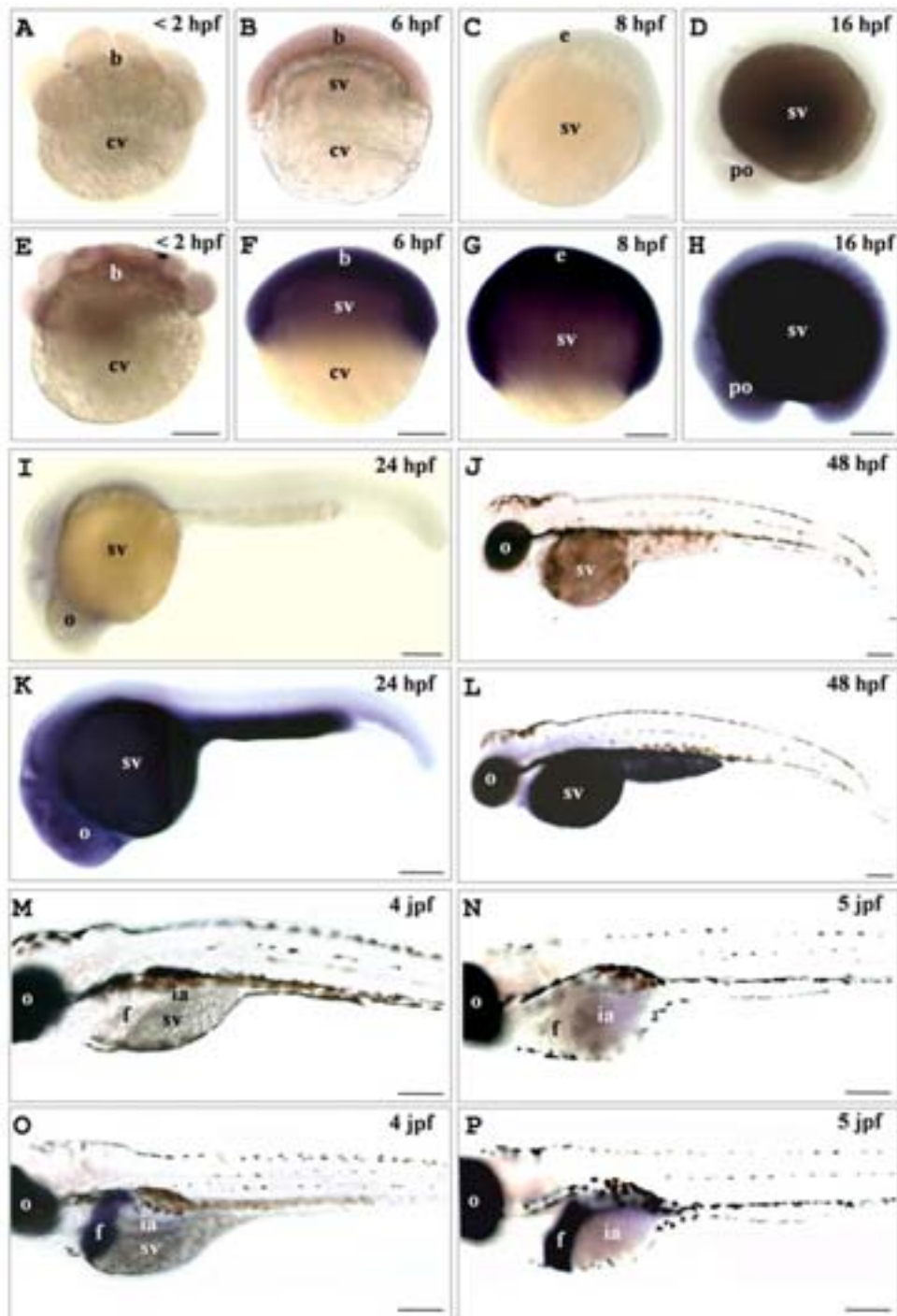


Figure 34 : Expression du gène *apoBα* au cours du développement embryonnaire et larvaire du poisson zèbre.

L'expression du gène *apoBα* a été suivie par hybridation *in situ in toto* en utilisant des sondes sens (A-D, I-J, M-N) et antisens (E-H, K-L, O-P) marquées à la digoxigénine et synthétisées en se servant du fragment *apoBα*-613pb comme matrice. Le signal d'hybridation est révélé par une coloration bleu foncé. Un signal est visible dans les blastomères (b) avant 2 hpf (E). Une expression est détectée dans les blastomères, l'embryon (e) ainsi que dans le syncytium vitellin (sv) à 6 hpf (F), 8 hpf (G), 16 hpf (H) et 24 hpf (K). A partir de 48 hpf (L), le signal dans la tête de l'embryon est absent. Une expression n'est détectée que dans le foie (f) des larves de 4 jpf (O) et de 5 jpf (P). Aucun bruit de fond n'est décelé dans les embryons et les larves hybridées avec la sonde sens. hpf : heures post-fécondation, jpf : jours post-fécondation, o : œil, ia : intestin antérieur, po : primordium optique, cv : cellule vitelline. Echelle : 100 μ m.

Au stade de 50% d'épibolie (vers 6 hpf), lorsque le syncytium vitellin (sv) recouvre la moitié de l'embryon, le signal d'hybridation est décelé dans cette structure extra-embryonnaire ainsi que dans les blastomères (b) situés au dessus. Aucun signal n'est visible dans la cellule vitelline (cv) sous-jacente. A 80% d'épibolie (vers 8 hpf), des transcrits *apoB α* sont détectés dans le syncytium vitellin ainsi que dans le corps de l'embryon (e) où le signal d'hybridation paraît plus intense. Dans les stades suivants, le signal localisé dans le corps de l'embryon disparaît progressivement. En effet, vers 16 hpf, le signal d'hybridation est encore présent tout le long de l'embryon mais semble moins foncé. A 24 hpf, le signal dans le corps de l'embryon apparaît uniquement dans la tête, essentiellement au niveau de l'œil et du cerveau, alors que le syncytium vitellin est toujours marqué. Le signal décelé dans la tête disparaît totalement à 48 hpf et n'est plus observé dans les stades suivants.

A partir de 4 jpf, les larves présentent une coloration dans les ébauches hépatiques puis dans le foie (f). Aucun signal n'est détecté ailleurs dans la larve. Ceci est également le cas lorsque la larve est nourrie à 5 jpf. Aucun bruit de fond n'est observé lors de l'hybridation des embryons et larves avec la sonde sens.

b- Le profil d'expression du gène *apoB β 1*.

Le profil d'expression du gène *apoB β 1* effectué par hybridation *in situ in toto* est montré dans la Figure 35. Aucun signal d'hybridation de la sonde antisens n'est observé dans les embryons de moins de 2 hpf. Ceci suggère l'absence de transcrits *apoB β 1* d'origine maternelle. Vers 8 hpf, un signal commence à être visible dans le syncytium vitellin (sv) sous la forme de tâches bleu foncé. Ce motif est caractéristique d'une expression des gènes dans cette structure extra-embryonnaire. Le signal présent dans le syncytium vitellin semble plus intense dans des embryons de 16 hpf. Aucun signal n'est décelé dans les structures embryonnaires avant 3 jpf (résultat non montré). A 4 jpf, une coloration est visible dans les ébauches hépatiques (f) ainsi que dans l'intestin antérieur (ia). Le signal localisé dans le syncytium vitellin est encore présent et disparaît à 5 jpf, stade pour lequel une coloration est uniquement visible dans le foie et dans l'intestin antérieur.

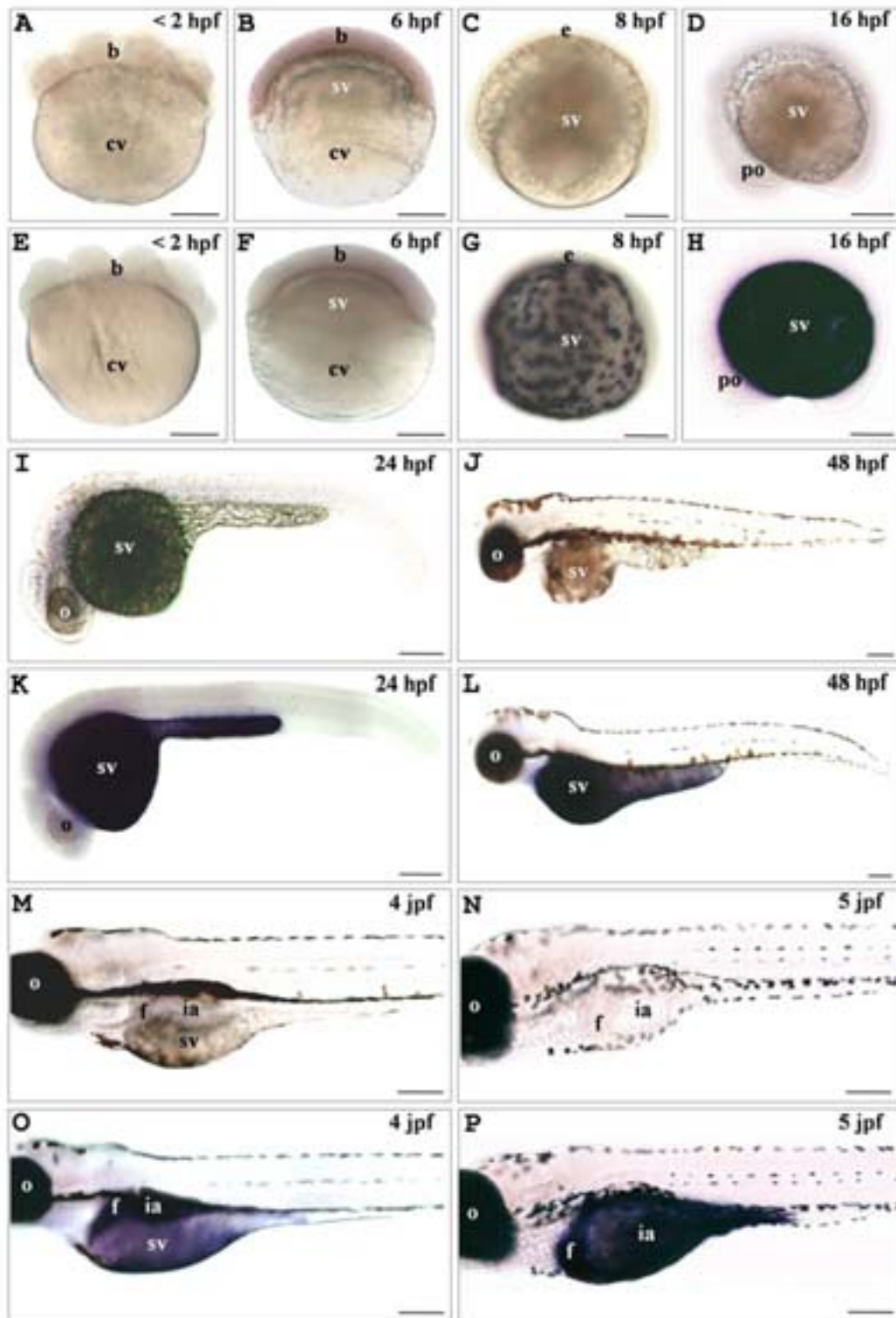


Figure 35 : Expression du gène *apoBβ1* au cours du développement embryonnaire et larvaire du poisson zèbre.

L'expression du gène *apoBβ1* a été suivie par hybridation *in situ in toto* en utilisant des sondes sens (A-D, I-J, M-N) et antisens (E-H, K-L, O-P) marquées à la digoxigénine et synthétisées à partir du fragment apoBβ1-496pb. Aucun bruit de fond n'est détecté dans les échantillons hybridés avec la sonde sens. Un signal commence à être visible vers 8 hpf (G), dans le syncytium vitellin (sv). Aucun marquage n'est trouvé dans l'embryon (e) avant 4 jpf (O) où une expression est détectée dans le foie (f) et l'intestin (i). Chez la larve de 5 jpf (P), un signal est visible dans le foie (f) et uniquement dans la partie antérieure de l'intestin antérieur (ia). hpf : heures post-fécondation, jpf : jours post-fécondation, o : œil, po : primordium optique, cv : cellule vitelline, b : blastomères. Echelle : 100 μm .

La quantité relative des transcrits *apoBβ1* a été mesurée par RT-PCRq sur les mêmes échantillons que pour le gène *mtp* (Figure 36). La quantification de l'expression du gène *eflα* codant pour le facteur d'élongation EF1α et celle du gène *β-actine* ont servi de références. Trois échantillons d'ARN rétro-transcrits par stade de développement ont été quantifiés afin de réaliser un test statistique ANOVA. La même tendance de variation de l'expression du gène *apoBβ1* est obtenue avec les deux gènes de référence. Aucun transcrit n'est détecté dans des embryons de moins de 2 hpf. Très peu de transcrits sont amplifiés dans des embryons de 5 hpf et de 6 hpf dont le rapport $(apoBβ1 / eflα) \times 100$ est respectivement de $1,76.10^{-3} \pm 3,89.10^{-5}$ et de $5,62.10^{-3} \pm 2,55.10^{-3}$. A 9 hpf, ce rapport est significativement ($p < 0,05$) augmenté par rapport aux stades précédents, avec une valeur de $0,23 \pm 0,12$. La quantité relative des transcrits *apoBβ1* ne varie pas dans les stades suivants pour lesquels le rapport $(apoBβ1 / eflα) \times 100$ est de $0,62 \pm 0,21$ à 12 hpf, de $0,35 \pm 0,02$ à 16 hpf, de $0,74 \pm 0,41$ à 24 hpf, de $0,81 \pm 0,35$ à 48 hpf et de $0,57 \pm 0,46$ à 72 hpf. Un profil similaire a été obtenu en utilisant le gène *β-actine* comme référence. Le rapport $(apoBβ1 / β-actine) \times 100$ est significativement plus élevé dans des embryons de 9 hpf ($3,65 \pm 1,56$), 12 hpf ($16,87 \pm 4,80$), 16 hpf ($14,47 \pm 5,00$), 24 hpf ($38,06 \pm 36,99$), 48 hpf ($10,45 \pm 4,97$) et 72 hpf ($7,79 \pm 4,87$) que dans des embryons de moins de 2 hpf (0) et de 6 hpf ($0,11 \pm 0,08$).

c- La comparaison des profils d'expression des gènes *apoBα* et *apoBβ1*.

Les profils d'expression des gènes *apoBα* et *apoBβ1* sont très différents tant d'un point de vue spatial que temporel.

Contrairement aux transcrits *apoBβ1*, les transcrits *apoBα* sont détectés très tôt, dans des embryons de moins de 2 hpf, et semblent donc être en partie d'origine maternelle. Des transcrits *apoBβ1* ne sont visibles que plus tardivement, vers 8 hpf, après que le syncytium vitellin soit devenu fonctionnel. Un signal d'hybridation pour les deux gènes est décelé dans le syncytium vitellin. Cette structure exprime les gènes *apoBβ1* et *apoBα* de façon décalée dans le développement embryonnaire. Alors qu'aucun signal n'est visible dans le corps de l'embryon pour le gène *apoBβ1*, des transcrits *apoBα* y sont détectés et plus particulièrement dans l'œil et le cerveau. L'expression différentielle de ces deux gènes est encore plus marquée chez la larve où un signal d'hybridation n'est observé que dans le foie pour le gène *apoBα* et à la fois dans le foie et dans l'intestin antérieur pour le gène *apoBβ1*.

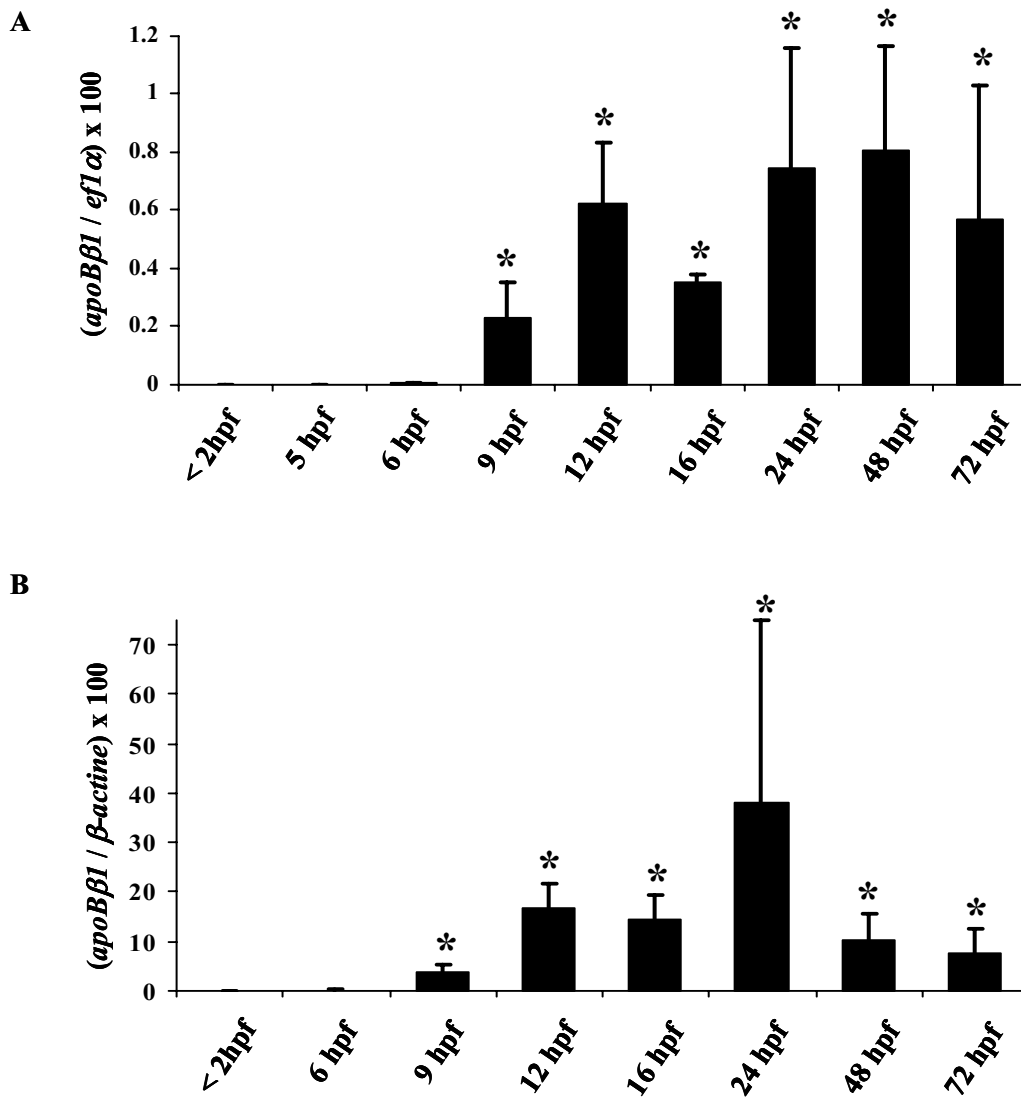


Figure 36 : Quantification de l'expression du gène *apoBβ1* au cours du développement embryonnaire du poisson zèbre par RT-PCRq.

Pour chaque stade de développement, la quantification des transcrits *apoBβ1*, *eflα* et β -actine a été réalisée par RT-PCRq sur 3 échantillons indépendants. Une analyse statistique a été effectuée avec le test ANOVA suivi d'une évaluation de type Tukey-Kramer. La variation des rapports (*apoBβ1* / *eflα*) et (*apoBβ1* / β -actine) reflète une augmentation significative ($p < 0,05$) de la quantité des transcrits *apoBβ1* à partir du stade de 9 hpf. Pour les stades suivants, aucune variation significative du taux relatif de transcrits *apoBβ1* n'a été observée. En effet, les rapports sont plus ou moins constants pour les embryons de 9 hpf à 72 hpf. hpf : heures post-fécondation.

2- L'expression des gènes *apoB α* , *apoB β 1* et *apoB β 2* chez le poisson zèbre adulte.

a- Le suivi de l'expression tissulaire par RT-PCR.

L'expression des gènes *apoB α* , *apoB β 1* et *apoB β 2* chez le poisson zèbre adulte a été suivie par RT-PCR sur des échantillons de cœur, de cerveau, d'ovaire, de testicule, de rein, d'intestin antérieur, d'intestin postérieur et de foie. L'amplification des transcrits *efl α* , *apoB α* , *apoB β 1* et *apoB β 2* par RT-PCR a été réalisée sur les mêmes échantillons (Figure 37) et le produit de taille attendue a été vérifié par séquençage.

La qualité des échantillons a dans un premier temps été testée par l'amplification d'un fragment d'ADNc de 376 pb codant pour le facteur d'élongation EF1 α . Les amorces EF1 α -S et EF1 α -R (Tableau 6) ont été utilisées. Après migration des produits d'amplification sur gel agarose et coloration au bromure d'éthidium, une bande de la taille attendue est retrouvée dans chaque organe avec une intensité de fluorescence équivalente. Dans certains organes, une bande supplémentaire d'environ 550 pb est visible. Cette bande n'est pas présente dans le produit PCR du contrôle positif dont la matrice correspond au fragment EF1 α -376pb inséré dans le plasmide pGEMT-Easy. Elle pourrait correspondre à l'amplification d'un autre transcrit *efl α* exprimé dans ces organes. Des contrôles de transcription inverse dits RT⁻, dans lesquels la transcriptase inverse a été substituée par de l'eau, permettent de contrôler l'absence d'amplification d'ADN génomique par ces amorces.

L'amplification d'un fragment d'ADNc de 181 pb codant pour l'*apoB α* a été effectuée sur ces mêmes échantillons en utilisant les amorces *apoB α -S* et *apoB α -R* (Tableau 6). L'obtention d'une bande à la taille attendue pour le contrôle positif correspondant au fragment *apoB α -181pb* inséré dans le plasmide pGEMT-Easy, confirme le bon fonctionnement des amorces dans les conditions de RT-PCR utilisées. Un produit d'amplification de taille correcte est observé dans les échantillons de cerveau, de rein, de testicule, d'intestin antérieur, d'intestin postérieur et de foie. L'intensité de la bande obtenue dans le foie est beaucoup plus forte que celle détectée dans le testicule qui elle-même est plus lumineuse que la bande décelée dans l'intestin antérieur, l'intestin postérieur ou le cerveau. Un très léger signal semble être détecté dans le rein. Le gène *apoB α* s'exprime donc fortement dans le foie et plus faiblement dans le testicule, l'intestin antérieur, l'intestin postérieur, le cerveau et le rein.

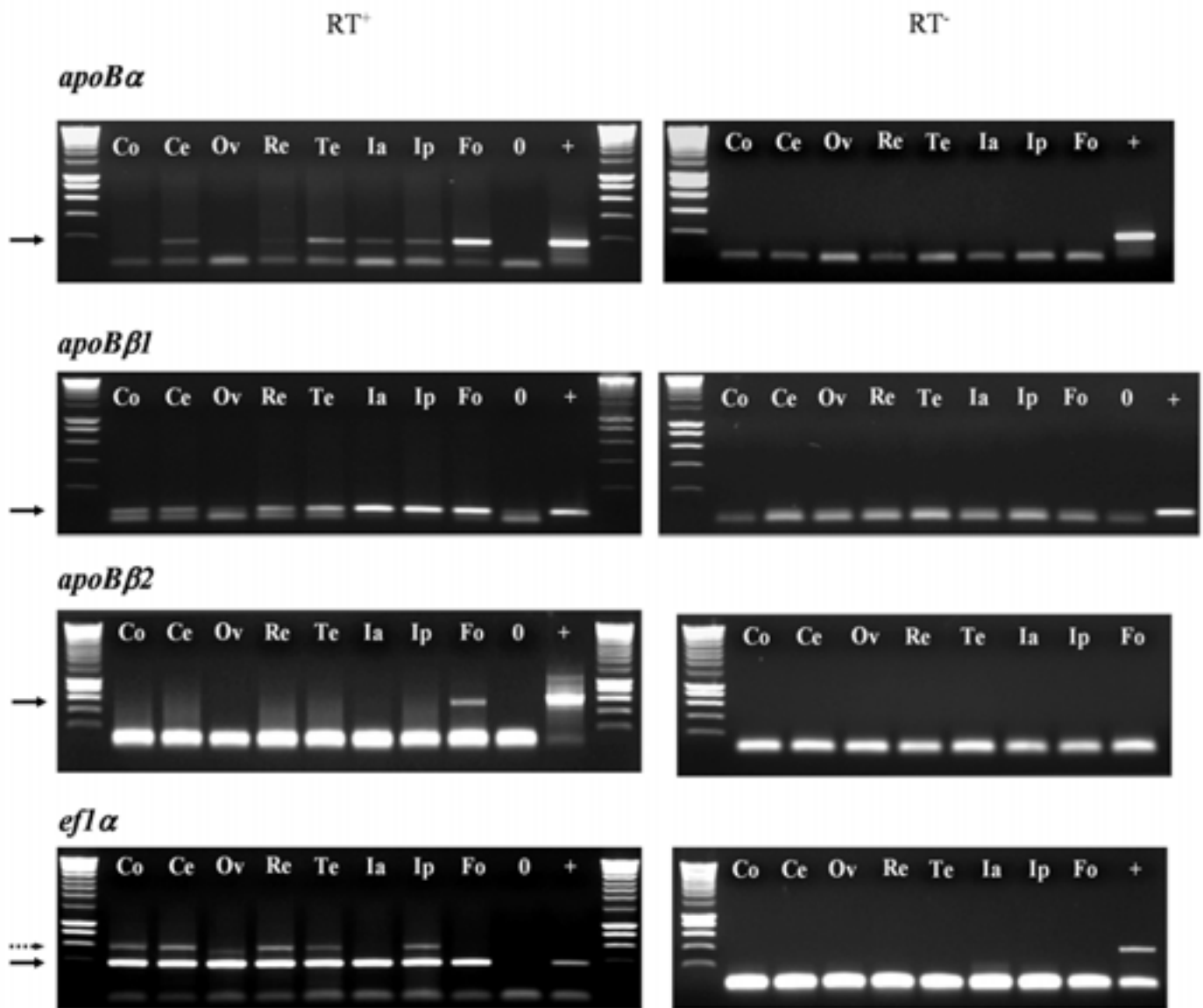


Figure 37 : Expression des gènes *apoBα*, *apoBβ1* et *apoBβ2* chez l'adulte, par RT-PCR.

L'expression des gènes *apoBα*, *apoBβ1* et *apoBβ2* a été suivie par RT-PCR sur des ADNc (RT⁺) de cœur (Co), de cerveau (Ce), d'ovaire (Ov), de reins (Re), de testicules (Te), d'intestin antérieur (Ia), d'intestin postérieur (Ip) et de foie (Fo) de poissons zèbres adultes. Les échantillons de foie, d'intestin antérieur et d'intestin postérieur ont été prélevés sur des femelles nourries. Une migration des produits d'amplification sur gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium a été réalisée et les photographies des gels obtenus sont présentées. L'amplification du transcrite *eflα* codant pour le facteur d'élongation EF1α est choisie comme référence. Les RT-PCR effectuées sur des contrôles de la transcription (RT⁻) dans lesquels l'ADN polymérase ARN dépendante est substituée par de l'eau ne montrent aucune amplification d'ADN génomique pouvant contaminer les échantillons. Un contrôle positif (+) réalisé sur l'insert inclus dans un plasmide (ApoBα-180bp, ApoBβ1-87bp, ApoBβ2-545bp et EF1α-376bp) et un contrôle négatif (0) contenant de l'eau sont effectués pour chaque PCR. Les flèches pleines indiquent les bandes de taille attendue. Les bandes visibles dans les échantillons en bas du gel correspondent à une amplification par dimérisation des amorces. La flèche en pointillé indique la position de la bande supplémentaire visible dans certains organes lors de l'amplification du transcrite *eflα*.

Ce profil est similaire à celui observé chez la larve par hybridation *in situ in toto* où un signal d'hybridation n'était détecté que dans le foie. Aucun produit n'est amplifié ni dans les contrôles négatifs RT⁻ ni dans l'eau.

L'amplification d'un fragment de 87 pb codant pour l'apoB β 1 a été réalisée en utilisant les amorces apoB β 1-S et apoB β 1-R (Tableau 6) sur les échantillons ainsi que sur un contrôle positif correspondant au fragment inséré dans un plasmide pGEMT-Easy. Après migration sur gel agarose et coloration au bromure d'éthidium, une bande de taille correcte est détectée dans le contrôle positif ainsi que dans tous les organes à l'exception de l'ovaire. L'intensité de cette bande est très forte pour les échantillons d'intestin antérieur, d'intestin postérieur et de foie. Elle est beaucoup moins intense dans les autres organes. Aucun signal n'a été décelé dans les contrôles négatifs RT⁻ confirmant qu'il ne s'agit pas d'une amplification d'ADN génomique.

L'expression du gène *apoB β 2* a été suivie par amplification d'un fragment de 545 pb sur les mêmes échantillons, en utilisant les amorces apoB β 2-S et apoB β 2-R (Tableau 6). Un produit d'amplification n'a été observé que dans l'échantillon de foie et dans le contrôle positif correspondant au fragment apoB β 2-545pb inséré dans le plasmide pGEMT-Easy. Aucune bande de taille correcte n'est détectée ni pour les échantillons des autres organes ni pour les contrôles négatifs RT⁻ et l'eau. L'expression du gène *apoB β 2* chez le poisson zèbre adulte semble donc être exclusivement hépatique.

Les trois gènes *apoB α* , *apoB β 1* et *apoB β 2* présentent des profils d'expression distincts chez le poisson zèbre adulte. Ils s'expriment tous les trois dans le foie. Seul le gène *apoB β 1* s'exprime fortement dans l'intestin. Un niveau beaucoup plus faible de transcrits *apoB α* semble être présent dans ce tissu.

b- La quantification de l'expression du gène *apoB β 1* dans les tissus de poisson zèbre adulte.

Le niveau d'expression du gène *apoB β 1* a été quantifié par RT-PCRq chez le poisson zèbre adulte en utilisant les mêmes échantillons que ceux qui ont servi à la quantification de l'expression du gène *mtp* chez l'adulte (Figure 38). Pour chaque tissu, trois échantillons indépendants ont été quantifiés pour permettre une analyse statistique ANOVA suivie d'un test Tukey-Kramer. La quantification de l'expression du gène *efl α* sert de référence afin de comparer la quantité relative de transcrits *apoB β 1* dans les différents organes testés.

Le rapport $(apoB\beta 1 / efl\alpha) \times 100$ de la quantité de transcrits $apoB\beta 1$ sur la quantité de transcrits $efl\alpha$ a été calculé et est présenté en fonction de l'organe (Figure 38). Ce rapport est élevé dans l'intestin antérieur ($157,9 \pm 96,8$), le foie ($29,3 \pm 12,9$) et l'intestin postérieur ($33,3 \pm 25,4$) comparativement au rein ($3,1 \pm 4,7$), au testicule ($4,3 \pm 0,9$), au cerveau ($1,3 \pm 2,2$), au cœur ($0,53 \pm 0,46$) et à l'ovaire pour lequel aucun transcrit n'a pu être détecté. La quantité relative de transcrits $apoB\beta 1$ dans l'intestin antérieur est significativement ($p < 0,05$) plus élevée que dans les autres organes. Cette quantification confirme le profil obtenu par RT-PCR et suggère un gradient d'expression du gène $apoB\beta 1$ dans l'intestin de poisson zèbre adulte.

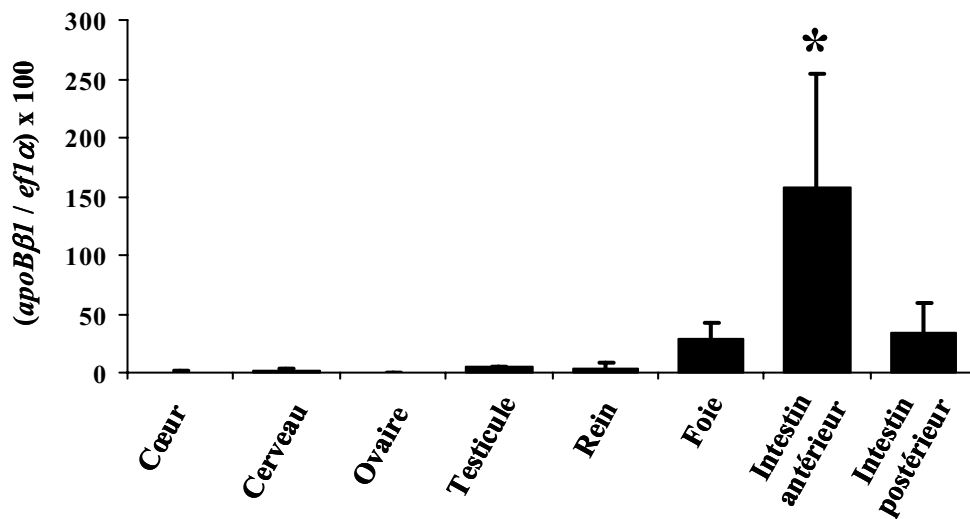


Figure 38 : Quantification de l'expression tissulaire du gène $apoB\beta 1$ chez le poisson zèbre adulte par RT-PCRq.

La quantité relative de transcrit $apoB\beta 1$ par rapport à celle des transcrits du gène de référence $efl\alpha$ a été mesurée par RT-PCRq. Le foie, l'intestin antérieur et l'intestin postérieur ont été prélevés sur des mâles nourris uniquement. Pour ces tissus ainsi que pour l'ovaire, trois poissons ont été prélevés par échantillon. Le cœur, le cerveau, les testicules et les reins ont été collectés sur une dizaine d'animaux nourris par échantillon. Une analyse statistique ANOVA a été effectuée suivie d'une évaluation par le test Tukey-Kramer. L'astérisque symbolise une différence significative ($p < 0,05$). Le rapport $(apoB\beta 1 / efl\alpha)$ est significativement plus élevé dans l'intestin antérieur que dans les autres organes. Un rapport élevé est également obtenu pour les échantillons de foie et d'intestin postérieur.

c- L'expression des gènes *apoB α* et *apoB β* dans l'intestin de poisson zèbre adulte.

Afin d'affiner la localisation de l'expression du gène *apoB β* dans l'intestin et de confirmer la différence d'expression des gènes *apoB α* et *apoB β* dans cet organe, des hybridations *in situ* sur coupes de cavité intestinale de poisson zèbre femelle adulte nourrie ont été menées (Figure 39). Les sondes utilisées sont les mêmes que celles qui ont servi pour l'hybridation *in situ in toto*. Comme pour le suivi de l'expression du gène *mtp*, des coupes transversales de la cavité intestinale ont été effectuées afin de traiter simultanément différentes régions de l'intestin. Trois anneaux d'intestin sont ainsi visibles sur les coupes et correspondent à la partie proximale de l'intestin antérieur (ia), à une partie plus distale de l'intestin antérieur (ia 2) et à de l'intestin postérieur (ip).

Aucun signal d'hybridation de la sonde antisens utilisée pour suivre l'expression du gène *apoB α* n'a été observé sur les coupes (Figure 39A). Les microvillosités de l'intestin antérieur sont parfaitement claires (Figure 39B). Ceci confirme le résultat obtenu par RT-PCR sur les échantillons d'intestin antérieur et postérieur pour lesquels une très faible amplification était détectée. Un morceau de foie (f) est également présent sur cette coupe et apparaît sans coloration alors qu'un fort signal d'amplification est obtenu par RT-PCR. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce phénomène. Les femelles prélevées pour l'hybridation *in situ* sur coupes pourraient ne pas être au même stade de vitellogenèse que celles qui ont servi à l'extraction des ARN totaux pour les RT-PCR. En effet, le foie exprime très fortement le gène codant pour la vitellogénine lorsque les femelles sont en vitellogenèse. Dans ce cas, l'expression des autres gènes est comme diluée. Une autre explication pourrait être que les conditions employées pour l'hybridation *in situ* sur coupes ne conviennent pas pour la détection de l'expression dans le foie.

Un fort signal d'hybridation pour le gène *apoB β* (Figure 39C) est visible dans la partie proximale de l'intestin antérieur (ia). Un signal moins intense est détecté dans une partie plus distale de l'intestin antérieur (ia 2) alors que l'anneau correspondant à l'intestin postérieur (ip) reste blanc. Le signal détecté dans l'intestin antérieur est localisé à l'apex des microvillosités, au niveau des entérocytes (en) (Figure 39D). Les cellules à mucus (cm) ne sont pas marquées.

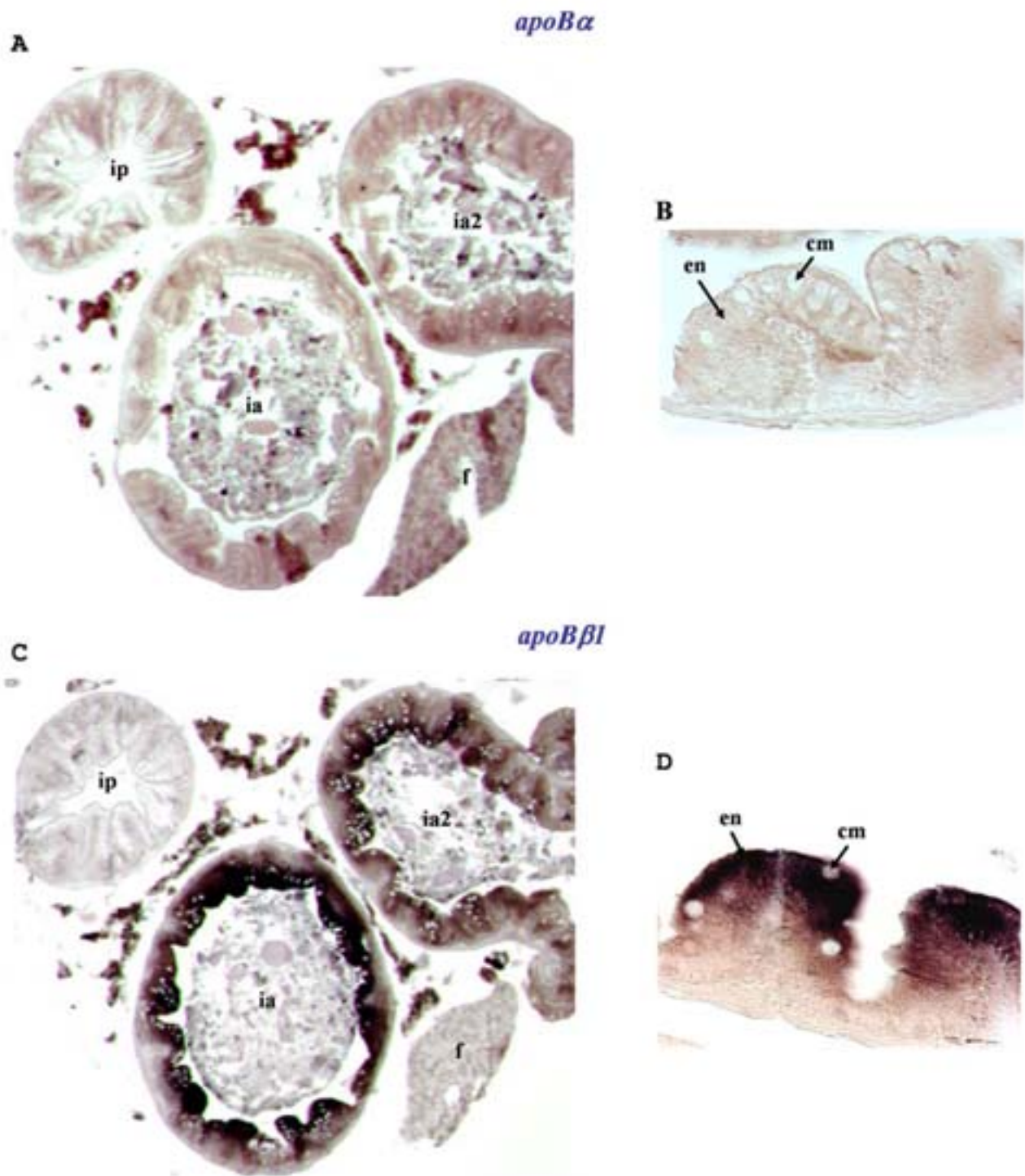


Figure 39 : Expression des gènes *apoBα* et *apoBβ1* dans la cavité intestinale du poisson zèbre adulte.

La cavité intestinale de poissons zèbres femelles de 8 mois nourries pendant 2,5 h a été prélevée, fixée et sectionnée transversalement en coupes de 7 μ m d'épaisseur. L'expression des gènes *apoBα* (A-B) et *apoBβ1* (C-D) a été suivie par hybridation *in situ* en utilisant les mêmes sondes que pour l'hybridation *in situ in toto*. Aucun signal n'est détecté pour le gène *apoBα* (A). Un signal d'hybridation du gène *apoBβ1* (C) est visible dans les anneaux correspondants à de l'intestin antérieur (ia et ia2) alors que l'anneau d'intestin postérieur (ip) reste clair. Sur un grossissement plus important (40x), le signal d'hybridation du gène *apoBβ1* est visible à l'apex des villosités au niveau des entérocytes (en) alors que les cellules à mucus (cm) ne sont pas colorées et qu'aucun signal n'est visible pour le suivi de l'expression du gène *apoBα* (B).

Ce profil confirme l'existence d'un gradient d'expression du gène *apoBβ1* dans l'intestin de poisson zèbre adulte. La nourriture présente dans l'intestin antérieur n'entraîne aucun bruit de fond. Un fragment de foie (f) est présent sur la coupe et apparaît pâle. Contrairement au résultat obtenu par RT-PCR, aucun signal d'expression du gène *apoBβ1* n'est visible ni dans l'intestin postérieur ni dans le foie par hybridation *in situ* sur coupes. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que cette expression n'est pas suffisante pour être détectée par cette technique. De plus, la totalité de l'intestin postérieur a été utilisée pour extraire les ARN et synthétiser les ADNc pour les RT-PCR. La limite entre l'intestin antérieur et l'intestin postérieur n'est pas évidente et il est probable que lors des dissections une partie d'intestin antérieur soit prélevé en même temps que l'intestin postérieur. L'hybridation de la sonde sens (résultats non montrés) ne s'accompagne d'aucun signal.

3- L'effet de la prise alimentaire sur l'expression du gène *apoBα*

L'effet de la prise alimentaire sur la localisation et le niveau d'expression du gène *apoBα* a été suivi par hybridation *in situ in toto* sur des larves nourries et non nourries (Figure 40). Après un jeûne de 18h, les larves sont nourries ou non pendant 2h avant d'être prélevées. La présence de nourriture dans l'intestin des larves nourries est vérifiée sous la loupe avant leur utilisation.

L'état nutritionnel de la larve ne modifie pas la localisation du signal d'hybridation de la sonde antisens qui demeure exclusivement hépatique. Le signal d'hybridation apparaît plus intense dans les larves de 5 jpf, de 8 jpf et de 15 jpf nourries en comparaison avec les larves non nourries. Dans les larves nourries, le signal d'hybridation s'étend au dessus de l'intestin antérieur, région correspondant à l'extension des lobes hépatiques insérés entre la vessie natatoire et le bulbe intestinal. Aucun bruit de fond n'a été détecté dans les larves nourries et non nourries hybridées avec la sonde sens.

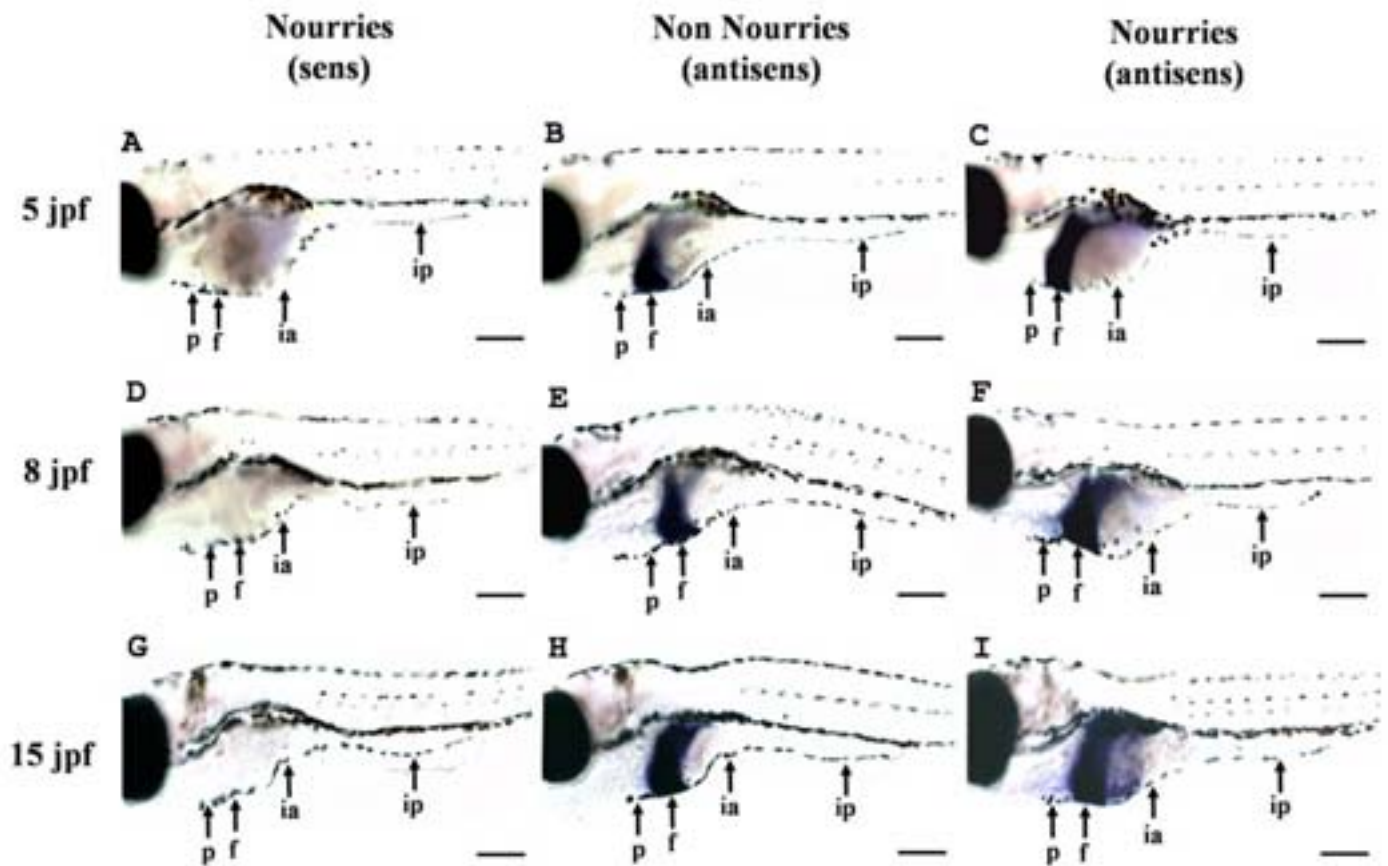


Figure 40 : Régulation nutritionnelle de l'expression du gène *apoBα* chez la larve de poisson zèbre visualisée par hybridation *in situ in toto*.

Des larves de 5 jpf (A, B, C), 8 jpf (D, E, F) et 15 jpf (G, H, I) ont été nourries (A, C-D, F-G, I) ou non (B, E, H) pendant 2 h après un jeûne de 18 h. L'hybridation des sondes ARN sens (contrôle) et antisens marquées à la digoxigénine a été réalisée à 60°C. Un signal d'hybridation de la sonde antisens (B, C, E, F, H, I) est décelé dans le foie (f) des larves, quelque soit leur stade de développement et leur état nutritionnel. L'intensité de ce signal semble augmenter lorsque les larves sont nourries (C, F, I) en comparaison avec les larves non nourries (B, E, H). Aucun signal n'est observé dans le tractus digestif que ce soit au niveau du pharynx (p), de l'intestin antérieur (ia) ou de l'intestin postérieur (ip). Les larves hybridées avec la sonde sens (A, D, G) ne présentent aucun bruit de fond. jpf : jours post-fécondation. Echelle : 500 µm.

4- L'effet de la prise alimentaire sur le niveau d'expression du gène *apoBβ1*

L'effet de la prise alimentaire sur la localisation et le niveau d'expression du gène *apoBβ1* a été suivi par hybridation *in situ in toto* sur des larves nourries et non nourries (Figure 41). Après un jeûne de 18h, les larves sont nourries ou non pendant 2h. La présence de nourriture dans l'intestin des larves nourries est vérifiée sous la loupe avant leur prélèvement.

Une augmentation de l'intensité du signal d'hybridation de la sonde antisens est visible dans l'intestin antérieur (ia) des larves nourries par rapport à celui observé dans l'intestin antérieur des larves non nourries, et ceci quelque soit le stade de développement. Cette différence est notable dès la première prise de nourriture, à 5 jpf. L'intensité du signal localisé dans le foie (f) ne semble pas augmentée hormis peut-être pour les larves de 8 jpf. Quelque soit le stade larvaire et l'état nutritionnel des larves, aucun signal d'hybridation n'est détecté dans le pharynx (p) ou au niveau de l'intestin postérieur (ip). L'état nutritionnel des larves ne modifie pas la localisation du signal d'hybridation. Aucun bruit de fond n'est décelé dans les larves hybridées avec la sonde sens qu'elles aient été nourries ou non (non montré).

La prise alimentaire semble donc augmenter la quantité de transcrits du gène *apoBβ1* dans l'intestin antérieur et ceci dès la première prise de nourriture.

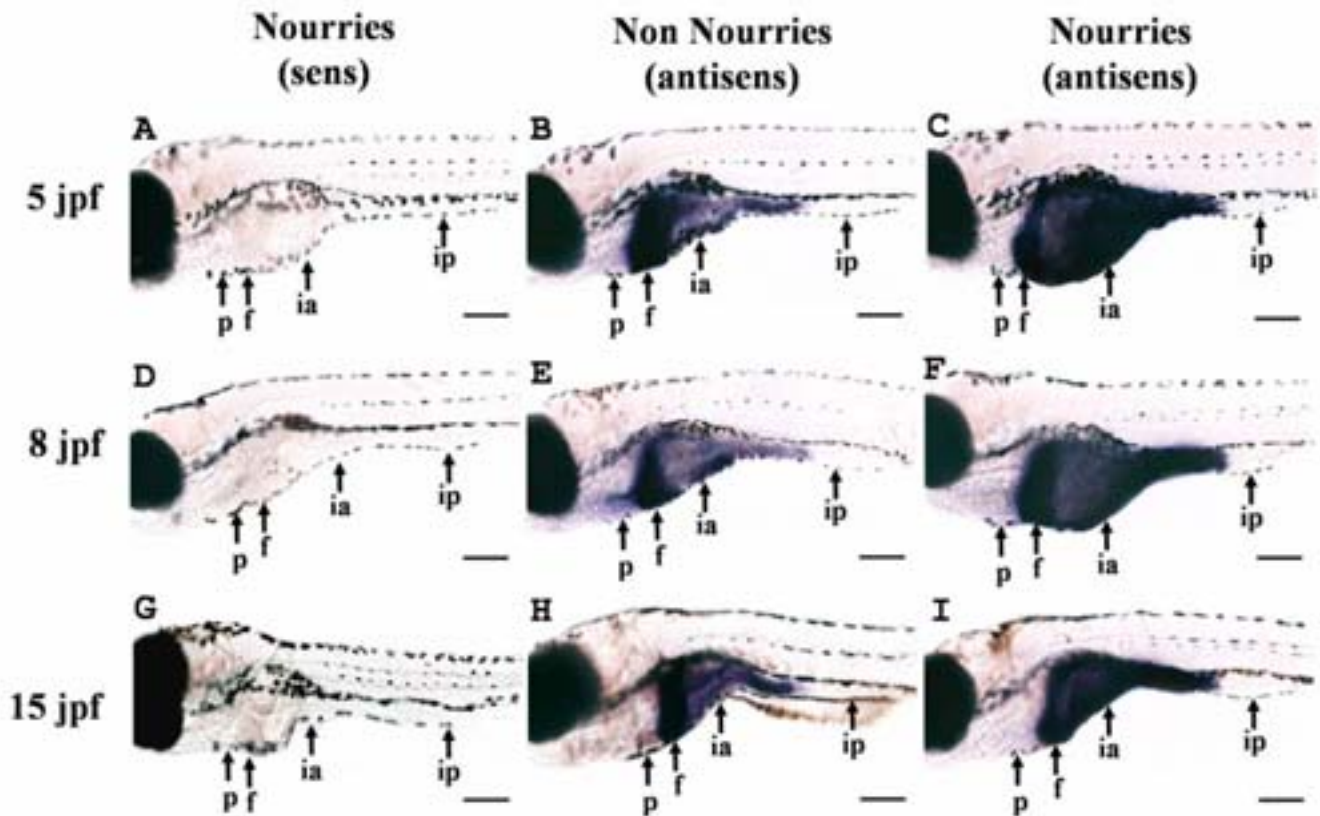


Figure 41 : Régulation nutritionnelle de l'expression du gène *apoBβ1* chez la larve de poisson zèbre visualisée par hybridation *in situ in toto*.

Des larves de 5 jpf (A, B, C), 8 jpf (D, E, F) et 15 jpf (G, H, I) ont été nourries (A, C-D, F-G, I) ou non (B, E, H) pendant 2 h après un jeûne de 18 h. L'hybridation des sondes ARN sens et antisens marquées à la digoxigénine a été réalisée à 60°C. Un signal d'hybridation de la sonde antisens (B, C, E, F, H, I) bleu foncé est observé dans le foie (f) et l'intestin antérieur (ia) quelque soit l'état nutritionnel et le stade de développement. L'intensité de ce signal semble augmenter lorsque les larves sont nourries (C, F, I) en comparaison avec les larves non nourries (B, E, H). Aucun signal n'est observé dans le pharynx (p) ou dans l'intestin postérieur (ip). Les larves hybridées avec la sonde sens (A, D, G) ne présentent aucun bruit de fond. jpf : jours post-fécondation. Echelle : 500 µm.

DISCUSSION

Les poissons Téléostéens sont des vertébrés qui appartiennent au même groupe monophylétique que les mammifères. Le mécanisme de transport des lipides d'origine exogène ou endogène s'est donc mis en place chez l'ancêtre de ces vertébrés dans un contexte commun de système vasculaire clos. Cette base commune aux mammifères et aux poissons Téléostéens est révélée par une composition lipidique des différentes classes de lipoprotéines circulantes comparable ainsi que par des analogies dans le métabolisme intravasculaire de ces particules chez ces vertébrés (Babin et Vernier, 1989).

Les données moléculaires, biochimiques et physiologiques concernant le métabolisme lipidique des poissons Téléostéens sont encore très fragmentaires. Ces animaux sont des poïkilothermes et possèdent des caractéristiques spécifiques comme un métabolisme énergétique basé essentiellement sur les lipides et non sur les carbohydrates comme c'est le cas des mammifères (Cowey et Sargent, 1977 ; Watanabe, 1992). Ces poissons présentent également une forte proportion en acides gras polyinsaturés dans les lipides constitutifs (Henderson et Tocher, 1987, Sargent *et al.*, 1989) et une concentration très importante en lipoprotéines dans le plasma (Babin et Vernier, 1989 ; Wallaert et Babin, 1994).

Les travaux qui sont engagés dans l'étude du métabolisme lipidique et lipoprotéique des poissons Téléostéens visent à mieux définir les similarités et les différences qui existent par rapport aux tétrapodes et aux mammifères en particulier et à dégager les spécificités métaboliques qui pourraient exister entre les différents groupes de poissons Téléostéens.

Le tractus digestif de ces animaux est une structure d'origine endodermique qui, chez la plupart des triblastiques, présente une régionalisation céphalo-caudale permettant de réaliser les différentes étapes requises pour la digestion, l'absorption et l'assimilation des lipides d'origine alimentaire. Chez les différents vertébrés, le plan d'organisation de ce tractus est en tout point comparable. Les adaptations morphologiques et fonctionnelles de ce tractus digestif chez les poissons pourraient être le résultat du mode de prise alimentaire, du type d'alimentation ou du régime ingéré par l'animal (Smith, 1989). Ceci se traduit par l'existence de poissons Téléostéens avec ou sans estomac et par la présence ou non d'un ou de plusieurs diverticules pyloriques. Quoiqu'il en soit, à la suite de la digestion lipidique intra-luminale, les lipides d'origine alimentaire, essentiellement présents sous la forme d'acides gras non estérifiés à ce niveau, sont absorbés par les entérocytes de l'épithélium intestinal. Cette

absorption se produit en particulier au niveau de la partie la plus proximale de l'intestin et au niveau du ou des caeca pyloriques. Les entérocytes permettent ainsi d'absorber puis de transférer les lipides d'origine alimentaire sous la forme d'acides gras non estérifiés ou de lipoprotéines riches en triglycérides (les chylomicrons et les VLDL), et ceci chez tous les vertébrés.

Les travaux qui ont été engagés dans le cadre de ce travail ont consisté à étudier, chez un poisson modèle, deux acteurs moléculaires majeurs précédemment identifiés chez les mammifères et impliqués dans l'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines par les entérocytes. Les gènes et les transcrits codant pour la grande sous-unité de la MTP et les apoB du poisson zèbre ont ainsi été caractérisés et comparés à leurs homologues mammaliens (*Discussion partie 1*). Les profils d'expression de ces gènes au cours du développement embryonnaire et larvaire ainsi que chez l'adulte ont été définis et comparés aux données existantes chez les tétrapodes (*Discussion partie 2*). Les effets de la prise de nourriture sur la quantité de ces transcrits chez la larve ainsi que dans l'intestin et le foie de poisson zèbre adulte ont ensuite été évalués et comparés aux données existantes chez les mammifères (*Discussion partie 3*). L'ensemble des résultats obtenus permet de discuter des similarités et des différences qui peuvent exister entre les entérocytes des poissons Téléostéens et des mammifères en ce qui concerne leur capacité à synthétiser des lipoprotéines au cours de l'absorption des lipides d'origine alimentaire et le métabolisme intravasculaire des lipoprotéines d'origine intestinale. Les données présentées permettent également de proposer des hypothèses quant à l'accumulation des nombreuses gouttelettes lipidiques cytosoliques observées dans les entérocytes des poissons au cours du pic d'absorption alimentaire (*Discussion partie 4*).

I. Caractérisation des gènes et des transcrits codant pour la grande sous-unité de la MTP et pour les apoB du poisson zèbre. Comparaison avec leurs homologues mammaliens.

A. La MTP.

Chez les mammifères, la MTP est un hétérodimère composé d'une grande sous-unité catalytique et d'une petite sous-unité, la PDI, indispensable au maintien du complexe dans le reticulum endoplasmique (Wetterau *et al.*, 1990).

Avant le début de ces travaux, les données d'ordre moléculaire ou biochimique sur la MTP des vertébrés non tétrapodes étaient inexistantes. En 2003, un homologue fonctionnel de la grande sous-unité de la MTP a été identifié chez la drosophile (Sellers *et al.*, 2003). Dans cette même publication, les auteurs rapportent l'identification d'une séquence issue du programme de séquençage du génome du *Fugu* pouvant coder pour une protéine homologue de la grande sous-unité de la MTP de mammifères.

1- La grande sous-unité de la MTP de poisson zèbre.

Un transcrite codant pour une protéine similaire à la grande sous-unité de la MTP des mammifères a été isolé et entièrement séquencé à partir d'ARN totaux extraits de l'intestin antérieur de poissons zèbres. La longueur de ce transcrite a été estimée à 4,2 kb par northern blot. Cette valeur est du même ordre de grandeur que celle obtenue pour la grande sous-unité de la MTP humaine ou de hamster dont le transcrite est de 4,4 kb (Sharp *et al.*, 1993 ; Lin *et al.*, 1994). Par interrogation de la base de donnée du génome du poisson zèbre (http://www.ensembl.org/Danio_rerio/), un gène correspondant à ce transcrite a été identifié. Ce gène *mtp* a une structure comparable à celle précédemment définie pour le gène *mtp* humain (Sharp *et al.*, 1994). Tous deux contiennent 18 exons et les introns présents dans le cadre ouvert de lecture sont de longueurs similaires et de types identiques, à l'exception de l'intron 13. L'excellente conservation de la structure des gènes *mtp* humain et *mtp* de poisson zèbre suggère que le gène de poisson zèbre pourrait être l'orthologue du gène humain. Par ailleurs, aucun autre gène homologue n'a pu être identifié dans le génome du poisson zèbre.

La séquence protéique déduite du transcrite obtenu est composée de 884 acides aminés. La grande sous-unité de la MTP de poisson zèbre possède environ 54% d'identité et 66% de similarités avec les protéines humaine et de hamster. Elle possède également 55% d'identité avec la MTP de poulet (XP_420662), 66% d'identité avec l'homologue identifié chez le *Fugu* (SINFRUP00000149051) et 23% d'identité avec l'homologue fonctionnel de drosophile (CG9342) (Sellers *et al.*, 2003). L'homologie de séquence entre les protéines humaine et de poisson zèbre est très forte dans leur partie C-terminale, notamment au niveau des feuillets de brins β présumés A et C. Ces feuillets correspondraient aux feuillets β A et β C de la lipovitelline de lamproie (LV) qui forment, dans cette protéine, deux côtés d'une cavité pyramidale capable de lier les lipides (Anderson *et al.*, 1998 ; Mann *et al.*, 1999 ; Read *et al.*, 2000 ; Thompson et Banaszak, 2002). Le troisième côté, situé en bas de cette cavité chez la LV de lamproie, correspond au feuillet β D absent de la grande sous-unité de la MTP humaine.

Les feuillettes A et C de la grande sous-unité de la MTP humaine seraient capables de former une cavité pouvant lier les lipides bien qu'elle soit ouverte à sa base. Ceci suggère que la partie C-terminale de la grande sous-unité de la MTP de poisson zèbre pourrait également constituer une cavité liant les lipides. Les acides aminés des feuillettes A et C de brins β dirigés vers l'intérieur de la cavité sont essentiellement hydrophobes dans la séquence de la grande sous-unité de la MTP humaine (Read *et al.*, 2000) ainsi que dans la protéine de poisson zèbre.

Dans sa partie C-terminale, la grande sous-unité de la MTP de poisson zèbre possède un fort pourcentage d'identité avec la protéine humaine. Dans la grande sous-unité de la MTP humaine, les acides aminés des hélices αA (725-736) et αB (781-786) situés en bas et dirigés vers l'intérieur de la cavité formeraient une crête hydrophobe qui faciliterait l'acquisition et la liaison des triglycérides. De part sa structure, l'hélice αA pourrait se comporter comme un peptide de fusion similaire à ceux présents dans les enveloppes virales. Elle serait capable de déstabiliser les membranes en adoptant une inclinaison de trente degrés par rapport à l'interface eau/lipides. Cette hélice située à l'entrée de la cavité lipidique présumée pourrait donc s'insérer dans les membranes, perturber l'orientation des chaînes acyles des phospholipides et faciliter ainsi l'extraction des lipides contenus dans les membranes (Read *et al.*, 2000). L'hélice αA est très bien conservée dans la grande sous-unité de la MTP du poisson zèbre ainsi que dans les séquences homologues d'autres poissons Téléostéens. Par contre, la séquence protéique de l'homologue fonctionnel de drosophile possède, à ce niveau, des acides aminés polaires pouvant expliquer la faible activité de transfert de cette protéine (Sellers *et al.*, 2003). La plupart des acides aminés essentiels à l'activité de la protéine humaine, comme l'arginine 540, les leucines 731 et 734 et l'asparagine 780 sont conservés dans la séquence de poisson zèbre à l'exception de la valine 782 appartenant à l'hélice αB . Cette valine est un acide aminé essentiel à l'activité de transfert des triglycérides de la grande sous-unité de la MTP humaine puisque sa substitution par une arginine réduit cette activité à environ 26% de celle de la protéine sauvage (Read *et al.*, 2000). Dans la séquence de poisson zèbre ainsi que dans celle d'autres poissons Téléostéens comme la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), le saumon (*Salmo salar*), le Fugu (*Takifugu rubripes*), le medaka (*Oryzias latipes*) et l'épinoche (*Gasterosteus aculeatus*), une alanine ou une valine est présente à la position 782. Cette substitution est également retrouvée dans la séquence du *Xénope* alors que la séquence du poulet présente une isoleucine à cette position. Les séquences de mammifères disponibles contiennent toutes une valine en position 782. Cette différence pourrait être associée à une activité de transfert des triglycérides de la grande sous-

unité de la MTP des poissons et du *Xénope* plus faible que celle de la grande sous-unité des mammifères ou du poulet.

2- La petite sous-unité de la MTP de poisson zèbre.

Des séquences correspondant à la PDI de poisson zèbre, homologue de la PDI humaine (P07237) impliquée dans le complexe MTP, ont été recherchées dans les banques de données par analogie de séquences. Des clones dbEST chevauchants ont été identifiés et le transcrit obtenu coderait pour la PDI de poisson zèbre. La séquence protéique déduite de ce transcrit contient 509 acides aminés et présente 75% d'identité avec la PDI humaine et 55% d'identité avec l'homologue de drosophile (P54399).

Le poisson zèbre exprime donc des gènes codant pour des protéines homologues à la petite et à la grande sous-unité du complexe MTP. Des expériences de co-immunoprécipitation entre ces protéines permettraient d'analyser leur interaction et leur capacité à former un complexe supramoléculaire possédant une activité de transfert des lipides de type MTP. De plus, des études de co-immunolocalisation de ces deux protéines chez l'embryon, la larve et l'adulte apporterait des informations précieuses sur la localisation du complexe MTP dans les différents tissus du poisson zèbre.

3- L'activité de transfert des lipides de la MTP de poisson zèbre.

Les identités de séquence en acide aminé ainsi que la conservation des structures secondaires déduites entre les grandes sous-unités de la MTP du poisson zèbre et humaine suggèrent une conservation de l'activité de transfert des lipides pour la protéine de poisson zèbre. La mesure de l'activité spécifique de transfert des lipides dans les fractions microsomales de foie et d'intestin antérieur du poisson zèbre ainsi que dans les fractions microsomales de foie et de duodénum de souris a été entreprise afin de tester cette hypothèse. Une activité spécifique de transfert des triglycérides et des esters de cholestérol a été décelée dans le foie et dans l'intestin antérieur du poisson zèbre. L'ajout d'inhibiteurs de la MTP mammalienne provoque une diminution importante de l'activité de transfert des triglycérides et des esters de cholestérol montrant bien que les tissus de poisson zèbre contiennent une activité de transfert des lipides de type MTP. L'activité spécifique de transfert des triglycérides par milligramme de protéines et par minute est plus faible chez le poisson zèbre que chez la souris dans le foie ainsi que dans l'intestin. Chez le poisson zèbre, l'activité

spécifique de transfert des triglycérides représente respectivement dans le foie et l'intestin 43% et 27% de l'activité mesurée dans ces mêmes tissus de souris. Cette différence d'activité spécifique de transfert des triglycérides entre le poisson zèbre et la souris peut s'expliquer soit par une plus faible activité de la grande sous-unité de la MTP de poisson zèbre soit par une plus faible quantité de protéine MTP dans les microsomes de foie et d'intestin de poisson zèbre comparativement à ceux de souris. Or, l'activité spécifique de transfert des esters de cholestérol est similaire dans les fractions microsomales de poisson zèbre et dans celles de souris. Ceci suggère que les quantités de protéine MTP chez le poisson zèbre et la souris sont équivalentes. De plus, Read et ses collaborateurs ont démontré que la substitution de la valine 782 en alanine a pour effet de diminuer de près de 74% l'activité de transfert des triglycérides de la grande sous-unité de la MTP humaine. L'activité de transfert des esters de cholestérol de ce mutant n'a pas été mesurée (Read *et al.*, 2000). La présence d'une glycine à la position 782 dans la séquence de la grande sous-unité de poisson zèbre pourrait donc être à l'origine de la différence d'activité de transfert des triglycérides observée entre la souris et le poisson zèbre. Afin de vérifier cette hypothèse et de déterminer si la grande sous-unité de la MTP de poisson zèbre possède une activité de transfert des triglycérides plus faible que celle des mammifères, la mesure de cette activité de transfert devra être effectuée *in vitro* après expression de la protéine recombinante comme cela a été réalisé précédemment pour la protéine humaine (Athar *et al.*, 2004). L'étude de la capacité à transférer les lipides entre deux vésicules unilamellaires permettra de s'assurer que la protéine de poisson zèbre est l'homologue fonctionnel de la grande sous-unité de la MTP humaine.

B. Les apoB.

1- Caractérisation moléculaire des apoB de poisson zèbre. Comparaison avec les apoB de mammifères.

Au cours de l'assemblage des lipoprotéines riches en triglycérides, la MTP transfère certains lipides sur l'apoB.

Les données biochimiques et moléculaires disponibles avant le début de cette étude indiquent que les deux apoB de mammifère, l'apoB-100 et l'apoB-48, sont codées par un seul et même gène nommé *apoB* (Innerarity *et al.*, 1996 ; Anant et Davidson, 2002). L'apoB-48 résulte en fait de la traduction de transcrits *apoB* ayant subi une modification post-traductionnelle qui consiste en la désamination de la cytidine 6666 en uridine. Ceci provoque le changement du

codon glutamine (CAA) en codon stop (UAA) à la position 2153 du transcrit *apoB* (Powell *et al.*, 1987 ; Chen *et al.*, 1987 ; Anant et Davidson, 2001). L'apoB-48 correspond aux 48 % N-terminaux de l'apoB-100. L'apoB-48 possède donc les structures potentielles de formation de la cavité liant les lipides ainsi que les domaines intervenant dans la liaison à la grande sous-unité de la MTP localisés dans la partie N-terminale de l'apoB-100 humaine (acides aminés 1 à 1001) (Segrest *et al.*, 1999 ; Manchekar *et al.*, 2004). Par contre, l'apoB-48 ne contient pas le domaine de liaison au récepteur aux LDL présent dans la partie C-terminale de l'apoB-100. L'apoB-48 est donc incapable d'interagir avec ce type de récepteur.

Chez les oiseaux, une seule forme d'apoB (Tarugi *et al.*, 1990) codée par un gène unique (Law et Scott, 1990) semble exister.

Chez la truite, deux apoB de haut poids moléculaire ont été identifiées dans les VLDL plasmatiques (Babin, 1987a ; Babin, 1987b). L'apoB de plus petite taille est la seule présente dans les LDL plasmatiques. Des déterminants antigéniques communs sont présents entre ces deux apoB de truite et l'apoB-100 humaine (Babin et Vernier, 1989). En 1995, un transcrit partiel codant pour le domaine liant le récepteur aux LDL d'une apoB a été cloné dans le foie du saumon atlantique (Babin *et al.*, 1995). Contre toute attente, ce domaine présente une délétion entre les régions A et B riches en acides aminés basiques jouant un rôle dans le domaine de liaison au récepteur aux LDL. Cette délétion n'existe pas pour les apoB des tétrapodes (Law et Scott, 1990) suggérant ainsi l'existence de différences structurales importantes entre les apoB des poissons Téléostéens et leurs homologues présents chez les tétrapodes.

Trois gènes, *apoB α* , *apoB β 1* et *apoB β 2*, codant pour trois apoB distinctes, l'*apoB α* , l'*apoB β 1* et l'*apoB β 2*, ont été identifiés dans le génome du poisson zèbre dans le cadre de ce travail. L'appellation de ces protéines a été définie selon la taille du domaine supposé de liaison au récepteur aux LDL. Lorsque ce domaine est de taille similaire à celui contenu dans l'apoB-100 humaine, la protéine est nommée de type α . Lorsqu'il présente une délétion entre les régions basiques A et B, les protéines sont dites de type β .

Le gène *apoB α* possède une structure génique et un environnement génomique semblables au gène *apoB* humain. En effet, ce gène est constitué de 28 introns dans le cadre ouvert de lecture, tout comme le gène *apoB* humain. Les 27 exons de ces deux gènes ont des tailles similaires dont l'un est de très grande taille, comprenant plus de 7500 pb, ce qui représente à lui seul la moitié de la longueur des transcrits correspondant. Une partie de cet exon code pour le domaine de liaison au récepteur aux LDL. L'environnement génique du

gène *apoB* humain et celui du gène *apoB α* de poisson zèbre sont similaires. Ces deux gènes sont disposés en amont d'un gène codant respectivement pour la protéine hypothétique FLJ21820 humaine et pour son homologue de poisson zèbre. Le gène *gdf7*, codant pour le facteur de croissance 7 de poisson zèbre, a été identifié à proximité du gène *apoB α* sur le brin inverse complémentaire du chromosome 17 de poisson zèbre. Cette syntenie est conservée entre les gènes *apoB* et *gdf7* situés en position 2p24-p23 sur le chromosome 2 humain.

De plus, le gène *apoB α* coderait pour une protéine de taille similaire à l'apoB-100 humaine (NP_000375) autrement dit de 4412 acides aminés pour l'apoB α de poisson zèbre et de 4563 résidus pour l'apoB-100 humaine, en incluant le peptide signal. Le pourcentage d'identité entre ces deux protéines est de 32 %. Les régions les plus conservées correspondent au domaine $\beta\alpha 1$ localisé en partie N-terminale (acides aminés 1 à 1001) des apoB humaines ainsi qu'au domaine de liaison au récepteur aux LDL (acides aminés 3169 à 3393) de l'apoB-100 humaine. Ces domaines présentent respectivement 38 % et 46 % d'identité entre l'apoB α de poisson zèbre et l'apoB-100 humaine. La partie N-terminale des apoB humaines est homologue à la lipovitelline (LV) de lamproie dont la structure a été déterminée par diffraction des rayons X (Anderson *et al.*, 1998; Thompson et Banaszak, 2002). Par analogie de séquence, un modèle structural du domaine $\beta\alpha 1$ de l'apoB-100 humaine a été proposé (Manchekar *et al.*, 2004). La partie N-terminale des apoB humaines formerait une cavité pyramidale qui participerait à la liaison des lipides. Cette cavité serait bordée par les feuillets de brins β A (ou feuillet β B) et C (ou feuillet β A) et elle serait fermée en bas par les hélices β A et β B. Ces feuillets et ces hélices sont très bien conservés dans l'apoB α de poisson zèbre suggérant que la partie N-terminale de cette protéine serait agencée en une cavité pouvant lier les lipides. C'est également dans cette partie N-terminale des apoB humaines que se trouvent les sites supposés de liaison à la grande sous-unité de la MTP. Il est à noter que les parties N-terminales des apoB et de la grande sous-unité de la MTP des vertébrés possèdent une structure similaire héritée d'un module protéique ancestral commun. En effet, ces deux protéines appartiennent à la superfamille des « Large Lipid Transfer Proteins » (Babin *et al.*, 1999).

Le domaine de liaison au récepteur aux LDL de l'apoB-100 humaine est constitué de deux régions à caractère basique, nommées A et B, séparées par un feuillet de brins β amphiphiles riche en proline (Yang *et al.*, 1989). Dans l'apoB α de poisson zèbre, le domaine supposé de liaison au récepteur aux LDL contient le même nombre d'acides aminés que celui de l'apoB-100 humaine. Les acides aminés inclus dans les régions A et B ainsi que dans le feuillet de

brins β riche en proline sont très bien conservés dans l'apoB α de poisson zèbre. Sur les onze prolines présentes dans ce feuillet de brins β de l'apoB-100 humaine, dix sont conservées dans l'apoB α de poisson zèbre. Cette forte similarité entre les domaines supposés de liaison au récepteur aux LDL de l'apoB-100 humaine et de l'apoB α de poisson zèbre pourrait permettre la liaison de cette apoB de poisson zèbre sur le récepteur aux LDL humain. Cette hypothèse est appuyée par la capacité des LDL de carpe à lier le récepteur aux LDL humain ou à déplacer des LDL humaines fixées sur ce récepteur (Fainaru *et al.*, 1988).

Les deux autres gènes identifiés dans le génome du poisson zèbre et dénommés *apoB β 1* et *apoB β 2* codent pour des protéines qui présentent des délétions étendues de plusieurs régions de leur séquence protéique par rapport à l'apoB α de poisson zèbre ou à l'apoB-100 humaine. Elles contiennent respectivement 3739 et 2570 acides aminés, ce qui est plus court que l'apoB-100 humaine (4563 acides aminés) et plus long que l'apoB-48 humaine (2190 acides aminés). Ces deux protéines déduites de la séquence de leur ADNc possèdent un faible pourcentage d'identité global avec l'apoB-100 humaine qui est respectivement de 29% pour l'apoB β 1 et de 15% pour l'apoB β 2. Toutefois, la partie N-terminale des ces protéines est la mieux conservée puisqu'elle présente, pour ces deux protéines, 36% d'identité avec la partie N-terminale des apoB humaines (acides aminés 1 à 1000). Ce pourcentage est similaire à celui obtenu entre les parties N-terminales de l'apoB α de poisson zèbre et des apoB humaines. La partie N-terminale de ces apoB de poisson zèbre pourrait donc être agencée comme celle des apoB humaines et contenir une cavité pyramidale permettant d'envelopper les lipides. Les apoB β 1 et apoB β 2 de poisson zèbre pourraient donc être assemblées sous la forme de lipoprotéines riches en triglycérides. Les sites susceptibles d'intervenir dans la liaison des apoB humaines avec la grande sous-unité de la MTP sont conservés dans ces deux apoB de type β du poisson zèbre.

Contrairement à l'apoB-48 humaine, les apoB β 1 et apoB β 2 de poisson zèbre contiennent les régions A et B riches en acides aminés basiques qui participent à la liaison de l'apoB au récepteur aux LDL. Ces régions sont bien conservées dans les apoB de poisson zèbre. Toutefois, le feuillet β amphiphile riche en proline inclus entre les régions A et B de l'apoB-100 humaine est absent des apoB β 1 et apoB β 2 de poisson zèbre. Dans la protéine humaine, ce feuillet permettrait un rapprochement spatial des régions A et B contenues dans le domaine de liaison au récepteur grâce aux courbures induites par les prolines. La proximité des régions A et B dans les apoB β de poisson zèbre du fait de leur séquence primaire pourrait être identique à celle observée dans l'apoB-100 humaine. De plus, la partie C-terminale de l'apoB-100 est

absente dans les apoB β 1 et apoB β 2 de poisson zèbre. Or, cette partie formerait une boucle et croiserait la région B du domaine de liaison au récepteur aux LDL (Borén *et al.*, 2001). L'arginine 3500 de l'apoB-100 humaine, acide aminé hautement conservé dans les séquences d'apoB de poissons Téléostéens que nous avons caractérisées, permet le maintien de cette boucle et empêcherait le recouvrement de la région B grâce à une interaction avec le résidu tryptophane 4369. La mutation de l'arginine 3500 en tryptophane ou en glutamine (Gaffney *et al.*, 1995 ; Borén *et al.*, 2001) est associée à une faible affinité du récepteur aux LDL pour la protéine mutée ainsi qu'à une hypercholestérolémie familiale due à une déficience en apoB-100 (FDB). La délétion des 5% C-terminaux de l'apoB-100 a été associée à une augmentation de l'affinité de cette apoB-95 au récepteur aux LDL (Borén *et al.*, 2001). L'absence de cette partie C-terminale allègerait l'encombrement stérique présent autour de la région B et rendrait le domaine d'interaction de l'apoB avec le récepteur aux LDL plus accessible. Ainsi, le domaine de liaison au récepteur aux LDL de l'apoB β 1 et de l'apoB β 2 de poisson zèbre pourrait posséder une affinité différente de celui de l'apoB α . Des mesures de liaison *in vitro* des apoB de poisson zèbre sur le récepteur aux LDL permettraient de déterminer l'affinité de ces protéines pour le récepteur humain ou pour son homologue de poisson zèbre. Si le domaine de liaison au récepteur aux LDL contenu dans les apoB de type β n'est pas capable de lier le récepteur, alors ce type d'apoB pourrait constituer des homologues fonctionnels de l'apoB-48 humaine.

Le génome du poisson zèbre possède donc trois gènes qui codent pour trois apoB distinctes. Les protéines déduites de la transcription de ces gènes possèdent les régions indispensables à leur liaison à la grande sous-unité de la MTP ainsi que celles supposées former une cavité pyramidale qui prendrait en charge les lipides. Ces trois apoB pourraient être constitutive des lipoprotéines légères circulantes du poisson zèbre. La mise en évidence de l'existence de plusieurs gènes d'apoB dans un même génome constitue une première dans la mesure où la ou les formes d'apoB précédemment caractérisées chez les vertébrés sont issues de la transcription d'un gène *apoB* unique. Il est à noter que le gène codant pour l'enzyme APOBEC1 qui permet la désamination du transcrit *apoB* chez les mammifères semble être spécifique du génome de ces vertébrés (Conticello *et al.*, 2004). La désamination des transcrits *apoB* identifiés chez le poisson zèbre n'aurait ainsi pas lieu suggérant l'absence de formes d'apoB tronquées en partie C-terminale issues de ce mécanisme, contrairement à ce qui existe chez les mammifères.

2- Relations phylogénétiques entre les apoB des vertébrés.

De part la structure protéique déduite, la structure génique, l'environnement génomique ainsi que son profil d'expression (voir plus loin), **le gène apoB α des poissons Téléostéens peut être considéré comme l'orthologue du gène apoB des mammifères.** L'homologie fonctionnelle des protéines apoB α et apoB-100 pourrait être vérifiée par l'étude de la capacité de la protéine apoB α des poissons Téléostéens à se lier sur le récepteur aux LDL de fibroblastes humains en culture ou à déplacer des LDL humaines liées sur ce même récepteur.

Les apoB de type β semblent être spécifiques des poissons Téléostéens. En effet, des séquences d'apoB β et/ou d'apoB α ont été identifiées chez d'autres poissons Téléostéens comme le *Fugu*, la truite, l'anguille et le tétraodon alors qu'aucune apoB de type β n'est identifiée chez les tétrapodes comme le *Xénope*, le poulet ou les mammifères. L'analyse phylogénétique effectuée à partir de l'alignement de la région contenant le domaine supposé de liaison au récepteur aux LDL démontre qu'il existe bien deux groupes distincts d'apoB chez les poissons Téléostéens. Le premier groupe contient les apoB de type β des poissons Téléostéens alors que le second comporte les apoB de type α de *Fugu*, de truite, d'anguille et de poisson zèbre associées de façon définitive (valeur de remise = 100) aux apoB des vertébrés tétrapodes. Deux hypothèses principales permettraient d'expliquer l'existence de l'apoB de type β chez les poissons Téléostéens (Figure 42). Le gène apoB β pourrait être le fruit d'une duplication, dans la lignée des poissons, du gène apoB α considéré comme le gène ancestral, suivie d'une ou plusieurs délétions dans ce gène dupliqué. Les duplications géniques globales ou partielles ont façonné le génome des poissons Téléostéens (Postlethwait *et al.*, 2000 ; Chen *et al.*, 2004 ; Jaillon *et al.*, 2004). La présence des gènes apoB de type α et β chez les poissons Téléostéens pourrait être dû à un événement de duplication plus ancien que la divergence menant à la séparation entre les Sarcoptérygiens et les Actinoptérygiens et à une perte secondaire de la forme β chez l'ancêtre des tétrapodes. La détermination de la structure du ou des apoB chez le Coelacanthe et/ou un Chondrichthyens permettrait d'apporter des éléments de réponse pour dater les événements évolutifs qui ont mené à la présence de ces deux types d'apoB dans le génome des poissons Téléostéens.

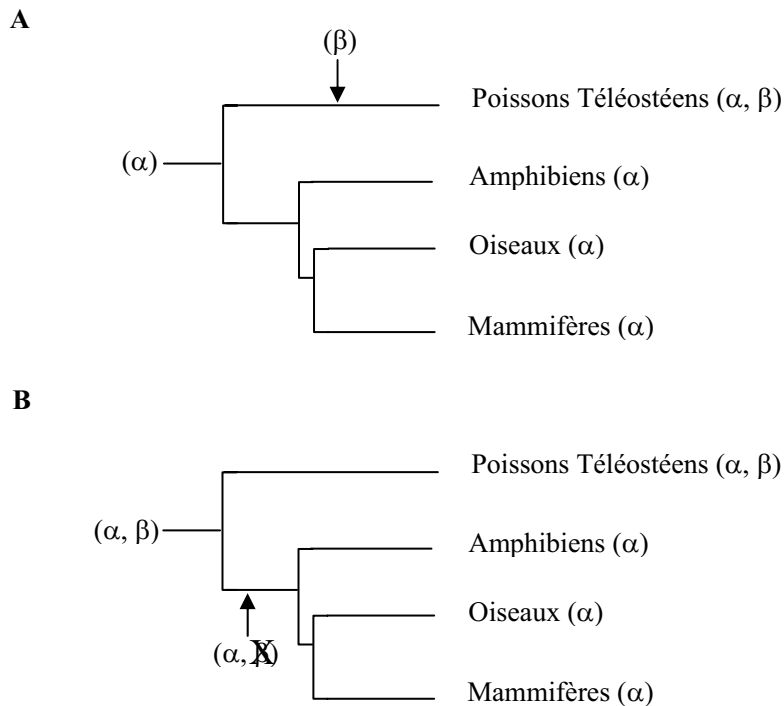


Figure 42 : Hypothèses relatives à l'origine de la présence des apoB α et apoB β chez les poissons Téléostéens.

Deux hypothèses principales permettraient d'expliquer le phénomène à l'origine de la présence de la forme β chez les poissons Téléostéens et à son absence chez les vertébrés tétrapodes. (A) La forme α pourrait être la forme ancestrale des apoB. Le gène correspondant à cette forme se serait dupliqué dans la lignée des poissons Téléostéens et aurait ensuite subi une dérive génique amenant à des délétions et à la formation de la forme β . (B) Les deux formes, α et β , auraient pu être présentes chez l'ancêtre commun et la forme β aurait disparu chez l'ancêtre des tétrapodes.

La présence au sein du génome des poissons Téléostéens de plusieurs apoB de type α et de type β pourrait être le résultat de duplication(s) en cis ou en trans suivie(s) d'une divergence ultérieure dans certaines familles de poissons Téléostéens. Ceci permettrait d'expliquer l'existence de deux gènes *apoB* de type β ($\beta1$ et $\beta2$) dans le génome du poisson zèbre et de deux gènes *apoB* de type α ($\alpha1$ et $\alpha2$) dans le génome de la truite arc-en-ciel ou de l'anguille japonaise. La présence d'une délétion supplémentaire étendue en aval de la région basique B du domaine supposé de liaison au récepteur aux LDL distingue l'apoB $\alpha2$ de son paralogue l'apoB $\alpha1$. Le gène *apoB $\alpha1$* serait donc pour les espèces qui possèdent deux gènes *apoB* de type α l'orthologue du gène *apoB* des tétrapodes. Plusieurs histoires évolutives peuvent être proposées pour expliquer la diversité structurale des gènes *apoB* identifiés chez les poissons Téléostéens (Figure 43).

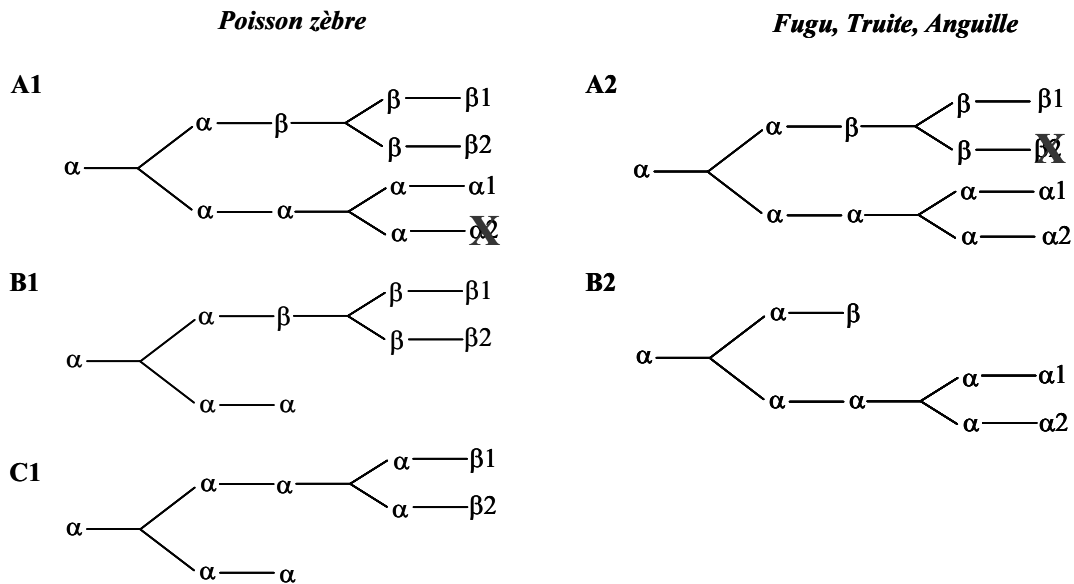


Figure 43 : Hypothèses sur la nature du ou des événements géniques permettant l'apparition des différentes formes d'apoB chez les poissons Téléostéens.

Plusieurs hypothèses existent afin d'expliquer la présence du gène *apoBβ2* chez le poisson zèbre (A1, B1, C1) et l'existence du gène *apoBα2* chez le *Fugu*, la truite et l'anguille (A2, B2). Après la duplication du gène ancestral de type α , l'un des gènes dupliqués subirait des modifications dont des délétions dans différentes régions afin d'être converti en gène *apoBβ* (A1, B1, A2, B2). Les gènes *apoBα* et *apoBβ* seraient de nouveau dupliqués puis modifiés afin de former les gènes codant pour les protéines apoBα1, apoBα2, apoBβ1 et apoBβ2 (A1, A2). Chez le poisson zèbre, le gène *apoBα2* disparaîtrait (A1) alors que chez le *Fugu*, la truite et l'anguille, c'est le gène *apoBβ2* qui disparaîtrait (A2). Une autre hypothèse après la première duplication et la première modification serait la duplication du gène *apoBβ* suivie d'une modification aboutissant à la création des gènes codant pour l'apoBβ1 et l'apoBβ2 du poisson zèbre (B1) et la duplication du gène *apoBα* suivie d'une modification engendrant les gènes codant pour l'apoBα1 et l'apoBα2 chez le *Fugu*, la truite et l'anguille (B2). Une dernière pourrait être que le gène *apoBβ2* soit issu d'une duplication et d'un événement de délétion parallèles à ceux nécessaires à l'apparition du gène *apoBβ1* (C1).

II. Comparaison des profils d'expression des gènes codant pour la grande sous-unité de la MTP et pour les apoB entre le poisson zèbre et les vertébrés tétrapodes.

A. Expression au cours de l'embryogenèse précoce.

Au début de nos investigations, il n'existait pas de données relatives à l'expression des gènes codant pour la grande sous-unité de la MTP ou pour l'apoB au cours de l'embryogenèse précoce des vertébrés.

De façon intéressante, des transcrits *apoB α* d'origine maternelle sont détectés avant l'activation du génome zygotique dans les blastomères en cours de division, puis au niveau de l'embryon de poisson zèbre. Ce profil d'hybridation est très différent de celui observé pour le gène *apoB β 1* dont aucun transcrit n'a pu être détecté dans les structures embryonnaires avant quatre jours de développement. Le niveau élevé d'expression du gène *apoB α* au cours de l'embryogenèse précoce dans le corps et en particulier au niveau de la tête de l'embryon de poisson zèbre pourrait être mis en relation avec le phénotype observé lors de l'inactivation du gène *apoB* chez la souris (Farese *et al.*, 1995). En effet, la mortalité embryonnaire observée chez les homozygotes semble être la conséquence d'une absence de fermeture du tube neural suggérant ainsi une fonction originale et non élucidée de l'apoB au cours de la neurulation. Il est à noter qu'une expression intense du gène *apoE* au sein des macrophages infiltrés dans le système nerveux central a pu être démontré au cours du développement du poisson zèbre (Babin *et al.*, 1997 ; Herbomel *et al.*, 2001). L'utilisation du modèle poisson zèbre pourrait permettre d'amener des éléments de réponse quant au rôle direct ou indirect de l'apoB au cours de l'organogenèse du système nerveux. Une première approche pourrait être l'étude du phénotype obtenu après injection d'oligonucléotides morpholino spécifiques du transcrit *apoB α* au cours des premières divisions de segmentation de l'embryon de poisson zèbre.

B. Expression au niveau des structures extra-embryonnaires.

Les données publiées indiquent que chez les mammifères, le gène *mtp* s'exprime au cours du développement embryonnaire tardif, en particulier au niveau des structures extra-embryonnaires qui jouent un rôle dans le transfert des nutriments d'origine maternelle. Des ARNm correspondant à ce gène ont été visualisés dans le sac vitellin d'embryons de souris de 9,5 jours et une activité de transfert des triglycérides y a également été détectée (Terasawa *et al.*, 1999 ; Shelton *et al.*, 2000). Cette activité est augmentée entre 9,5 et 13,5 jours de gestation puis diminue entre 13,5 et 18,5 jours. Toutefois, aucune donnée n'est rapportée dans la littérature quant à une variation de l'expression du gène *mtp* au cours du développement des mammifères. Il est à signaler que la grande sous-unité de la MTP a également été détectée par western blot à partir d'extraits protéiques provenant du sac vitellin d'embryons de poulet (Hermann *et al.*, 2000). Chez la souris, le gène *apoB* s'exprime dès le stade de 7,5 jours de gestation dans le sac vitellin (Farese *et al.*, 1996 ; Terasawa *et al.*, 1999). Le niveau d'expression du gène *apoB* dans le sac vitellin augmente entre 13,5 et 18,5 jours de gestation. Chez le rat, une expression du gène *apoB* est détectée dans les membranes foetales à 18 jours

de développement (Demmer *et al.*, 1986). Le niveau de cette expression est ensuite augmenté entre 18 et 21 jours de gestation. La co-expression des gènes *mttp* et *apoB* dans les structures extra-embryonnaires au cours du développement des mammifères et des oiseaux a comme conséquence une synthèse très active de lipoprotéines de grande taille par ces structures (Farese *et al.*, 1996 ; Speake *et al.*, 1998). Chez les rongeurs, les cellules épithéliales de l'endoderme du sac vitellin joueraient un rôle fondamental dans l'absorption des nutriments maternels avant que la circulation placentaire de l'embryon ne se mette en place (Jollie, 1990). La délétion du gène *apoB* ou du gène *mttp* chez la souris est associée à une accumulation de gouttelettes lipidiques dans le sac vitellin (Farese *et al.*, 1996 ; Raabe *et al.*, 1998 ; Shelton *et al.*, 2000). Dans l'espèce humaine, le sac vitellin est un vestige et le placenta participe au transfert des lipides de la mère au fœtus *via* la sécrétion de lipoprotéines (Madsen *et al.*, 2004). Une expression des gènes *mttp* et *apoB* dans des biopsies de placenta est associée à la synthèse et à la sécrétion de lipoprotéines d'environ 47 nm de diamètre contenant de l'apoB (Madsen *et al.*, 2004).

Au cours du développement du poisson zèbre, l'expression du gène *mtp* débute dans les blastomères marginaux après la transition blastuléenne qui a lieu vers 3 hpf. Au cours de la gastrulation, une expression intense est observée dans le syncytium vitellin. Cette expression est ensuite diminuée au sein de cette structure extra-embryonnaire au cours de la somitogenèse pour disparaître avant l'éclosion. Les gènes *apoB α* et *apoB β 1* s'expriment tous les deux dans le syncytium vitellin des embryons de poisson zèbre, dès la transition blastuléenne pour le gène *apoB α* et à partir de la fin de la gastrulation pour le gène *apoB β 1*. Ces deux gènes sont ensuite co-exprimés avec le gène *mtp* dans le syncytium vitellin de l'embryon de poisson zèbre jusqu'à environ deux jours après la fécondation suggérant l'incorporation de ces apolipoprotéines dans des lipoprotéines. Il est à noter que des ESTs correspondant au transcrit *pdi* sont retrouvés dans les banques d'ADNc synthétisés à partir d'ARN extraits d'embryons en période de gastrulation ou de somitogenèse (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/ESTProfileViewer.cgi?uglist=Dr.5594>) suggérant l'existence d'un complexe MTP actif à ces stades embryonnaires. Le syncytium vitellin d'embryons de poissons zèbre synthétise des lipoprotéines (Babin, données non publiées) et exprime de façon très intense les gènes *apoE* et *apoA-I* (Babin *et al.*, 1997). Toutefois, l'expression de ces deux gènes est maintenue dans le syncytium vitellin jusqu'à l'épuisement total des réserves vitellines, i.e. jusqu'à la fin de la période de nutrition mixte des larves (Babin *et al.*, 1997). Ce profil d'expression est donc différent de celui observé pour les gènes

apoB α et *apoB β* et pourrait être la conséquence de l'épuisement rapide des réserves vitellines en lipides neutres dans le sac vitellin du poisson zèbre. En effet, il n'existe pas de globules lipidiques dans le vitellus du poisson zèbre (Selman *et al.*, 1983) par opposition à de nombreux poissons Téléostéens et en particulier aux espèces marines. De ce fait, la synthèse de lipoprotéines riches en triglycérides ne pourrait pas être maintenue dans le syncytium vitellin du poisson zèbre au-delà de l'éclosion. Pour les espèces contenant un ou plusieurs globule(s) lipidique(s) volumineux une synthèse très active de lipoprotéines de la taille des VLDL par le syncytium vitellin a pu être démontrée chez la truite (Vernier et Sire, 1977 ; Walzer et Schonenberger, 1979a ; Walzer et Schonenberger, 1979b) le bar et la daurade (Mani-Ponset *et al.*, 1996) ainsi que chez le turbot (Poupard *et al.*, 2000). Dans ce dernier cas, cette synthèse est corrélée à l'expression d'un gène *apoE* marqueur de la nutrition endogène (Poupard *et al.*, 2000).

En conclusion, le syncytium vitellin des poissons Téléostéens joue un rôle central dans la nutrition lipidique de l'embryon grâce à sa capacité à dégrader les réserves vitellines, à synthétiser des lipoprotéines et à les transférer dans la circulation embryonnaire. La composition lipidique et apolipoprotéique de ces particules, révélée indirectement par leur taille et par la nature des gènes d'apolipoprotéines exprimés, pourrait être modulée par la composition lipidique des globules vitellins préalablement formés dans le cytoplasme de l'ovocyte au cours de la vitellogenèse. L'étude de l'expression des gènes *mtp* et *apoB*, l'immunolocalisation des protéines correspondantes et la mesure de l'activité de transfert des triglycérides au cours du développement, en particulier chez un poisson téléostéen dont l'œuf contiendrait des globules lipidiques permettrait de tester cette hypothèse. Les structures extra-embryonnaires mises en place au cours du développement des vertébrés permettent le transfert des lipides d'origine maternelle grâce à leur capacité à assembler et à sécréter des lipoprotéines.

C. Expression au niveau de l'intestin et du foie au cours du développement.

Chez tous les vertébrés, le foie et l'intestin sont mis en place à partir de diverticules issus du feuillet endodermique primitif. Ces deux organes jouent un rôle central respectivement dans les voies de transport endogène et exogène des lipides et sont de ce fait des sites majeurs de biosynthèse des lipoprotéines et donc de l'expression des gènes indispensables à cette activité. Les données peu nombreuses disponibles chez les mammifères

indiquent que ces deux organes expriment le gène *mtp* avant la naissance (Shelton *et al.*, 2000 ; Levy *et al.*, 2001 ; Lu *et al.*, 2002). Chez la souris, l'expression du gène *mtp* dans le foie embryonnaire est détectée dès 9,5 jours de développement. L'expression de ce gène dans l'intestin est ultérieure à celle du foie et commence à être visible vers 12,5 jours de gestation (Shelton *et al.*, 2000). Une augmentation de l'activité de transfert de la MTP dans l'intestin fœtal est observée entre les semaines 15 à 16 et les semaines 19 à 22 de gestation (Shelton *et al.*, 2000). De façon concomitante, le gène *apoB* s'exprime dans le foie et l'intestin embryonnaire des mammifères (Demmer *et al.*, 1986 ; Glickman *et al.*, 1986 ; Terasawa *et al.*, 1999). Chez l'homme, l'intestin foetal synthétise à la fois de l'apoB-100 et de l'apoB-48 (Glickman *et al.*, 1986), puis la synthèse de l'apoB-100 disparaît progressivement et seule l'apoB-48 est traduite par l'intestin adulte (Glickman *et al.*, 1986). En effet, l'expression du gène codant pour l'APOBEC-1, sous-unité catalytique du complexe permettant la production de l'apoB48 est régulée au cours du développement (Giannoni *et al.*, 1995). Une variation de la quantité du transcrit *apoB* dans l'intestin embryonnaire a également été observée chez le rat avec un maximum obtenu en fin de gestation (Demmer *et al.*, 1986). Une synthèse de lipoprotéines par l'intestin est démontrée au cours du développement fœtal chez l'Homme (Levy et Menard, 2000).

De façon similaire à la situation observée pour les mammifères, les gènes *mtp* et *apoBβ1* s'expriment massivement dans l'intestin antérieur et dans le foie de l'embryon et de la larve de poisson zèbre. Le signal d'hybridation obtenu pour le gène *apoBα* est quant à lui toujours restreint au foie embryonnaire et larvaire après l'extinction du marquage dans le syncytium vitellin. Ces données suggèrent une synthèse active de lipoprotéines, à partir des lipides endogènes, par ces tissus embryonnaires et larvaires avant même la première prise de nourriture. Les entérocytes de certains poissons Téléostéens comme la truite ou le bar synthétisent des lipoprotéines de type VLDL d'un diamètre moyen de 40 nm avant l'ouverture de la bouche (Vernier et Sire, 1977 ; Deplano *et al.*, 1991). Chez le poisson zèbre, le tube endodermique primitif droit et uniforme (Warga et Nüsslein-Volhard, 1999) subit, vers trois jours de développement, une courbure de sa partie moyenne vers la gauche et une régionalisation fonctionnelle céphalo-caudale concomitante (André *et al.*, 2000 ; Horne-Badovinac *et al.*, 2003). Cette régionalisation fonctionnelle est parfaitement illustrée par une expression restreinte à la partie antérieure de l'intestin du gène *fabp2* qui code pour la « fatty acid binding protein » intestinale (FABP-I) du poisson zèbre (André *et al.*, 2000 ; Her *et al.*,

2004a ; Sharma *et al.*, 2004). Conformément à cette régionalisation, les gènes *mtp* et *apoBβ1* du poisson zèbre s'expriment exclusivement dans la partie antérieure de l'intestin larvaire.

D. Expression tissulaire chez l'adulte.

L'expression tissulaire chez le poisson zèbre adulte a été étudiée par RT-PCR pour les gènes *mtp*, *apoBα*, *apoBβ1* et *apoBβ2*, par RT-PCRq pour les gènes *mtp* et *apoBβ1* et par hybridation *in situ* sur coupes pour les gènes *mtp*, *apoBα* et *apoBβ1*.

Chez le poisson zèbre adulte, une forte expression du gène *mtp* est observée dans l'intestin antérieur. La quantité des transcrits correspondant y est significativement plus élevée que dans les autres organes. Le niveau d'expression du gène *mtp* dans l'intestin antérieur est 3,3 fois plus élevé que dans l'intestin postérieur, 3,2 plus élevé que dans le foie et plus de 30 fois celui déterminé pour les autres tissus. Le transcrit *mtp* serait présent en très faible quantité dans le cerveau, le rein et le testicule et quasi indétectable dans le cœur. Chez les mammifères, des transcrits *mtp* sont détectés dans l'intestin grêle, le foie, le testicule, l'ovaire, le rein et le cœur (Shoulders *et al.*, 1993 ; Nielsen *et al.*, 1998). Le profil d'expression du gène *mtp* chez le poisson zèbre adulte est donc similaire à celui de son homologue mammalien, à l'exception d'une absence d'expression dans l'ovaire et à une très faible quantité de transcrits dans le cœur.

Chez le poisson zèbre adulte, les gènes *apoBα*, *apoBβ1* et *apoBβ2* possèdent chacun un profil d'expression tissulaire distinct. Le gène *apoBα* est très fortement exprimé dans le foie. L'expression dans les autres organes analysés est beaucoup plus faible bien que le niveau d'expression semble plus élevé dans le testicule que dans l'intestin antérieur, l'intestin postérieur ou le cerveau. Le profil d'expression du gène *apoBα* chez le poisson zèbre adulte rappelle celui du transcrit codant pour l'apoB-100 des mammifères (Demmer *et al.*, 1986 ; Kirchgessner *et al.*, 1987 ; Shoulders *et al.*, 1993). La distribution tissulaire du transcrit *apoBβ1* est remarquablement similaire à celle du transcrit *mtp*. Le gène *apoBβ1* s'exprime très fortement dans l'intestin antérieur du poisson zèbre adulte. L'étiquette correspondant à la partie 3' de ce transcrit a été retrouvée dans la tête de liste du SAGE (« Serial Analysis of Gene Expression ») réalisé au laboratoire à partir de l'intestin antérieur du poisson zèbre (Knoll-Gellida *et al.*, données non publiées). Cette donnée confirme de façon indépendante le très fort niveau d'expression de ce gène dans l'intestin antérieur. De plus, la quantification du niveau d'expression du gène *apoBβ1* par RT-PCRq a montré que le rapport ($apoBβ1 / eflα$) x 100 dans l'intestin antérieur est de 157,9 contre une valeur de 21 pour le rapport

$(mtp / efl\alpha) \times 100$. Le gène *apoBβ1* s'exprime donc très fortement dans l'intestin antérieur de poisson zèbre adulte. Une expression du gène *apoBβ1* est également identifiée dans le foie et l'intestin postérieur avec une quantité de transcrits respectivement 5,4 fois et 4,7 fois moins abondante que celle obtenue dans l'intestin antérieur. Des transcrits *apoBβ1* ont été détectés dans le cœur, le cerveau, le rein et le testicule. Leur quantité serait au minimum 36 fois plus faible que celle détectée dans l'intestin antérieur. Le gène *apoBβ2*, quant à lui, est exclusivement et modérément exprimé dans le foie du poisson zèbre adulte.

Chez les mammifères, le gène *apoB* s'exprime dans l'intestin grêle, le foie ainsi que dans le cœur (Demmer *et al.*, 1986 ; Shoulders *et al.*, 1993 ; Nielsen *et al.*, 1998 ; Borén *et al.*, 1998). Le niveau d'expression de ce gène est plus élevé dans l'intestin grêle que dans le foie. Chez le poulet, une expression du gène *apoB* est identifiée dans le petit intestin, le foie et le rein (Kirchgessner *et al.*, 1987 ; Tarugi *et al.*, 1998).

La comparaison des sites d'expression de ces gènes entre le poisson zèbre et les tétrapodes amène plusieurs commentaires. Les sites d'expression privilégiés, le foie et l'intestin, sont ceux pour lesquels la synthèse de lipoprotéines, en particulier légères, est la plus active aussi bien chez les poissons que chez les mammifères (Sire *et al.*, 1981 ; Rogie et Skinner, 1985 ; Babin et Vernier, 1989 ; Yu *et al.*, 1991 ; Wallaert et Babin, 1992). L'expression dans l'intestin de poisson zèbre est fortement régionalisée en continuité avec ce qui a été observé chez la larve. Aucun signal n'est détecté dans le pharynx ou l'intestin postérieur et ceci quel que soit l'état nutritionnel de l'animal. Chez l'adulte, la quantité de transcrits *mtp* et *apoBβ1* est respectivement 3,3 et 4,7 fois plus élevée dans l'intestin antérieur par rapport au postérieur. Un gradient du niveau d'expression de ces deux gènes est donc présent le long du tractus digestif du poisson zèbre, aussi bien chez la larve que chez l'adulte. L'expression des gènes *mtp* et *apoBβ1* essentiellement identifiée dans la partie antérieure de l'intestin confirme que l'intestin est fonctionnellement et morphologiquement régionalisé et que cette partie de l'intestin est dédiée à l'absorption des lipides ainsi qu'à la synthèse de lipoprotéines (Sire *et al.*, 1981 ; Honkanen *et al.*, 1985). De façon similaire, la partie la plus proximale de l'intestin des mammifères est le site majeur d'absorption des lipides et de sécrétion des lipoprotéines riches en triglycérides (Borgstrom *et al.*, 1957 ; Jersild et Clayton, 1971). Un gradient d'expression proximo-distal du gène *mttp* a été observé chez le hamster (Lin *et al.*, 1994), le porc (Lu *et al.*, 2002) et l'Homme (Levy *et al.*, 2001) avec une forte expression dans le duodénum et le jéjunum et une expression plus faible dans le colon.

Les gènes *mtp*, *apoB α* , et *apoB β* possèdent des sites d'expression chez le poisson zèbre adulte distincts de ceux de leurs homologues mammaliens. Chez le poisson zèbre adulte, des transcrits correspondant à ces trois gènes sont localisés dans le testicule. Chez les mammifères, seuls des transcrits du gène *mtp* ont été détectés dans ce tissu alors qu'aucun transcrit *apoB* n'y a été décelé. Le testicule de poisson zèbre pourrait donc être capable de synthétiser et sécréter des lipoprotéines riches en triglycérides ou bien ce type d'apolipoprotéine pourrait y jouer un rôle biologique distinct de celui qui leur est classiquement attribué dans le métabolisme des lipoprotéines. Aucun des transcrits étudiés dans le cadre de ce travail ne semble être présent dans l'ovaire de poisson zèbre alors que chez l'Homme, une expression du gène *mtp* a été identifiée dans ce tissu (Shoulders *et al.*, 1993). Une expression limitée des gènes *mtp* et *apoB β* semble détectable dans le cœur de poisson zèbre alors que chez les mammifères, le cœur est un site d'expression des gènes *mtp* et *apoB* et de synthèse de lipoprotéines (Nielsen *et al.*, 1998 ; Borén *et al.*, 1998).

III. Evaluation de l'effet de la prise de nourriture sur la quantité des transcrits *mtp* et *apoB* chez la larve ainsi que dans l'intestin et le foie de l'adulte du poisson zèbre. Comparaison avec les données existant chez les mammifères.

Chez les mammifères, le taux de transcrits *mtp* ne semble pas être significativement modifié après la prise alimentaire dans le foie et dans l'intestin grêle (Lin *et al.*, 1994). Toutefois, une modulation de l'expression de ce gène a été détectée après l'ingestion de régimes alimentaires dont la composition lipidique a été modifiée (Lin *et al.*, 1994 ; Bennett *et al.*, 1995 ; Lu *et al.*, 2002). Par ailleurs, certains aliments, comme l'ail, augmentent le niveau d'expression du gène *mtp* (Lin *et al.*, 2002). Les dérivés oxygénés du cholestérol (Ringseis et Eder, 2004) ou les flavonoïdes citriques quant à eux diminuent le taux de transcription du gène *mtp* (Wilcox *et al.*, 2001). Très récemment, il a été montré que l'expression du gène codant pour la grande sous-unité de la MTP de souris est régulée par le facteur PPAR α *in vitro* dans les hépatocytes mais pas dans les entérocytes (Améen *et al.*, 2004). Des travaux précédents avaient suggéré une régulation différentielle de l'expression du gène *mtp* entre les deux tissus (Lin *et al.*, 1994 ; Phillips *et al.*, 2002).

La régulation de l'*apoB* n'aurait pas lieu à un niveau transcriptionnel chez les mammifères mais plutôt à un niveau post-transcriptionnel et traductionnel (Yao et McLeod,

1994). Dans certains cas cependant, une régulation de l'expression du gène *apoB* est observée (Selby et Yao, 1995). Ainsi, dans des cellules HepG2, la quantité d'ARNm *apoB* est diminuée par un régime riche en acides aminés (Zhang *et al.*, 1993) alors qu'elle est augmentée par une plus grande administration de 25-hydroxycholesterol (Dashti, 1992). Cette variation de l'expression du gène *apoB* pourrait impliquer des cytokines, comme le « transforming growth factor » β (TGF- β) (Singh *et al.*, 2002), le « peroxisome proliferator-activated receptor » α (PPAR α) (Lindén *et al.*, 2002) ou encore le facteur de transcription ARP-1/COUP-TFII (Kang *et al.*, 2003).

L'effet de la prise alimentaire sur l'expression des gènes *mtp*, *apoB α* et *apoB β* de poisson zèbre a été suivi dans un premier temps par hybridation *in situ in toto* en comparant le signal d'hybridation obtenu sur des larves de poisson zèbre nourries et non nourries. Pour le gène *mtp*, la quantification de cette variation a été effectuée par RT-PCRq. Le signal d'hybridation obtenu pour les gènes *mtp* et *apoB β* est augmenté dans l'intestin antérieur ainsi que dans le foie après la prise alimentaire. La variation de la quantité du transcrit *mtp* en fonction de l'état nutritionnel de la larve a été évaluée en utilisant les gènes *efl α* et *β -actine* comme gènes de référence. Lorsque le gène *efl α* est utilisé comme standard, une augmentation significative de la quantité de transcrits *mtp* est observée entre les états nourri et non nourri dans les larves entières de 5 jpf et de 8 jpf. La variation mesurée pour les larves de 15 jpf n'est toutefois pas significative. Chez l'adulte, la quantité de transcrits *mtp* dans l'intestin antérieur est augmentée d'un facteur 2 environ, lorsque les animaux ont été préalablement nourris. L'effet de la prise alimentaire sur le niveau d'expression du gène *mtp* n'est cependant pas retrouvé lorsque le gène *β -actine* est utilisé comme référence. Ceci signifie que l'un des deux gènes utilisés comme standard est lui-même régulé par la prise alimentaire. La régulation pré-traductionnelle de l'expression du gène *mtp* par la prise de nourriture est conforme aux résultats obtenus par hybridation *in situ in toto*. La différence entre l'augmentation de l'intensité du signal d'hybridation dans les larves nourries par rapport aux valeurs obtenues par RT-PCRq peut s'expliquer par le fait que les transcrits sont amplifiés par RT-PCRq sur des ARN totaux extraits de larves entières. L'augmentation de l'expression du gène *mtp* dans la larve entière pourrait être trop faible et les transcrits *mtp* trop dilués pour que cette différence soit détectée de façon significative par RT-PCRq. De plus, cette technique nécessite l'extraction des ARNm sur un grand nombre de larves qui ont pu ingérer des quantités de nourriture non équivalentes. Les échantillons peuvent donc être très hétérogènes expliquant la taille des écart-types obtenus lors de la quantification des transcrits

mtp chez les animaux nourris. Les résultats obtenus chez le poisson zèbre par hybridation *in situ in toto* semblent indiquer une augmentation modérée de la quantité de transcrits *apoBβ1* au niveau de l'intestin antérieur, après la prise alimentaire. Ce résultat n'a pas encore été validé par RT-PCRq.

En conclusion, ces travaux indiquent l'existence d'une régulation pré-traductionnelle de l'expression du gène *mtp* par la prise de nourriture dans l'intestin antérieur du poisson zèbre. Il existe donc une différence entre le poisson zèbre et les rongeurs dans la régulation par la prise de nourriture de la quantité de transcrit codant pour la grande sous-unité de la MTP dans les entérocytes. Des travaux complémentaires doivent être menés aussi bien chez d'autres poissons Téléostéens que chez d'autres mammifères afin de déterminer si cette différence peut-être étendue à l'ensemble des espèces de ces deux groupes de vertébrés. L'étude de l'impact de la composition lipidique des aliments sur l'expression larvaire du gène *mtp* de poisson zèbre a été initiée par des expériences d'hybridation *in situ in toto*. Les premiers résultats suggèrent une variation de l'expression de ce gène en fonction des régimes administrés (données non montrées).

IV. De l'accumulation des gouttelettes lipidiques aux différences qui pourraient exister dans la voie de transport exogène des lipides entre les poissons Téléostéens et les mammifères.

L'ensemble des résultats obtenus, à la fois au niveau de la caractérisation moléculaire de gènes importants du métabolisme lipidique entérocytaire du poisson zèbre et sur la régulation de leur expression, permet de discuter des similarités et des différences qui peuvent exister entre les entérocytes de poissons Téléostéens et de mammifères concernant leur capacité à synthétiser des lipoprotéines au cours de l'absorption des lipides d'origine alimentaire.

A. Hypothèses quant à l'accumulation des gouttelettes lipidiques cytosoliques dans les entérocytes des poissons.

Chez les mammifères, des gouttelettes lipidiques peuvent être présentes dans le cytoplasme des entérocytes de façon physiologique. Le nombre et la taille de ces gouttelettes peuvent être augmentés en période post-prandiale, lorsque la concentration en triglycérides alimentaires est très importante (Sabesin et Frase, 1977 ; Mahmood *et al.*, 2003). Une

accumulation de gouttelettes lipidiques cytosoliques est également observée dans des cas pathologiques, chez des patients atteints d'abétalipoprotéïnémie (Bouma *et al.*, 1990).

Dès la première prise de nourriture, des gouttelettes lipidiques de plusieurs micromètres de diamètre se forment dans le cytoplasme des entérocytes en position supranucléaire et de nombreuses lipoprotéines de grande taille sont présentes dans le reticulum endoplasmique et les saccules golgiens des entérocytes de l'intestin antérieur chez de nombreuses espèces de poissons Téléostéens (Iwai, 1969 ; Bergot et Fléchon, 1970 ; Gauthier et Landis, 1972 ; Noaillac-Depeyre et Gas, 1973 ; Noaillac-Depeyre et Gas, 1976 ; Sire *et al.*, 1981 ; Rombout *et al.*, 1984 ; Vetter *et al.*, 1985 ; Diaz *et al.*, 1997 ; André *et al.*, 2000 ; Marza *et al.*, 2005). Cette formation semble être un phénomène obligatoire et transitoire. Ces particules étalées semblent toujours présentes au cours du pic d'absorption alimentaire de ces animaux, bien qu'aucune cinétique précise de l'apparition et de la disparition de ces gouttelettes n'ait jamais été réalisée. Cependant, cette présence intense de gouttelettes lipidiques dans les entérocytes n'est pas associée à une pathologie de l'épithélium intestinal puisque les microvillosités sont intactes et qu'aucun signe de nécrose ou de dégénération cellulaire n'est visible (Caballero *et al.*, 2004). L'abondance de ces gouttelettes semble dépendre de la composition lipidique des aliments puisqu'elle paraît d'autant plus importante que l'alimentation est riche en acides gras polyinsaturés (Sire *et al.*, 1981 ; Deplano *et al.*, 1991). Caballero et ses collaborateurs ont également montré que l'accumulation des gouttelettes lipidiques dans les entérocytes de daurade est plus forte lorsque les huiles de poissons sont substituées par des huiles végétales. L'utilisation d'huile de pépin de raisin, riche en acide oléique (C18:1 (n-9)), est associée à une forte présence de gouttelettes lipidiques localisées en partie supra-nucléaire (Caballero *et al.*, 2004). Ceci est très proche du phénotype que nous observons dans les entérocytes de larves nourries avec du jaune d'œuf de poule. Or cet aliment est très riche en acide oléique. Une formation de gouttelettes lipidiques a également été observée chez le poisson zèbre adulte deux heures et demi après la prise de paillettes Tétramin dont la composition en terme d'acides gras n'a pas été déterminée. L'accumulation des gouttelettes lipidiques observées pourrait donc également provenir d'une alimentation des larves et des adultes de poisson zèbre mal adaptée à leurs besoins nutritionnels. Comme chez les mammifères, le rôle de ces gouttelettes pourrait être relatif au stockage des lipides neutres formés dans la cellule du fait d'une plus faible capacité, dans des conditions alimentaires standards, à assembler et/ou à sécréter des lipoprotéines riches en triglycérides en comparaison avec celle de l'entrée et de l'estérification des acides gras dans les cellules. Chez les oiseaux, une accumulation de gouttelettes lipidiques dans les

hépatocytes est observée lorsque la capacité de lipogenèse du foie est supérieure à celle de synthèse et de sécrétion des lipoprotéines (Hansen et Walzem, 1993 ; Hermier *et al.*, 1994 ; Hermier, 1997 ; Hermier *et al.*, 1999). Des gouttelettes lipidiques sont également visibles en grande quantité dans les hépatocytes d'un rongeur (*Suncus murinus*) au cours du jeûne étant donné la très faible capacité de synthèse de l'apoB (Liang *et al.*, 1998) ainsi que dans les entérocytes de souris dont le gène qui code pour l'enzyme acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase 1 a été inactivé (Buhman *et al.*, 2002).

La présence des gouttelettes lipidiques de plusieurs micromètres de diamètres dans les entérocytes de poissons zèbre, à la fois chez la larve et chez l'adulte, ne peut pas être due à une absence des acteurs moléculaires indispensables à l'assemblage des lipoprotéines riches en triglycérides. En effet, nous avons pu démontrer que les gènes *mtp* et *apoBβ1* de poissons zèbre sont tous les deux fortement exprimés dans les entérocytes de l'intestin antérieur et dans une moindre mesure le gène *apoBα*. Ceci indique que les entérocytes du poisson zèbre sont en mesure d'assembler des lipoprotéines contenant de l'apoB de façon comparable aux entérocytes des mammifères. Les domaines fonctionnels et structuraux de la grande sous-unité de la MTP humaine sont conservés dans la protéine homologue de poisson zèbre. Les parties N-terminales des trois apoB de poisson zèbre et des apoB humaines sont bien conservées et en particulier les régions qui permettraient la liaison à la grande sous-unité de la MTP ainsi que l'agencement de la cavité pyramidale supposée lier les lipides. De plus, des lipoprotéines de grande taille ont été observées dans le reticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et les espaces intercellulaires d'entérocytes de la larve de poisson zèbre (André *et al.*, 2000).

Nos travaux indiquent qu'il existe une régulation pré-translationnelle du gène *mtp* après la prise de nourriture chez le poisson zèbre. Cette augmentation de la quantité de transcrite au cours de l'absorption des lipides a été observée dans l'intestin antérieur de la larve et de l'adulte. Comme indiqué précédemment, une modulation de l'expression du gène *mtp* n'a pu être détectée chez les mammifères que dans le cas de l'ingestion de régimes alimentaires dont la composition lipidique a été modifiée. Cette variation de la quantité de transcrite *mtp* dans l'entérocyte de poisson zèbre pourrait s'accompagner d'une variation concomitante de l'activité de transfert de type MTP des lipides d'origine alimentaire au cours du pic d'absorption. L'activité spécifique de transfert des triglycérides et des esters de cholestérol mesurée à partir de fractions microsomales d'intestin antérieur de poissons zèbre nourris est d'environ le quart de celle obtenue dans les mêmes conditions de dosage avec une fraction d'intestin grêle de souris. L'activité spécifique de transfert des esters de cholestérol

est quant à elle similaire pour les deux espèces. Ceci suggère que l'activité totale de transfert des triglycérides pourrait être l'un des facteurs limitants de l'assemblage de ces lipides sous forme de lipoprotéines dans l'entérocyte du poisson zèbre. L'entrée des acides gras d'origine alimentaire dans les entérocytes de poisson zèbre serait ainsi fortement découplée de leur transfert sous forme estérifiée sur l'apoB β 1 en cours de traduction. Etant donné que l'intestin antérieur du poisson zèbre présente tout de même une activité de transfert des triglycérides, les acides gras d'origine alimentaire peuvent être assemblés dans les lipoprotéines, expliquant ainsi l'accumulation transitoire des gouttelettes lipidiques. Les gouttelettes lipidiques observées dans les entérocytes de poisson pourraient être le résultat d'une régulation limitante de l'assemblage ou de la sécrétion des lipoprotéines par rapport à la capacité de stockage en lipides neutres dans les entérocytes.

B. Existe-t-il des différences dans la voie de transport exogène des lipides entre les poissons Téléostéens et les mammifères ?

Chez les mammifères, les chylomicrons déversés dans le système lymphatique rejoignent ensuite le système sanguin où ils sont dégradés par la lipoprotéine lipase en chylomicrons résiduels et en acides gras qui sont absorbés par les tissus. L'endocytose hépatique du chylomicron résiduel médiée par un récepteur est possible après captation de l'apoE dans l'espace plasmatique.

Chez le poulet, les chylomicrons synthétisés au cours du pic d'absorption alimentaire contiennent de l'apoB-100, sont dépourvus d'apoE et sont directement déversés dans le système porte-hépatique (Tarugi *et al.*, 1990 ; Teng et Davidson, 1992).

Le transport des lipides d'origine alimentaire dans l'espace plasmatique s'effectue chez les poissons Téléostéens comme chez les mammifères sous forme de lipoprotéines riches en triglycérides (Babin et Vernier, 1989 ; Wallaert et Babin, 1992 ; Wallaert et Babin, 1994). Un passage trans-épithélial direct d'acides gras à chaîne courte et moyenne a également été détecté au cours de l'absorption précoce (Sire *et al.*, 1981). Les données obtenues en microscopie électronique indiquent un déversement des chylomicrons soit exclusivement dans le système lymphatique chez la truite (Sire *et al.*, 1981) soit dans le système sanguin ainsi que dans le système lymphatique des villosités intestinales chez la carpe (Noaillac-Depeyre et Gas, 1973 ; Noaillac-Depeyre et Gas, 1976). Ces lipoprotéines subiraient alors l'action de la lipoprotéine lipase à l'aide de son cofacteur activateur l'apoC-II, ces deux protéines étant également présentes chez les poissons Téléostéens (Arnault *et al.*, 1996 ; Shen *et al.*, 2000 ;

Lindberg et Olivecrona, 2002 ; Oku *et al.*, 2002). La présence de l'apoB β 1 et/ou de l'apoB α dans les lipoprotéines synthétisées par les entérocytes, révélée par l'expression de ces deux gènes, pose toutefois la question de la conséquence métabolique de la présence de ces apolipoprotéines dans ces lipoprotéines. En effet, ces deux apoB possèderaient dans leur partie C-terminale un domaine qui pourrait se lier au récepteur aux LDL. Si tel était le cas, le largage de ces lipoprotéines dans le système sanguin aurait pour conséquence leur captation rapide par les tissus possédant ce type de récepteur membranaire sans l'obligation d'attendre la dégradation en chylomicrons résiduels comme c'est le cas pour les lipoprotéines à apoB-48 des mammifères. Cette captation ne serait possible que dans la mesure où le domaine de liaison au récepteur est exposé à la surface de la lipoprotéine. Cette adaptation physiologique pourrait permettre de compenser le flux plus lent de sécrétion des lipoprotéines des entérocytes en particulier à basse température. En effet les mesures de la variation de la lipoprotéinémie post-prandiale réalisées chez la truite indiquent que le pic d'absorption alimentaire, dont la cinétique dépend de la température d'élevage des animaux, peut apparaître après plus de vingt quatre heures après la prise de nourriture chez cette espèce (Wallaert et Babin, 1992 ; Wallaert et Babin, 1994a ; Wallaert et Babin, 1994b).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Nous nous sommes intéressés aux processus moléculaires d'assemblage des lipoprotéines riches en triglycérides chez les poissons et plus particulièrement chez le poisson zèbre. Nous avons choisi ce modèle d'étude du fait de la possible conservation de ces processus chez tous les poissons Téléostéens mais aussi de part les avantages que ce modèle expérimental procure (e.g. temps de génération court, transparence des embryons et des larves, génome partiellement séquencé, nombre d'EST disponibles très grand, possibilité de mutagenèse et d'inactivation transitoire de leur expression). Avant le début de ces travaux, très peu de données étaient disponibles quant aux mécanismes moléculaires de l'assemblage des lipoprotéines riches en triglycérides chez les poissons. En revanche, nous savions que chez les mammifères, les lipoprotéines riches en triglycérides sont composées majoritairement d'apoB et que les triglycérides, les esters de cholestérol et les phospholipides sont transférés sur cette protéine par la MTP.

Nous avons voulu savoir si des gènes codant pour la grande sous-unité de la MTP et pour l'apoB sont exprimés dans les entérocytes du poisson zèbre, déterminer l'influence de la prise alimentaire et de la composition lipidique de l'aliment sur le niveau d'expression de ces gènes et tenter d'établir une corrélation avec la présence des gouttelettes lipidiques intracellulaires.

Ainsi, nous avons :

- **identifié et séquencé, pour la première fois chez les poissons, les transcrits codant pour la grande sous-unité de la MTP et pour la PDI.** La grande sous-unité de la MTP de poisson zèbre possède environ 54% d'identité et 66% de similarités avec la protéine humaine. La séquence protéique déduite du transcrit codant pour la PDI présente pour sa part 75% d'identité avec la PDI humaine. C'est la première fois que des données concernant ces protéines ont été obtenues chez les poissons.

- **identifié et séquencé, pour la première fois chez les poissons, les transcrits codant pour trois formes d'apoB différentes.** Précédemment, des études biochimiques avaient révélé l'existence de deux apoB de masses moléculaires distinctes (Babin et Vernier, 1989). Grâce à notre travail, nous avons montré que ces trois transcrits sont issus de trois gènes différents (*apoB α* , *apoB β 1* et *apoB β 2*) dont l'un, le gène *apoB α* , pourrait être l'orthologue du gène *apoB* humain.

- **montré l'existence d'une forme d'apoB dite « beta » chez plusieurs poissons Téléostéens.** Cette forme apoB β qui présente une troncature dans le domaine de liaison au récepteur aux LDL n'a pas été trouvée chez les mammifères, le poulet ou le *Xénope*. Elle serait donc spécifique des poissons Téléostéens puisque des transcrits codant pour une apoB β ont été identifiés chez le saumon (*Salmo salar*), la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), le *Fugu* (*Takifugu rubripes*) et le tétraodon (*Tetraodon nigroviridis*).

- **localisé les sites d'expression des gènes *mtp*, *apoB α* et *apoB β* chez l'embryon, la larve et l'adulte de poisson zèbre ainsi que ceux du gène *apoB β* chez le poisson zèbre adulte.** Le gène *mtp* s'exprime dans le syncytium vitellin des embryons jusqu'à leur éclosion puis dans le foie et l'intestin antérieur des larves. Les gènes *apoB α* et *apoB β* s'expriment différemment tant d'un point de vue spatial que temporel. Ainsi, des transcrits du gène *apoB α* sont visibles avant 3 hpf, dans les blastomères, puis dans le syncytium vitellin et le corps des embryons et enfin uniquement dans le foie des larves de plus de 4 jpf. Le gène *apoB β* s'exprime plus tardivement, à partir de 8 hpf, uniquement dans le syncytium vitellin puis dans le foie et l'intestin antérieur des larves de plus de 4 jpf. Chez l'adulte, les gènes *mtp* et *apoB β* ont un profil d'expression similaire. Ils sont tous deux majoritairement exprimés dans l'intestin antérieur puis de façon moins abondante dans le foie et l'intestin postérieur. Une faible expression de ces gènes est observée dans le cerveau, les reins, le testicule et le cœur. Le gène *apoB α* est très fortement exprimé dans le foie puis dans une moindre mesure dans le testicule. Il est très faiblement exprimé dans l'intestin antérieur, l'intestin postérieur, le cerveau et les reins. Le gène *apoB β* est uniquement exprimé dans le foie chez le poisson zèbre adulte.

- **démontré une augmentation de l'expression du gène *mtp* au cours de la gastrulation et une diminution de ce niveau d'expression au cours de la somitogénèse.**

- **observé une augmentation du signal d'hybridation de l'expression des gènes *mtp* et *apoB β* dans l'intestin antérieur et dans une moindre mesure dans le foie de larves nourries en comparaison avec des larves non nourries.**

- **observé que l'activité de transfert des triglycérides présente dans les fractions microsomales d'intestin antérieur et de foie de poisson zèbre est plus faible que celle mesurée dans le duodénum et le foie de souris.**

Les travaux qui peuvent être réalisés en continuité de ce travail sont nombreux :

1. Les fonctions respectives des différentes apoB de poisson zèbre devront être déterminées. En effet, l'apoB α , l'apoB β 1 et l'apoB β 2 devraient être assemblées sous la forme de lipoprotéines. Elles contiennent toutes les trois en partie N-terminale un domaine homologue à lipovitelline de lamproie et pourraient donc lier les lipides. L'analyse fine du profil électrophorétique des apolipoprotéines plasmatiques de poisson zèbre permettrait de savoir si ces trois formes d'apoB sont sécrétées et sous quelle forme de lipoprotéines elles sont assemblées. Des anticorps spécifiques pour l'une ou l'autre de ces apoB de poisson zèbre pourraient être utilisés. L'étude de la capacité de l'apoB α , l'apoB β 1 et l'apoB β 2 à lier le récepteur aux LDL apporterait des informations précieuses quant au métabolisme des lipoprotéines chez le poisson zèbre et les autres poissons Téléostéens. L'apoB α possède un domaine de liaison au récepteur aux LDL similaire à celui de l'apoB-100 des mammifères. Elle pourrait donc lier le récepteur aux LDL avec une affinité semblable à celle de l'apoB-100 humaine. Les apoB β 1 et apoB β 2 présentent une troncature dans ce domaine. Elles pourraient donc soit ne pas lier le récepteur aux LDL et être ainsi des protéines fonctionnellement homologues à l'apoB-48 humaine, soit lier le récepteur avec des affinités plus faibles ou plus élevées que l'apoB α . Des expériences de liaison *in vitro* sur le récepteur aux LDL de ces protéines marquées seraient importantes à réaliser. De plus, la fonction spécifique de chacune de ces protéines pourrait être abordée par l'injection, dans les embryons, d'oligonucléotides morpholino ou d'ARN antisens dirigés spécifiquement contre chacun de ces transcrits d'apoB. L'étude du phénotype de ces embryons et larves tant au niveau de la morphologie générale, de celle du syncytium vitellin, du foie et de l'intestin qu'au niveau biochimique par le suivi du profil des lipoprotéines plasmatiques serait intéressante. Des expériences de « sauvetage » par l'injection de séquences codant pour le transcrit manquant pourraient également être réalisées. Ces expériences apporteraient des informations sur l'implication de ces gènes dans le métabolisme des lipoprotéines ainsi que dans le développement embryonnaire du poisson zèbre. De plus, comme pour certains mutants transgéniques « knock-out », l'action de ces molécules peut être déclenchée après un certain stade de développement évitant une mortalité précoce qui empêcherait d'observer les effets de l'absence d'expression de ces gènes sur des stades larvaires.

2. L'origine de la présence de l'apoB β chez les poissons Téléostéens devra être définie. L'apoB β est-elle apparue chez les poissons Téléostéens du fait d'une duplication

génique chez l'ancêtre de ces animaux ou était-elle présente chez l'ancêtre commun des vertébrés ? L'étude de la présence d'une apoB β chez la lamproie ou la myxine représentatif des vertébrés les plus anciens, ainsi que chez le coelacanthé ou le dipneuste, phylogénétiquement plus proches des ancêtres des vertébrés terrestres, permettrait de répondre à cette problématique. Nous avons réalisé le criblage d'une banque génomique de coelacanthé pour rechercher le ou les gènes *apoB* chez cet organisme. Les clones positifs identifiés (données non montrées) sont en cours d'analyse.

3. La mesure de l'activité de transfert des triglycérides et des esters de cholestérol *in vitro* par le produit de la traduction du transcrit *mtp* que nous avons isolé serait nécessaire afin de confirmer que ce transcrit code pour la grande sous-unité de la MTP. Pour cela, nous avons commencé la construction d'un plasmide d'expression contenant le transcrit *mtp* entier associé à une étiquette FLAG qui permettra à l'équipe du Dr Paul Rava à New York (USA) de faire ces mesures. En comparant l'activité ainsi obtenue avec celle de la grande sous-unité de la MTP humaine mesurée dans les mêmes conditions, nous saurons si la grande sous-unité de la MTP de poisson zèbre est moins active que celle de l'espèce humaine confirmant ou non les résultats obtenus sur les fractions microsomales. Des expériences de mutagenèse dirigée sur le transcrit *mtp* de poisson zèbre permettront de déterminer la responsabilité de la glycine 782 dans cette possible baisse d'activité. En effet, la mutation de la valine 782 de la grande sous-unité de la MTP humaine en alanine a été associée à une baisse de l'activité de transfert des triglycérides de plus de 70% par rapport à celle de la protéine sauvage (Read *et al.*, 2000).

4. La localisation de la grande sous-unité de la MTP à l'échelle cellulaire et tissulaire devra être réalisée. Nous avons dès à présent développé un anticorps contre deux peptides désignés à partir de la séquence en acide aminé déduite du transcrit *mtp* de poisson zèbre. Ceci permettra de localiser cette protéine par immunodétection par western blot et par immunofluorescence. Des expériences de co-immunoprécipitation permettraient également de savoir si la grande sous-unité de la MTP est associée à la PDI pouvant former un complexe MTP fonctionnel.

5. La cinétique de l'augmentation de la quantité de transcrit *mtp* dans l'intestin au cours du pic d'absorption alimentaire des lipides devra être définie. La modulation de cette expression devra être confirmée par utilisation d'autres standards et pour d'autres espèces. Des travaux sont actuellement en cours au laboratoire afin d'évaluer cette régulation dans l'intestin de la truite.

6. Des expérimentations doivent être engagées afin de comprendre les mécanismes de formation et d'accumulation des gouttelettes lipidiques cytosoliques dans les entérocytes des poissons. Aucune analyse cinétique de la formation de ces gouttelettes lipidiques n'a pour l'instant été effectuée au cours de l'absorption lipidique. La formation et la disparition de ces particules lipidiques cytosoliques pourraient être suivies sur coupes à cryostat et par microscopie électronique sur des fragments d'intestins antérieurs prélevés à différents temps après la prise alimentaire. L'accumulation transitoire de ces gouttelettes lipidiques dans les entérocytes de poisson pourrait être due à une faible activité de transfert des triglycérides de la grande sous-unité de la MTP dans les entérocytes de poisson provoquant ainsi un découplage entre l'entrée massive des acides gras après la prise de nourriture et leur sécrétion sous forme estérifiée après assemblage des lipoprotéines riches en triglycérides. Les triglycérides accumulés sous forme de gouttelettes lipidiques seraient ainsi lentement transférés et assemblés sous la forme de lipoprotéines. Ces particules lipidiques disparaîtraient progressivement au cours du pic d'absorption alimentaire, expliquant l'état transitoire de l'accumulation des gouttelettes. L'implication de la grande sous-unité de la MTP de poisson zèbre dans la formation des gouttelettes lipidiques cytosoliques pourrait être étudiée par des expériences de surexpression du gène *mtp*. Si l'hypothèse proposée est correcte, la surexpression du gène *mtp* devrait compenser la faible activité de la protéine et diminuer la quantité de gouttelettes lipidiques présentes dans le cytoplasme des entérocytes. De plus, l'effet de la composition lipidique de l'aliment sur la formation des gouttelettes lipidiques est un paramètre essentiel à étudier. Plusieurs critères provoqueraient ou atténueraient cette formation. En outre, le rapport de la quantité de phospholipides sur celle de triglycérides ainsi que la nature des acides gras polyinsaturés semblent influencer grandement la présence de ces gouttelettes lipidiques riches en lipides neutres. La modification maîtrisée de ces paramètres dans l'alimentation du poisson zèbre permettrait de déterminer les conditions de formation de ces gouttelettes, de les comparer chez la larve et chez l'adulte, de connaître ses besoins nutritionnels et d'élaborer un aliment mieux adapté si cela s'avère nécessaire. De plus, de nouveaux marqueurs moléculaires intervenant dans ce mécanisme pourraient être facilement identifiés chez ce poisson.

7. L'effet de la composition lipidique des aliments sur l'expression des gènes *apoB* et *mtp* du poisson zèbre devra être déterminé et corrélé aux performances zootechniques des animaux. Ceci pourrait permettre d'utiliser ces marqueurs et d'autres déjà disponibles au laboratoire pour optimiser sur des bases non empiriques la formulation lipidique des aliments synthétiques en particulier pour l'alimentation larvaire.

8. Le poisson zèbre pourrait être utilisé pour réaliser un criblage moléculaire de l'effet de molécules nouvelles sur l'assemblage et/ou la sécrétion des lipoprotéines permettant de mettre à jour des données inédites de ce métabolisme chez les mammifères. D'autre part, le poisson zèbre est un modèle de référence quant au développement des vertébrés. Il faciliterait l'étude des mécanismes moléculaires de mise en place du métabolisme des lipoprotéines au cours du développement et plus particulièrement ceux intervenant dans la transition entre la nutrition endogène et exogène.

L'ensemble de ces travaux sera facilité lorsque les données de génomique fonctionnelle à grande échelle actuellement réalisés au laboratoire seront complètement disponibles. Ces données permettront la découverte de nouveaux gènes impliqués dans le métabolisme lipidique et la définition de la régulation de leur expression en fonction des conditions nutritionnelles.

Texte issu du film « Le dictateur » (« The Great Dictator ») de Charlie Chaplin, 1940.

“ I’m sorry but I don't want to be an Emperor - that's not my business - I don't want to rule or conquer anyone. I should like to help everyone if possible, Jew, gentile, black man, white. We all want to help one another, human beings are like that.

We all want to live by each other's happiness, not by each other's misery. We don't want to hate and despise one another. In this world there is room for everyone and the earth is rich and can provide for everyone.

The way of life can be free and beautiful. But we have lost the way. Greed has poisoned men's souls - has barricaded the world with hate; has goose-stepped us into misery and bloodshed.

We have developed speed but we have shut ourselves in, machinery that gives abundance has left us in want. Our knowledge has made us cynical, our cleverness hard and unkind. We think too much and feel too little. More than machinery we need humanity. More than cleverness we need kindness and gentleness. Without these qualities, life will be violent and all will be lost.

The aeroplane and the radio have brought us closer together. The very nature of these inventions cries out for the goodness in men, cries out for universal brotherhood for the unity of us all. Even now my voice is reaching millions throughout the world, millions of despairing men, women and little children, victims of a system that makes men torture and imprison innocent people. To those who can hear me I say "Do not despair". The misery that is now upon us is but the passing of greed, the bitterness of men who fear the way of human progress: the hate of men will pass and dictators die and the power they took from the people, will return to the people and so long as men die [now] liberty will never perish...

Soldiers - don't give yourselves to brutes, men who despise you and enslave you - who regiment your lives, tell you what to do, what to think and what to feel, who drill you, diet you, treat you as cattle, as cannon fodder.

Don't give yourselves to these unnatural men, machine men, with machine minds and machine hearts. You are not machines. You are not cattle. You are men. You have the love of humanity in your hearts. You don't hate - only the unloved hate. Only the unloved and the unnatural. Soldiers - don't fight for slavery, fight for liberty. In the seventeenth chapter of Saint Luke it is written "the kingdom of God is within man " - not one man, nor a group of men - but in all men - in you, the people.

You the people have the power, the power to create machines, the power to create happiness. You the people have the power to make life free and beautiful, to make this life a wonderful adventure. Then in the name of democracy let's use that power - let us all unite. Let us fight for a new world, a decent world that will give men a chance to work, that will give you the future and old age and security. By the promise of these things, brutes have risen to power, but they lie. They do not fulfil their promise, they never will. Dictators free themselves but they enslave the people. Now let us fight to fulfil that promise. Let us fight to free the world, to do away with national barriers, do away with greed, with hate and intolerance. Let us fight for a world of reason, a world where science and progress will lead to all men's happiness.

Soldiers - in the name of democracy, let us all unite!»

Texte issu du film « Le dictateur » (« The Great Dictator ») de Charlie Chaplin, 1940.

« Je suis désolé, mais je ne veux pas être empereur, cela ne me concerne pas. Je ne veux ni commander ni conquérir personne. Je voudrais aider tout le monde dans la mesure du possible, juifs, chrétiens, païens, noirs et blancs. Nous voulons tous nous entraider, les êtres humains sont ainsi faits.

Nous voulons tous donner le bonheur à notre prochain, et pas le malheur. Nous ne voulons ni nous haïr ni nous humilier les uns les autres. Dans ce monde, il y a de la place pour chacun de nous et la Terre est bien assez riche pour nourrir tous les êtres humains.

La vie peut être libre et magnifique. Mais nous avons perdu le chemin. L'avidité a empoisonné l'âme des Hommes, a barricadé le monde dans la haine, nous a plongé dans l'horreur et les effusions de sang.

Nous avons inventé la vitesse mais nous nous sommes enfermés dedans. Les machines qui nous procurent l'abondance nous laissent insatisfaits. Notre connaissance nous a rendu cynique et notre intelligence durs et mauvais. Nous pensons trop et nous ne ressentons que trop peu. Plus que des machines, nous avons besoin d'Humanité. Plus que de l'intelligence, nous avons besoin de tendresse et de gentillesse. Sans ces qualités, la vie sera violente et tout sera détruit.

Les avions et la radio nous ont permis de nous rapprocher les uns des autres. Ces inventions ne trouveront leur vrai sens que dans la bonté de l'être humain, que dans la fraternité universelle, dans l'amitié et l'unité entre tous les hommes. En ce moment même, ma voix atteint des millions de gens à travers le monde, des millions d'Hommes désespérés, de femmes et d'enfants, victimes d'un système dans lequel des hommes torturent et emprisonnent des personnes innocentes. A ceux qui peuvent m'entendre je dis « Ne désespérez pas ». La misère qui s'abat sur nous n'est que le produit d'une éphémère avidité, de l'amertume des hommes qui ont peur des progrès accomplis. La haine des hommes disparaîtra et les dictateurs mourront et le pouvoir qu'ils avaient volé au peuple retournera au peuple. Tant que des hommes mourront pour elle, la liberté vivra.

Soldats, ne vous sacrifiez pas pour des brutes, des hommes qui vous humilient et vous mettent en esclavage, qui dirigent vos vies, vous disent quoi faire, quoi penser et que ressentir, qui vous enfoncent, vous amaigrissent, vous traitent comme du bétail, comme de la chair à canons.

Ne donnez pas vos vies à ces hommes inhumains, à ces machines à l'esprit mécanique et au cœur de pierre. Vous n'êtes pas des machines. Vous n'êtes pas du bétail. Vous êtes des Hommes. Vos cœurs ont l'amour de l'Humanité. Vous ne haïssez pas, sinon ce qui n'est pas humain ou n'est pas fait d'amour. Soldats, ne vous battez pas pour l'esclavage, battez vous pour la liberté. Il est écrit dans le chapitre dix-sept de l'Evangile selon Saint Luc que « Le Royaume de Dieu est dans l'être humain », pas dans un seul homme ni dans un groupe, mais dans tous les Hommes, en vous, le peuple.

Vous, le peuple, avez le pouvoir, le pouvoir de créer des machines, le pouvoir de créer le bonheur. Vous, le peuple, vous avez le pouvoir, le pouvoir de rendre la vie libre et belle, de faire de cette vie une merveilleuse aventure. Alors, au nom de la démocratie, utilisons ce pouvoir, unissons nous. Luttons pour un monde nouveau, un monde décent qui donnera à chaque être humain un travail, qui assurera votre futur, votre vieillesse et votre sécurité. Par leurs promesses, les brutes sont arrivées au pouvoir, mais ils mentent. Ils n'ont pas tenu leur promesse et ne le feront jamais. Les dictateurs s'affranchissent eux-mêmes mais ils emprisonnent le peuple. Maintenant, battons nous pour réaliser ces promesses. Battons nous pour libérer le monde, brisons les frontières et les barrières raciales, rasons l'avidité, la haine et l'intolérance de ce monde. Luttons pour un monde de raison, un monde où la science et le progrès conduiront au bonheur de tous les Hommes.

Soldats, au nom de la démocratie, unissons nous ! »

Annexe 1 : Solutions et tampons

- Solution d'acétate d'ammonium 5M, pH 7,5
38,5% d'acétate d'ammonium (385 g)
Eau qsp 1 L

- Solution de CaCl₂ 1M
27% de CaCl₂.6H₂O (54 g)
Eau qsp 200 ml

- EDTA 0,5 M, pH 8
16,8% EDTA (33,62 g)
2,1% NaOH (4,2 g)
Eau qsp 200 ml

- Solution Glucose 1M
18% de glucose (7,2g)
Eau qsp 40 ml

- Solution MgCl₂ 1M
20,3% de MgCl₂.6H₂O (20,3g)
Eau qsp 100 ml

- Solution MgSO₄ 1M
24,6% de MgSO₄.7H₂O (24,6g)
Eau qsp 100ml

- Solution NaCl 5M
29,22% de NaCl (116,88 g)
Eau qsp 400 ml

- Solution de NaOH 10N
40% de NaOH (24 g)
Eau qsp 60 ml

- Tampon PO₄ 0,1M, pH 7,3

77% 0.1 M NaH₂PO₄

23% 0.1 M Na₂HPO₄

- Tampon PBS 1x

0,8% de NaCl

0,02% de KCl

0,02 M de tampon PO₄, pH 7,3

- PAF 4%

8% de paraformaldéhyde sont ajoutés à de l'eau. Le mélange est chauffé et une goutte de NaOH 10N est ajoutée afin que le paraformaldéhyde soit entièrement dissout. Cette solution est conservée à -20°C. Un volume de cette solution est décongelé et un volume de PBS 2x est ajouté avant utilisation.

- Tampon SSC 20x, pH 7

3 M de NaCl (175 g)

0,3 M de citrate trisodium 2H₂O (88 g)

Eau qsp 1l

- Tampon Tris-HCl 1M, pH 7,4

121 g de Tris Base

70 ml HCl pour amener à pH 7,4

Eau qsp 1L

- Tampon Tris-HCl 1M, pH 8

121 g de Tris Base

42 ml de HCl pour amener à pH 8

Eau qsp 1L

Annexe 2 : Culture bactérienne

- Génotype et référence des souches bactériennes utilisées.

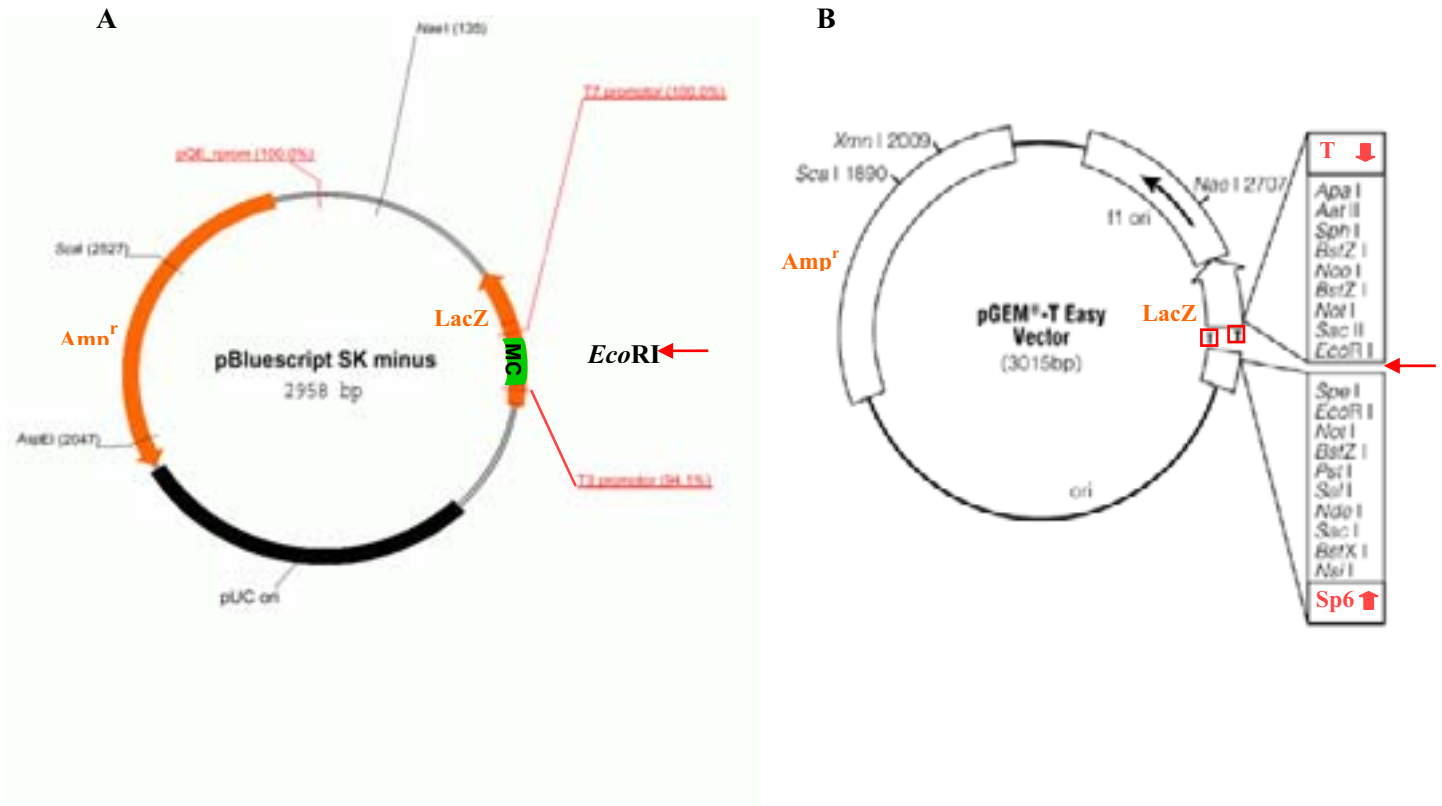
<i>Souche</i>	<i>Génotype</i>	<i>Référence</i>
XL1-Blue MRF'	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA gyrA46 thi relA1 lac⁻ F'[proAB⁺ lacI^q lacZΔM15 Tn10(tet^r)]</i>	Bullock (1987)
C600hflA	<i>supE hsdR thi-1 thr-1 leuB6 lacY1 tonA21 hflA150[chr ::Tn10(tet^r)]</i>	Young et Davis (1983)

La souche bactérienne XL1-Blue MRF' a servi pour le clonage des différents fragments. Les cellules C600hflA ont permis l'amplification de la banque d'ADNc de truite.

- Références et indications sur les plasmides utilisés.

<i>Plasmide</i>	<i>Numéro d'accèsion Genbank</i>	<i>Taille (bp)</i>	<i>Marqueur de sélection</i>	<i>Remarques</i>
λgt10 Jendrisak et al. (1987)	U02447	43 340	aucun	Bactériophage utilisé dans les banques car il peut amplifier des fragments de 7 000bp
pBluescript SK⁻ Short et al. (1988)	X52324	2 958	ampicilline	Sélection colorée par α-complémentation de la β-galactosidase
pGEMT-Easy http://www.promega.com	Plasmide commercial (Promega)	3 015	ampicilline	Sélection colorée par α-complémentation de la β-galactosidase

- Représentation des plasmides pBluescript SK- et pGEMT-Easy.



Les vecteurs pBluescript SK⁻ (A) et pGEMT-Easy (B) possèdent un marqueur de sélection de résistance à l'ampicilline (*Amp^r*), une origine de répllication bactérienne (*ori*) et la partie 5' du gène *LacZ*. Cette région codant pour la partie N-terminale de la β-galactosidase est interrompue par la présence d'un multi-site de clonage (MCS) rendant possible une sélection colorée des clones grâce à l'α-complémentation de la β-galactosidase. Le clonage des fragments ADN d'intérêt a lieu au site *EcoRI*, entre les promoteurs des ARN polymérase ADN dépendantes T7 et Sp6. Le plasmide pGEMT-Easy est acheté ouvert au site *EcoRV* avec des thymidines (encadrées en rouge) aux extrémités.

- Milieu NZY liquide, pH 7,5

- 0,5% NaCl (5 g)
- 0,2% MgSO₄.7H₂O (2 g)
- 0,5% Yeast extract (5 g)
- 1% NZ amine (10 g)
- Eau qsp 1 L

- Milieu NZY agar

- 1,5% d'agar sont ajoutés afin d'obtenir le milieu NZY solide

- Milieu NZY agarose

0,7% d'agarose est ajouté à du NZY liquide afin d'étaler les bactéries et les phages lors du criblage de la banque de truite.

1,3% d'agarose sont ajoutés à du NZY liquide afin de couler des boîtes pour extraire les phages des clones secondaires positifs.

- Tampon SOC, pH 7

2% Tryptone (20 g)

0,5% Yeast extract (5 g)

0,05% NaCl (0,5 g)

2,5 mM KCl

Eau qsp 900 ml

Autoclaver et ajouter une fois que la solution a refroidi 20 mM de glucose et 10 mM de MgCl₂.

Annexe 3 : Migration des ADN et des ARN

- Bleu de charge 10x
 - 0,25% de bleu de bromophénol
 - 0,25% d'orange G
 - 50% de glycérol
 - 0,1 mM EDTA

1/10ème de bleu de charge est ajouté aux échantillons avant leur dépôt dans le gel et leur migration.

- Tampon TBE 10x
 - 10,8% Tris base (108 g)
 - 5,5% Acide borique (55 g)
 - 20 mM EDTA, pH 8 (soit 40 ml d'une solution à 0,5 M)
 - Eau qsp 1 L

- Gel TBE
 - 1% agarose (Eurogentec) dissout dans du tampon TBE 1x.
 - 5µl de marqueur de taille ADN (Eurogentec) est déposé à côté des échantillons afin d'estimer leur quantité par comparaison des intensités des bandes.

- Tampon TAE 50x, pH 8,5
 - 24,2% Tris base (242 g)
 - 57,1 ml d'acide acétique glacial
 - 50 mM EDTA, pH 8 (100 ml EDTA 0,5M)
 - Eau qsp 1 L

- Gel TAE
 - 1% d'agarose LMT (Low Melting Temperature) dissout dans du tampon TAE 1x

- Tampon Borax 10x, pH 8,3
 - 0,2 M Borax (76,2g)
 - 2 mM EDTA (4 ml d'EDTA 0,5M)
 - Eau qsp 1 L

- Gel Borax

1% d'agarose (0,3 g)

73% d'eau (22,1 ml)

Faire fondre et attendre que cela ait refroidi puis ajouter :

1x de Borax (3 ml)

16,3% de Formaldéhyde 37% (4,9 ml)

- Préparation des échantillons ARN

Echantillon (2 µl)

½ volume de formamide (10 µl)

1/10 volume de bleu de charge (2 µl)

1/10 volume de Borax 10x (2 µl)

16,5% de formaldéhyde (3,3µl)

4% de bromure d'éthidium (0,7 µl)

Le tout ajouté à l'échantillon et chauffé 5 min à 65°C avant d'être déposé.

2,5 µl de marqueur de taille ARN (Promega) est traité de la même manière avant d'être déposé et permettre une comparaison des intensités des bandes du marqueur avec les bandes 18 S et 28 S des échantillons. Ainsi, une estimation de la quantité des échantillons est effectuée sachant qu'une bande du marqueur est de 100 ng/µl déposés.

Annexe 4 : Extraction de l'ADN plasmidique

- Centrifuger 1,5 ml de culture bactérienne fraîche 1 min à 11 000 g.
- Jeter le surnageant, rincer le culot avec 250 µl de tampon STE et reprendre le culot bactérien avec 500 µl de tampon STE.
- Centrifuger 1 min à 11 000 g.
- Jeter le surnageant et ajouter 100 µl de tampon GTE.
- Ajouter 200 µl de solution de lyse préparée extemporanément, mélanger en retournant le tube plusieurs fois et mettre dans la glace pendant 5 min maximum. La solution s'éclaircit.
- Ajouter 150 µl d'acétate de potassium, pH 4,8. Inverser le tube pour mélanger. La solution devient trouble.
- Centrifuger 20 min à 11 000 g.
- Récupérer le surnageant.
- Ajouter 5 µg de RNase A (5 µl d'une solution à 10 mg/ml) et incuber 1 h à 37°C.
- Précipiter en ajoutant 1 ml d'éthanol 100% froid et mettre le tout à -20°C pendant 20 min.
- Centrifuger 20 min à 11 000 g.
- Éliminer le surnageant.
- Rincer 2 fois en éthanol 75% froid.
- Sécher le culot.
- Reprendre en 20 µl d'eau.

La digestion enzymatique se fait ensuite en 20 µl en prenant 10 µl de plasmide.

- Tampon STE
 - 0,1 M de NaCl (8 ml de NaCl 5M)
 - 10 mM de Tris-HCl, pH 8 (4 ml de Tris-HCl 1M)
 - 1 mM EDTA, pH 8 (0,8 ml d'EDTA 0,5M)
 - Eau qsp 400 ml

- Tampon GTE
 - 50 mM glucose (25 ml de glucose 1M)
 - 25 mM Tris-HCl, pH 8 (12,5 ml de Tris-HCl 1M)
 - 10 mM EDTA, pH 8 (10 ml de EDTA 0,5M)
 - Eau qsp 500ml

- Solution de lyse

0,2N de NaOH (0,8 ml de NaOH 10N)

1% de SDS (4 ml de SDS 10%)

Eau qsp 40 ml

- Acétate de potassium, pH 4,8

60 ml d'acétate de potassium 5M (34,34 g d'acétate de potassium pour 70 ml d'eau)

11,5 ml d'acide acétique glacial

Eau qsp 100 ml

Annexe 5 : Northern blot et criblage de banque

- Tampon d'hybridation HYBE
 - 5x de Denhart's
 - 5x de SSC
 - 50 mM de NaP, pH 6,5
 - 0,1% de SDS
 - 50% de Formamide en conditions homologues et 35% en conditions hétérologues
 - 100 µg/ml d'ARNt préalablement dénaturés 10 min à 100 °C
 - Eau qsp 20 ml

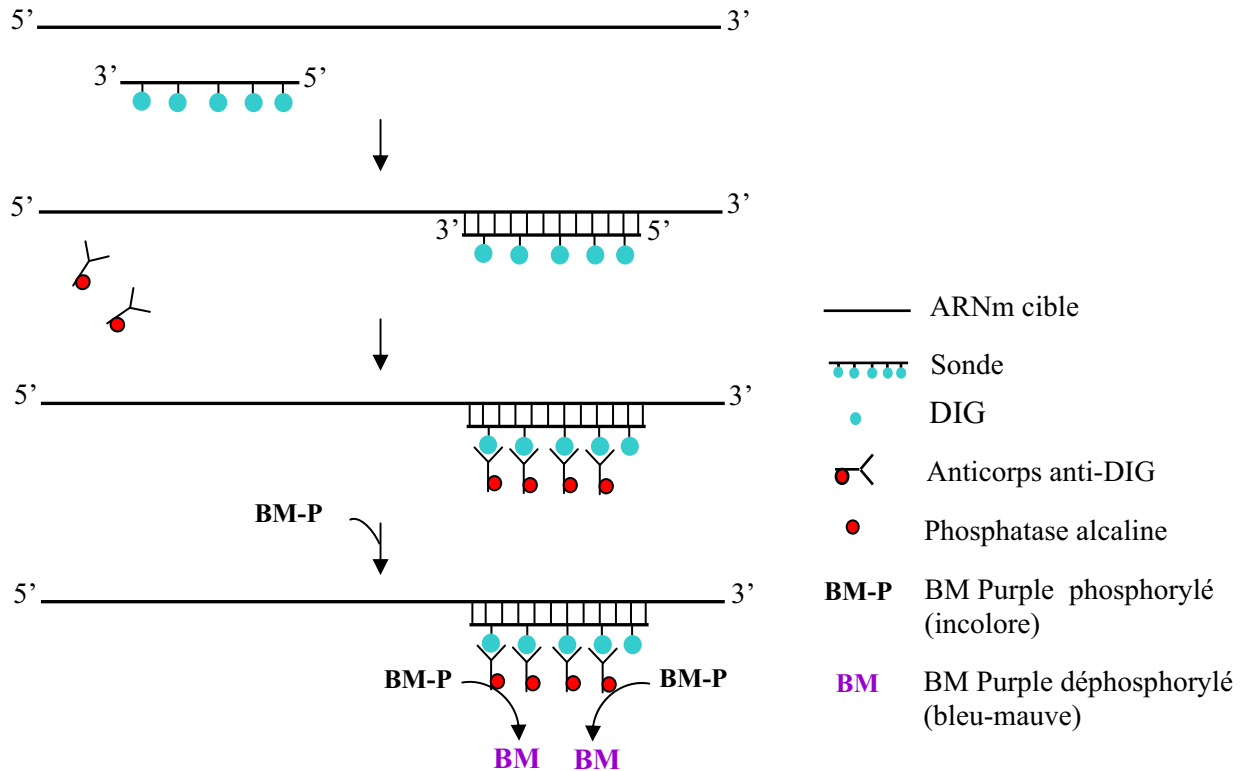
- Tampon Tris EDTA, pH 7,4
 - 10 mM de Tris HCl, pH 7,4
 - 1 mM EDTA, pH 8

- Tampon SM
 - 0,58% de NaCl (5,8 g)
 - 0,2% de MgSO₄.7H₂O (2 g)
 - 5% de Tris-HCl 1M, pH 7,5 (50 ml)
 - 2% de Gélatine w/v (5 ml)
 - Eau qsp 1 L

- Tampon λ-diluant, pH 7,5
 - 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
 - 10 mM MgSO₄

Annexe 6 : Hybridation *in situ*

- Représentation de l'hybridation et de la détection d'une sonde ARN marquée à la digoxigénine.



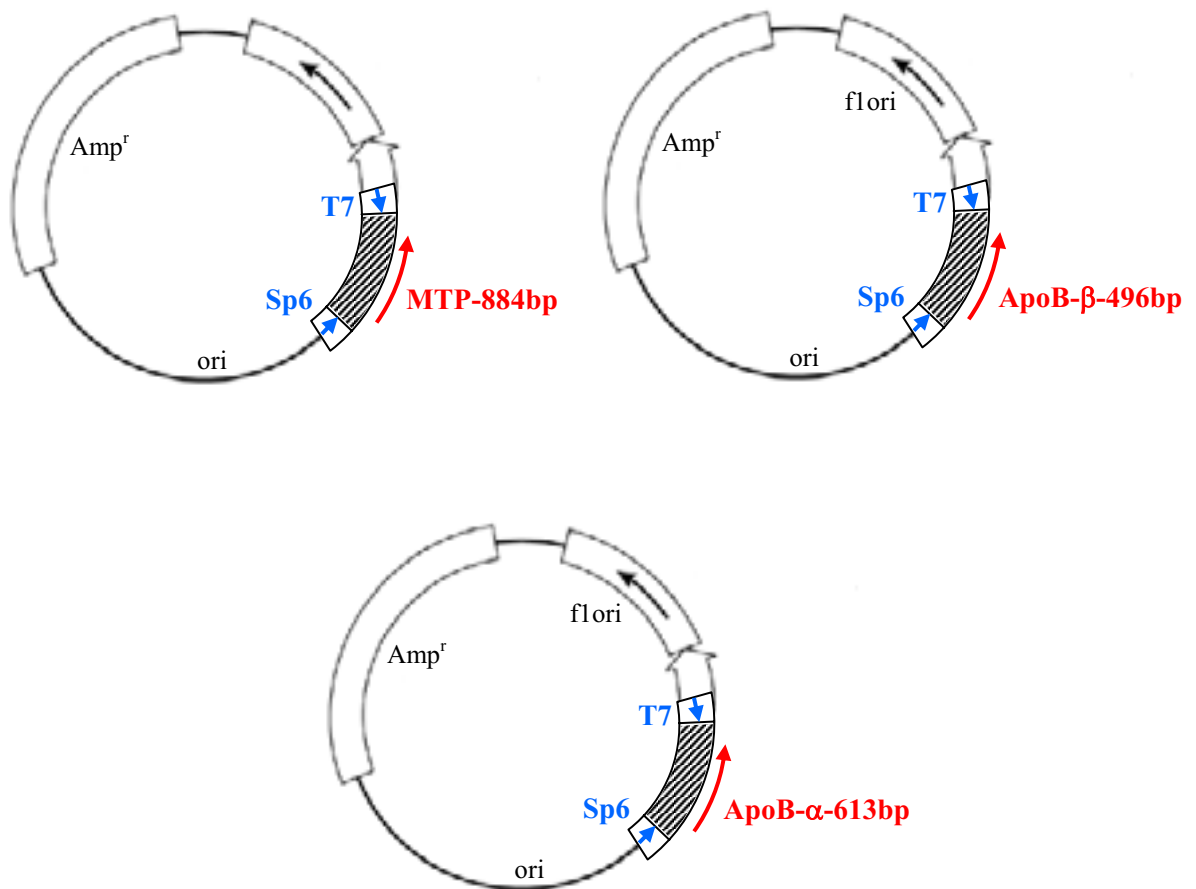
La sonde ARN marquée à la digoxigénine (DIG) inverse complémentaire de l'ARNm cible est capable de s'hybrider sur ce dernier. Les anticorps anti-digoxigénine (anti-DIG) se lient aux résidus DIG contenus dans la sonde. La phosphatase alcaline couplée à l'anticorps provoque la déphosphorylation du substrat incolore BM-Purple (BM) libérant ainsi un produit coloré bleu mauve.

- Représentation de l'orientation des inserts servant à la synthèse des sondes ARN.

A



B



A : Schéma représentant le produit de l'amplification par PCR du fragment SP6-T7 contenant un insert orienté en antisens (AS) par rapport au promoteur T7. B : Dessins des vecteurs pGEMT-Easy dans lesquels sont insérés les fragments MTP-884bp, ApoB- α -613bp et ApoB- β -496bp. Ils sont tous les trois orientés en antisens par rapport au promoteur T7. Ainsi, la sonde sens sera synthétisée grâce à l'utilisation de l'ARN polymérase ADN dépendante Sp6 et la sonde antisens grâce à l'ARN polymérase ADN dépendante T7. Le sens des flèches indique le sens de l'orientation du fragment ADN de la partie 5' vers la 3'.

- Tampon PBST
0,1% de Tween 20 est ajouté à du PBS 1x (annexe 1)

- Tampon triéthanolamine, pH 7,5
1,2% de triéthanolamine dilué dans de l'eau
Soit 2,4 ml pour un volume final de 200 ml

- Tampon SSCT
0,1% de Tween 20 est ajouté à du tampon SSC (annexe 1)

- Tampon d'hybridation HB
50% de Formamide
5x de SSC
1x de Dehhardt's
5 mM d'EDTA, pH 8
0,1% Tween 20
100 µg/ml d'héparine
Juste avant d'utiliser ce tampon, 500 µg/ml d'ARNt préalablement dénaturés 5 min à 95°C et 0,1% CHAPS sont ajoutés

- Tampon d'hybridation pour les coupes HBc
50% de Formamide
5x de SSC
1x de Dehhardt's
5 mM d'EDTA, pH 8
100 mg/ml de sulfate de dextran
50 µg/ml d'héparine
Juste avant d'utiliser ce tampon, 500 µg/ml d'ARNt préalablement dénaturés 5 min à 95°C et 0,1% CHAPS sont ajoutés

- Tampon TN
100 mM Tris-HCl, pH 7,5 (100 ml de Tris-HCl 1M)
150 mM NaCl (30 ml de NaCl 5M)
Eau qsp 1 L

- Tampon TNT
0,1% de Tween 20 est ajouté à du tampon TN

- Solution de blocage
2% de sérum de mouton
2 mg/ml de sérum albumine de bœuf
Tampon TNT

- Tampon chromogène
100 mM Tris-HCl, pH 9,5 (5 ml de Tris-HCl 1M)
50 mM MgCl₂ (2,5 ml de MgCl₂ 1M)
100 mM NaCl (1 ml de NaCl 5M)
Eau qsp 50 ml
Au dernier moment, 2 mM de lévamisole sont ajoutés

- Solution de coloration
BM-Purple (Roche) auquel 2 mM de lévamisole sont ajoutés

Annexe 7 : Aligement des séquences protéiques des apoB-100 humaine, de souris, de poulet avec l'apoB α (Dr_alpha), l'apoB β 1 (Dr_beta1) et l'apoB β 2 (Dr_beta2) de poisson zèbre.

Les séquences des apoB α (Dr_alpha), apoB β 1 (Dr_beta1) et apoB β 2 (Dr_beta2) de poisson zèbre ont été alignées avec l'apoB humaine (NP_000375.1), l'apoB de souris (XP_137955.3), et l'apoB de poulet (XP_419979.1) à l'aide du logiciel ClustalW et un réajustement manuel. Les positions conservées dans au moins 4 de ces séquences sont surlignées en vert. Les astérisques et les points représentent les acides aminés conservés et similaires dans toutes les séquences, respectivement. Les régions A et B du domaine de liaison au récepteur aux LDL sont indiqués comme décrit par Babin *et al.* (1997). Le peptide signal de l'apoB-100 humaine de 21 acides aminés est indiqué en souligné. Les substitutions conservatives utilisées sont : A, G; S, T; E, D; R, K, H; Q, N; V, I, L, M; Y, F; W; P; C.

humain	<u>MD</u> PPRPALLLALLAIPALLLLILLAGARAEEMLENVSLVCPK-----DATRFKHLLRK	51
souris	MGPRKPALRTPPLLFLFLFLDTSVWAQDEVLENLSFSCPSKAFFTGRLEDATRFKHLLRK	60
poulet	MGPVQ-----LFLFLFLSSGVLVQ-----DAARFKSLRK	30
Dr_alpha	MD-TKLCL-----LFSAHLLAGSTVEAEEDTEGLS-KCP-----LSARFKNLLRK	43
Dr_beta1	MGGTKLCL-----LFLCAIALSYAQEEEP-----CL-----LAKRFKSFQK	37
Dr_beta2	MGDHK--LR--LLFFSLIILS-----ICR-----RFKPLISK	28
	* * * * *	
humain	YTYNYEAESSSGVPGTADSRSATRNCKVLEVPQLCSFILKTSQQTILKEVYGFNPEGKA	111
souris	YVYNYEAESSSGVQGTADSRSATKINCKVELEVPQICGFIMRTNQQTILKEVYGFNPEGKA	120
poulet	YVYLYEAETSSGITGTADSHSGSKITCKVELEVPQLCQFILRTMHCSLRETFGVDSERRA	90
Dr_alpha	YVYQYTAESKNEVTGTANLKNPKIISQVEIEVPQTCSEVLRTECVLSEVSVIDAQQQP	103
Dr_beta1	YEMTYETESLNALNCG--AINGPKARCKVEIEVPRIQSYIVHTTECELSDVIDVDAEGKP	94
Dr_beta2	HEFYETESLNSLNK---QVNGPKASCRVEILVVDASKYILRTTDCKLSEVTAVDTEGNP	85
	* * * . . . * * * * * * * * .	
humain	LLKRTKNSSEFAAAMSRYELKLAIPKQVFLYPEKDEPTYILNIRKGIISALLVPEPETE	171
souris	LMKRTKNSSEFAAAMSRYELKLAIPKQIVLYPKDEPKYILNIRKGIISALLVPEPETE	180
poulet	MLRKSNSDDFANAMSKHELRFSTQDGTKVKLYPEKDEPLNVLNLRKGIISALLAPTETE	150
Dr_alpha	VYRQAAGAEAFQAAMEKNTLNFVVDQVTSVSIYPEDEPENILNIRKGIISALLVPLEE	163
Dr_beta1	IFMSSAGAEAFKAAMAKNPLKFTVEGDNDIKLFPENDEBANILNFKRGLISALAAVLEE	154
Dr_beta2	VFGKAAAADERTDMKKNPLKFTVTKG-EIRLFPKGERANILNIRKGIISALAVPLEE	144
	. * * * * * * * * * * * * * * * * *	
humain	EAKQVFLFDTVYGNCSHFVTKTRKGNVATEISTERDLGQCDRFKPIRTGISPLALIKGM	231
souris	EDQQLFLFDTVYGNCSQVTVNSRKGTVPTMSTERNLQCCDGFQPISTSVSPLALIKGL	240
poulet	ENIKTISMDTVYGNCSDFEVEFKSRGVSVAEDISINRNKACDNFSPIRDYVSPVAIVKGL	210
Dr_alpha	EHNE--RMSTIHGICKTEVTVNSRK-DIDIDVSVVRDLSDCSHFSPHSLSTSPLSLMPGL	220
Dr_beta1	DRNR--RMPVYGMCRIDYSVNAHQ-DIATDVVLNRDLNCDKFSPVKDHTSPLALITGM	211
Dr_beta2	DRKK--NTPSIYGLCMTEYTV-----DTATAVTLNRDLSRCDKERPIEDHTSPLALITGL	197
	. . . * * . . . * * * * * * * * * * * * *	
humain	TRPLSTLISSSSQCYTLDAKRKHVAEAICKEQHLFLPFSYNNKYGMVAQVTQTLKLEDT	291
souris	VHPLSTLISSSQCYTLDPKRKHVSEAVCDEQHLFLPFSYKNKYGIMTRVTKLSLEDT	300
poulet	NIPLSTLLSSQSCYHSIDAKKHIRDVVCSKHLFLPFSYKNQYGMTEVNTQTLKLEDN	270
Dr_alpha	NGLFSKLIRSTQTCNYQFDNRRKHMTAQCETKHLFIPFSHEGQYGISSEVKQSLTLDQS	280
Dr_beta1	QYPLAQLIRSSQTCNYKFDNDQKHMTSASCSEKHMLLPFSYKGEHGVSNVKGQALTVGV	271
Dr_beta2	SHPLAQLIRSNQTCNYKFDKQEEMTCAICTEKHVLVFFSHKGEYGVNTNGKQVLTLDGV	257
	* *	
humain	PKINSRFFFG-EGTKKMGLAFESTKSTSPKQA-EAVIKTLQELKKTISEQNIQRANLEN	349
souris	PKINSRFFS-EGTNRMGLAFESTKS-SSPKQA-DAVLKTLQELKKTISEQNAQRANLEN	357
poulet	QRMNRRNPDGDELEEKGLALESTDAKFS-ROG-DAVLKILQELQKLTASQQNQORAKLFY	328
Dr_alpha	VKINRRYFNKDDTLEKKLFIEEVED-KHEVQSKDVLATMKELITLSSSGKSQQRASLEH	339
Dr_beta1	SVYNGRIFDHNEANMKTLHLDDSIDSVHPIQDKDAILSLRDLNDLSETTNGENRAHLAH	331
Dr_beta2	TENNDRVFDHNIANMKPLHLDRSVD-ISPVDKEAALAVLRELADLYKTNNGRKRRAHLAY	316
	* *	

```

humain    KLVTELRLGLSDEAVTSLLPQLIEVSSPITLQALVQCGQFQCSTHILQWIKRVHANPLLLID 409
souris    KLVTELRLGLTGEAITSLLPQLIEVSSPITLQALVQCGQFQCYTHILQWIKTEKAHPLLLVD 417
poulet    KLVSEVRLGKNETLSGADEMCKFSEWLITWQTLFQCGTDECTSAIMQILRTFDEADREVD 388
Dr_alpha  KLVSEVRLGKNETLSGADEMCKFSEWLITWQTLFQCGTDECTSAIMQILRTFDEADREVD 399
Dr_beta1  KLISTIRKMSAESLSAALPEALEISRPLVYQALFQCGTPECTSAILRVLRITFDRSSVEID 391
Dr_beta2  KLVAVIRKMEAEITLRAALPEALGISRSLLTYQALLQCGTPKCSSAIMQIIRTFDKSSFEVD 376
          * . . * . . . . * . * * * * * . . . . . *

humain    VVTYLMVALIPEPSAQQRLREIFNMRDQRSRATLYALSHAVNNYHKTNPQTGQELLDIANY 469
souris    IVTYLMALIPNPSSTQRLQEIFNTAKEQQSRATLYALSHAVNSYFDVDHSRSPVLQDIAGY 477
poulet    LVTYTLGLLPSPTPKRIRIILNMAQYQPSRASFYGLSHAVTKFYSEKMIVTEEITDVADF 448
Dr_alpha  AIVYALSLLPQSSPQRLRDMLSMAQSKPSKPIYALANTVKQLPQDQATSTPEVKEVAKF 459
Dr_beta1  AAVYAMGMVNPSPRDLVEEMLEMAFKSKPIYALSNVKKRLEYEVEKSVTPEIKAVADY 451
Dr_beta2  AAVYAIIGIIPQTSQVLVKEMLATKIKPSRPIYALSNVRRLEYETDG-VTSEIQAVADY 435
          * . . * . . . . * . * * * * * . . . . . *

humain    LMEQIQD DCTGDEDTYLLILRVIGNMQTMEQLTPELKSSILKCVQSTKPSLMIQKAAIQ 529
souris    LLKQIDNECTGNEDHTFLILRVIGNMGRTEQVMPALKSSVLSVCRSTKPSLLIQKAAIQ 537
poulet    MVSLLGTD DCSGDAELTYLTLRAIGNMGAVMEKAKPSLKASLKT CIRNQAASLSVQKAAIQ 508
Dr_alpha  MEFMLG-DCSGDEDSIFLTLRVIGVMGKYMEG-FPSLKSSVLCMKQAYAPLPVQKAAIQ 517
Dr_beta1  TLEQIG-DCTGNQEHVYLSLRVIGNMAAAVGAASPAKLSAVIQ CINQPAASPEVQAAIQ 510
Dr_beta2  ALEQIG-DCTGDEHVFVLSLRVIGNMVAALGGCTE-LHFAVIKGINQPGASPAVQAAIQ 495
          . . * * . . * * * * * . * * . . . * * * *

humain    ALRKMPEPKDKDQEVLLQTFLLDASFGDKRLAAYLLMLRSPSQADINKIVQILPWEQNEQV 589
souris    ALRKMEELEDEVRTILFDTFVNGVAVPEKRLAAYLLMKNPSSSDINKIAQLLQWEQSEQV 597
poulet    AFRKMTITEEDRSALLKEFQEGDAPTDKRLATYLLMKNPSPADLAKIMRILTREKNEQV 568
Dr_alpha  AFRLEMEDSDVRSALIQYQNVFAAQKRIAAYLLMLRNPEVAE--NVLRTLKSEQNEQV 575
Dr_beta1  VFRLLTVPDEGREVILMKVIFDKAAEIQKRVAAAYLLVMKDPQTELAQLVAALPNKNCQA 570
Dr_beta2  VYRHLKITSSGREVILMHTVLDKVASVQKRVAAAYLLMKNPTELAQLAAALEIEKNEHA 555
          * * * * * * * * * * * * * * * * *

humain    KNFVASHIANILNSEELDIQDLKLVKEALKESQLPTVMDFRKFSRNYQLYKSVSLPSLD 649
souris    KNFVASHIANILNSEELYVQDLKVLIKNALENSQFPTIMDFRKFSRNYQISKSASLPMFD 657
poulet    KSFVASHIANILSDEVGIEDLKVHVEALKGNEVPTAKDFRKFSRNYQVSKRVSPVGLN 628
Dr_alpha  KSFVSSHIANILSENPNLSIAKDYILKAVQGDVSPMPDETSLSRNYKTEVPLVPG---- 631
Dr_beta1  MSFVNSHLRNILSSTTSETGELRVKILNALQGNEISTDPTKFSRNYK-----IG---- 621
Dr_beta2  KSFIISSHISSIMASTAPETLKYKIVNNVNLGL-----HVR-----LG---- 592
          * . * * . * * . . . . *

humain    PASAKIEGNLIFDPNNYLPKESMIKFTLTAFGFASADLIEIGLEGKGFEPTEALFGKQG 709
souris    PVSVKIEGNLIFDPSSYLPRESLTKFTLTVFGLASLDLFEIGLEGKGFEPTEALFGKQG 717
poulet    PISAKVEGNVIFDPSSYVPKETMIKFTLNLNYCFGPSLIFELGLDGKGFEPTEALFGKQG 688
Dr_alpha  ----SVESNVIFDSANYMPREVMIAFTLDFNFP---EILEIGLEGELEPVEVLFGENG 684
Dr_beta1  ----SLEGNVIFESEELLPNEVILEMTLNAFGYD-VDMFEIGLNGKGLEPTVDALIGIDG 676
Dr_beta2  ----SLEGNVIFESPDLPREVMILEMTLNAFGLD-MLLIEIGMEGKGFEPTEALFGEDG 647
          . * * * * . * * . * * * . . * * * * * * * * *

humain    FFPDSVNKALYWVNGQVPDGVSKVIVDHFGYTKDDKH----EQDMVNGIMLSVEKLIKDL 765
souris    FFPDSVNKALYWVNGRVPDGVSKVIVDHFGYTTDGKH----EQDMVNGIMPVVDKLIKDL 773
poulet    FFPDTASKALYWVDGKVPQVSKALFDYFGYSHDGKQ----DQETTRAVILNLEKLIKEL 744
Dr_alpha  FFPDTISKAMYWVNDKIPHPVKRVLEKWI SPLNGERMKRQVPODITMK----SMEEYISEF 740
Dr_beta1  FFRITMQKTINYAADKVPRGNDIMQSMFPTLWNNITM-QKAPOSIVKEITNNVNKLIKQL 735
Dr_beta2  FFPDIVMKSILYATDKMPAELNEVDWNMLPNLNYYRKKRQATQNIIVKEISDSVNKLSDEL 707
          ** * * * . * . . * . . . . * . . . . .

humain    K-----SKEVPEARAYLRILGEELEFASLHDLQLLGKLLLMGARTIQGI-PQMIGEVIK 819
souris    K-----SKEIPEARAYLRILGKEISFVRLQDLQVLGKLLLSGAQTIQGI-PQMVQAIK 827
poulet    S-----KKEAPEGRAFLRILGEELEGMKLSDFKLLGSVALECIKTLQRI-PEIIAQATSK 798
Dr_alpha  KNRLEQVEDAPKGLAYLRILGTELGYLKTSDLKHVTQYINLCAETFKST-SLNFMGKLIS 799
Dr_beta1  K-----VQDNPEAMTYLRLLGAEMGYLKTNDVEDMAYSAALLTKSLNMFPTDFLRNLIS 790
Dr_beta2  K-----AQDAPEAMVYLKLLGAELGYLDAK-----GKMIGSLKMIPTDFTRKRLFS 757
          . * . . * * * * * * *

```



```

humain      GSKNDFFLHYIFMENAFAELPTGAGLQLQIISSSGVIAFGAKAGVKLEVANMQAELVAKPSV  879
souris      GSKNDLFLHYIFMDNAFAELPTGAGLQLQVSSSSGVFTPGIKAGVRELANIQAELVAKPSV  887
poulet      GVDKDLFVHYMFMDNEFELPTGAGLQLKFALSGIVTPGAKVAVKLVHOKSMQAELIAKPSV  858
Dr_alpha    SLENFEFVHYMFLKAFATLPTSAGFPLKLTLSGVLAPGAKG--GLTIDRMMQQLSFMPSV  857
Dr_beta1    SVNMLFLHYIFMDNEFYLPQTGTGLPLRVALSGTFAPGVKG--GLKLARDMSEVAFMPSA  848
Dr_beta2    SVDNELFLHYIFMDNEFYLPQAAGFPLRVALSGTFTPGIKG--GLSFNPGMGDFAFMLSA  815
          *.*.*.*.  *  ***  *  *  **  **  *  *
          .
humain      SVEFVTNMGIIIPDFARSGVQMNINFFHESGLEAHHVALKAGKLFITFSPKRPVKLLSGG  939
souris      SLEFVTNMGIIIPDFAKSSVQMNINFFHESGLEARVALKAGQLKVIIFSPKRPVKLFSGS  947
poulet      AVEFVTHLGINMPEFARSGVEMNSNIFHESGIEAHVSVKAGQLKFSIPAPKTPTKLLSIS  918
Dr_alpha    GVEHIIQMGVYIPEFVVAGIETHINLYHESAVNARVTLSDSQIKLSIPAFSGNIQLFVS  917
Dr_beta1    GVEFVTEVGAALLEYVESGLEMHTNIYHESGLKVKVAVTNKQFKLITFTPKTSTKLISVS  908
Dr_beta2    GVELVTEIGTHLPDYVHSGLEMHTNIYHESGLRAKISGTQKRLKLSIPAREPTEELISVT  875
          .  *  *  *  *  .  .  .  .  *  *  *  *  *  *  *  *
          .
humain      NTHLVSTTKTEVIPPLIENRQSWSVGQVFPGLNYCTSGAYSNASSTDSASYYPLTGDT  999
souris      NTHLVSTTKTEVIPPLIENRQSWSTCKPLFTGMNYCTTGAYSNASSTESASYYPLTGDT  1007
poulet      NTHLVSPAKTEEIPPLIENREFSTSCKPFISGLNFCCLKLLYSNASSMEAAPYYPLTGET  978
Dr_alpha    NKLLSVTSTQTKIVFSMVEDRIDSTEGNRIFFGMNYCTILRYSNASTNNAPYYPLTGET  977
Dr_beta1    NSIIVSVTGTEIKRIPPLAEHVKAR-KCTPFIPGFQYCGVMQYSNAFNDAAAPYFPLTQDS  967
Dr_beta2    NSIIVSVVG--GKILPI SANVQYTMEDCTAVFPGLKSCITLEYVPAALNDNAPYFPLTQDS  933
          *  .  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
          .
humain      RLELELRPTGEIEQYVSATYELQRENDRA---LVDTLKFLVQAEQAKQTEATMTFKYNRQ  1056
souris      RYELELRPTGEVEQYSATATYELVKEEDKS---LVDTLKFLVKAEGVQSEATVLFKYNR  1064
poulet      RFEVEIVSTGEVKEYSASANYDLQREGTD---LVDTLKFAVQAEQVQHEATLTFKYNR  1035
Dr_alpha    RLALELQPTGEVREYATATISYALLREKGEGRQKVLSVIVLKAEGAEPTEATAVVKYNR  1037
Dr_beta1    KFAIEIHPTGEVSSYATADYAYDGK-----DDIVTIFGLKAEGIT-FESIVKLTDFR  1019
Dr_beta2    RFAVEIRPSGTVTEITAIIGTYEDE-----EKLTFESVKAEG-TPFVVLNTVMI  985
          .  .  *  .  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
          .
humain      SMTLSSSEVQIPDFVDLGTILRVNDESTEGKTSYRLTLDIQNKKITFVALMGHLSCDTKE  1116
souris      SRTLSSSEVLIPGFVDNFGTILRVNDESAKDKNYKLLLDIQNKKITFVSIVGHLSYDKKG  1124
poulet      RKLTSDVSIIPDVVDVDFGTNFRITDESIVSGKKAYTFVIDFNKKKISEVTLTGQIRYAG  1095
Dr_alpha    RSIHTDLOIPDYLEAGIKLAVDTNAKGGKMRGITIDVTNRDIPQLSIVGHARLES  1097
Dr_beta1    NYEVSADVQIPDYLEAGIRVHAVRKAQSDATHSIQIDLMMKNVPEASTIGLAKIGSMK  1079
Dr_beta2    LNTAS-----LNTAS-----LNTAS-----LNTAS-----LNTAS-----  990
          .
          .
humain      ERKIKGVISIPRLQAEARSEILAHWSPAKLLLQMDSSATAYGSTVSKRVAVWHYDEEKIEF  1176
souris      DGKIKGVVISIPRLQAEARSEVHTHSSTKLLQMDSSATAYGSTISKRVTWRYDNEIIEF  1184
poulet      EAMLRGTVISIPRLQTEKTEALVNSPTKGLYLMQSSVGTGHNTVSKRVLIRYDSEKAE  1155
Dr_alpha    DGLIELQMSVPAQLMDTSATATLKNNGLVLQLETAFNMPETTS-VQKAILRYDNKVEI  1156
Dr_beta1    DAMLQVQLLIPNFEETDAKVATATLKNTELKVELESDIKPEMTSSIQMKILKYDAEIEA  1139
Dr_beta2    -----MKLLMEALQLDHTVSGKFTNAEKLKLELQSDLKLPGTTS-VQTLILTYESEKIEA  1044
          .  .  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
          .
humain      EWNTGTNVDTKKMSTSNFPVDLSDPKSLHMYANRLDHRVPETDMTFRHVGSKLIVAMSS  1236
souris      DWNTGTNVDTKKVASNFPVDLSHYPRMHEYANGLDHRVPQTDVTFRDMGSKLIVATNT  1244
poulet      EWNSGATAAVGRMSSAFQVDFSDYSKTLEKYANELLDRKVALTDMTFRHIVSQFIVATNT  1215
Dr_alpha    EMKSDINSEVEKLFP---NMEEVRSOLQASIDEILDKKVTKTDMKLRHIVSKGLEAVNI  1212
Dr_beta1    EVSDVTTTEIHNIIT-----TDAIKATFNDILDQEIGTSDKKIRDVLTQFVEASNA  1190
Dr_beta2    EVKSHFN SKTRTLVP-----LFRGTDTIIGLITRQMGQN-KIKLLDII-----  1087
          .  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
          .
humain      WLQKASGSLPYTQTLDHNLNSLKEFNLQNMGLPDFHIFENLFLKSDGRVKYTLNKNSLKI  1296
souris      WLQMATRGLPPYQTLQDHLNLSLSELNLLKMGLSDFHIFDNLFLKTDGRVKYTMNRKINI  1304
poulet      WLQKASKDVPYAQTLQAKLSGLQELNIQKIKLPVITPEELFLKSEGRKYSFNKNSFLI  1275
Dr_alpha    WLDKIAAGSSFVDVQRNKRS-----TPELILPSLPEKLYLKSALLRYQFNKGRIST  1264
Dr_beta1    YLEQFSPNIPYVQ-----ELRIPALPEFTFEKKLFLNAEAAKYKFGQNYTYI  1238
Dr_beta2    -----AKLAA---F-SGVPATLDITLPEELFLNIDAAVKYHFGQPYTYI  1127
          *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
          .

```

```

humain    EIPLPFGGKSSRDLMKLETVRTPAIFHKFSVGFHLPSPREFQVPTFTTIPKLYQLQVPLLVL 1356
souris    DIPLPLGGKSSKDLKMPESVRTPAIFNFKSVGFHLPSPREVQVPTFTTIPKTHQLQVPLLVL 1364
poulet    NIPLPLFGGRSSHDIRVFPQTVKTPRIVIESMGINIPSQEYRMPFTFTVFESYPLLVPLFGAL 1335
Dr_alpha  SLPLLLGGKSSAEDIPPTLTLTLPQIQIPLLGLEVENSYKIPTFTTIPRTLEFSLPMLGVA 1324
Dr_beta1  TLPVPLGGKTSRDLENLPAALETPVILNVPQLDLQVRSINIPLPVFFIPESLSLSLPLVAKA 1298
Dr_beta2  TLPPLPLGGKSTRDLKFFTLSTDLFIVDPD-----LESMQLPEVSLPESVTLSLHAFQLA 1182
          . * . ** . . . . . . . . . * . * . . .

humain    DLSTNVYSNLYNWSASYSGGNTSTDFHS-LRARIHMKADSVVDLLSYNVQGGSETTYDHK 1415
souris    DLSTNVYSNLYNWSASYTGGNTSRDFHS-LQAQYRMKTDVVDLFSYSVQGGSETTYDSK 1423
poulet    EASASVHSNLYNWTAAAYTLTNSSTEKTRALIGTTAVNADSVFELLSYNMKGSSEASS-SR 1394
Dr_alpha  ELSAKMNSNFYEWEGSILGGNNTVDPN-YIAKYKIMASCPLTPLSYKIEGCMISGTVD 1383
Dr_beta1  EVSKLSSNFYDMEAKASAGSELVQKPT-YSAMIEVTGTSPVDLLSFKIEGSTFLVGRLG 1357
Dr_beta2  DVSGKLRCHLYDLDA TVSAARDPAAHSS-YSAKLKVGTGTSPEVQFCLQVEGSALAEATSG 1241
          . * . * . . . . . . . . . * .

humain    NTFTLSCDGSILRHKFLDSNIKFVSHVEKLGNNPVS KGLLIFDASSWGPOMASVHLD SKK 1475
souris    NTFTLSCDGSILHHKFLDSKFKVSHVEKFGNSPVS KGLLTFETSSALGPOMSATVHLD SKK 1483
poulet    NGFTCAYENHLKFRLLTSDFKMSRDKSYEPTSVSNCTIFLMASSALGPQLSFSDDVSEK 1454
Dr_alpha  DTLKYLVNGSINHCLLDASISFFETMSLADKINGRTNYRLEASSPLGLDTSLFYSAQSAS 1443
Dr_beta1  ESLKTEMKSSINHKLLEASVNYFEEITTGKKITMSSSKMEAKSPFGLKISLEHTGQVGL 1417
Dr_beta2  DSLKASMKTVIEHFFFNATISVEEEVQSAAKLSVSKSKLEVTSLVAEQMSVEHNAIFEG 1301
          . * . . . . . . . . * . *

humain    KQHLFVKEVKIDQFRVSSFYAKGTYGLSCQRDPNTGRLNGESNLRFNS SYLOGTNOITG 1535
souris    KQHLYVKDIKVDQFRASSFYAQGYGLSCERDVTGQLSGESNMRFNSTYFOGTNOITG 1543
poulet    TNNMNINNVRIEQLEVAVSFARSVYTMSSSYNEKRRVLEGGKSNRLDSSYLOATNHLSG 1514
Dr_alpha  TSDEVIGDGNLDGFIKIGSLYANSTLSQSYIYNMPKQEGKGESTLKFDS SLIQGQNVIKG 1503
Dr_beta1  DEDEISGDGNLLGSIKAGPLNGEVALRQSLILLPFKPELKIDSSLKVDLEIQIQAENITEA 1477
Dr_beta2  DAGQISGDGNLEGSFKAGSIYGSNGLKQSVLLIPSKQEAKIDSLKVDSSKLLQAQNSFSV 1361
          . * . . * . . . * *

humain    RYEDGTLSLTSTSDLQSGIINKNTASLKYENYELITLKSDTNGKYKNFATS NKMDMTFSKQN 1595
souris    MYQDALSITSTSDLDQGFKNNTASLKYENYELITLKS DSSGQYENFAASNKLDVFTTQS 1603
poulet    RTDQVFSITASDVQNGLLKNTASLKYENSQKLTSETNGRYLHLAAVNKLEFLLSKKM 1574
Dr_alpha  SYVNGELSLLSKTNAGNDVLKHVVELKHKKGELSVKSDGSATALGKALRCKAELDVKNGE 1563
Dr_beta1  AFANGELSTFSKSTAFQDNLIHVVELAYKESQLALKSDARAKAFGLNIQNVAEASAFNL 1537
Dr_beta2  AFANRELTVLSTTAFDDILTNTAKVAINESQIGSYYTKAQGFGLKIENTAETRAKAKA 1421
          . . * . . . . . . . .

humain    ALLRSEYQADYES-LRFFSLLSGSINSHGLELNAIILGTDKINSGAHHKATLRIGQDGLST 1654
souris    ALLRSEHQANYKS-LRLVTLSSGSLTSQGVLELNAIILGTDKINTGAHKATLKIARDGLST 1662
poulet    AALLRSEYQATYKQ-TQCYALFTGSINSQDLVFNTDFSLTDQRNRAAHHKSSLNVNQYGLAS 1633
Dr_alpha  ATLKVESQANDAT-HDAFSLLTGSINSNGLEINMEGLLNLESGRGTHKGTLSFGGNGLST 1622
Dr_beta1  VNVKIDTNVDTLFGNVRVRSQFIAALDANGLDVKSASANLDEHTASHMCSLSLTRNGLVT 1597
Dr_beta2  ISVKIETSGDLSQ-ERIYSIVTGEIDINGLGY----- 1452
          . . . . * . . .

humain    SATNLKLC--SLVLENELNAELGLSGASMKLTTNGRFREHNAKFSLDGKAALTELSLGS 1712
souris    SATNLKY--SPLLENELNAELGLSGASMKLSTNGRFKEHHAKFSLDGRAALTEVSLGS 1720
poulet    SATNVQF--SPLTMQSEMNAKLDTSGGSVLSLSSSGRYGKNNAKFNVGGRVSLTEITLGS 1691
Dr_alpha  SCMTTIE--GNSLTFENAFNGGINGEGASVSVSKGSSQDNTIELSAKGIKISPKIASLTS 1680
Dr_beta1  IGSLLLECPDMP LTLQNKFNALDTSGLSLSVETKPKFVEVTIEN----- 1642
Dr_beta2  ----- 1452

humain    AYAAMILGVDSKNIFNFKVSQEGIKLSNDMMGSYAEMKFDHTNSLNIAGLSLDFSSKLDN 1772
souris    IYAAMILGADSKNIFNFKLSREGLRLSNDLMGSYAEMKLDHTHSLNIAGLSLDFSSKMDN 1780
poulet    EYOSTILGMDNKHVLNFRINKEGLKFSNNLQGSLEIKLEYTNDLNIPLSLTFVSKLDN 1751
Dr_alpha  VFGNAFDGTARNTMNI GINKQGLSMNTMRGTQLQKMRSECMQTLNITLWTLAFRSKMDN 1740
Dr_beta1  -----TNSLSASLSSVDFISKAN- 1660
Dr_beta2  ----- 1452

```

```

humain IYSSDKFYKQTVNLQLQPYSLVTTLNSDIKYNALDITNNGKLRLEPLKLVHAGNFKGAYQ 1832
souris IYSGDKFYKQNFNLQLQPYSFITTLNSDLRYGALDITNNGRFRLEPLKLVNCGNFKGTQYQ 1840
poulet SFSFDKFKHKHVFDFLQLQPRSLTAKLNNNIKYTKTEVSNKAELLLLEPLKLVNCGNVRAAYG 1811
Dr_alpha FICDGASYNHDIKVMRPFITSISANNELELDFDGLSSDGRKMEPFKMDVAGSLSGKYG 1800
Dr_beta1 --SDLGTYVHDFS LQLQPYSTSLKISNNLNALNIKLINEAQFKALPYAADLTGSWKLSSG 1718
Dr_beta2 ----- 1452

humain NNELIKHIYAI-SSAALS-ASYKADTVAKVQGVESHRLNNTDIAGLASAIDMSTNYNSDSL 1890
souris NNELKHIYTI-SYTDLVVASYRADTVAKVQGVESHRLNADIEGLTSSVDVTTSYNSDPL 1899
poulet TDEVRHTYAI-TYADIT-ANFKTDTVANVQGAAVSHRVNLSVAGLASITMNTNCDKSL 1869
Dr_alpha EDDSFNHGCEFTYADLA-GTIKCDTAVKVFDSHISNFDLDFAGLSSVMNTKTQVNCESL 1859
Dr_beta1 TDELNKNTYET-KYEDLV-ATAKCGLTGKLMGSHMSQNTTEIEVAGLSVTYGSESNFNSQYL 1776
Dr_beta2 -----EV-IYKKIT-ANLQCKLNKGFIGASIDHNTEMKINGLGRINIILRFRNSRII 1502
* . ** *

humain HFSNVFRSVMAPFTMTIDAHTNGNKKIALWGEHTGQLYSKFLKAEPLAFTFVSHDYKGST 1950
souris HFNNVFHFSLAPFTLGIDTHTSGDKLSFWGEHTGQLYSKFLKAEPLALIVSHDYKGST 1959
poulet RFSNALRSTMAPFTITADVHTNGNKKIALGEHTGDLYSKILFKAEPLAFTFVSHDYRGST 1929
Dr_alpha RLENMIRTMAMPFSLTVDAILNSDGTVNFYGKHSQVSSKFLKAEPLAIAKSHECRASA 1919
Dr_beta1 RENSDDLHAAAVPREFNVDAMVNADGDLVLYGKQSAQVYSKFLMKAEPLAFAHSHECRVST 1836
Dr_beta2 NVETNTRGTTVPFSFNFNFAANGSENVYNRGHYREDFNTKMHLLKIDFESITHSHECKIST 1562
. ** . * . * . * . * . *

humain SHHLV--SRKSISAALEHKVSAALLTPAEQTGTWKLKTFQFNNEYSQLDAYNTKDKIGVE 2008
souris SHSLP--YESSISALEHTVSAALLTPAEQTSTWKFKTKLNDKVYSQDFEAYNTKDKIGVE 2017
poulet SHSFK--SMRRYSQLDNKFHMLFTQGEQSSAWKLK----- 1963
Dr_alpha VHMIP--NGESAETHIENKFDLSLITNEQSVLWKFKSKLNNHAYNQVNIYNKENDMGVQ 1977
Dr_beta1 TYNLY--DDLVEFNLDNKIDTVLTPSEQKATVRVSKFNNHEFNKLSAYNTPERLQVE 1894
Dr_beta2 LVETYGFGYGEVESEFQSKSELLNNSQKAKMAVVKVNVKHAINEINAYNTPAQFGL 1622
. ** *

humain LTRTLADLTLLEDSPKVPPLLSEPINIIDA-LEMRDAVEKPOEFTIVAFVKYDKNQDVH 2067
souris LSGR--ADLSGLYSPIKLPFFYSEPVNLVNG-LEVNDAVDKPOEFTIIAFVKYDKNQDVH 2074
poulet ----- 1963
Dr_alpha FSGVLQ-----TNLFNTERESSDIPLDNOKFSTSGFVKYDKNSDCH 2018
Dr_beta1 MSGSII-----TNIFNT-----VSDNDODHFFSAFLKYDKNNSR 1929
Dr_beta2 GSKVF-----TNLLNT-----ADDDHODEAVSAFLKYDKNQMH 1657

humain SINLPPFETLQEQYFERNRQTIIVVENVORNLKHINIDQFVRKYRAALGKLPQQAANDYLN 2127
souris TINLPPFKSLPDYLERNRRGMISLLEAMRGELQRLSVDQFVRKYRAALSRLPQQIHHYLN 2134
poulet -----IYFQIRGAILSTLQAVQNYLKNIDIDQYMKKYKATIDFPQHLNDYMD 2012
Dr_alpha ILYYFPIESFPAAFSINKAILHKEFSLQNYLNSLDLALIGQFRNKLEDFPQKVNIIIV 2078
Dr_beta1 ALSLPPIDEFPFDLQHMKLAVLRIVEAMOSYINREEIIVEIQKLATYVSDFFVNELN---- 1985
Dr_beta2 SLYLPPVDSLGLVPSSVILTYSSIEETL-AYLAYLSL-----PKHVSNEFVSNM----- 1705
. . .

humain SFNWERQVSHAKEKITALTKKYRITENDIQIALDDAKINFNEKLSQIOTYMIQ-FDQYIK 2186
souris ASDWERQVAGAKEKITSFMENYRITDNDVLI/AIDSAKINFNEKLSQIETYAIQ-FDQYIK 2193
poulet KLDLKGRASTIKTNLIAFTKDYRITSDLEIILEKALDNLQEIILQIQVYLVQ-IEQYIK 2071
Dr_alpha DLDLENKINNVKNQILSLIHDTISIDLDAYAERFKEATGKKIIDFATKIRD-LSIQIK 2137
Dr_beta1 ---LEEKIKFSKDTALYEDYGITLDDLEASLMNLKPVLLKLVTEIDTYVVE-IEKIVR 2041
Dr_beta2 ---FGRRAEQFORASIALYQEQYPLKLGVEYKQLSDMISQITEALSFKQLTANGMLIENV 1762
* .

humain CSYDLHDLKIAIANIDEIIEKLSLDEHYHIRVNLVKTTHDLHLFIENIDFNKSGSSTA 2246
souris DNYDPHDLKRTIAEIDRIIEKLSLDEQYHIRVNLAKSITHNLYLFVENVDLNQVSSNT 2253
poulet ENYDQFDINALIAQLLDKLVKMTALDEKYKIRVTVVDTIQKLQFLNQYPSNIGSSTM 2131
Dr_alpha DGIESGAWANSVSDLAQIGREIKAFDEQYKIKTKTIIRGIDGIEDVIRQIDLEKLDSSA 2197
Dr_beta1 EIITSGTPSDAAIQRFDTILN---SFNEKYDVKAVLTVLEAIEKFLREIDVMSIKGSR 2098
Dr_beta2 DRMLTKHINALMFLITEDVKLLSLKPKQGHTKLQI----- 1798
. .

```

```

humain SWIQNVDTKYQIRIQIQEKLQQLKRHIQNIHQHLAGKLLQHIEATIVRVLLDQLGTTIS 2306
souris SWIQNVDSNYQVRIQIQEKLQQLRTQIQNIHQQLAAEVKQMDAIVTMHLDQLRTAIL 2313
poulet TWIKNIDDEYRITGRIKENLEQLKIQIQNIHQDIRSFAENLKRKIKITDVKQLLEKLRSLP 2191
Dr_alpha TWLKQLDAKYEIKTKLLEKLELRKVVETFEINMLEDLRQYITSIHLTEYVDQLSGQTP 2257
Dr_beta1 VFRQYVDEYFAIKSKVEEILSELKQFVANFDQEKFTEDVKNFVTSARFRDYADNLVAKTP 2158
Dr_beta2 ----- 1798

humain FERINDVLEHVKHFVINLIGDFEVAEKINAFRAKVHELIERYEVDQQIQVLMDKLVELTH 2366
souris FQRISDIIDRVKYFVMNLIEDFKVTEKINTFRVIVRELIKEYEVDQHQVLMDKSVELAH 2373
poulet IKKMKEVLEQIKDFILSWMEEYEVEKISAFRGMHKLIVKYEIDKHVYFLDRMIETLN 2251
Dr_alpha YEDIERVLDLSDAKDVILNWIEEYEVPEKINRVYLNQELILRYEIDKKIEVIVEQAIILVK 2317
Dr_beta1 TEQISKILEKAKQLLN-----LLGNRMNAIYTNVREILVKSQVQKKIETLKKVVELIK 2212
Dr_beta2 ----- 1798

humain QYKLEKTIQKLSNVLQQVKIKDYFEKLVGFIDDAVKKLNELSFKTFIEDVNKFLDMLIKK 2426
souris RYSLSEPLQKLSNVLQRIEIKDYEKLGVFIDDTVEWLKALSFKNTIEELNRLTDMLVK 2433
poulet QYRIRETVRKMTTYLRKIDLKTCFDKIVSLIDDAVKKVQTFDYEMMKKLNKFLDMIKK 2311
Dr_alpha QYRIQELVQAVVDTLKSQFEYISDKMMEIMDSIVSLKRMDFQKIVNDLNDYIQLIKT 2377
Dr_beta1 KFNIEETVKTLDATLKS-----ILTPVELVDKAINYLKTTAKEIIEEDLNCLNHCIKY 2267
Dr_beta2 ----- 1798

humain LKSFQYHQFVDETNDKIREVTQRLNGEI-QALELPQKAEALKLFLEETKATVAVYLESLSQ 2485
souris LKAFDYHQFVDKTNKIREMTQRINAEI-QALKLPQKMEALKLLVEDFKTTVSNLSLRLK 2492
poulet LKSFQYHQFVDDTNKIQEIIQKINEEL-RNLELPQKAEALKQYMRDFNAVVSQYVQLR 2370
Dr_alpha FRTFDYNTYIDEVNRKVRDVVDYINQKINEVYEIPRRIEASREFIKEMQATVFDYLEKTK 2437
Dr_beta1 IRSFDYNAFVDEANQIKKLTNDLYTMS-LSLEIROKLEAIREFVNYALSSMSACIEKLE 2326
Dr_beta2 ----- 1798

humain DTKITLIINWLQEALSSASLAHMKAKFRETLEDTRDFMYQMDIQQELQRYISLVGQVYST 2545
souris DTRVTVVIDWLQDILT-----QMKDHFQDTLEDVDRDIYQMDIQRELEHFLSLVNQVYST 2547
poulet DTKLVAIINWLKELIDSTTFTNLKAKVNEHLEDLERISDMDISKFEFWYLQKISQFVNS 2430
Dr_alpha NTRIAEVCRNKIDVIDTTAYKDIKIKIQDIIEDVQRISDMIRNEISVYLERASGAVN 2497
Dr_beta1 KVVVVDVVKKFSDIVDS-----VVFIDTEALIEDLRKILADIDIREIQKFLKHASSISTK 2382
Dr_beta2 ----- 1798

humain LVTYISDWWTAAKNLTDFAEQYSIQDWAKRMKALVEQGFTVPEIKTILGTMPAFEVSLQ 2605
souris LVTYMSDWWTLTAKNITDFAEQYSIQNWAESIKVLVEQGFIQVPEMQTFLWTMPAFVSLR 2607
poulet VVIHISEQWNIAFKKIVTLAEKYDLKNWAENLNQFIETGFKVPEIRTVIVTIPAFVSLR 2490
Dr_alpha MIEVILTQFTQLIDEMKKMAEDKEILDQIS-----QAVEGVFN 2535
Dr_beta1 VVTATDACSVMQVIQNILKDQAVVNELK-----QICDRVKT 2420
Dr_beta2 ----- 1798

humain ALQKATFQTPDFIVPLTDLRIPSVQINFKDLKNIKIPSRFSTPEFTIINTFHIPSEFTID 2664
souris ALQEGNFQTPVFIPLTDLRIPSIKINFKMLKNIKIPSRFSTPEFTIINTFHVHSEFTID 2666
poulet SLREATFRTPDFIVPLTDLKIPSYEINIRRLKDMKIPAKFTTPEFTVLSFKVPSYFTID 2549
Dr_alpha ALKTAEFDVPAFMLFETLEIPAFKIKMARIHDTIPAKMITIPEFTVLDLISLPSITVD 2594
Dr_beta1 VLRTAEEKIPSEIFPLTDLVVPSIKISLKNLQEINLSESLIDLPGFTIILQYYTVPEIRVE 2480
Dr_beta2 ----- 1798

humain FVEMKVKIIRTIDQMNSELQWVPDIYLRDLKVEDIE-LARITLPDFRLPEIAIPEFTI 2723
souris LLETAKAKIIRTIDQILSSELQWLPPEMYLRDLVDVNIPL-LARLTLPDFHVPEITIPPEFTI 2725
poulet LNEIKFQIVRMIDQLISGEFQLEPAIDLYFKDLKMRDMF-FSEISFPELQMPQLEIPELLI 2608
Dr_alpha FEKIKQSIIDFIDKVRQIEMPEVDPEAIFGDLRALYLSLDPDFTFSEITLSEIKFPEINV 2654
Dr_beta1 YADIKQGLLDLLHFIANFEI-MPAVENIFGDLRIVYMEIDISAITLPEISLPEISLPE--I 2537
Dr_beta2 ----- 1798

```

```

humain PTLNINDFQVPDLHIPEFQLPHISHTIEVPTFGKLYSILKIQSPLFTLDANADIGNGPTS 2783
souris PNVNLKDLHVPDLHIPEFQLPHLSHTIEIPAFGKLHSILKIQSPLFTLDANANIQNVPTS 2785
poulet PKLNLNEFQIPDLKIPEFQLPRIPHTVTAPTFGKLSCAFVRVASFPTLSTQAEVHNTTAS 2668
Dr_alpha PKLKLDSFEITMLPIPEVVKFPEIPFEPCLPAFGKLYGEFKVDSFYTYTMTSAAFENTTA 2714
Dr_beta1 PKYISKHKFS-DLTIPEFTLPGVPTEVMVPCFGKLYGEVRVTIPIINMRTTVEFLNSTES 2596
Dr_beta2 -----PASTKSYQLPCFEKMHGEIRFTSPVYSINTSAEFKNV--S 1837
          * * * * *

humain ANEAGIAASITAKGES--KLEVLNDFDQANAQLSNPKINPLALKE SVKFSSKYLRTETGSE 2842
souris GNKAEIVASVTAKGES--QFEALNDFDQAAQFLLELNPHPPVLKESMNFSSKHVRMEHEGE 2844
poulet AN----- 2670
Dr_alpha LKFPQFKATLKSNAKS--SLEFLDYTLDAMLQIEAPKMRKMIISSETVSLSHMAFGTEHEGS 2773
Dr_beta1 AETPQFVGHITSHGSS--EYDLLKYTLDSTARVAMPKMSRVILAE TLKITHSVLAIDHQSS 2655
Dr_beta2 ATHPQFAGVIKSKGISASLEVLNYNIDYTMQISIPEMTPVSVSETLKITHSYLTLD-QSA 1896

humain MLFFGNAIEGKSNTVASLHTEKNTLELSNGVIVKINNQLTLDSTKMFHKLNIPKLDFFS 2902
souris IVFDGKAIEGKSDTVASLHTEKNEVEFNNGMTVKVNNQLTLDSTKMFHKLSVPRLDFSS 2904
poulet ----- 2670
Dr_alpha VVLSGSPSAEATAKTAVKVTTHMYTADLINNIGITLKNGISAYMDTSNNHNLNIPRLDIFSS 2833
Dr_beta1 VSLYGLSAQASSKSTMKITSSYNNANIVNTAFFALAGGISANIKITTYNDKLNADLWNSEY 2715
Dr_beta2 -----SLTLNASITKGPDFSSSLSDTSYKQVNIPLHSLSS 1932

humain QADLRNEIKTLLKAGHIAWTSSGRKSWKWACPR-----FSDEGTHESQISFTIEG 2952
souris KASLNNEIKTLLKAGHIAWTSSGRKSWNWACPN-----FSDEGTHESQISFTVDG 2954
poulet ----- 2670
Dr_alpha QAIITRTAKARFESGTISLTVGTVSGKWSPSNPSRTVKSIDDYSDHITHKSDFEITVNA 2893
Dr_beta1 YYGNDIILKQDGLKLLLTMEEEAKGHISVLEKS-----DDITGKSSSSIIIT 2762
Dr_beta2 EVTLASKAVAVYQNNAAVILKVLNTGIGKFTL-----EDFSDEGTHESDILLFMGL 1983

humain PLTSFGLSNKINSKHIRVNQNLV-YESGS-LNFSKLEIQSQVDSQHVGHSVLTAKGMALF 3010
souris PIAFVGLSNNINGKHIRVIQKLT-YESGF-LNYSKFEVESKVESQHVGSILTANGRALL 3012
poulet ----- 2670
Dr_alpha GTAKLNFDGETNSRNKMKQSVS-AESVILSHIT-IDARAETEAPFLKGSVLTTLKVKAKOM 2951
Dr_beta1 PTFSLIISVDSSSSVSNIKKSI-KADGVALSYVDFT-ASIEGTSDELFLNAAKADL 2820
Dr_beta2 SAAKRLRLKGHTDSALQMEMNVDVDADAVALSYLKFNVFAETKSPFIKKNLLVASENVSI 2043

humain GEGKAEFTGRHDAHLNGKVIGTLKNSLFFSAQPFITASTNNEGKLVRFPLRLTGKIDF 3070
souris KDAKAEFTGRHDAHLNGKVIGTLKNSLFFSAQPFITASTNNEGKLVGFPLKLTGKIDF 3072
poulet ----- 2670
Dr_alpha EDVRMEIEISHSADLIGKVSISNTCDFLAOPFVTLDCRNKGNKSIILPLKLTGKIDL 3011
Dr_beta1 RQMKVEMKADLDTKYAGLLSGTFTSAFNFLVQPFVVLDFKNKANTKLNLVEPLSAKIDL 2880
Dr_beta2 NDMDVKISGNHETEFDCVSVSVLSNTASVIICREIAVEFQNKGNAKTDLYEFLITSVIL 2103

humain LNNYALFLSPSAQASWQVSAARFNQYKYNQNFSAQNNENIMEAHVGINGEANLDFLN--I 3128
souris LNNYALFLSPRAQASWQASTRFNQYKYNQNFSAINNEHNIEASIGMNGDANLDFLN--I 3130
poulet -----SPEFIEAHVEMSGDANLDFLN--I 2692
Dr_alpha QDDFGFTLNSNKQHAFWVGLARFNQYKYKHNLTFDNNENEAGIYTSVDCEANLEFLT--V 3069
Dr_beta1 QNNITVILNSDEQMLSTGLLARFNQYKYSHNFTLANNEDEAGIYAAVNGEANLEFLT--I 2938
Dr_beta2 QNDYTVIVNSDLQEVSTIAVAQINHYKSHNLTANNNAEIGVYAGVNSFGILNNAVQFV 2163
          *

humain PLTIPEMRLP--YTIITTPPLKDFSLWEKTGLKEFLKTKOSFDLSVKAQYKKNKHRHSI 3186
souris PLTIPEINLP--YTEFKTPPLKDFSIWEETGLKEFLKTKOSFDLSVKAQYKKNKSDKHSI 3188
poulet PLTIPEQLHIP--YTGITPQLKDYSLWEQAGLKNLTKTROSFDLNLNAQYKKNKDMHVI 2750
Dr_alpha PISITPEIPIP--YLGITPKINEFSEFWEDYRLKDLITTPKOTIDIDFKLLYQKNPEKHTF 3127
Dr_beta1 PFSITPAMELETTLMVIEIPEISNINLYEQTGLKHVLTDFDQAI DVDAKMVYQKN----- 2992
Dr_beta2 PFVFEKAVVE--Y-----LKD-----ESGIWHDFTTNNOATDINAKLVYQKTTTVLIG- 2208
          * * * * *

```

humain TNPIAVLCEFISQSIKSFDRHFEKNNALDFVTKSYNETKIKFDKYKAEKSHDELPRTF 3246
souris VVPLGMFYEFILNNVNSWDRKFEKVRNNALHFLTTSYNEAKIKVDKYKTENSLNQPSGTF 3248
poulet PLPIATVHEALNKYIIFFNKYFERGNTALDFLTKSYNEAKTKFDKYKIQTSLNKLPRTF 2810
Dr_alpha DLNLEPIYEAFFNENAKILRLHFEELGFDHIFDALINSYNQARIQHEKYKIDTSN-HPPRYF 3186
Dr_beta1 ----- 2992
Dr_beta2 ----- 2208

humain QIPGYTVPVVNVEVSPFTIEMSAFGYVFPKAVSMPSFSLGSDVRVPSYTLILPSELELPV 3306
souris QNHGYTIPVVNIEVSPFAVETLASSHVIPTAISTPSVTIPGPNIMVPSYKLVLPPELELPV 3308
poulet RIPGYTIPIVNIEVSPFAEMPAFGYVLPKEISTTGFTVPFIGFSVPSYTLVLPSELELPV 2870
Dr_alpha TVPGYTIPILNIEVSAFRAELPAFGYFIPKEVSTPSFKTPLLGFVPSYTLVLPSELELPV 3246
Dr_beta1 ----- 2992
Dr_beta2 ----- 2208

humain LHVFRNLKLSLPHKELCTISHLFIIPAMGNITYDFSKSSVITLNTNAELFNQSDIWAH 3365
souris FHGGGNLKFFFLPDEKGFNTIDNIYIPAMGNITYDFSKSSVITLNTNAGLYNQSDIWAH 3368
poulet LHVQDLRTLKLPFRINSPSNQILIPAMGNITYDFSKSSVITLTANAGLFNQSDIAGH 2930
Dr_alpha LHVETLRDLTLETTIPDIQNNMIPAFGNLTYEFSIKSPVLSLNSNGGLYNHSDMVIK 3306
Dr_beta1 -----DLTSELSEKSSIFNLNANAGFYQKDNPIR 3022
Dr_beta2 -----DSDGLAVVVEISLGNLVSEVSTSSILNLANAGVYP-DIYLMR 2250

B

humain LLSSSSVVIDALQYKLEGTTRLTRKRGLKLATALSLISN-KFVEGSHNSTVSLTTK--NME 3422
souris FLSSSFVTDALQYKLEGTSRLMRKRGLKLATAVSLTN-KFVKGSHDSTISLTKK--NME 3425
poulet LSISSSVVIDALQFKLDGSTSLTRKRGLKLATALSLNNKFLGGSHDNSISLTKK--NLE 2988
Dr_alpha FVSSSTSVFVLDKGLDGSATINKRGLKMATSLSI VH-MCAECSEHSTVSLTKR--NME 3363
Dr_beta1 FGVITASEFESLAKLEGTSSLSLTKSGFKLANSLLLEN-RHIEGTHESTATMNLNNFEVT 3081
Dr_beta2 ISGTATSAFQQLRAKLYGATIIITTESGLKLASTLFDN-SQIGGTHNSVTLQDN-YEVV 2308

humain VSVAKTTKAEIPILRMNFKQELNGNTKSKPTVSSMEFKYDFNSSMLYSTAKGAVDHKIS 3482
souris ASVRTTANLHAPIFSMNFKQELNGNTKSKPTVSSSIELNYDFNSSKLHSTATGGIDHKFS 3485
poulet ASMMTNAKINTPVFKMNFQELSNTKSKPTISSGLKVTYDFTTPKHGISAKGGVAHKLA 3048
Dr_alpha ASLTNLAKIKCFVLMMDLNOVLRGNTKSKPNIASNIKVSYSYDLPIIETQGTGSIDHFA 3423
Dr_beta1 LSMATDAKMNLPILTANANHQLTADNKANPKADSTFKMDYNFDVPIIKLVGKGAETLIK 3141
Dr_beta2 LVSDTIKINLTLFSIEADHQLSADTKTHLKALESNLKIKYSFDHP--DSRGGDAENTLK 2366

humain LESLTSYFSIESSTKGDVKGSVLS-REYSGTIASLANTYLNKSTRSSVKLQGTSKID-- 3539
souris LESLTSYFSIESFTKGNIKSSFLS-QEYSGSVANEANVYLNKSTRSSVRLQGASKVD-- 3542
poulet LETLTSYLSVETSTKGNIDGAIYTGNSFSGALDHEANTYLHANGVRSLSKLEANSKVD-- 3106
Dr_alpha LEALSSYISLESAWKGTDDSTIMESGNLAASLNNEVTIYLNANGLRSLTKTDVNSKV-YH 3482
Dr_beta1 GEGTRTFISAETLIKSNIDGTFDRGILKGTNLNYDESLYVNGNSLRYALKTGNGDLNYG 3201
Dr_beta2 MNAYLSLITVESLTSQVTTNSTLPLDGGALKGTLSDANISVNVAGLKNVVKASANGYYDYR 2426

humain ---DIWNLEVKENFAGEATLQRIYSLWEHSTKNHLQLEGLFFTINGEHTSKATLELSPWQM 3596
souris ---GIWNVEVGENFAGEATLQRIYTTWEHNMKNHLQVYSYFFTKGKQTCRATLELSPWTM 3599
poulet ---GLWNSEMKEILAVEASTSRVYAVWEHNGKNFARYTPLFTTTGSQKCKATFELAPWTV 3164
Dr_alpha QKACSWNIDVTKNLALEASLRRIYATMAYTS-SNAASIASFSTNGKQNV RATLEFVPLTT 3541
Dr_beta1 --DFKVAFDVDENLSVETANEHVYATMKFTS--NNEANVGSFNTKGVHSSQATLDMALKS 3258
Dr_beta2 --NNKLSFDMNDQVILEGNFNRIHYLLDIDS-NYTHKYRREEVAVKHTAHGKTTIIMST 2483

humain -SALVQVHASQESSFHDFPDLGQEVANANTKNQKIRWKNEVRIHSGSFQSQVELSNDQE 3655
souris -SLLQVHVSQLSSLLDLHHFDQEVILKANTKNQKISWKGQVQVESRVLQHNAQFVSNDE 3658
poulet -SADLQIQVTFNSFLDTASVNVQVLMKVSPTDQKVGWKGEGQIQSLSLRHDMQLSNEKS 3223
Dr_alpha LSANLDIDISQPTNYGHAGIVENI-DLSITSDKQRFVLSGKEQLATLIHSADLILSNVTS 3600
Dr_beta1 LVAIDMKIDLQPSSTFGELSIFETM-KVDLSAPKQKI----- 3293
Dr_beta2 FMAAVDFFLTQPDHDDFEHRGEG----- 2506

humain	KAHLDIAGSLECHLRFKNIILPVDYKSLWDFLKLDTTTSIGRRQHLRVSTAFVYTKNPN	3715
souris	EIRLDLAGSLDGLWDLLEAIFLPVYGKSLQELLQMDG-----KRQYLQASTSLLYTKNPN	3713
poulet	NAKFDISGSLECYMDFLKRINCAISKSLWDILKLDVTTVADRKHLYLNASASFIYRKSD	3283
Dr_alpha	EIRVEMSESVEGKVAFLKSIKLPVYQKSLWDIFKFGVSSSTGELQFFNVSTVVIYTKSME	3660
Dr_beta1	-----	3293
Dr_beta2	-----	2506
humain	GYSFSIPVKVLAD--KFIITPGLKLN-----LNSVLV	3745
souris	CYLLSLPVQELAD--RFIIPGIKLN-----	3736
poulet	CYFFMPVIRLSDGFTFSIPELHLKAP-----SPVLS	3315
Dr_alpha	GTLFAIPTKLFENGVSFNIPQITFGVPDLFKTIPQMIREVDMRFEEPDLPDYISIPPVIT	3720
Dr_beta1	-----	3293
Dr_beta2	-----	2506
humain	MPTFHVPFDTLQVPSCKLDFREIQIYKRLRTSSFALNIPTLPEVKFEEVDVLTQYSQPED	3805
souris	-----DFSGVKIYKRLSTSPFALNITMLPKVKFFGIDLLTQYSTPEG	3778
poulet	TPEFRVPFSTLQVPAYTIDLNRNIKIPQTLNIMPEDVNIPTLPKLRFFRVDVGANYITLEE	3375
Dr_alpha	IPEFSIPFTTLHVPTFVIDLTNLEVPNEISTPSFDIMIPGLPKVELSINARTKYLK---	3777
Dr_beta1	-----	3293
Dr_beta2	-----	2506
humain	SLIPFFEITVPESQLIVSQFTLPKSVSDGIAALDINAVANKIADFELEPTIIVPEQTEIEP	3865
souris	SSVPIFEATIEIHLIVSQFTLPKSLPVGNTVFDLNKLANMIADVDLPSVTLPEQTIIVIP	3838
poulet	YKIPLYEVTVPYEQITVSQFTLPKSIISLGSFHVDLDEVANKIADFDLPTITIPPEQTEIEP	3435
Dr_alpha	DKMAHLFVSLPQYETIISPENLPKAFDIGDYPIRIDDITNTLYHFELPTIIPPEQTEIDVE	3837
Dr_beta1	-----	3293
Dr_beta2	-----	2506
humain	SIKFSVPAGIVIPSPQALITARFEVDSFVYNATWSASLKNKA-----DYVETV	3912
souris	PLEFSVPAGIFIFPFGELTARAGMASFLYNVTWSAGWKTKA-----DHVETF	3885
poulet	PLKVSLPAGIYIPSPGALTGSLKVASFLYNVTWRDLDLNKK-----ESFEVS	3482
Dr_alpha	EISLHLFAGVFLKFGDLSATFKMASFIYNNNTWTGNVENTE-----AGTVCT	3884
Dr_beta1	-----DILSTIK--SEVYTTDVRAKLDG--YKTV	3322
Dr_beta2	-----FGYINKT--SLYNGQIYSRWFNSSTAISVESDNDSPDRKFLLE	2547
humain	LDSFGSSTVQFLEYELNVLGTHKIDGTLASKTKGTLAHRDFSAEYEDGKFEGLQEWEG	3972
souris	LDSMCTSTLQFLEYALKVVETHKIEFDLLTYNIKGTLQHCDFNVEYNEDGLFKGLWDWQG	3945
poulet	IDSTFGSSTLQFLEYDINVVSNYKYEEGKFKVKTVGSFAHRDLSANYIEDLALQGFQTVEN	3542
Dr_alpha	LKSTCTSTMVFLYENLDAIATILLENALGLDAKSTFNHRDMNINWKHLRQNLRMKRDE	3944
Dr_beta1	LKASATSPVVRLOVDLSSMSSTMENALVVGANAVLTHQDFTMDISNAIRMSERS----	3378
Dr_beta2	CSFNFTAPSVLVESELSRISIPIKIDDDY-----	2577
humain	-----KAHLNPKSPAFDLDHLRYQKDKKGLSTSAASPAVGTVMMDDEDDDFSKWN	4023
souris	-----EAHLDTSPALTDHFHLYYKEDKTSLSAASSTIGTVGLDSSSTDDQSVELN	3996
poulet	-----TASLIVISPTFADVHVRYQMTDNMISSTVSSPSAGILGFLVQIETDTLKE-	3592
Dr_alpha	SSVSRPSRHTLGIIDIASQTFSDVSFRYASHNNGITSSVSSPAAGFICFQFTRRSPSQFYA	4004
Dr_beta1	-----HILNVDITSQTFEDVNLRYAARSDBGISGSVSTPGSGLLGFQLQGNIPSQMNA	3430
Dr_beta2	-----	2577
humain	-FYSPQSSPDKLTIKFKTEL RVRESDEETQIKVNWEEEAASGLLTSKDNVPKATGVLY	4082
souris	-VYFHPQSPPEKKLSIFKTEWRYKESDGERYIKINWEEEAASRLLGSLKSNVPKASKAIY	4055
poulet	KFYRRTLAPQKIDILKSEISFRNSDIIQIKLNWKEDAADKLLGLKEKVPKMTSAVY	3651
Dr_alpha	KLFSRYLSTSDKDTDLLSLKMTLKNSEKLSVQVGYHFSGLSDMINGLKDRLPSILALQ	4063
Dr_beta1	RLCRYAFAPDDDDVDILSVRAVPKG-LEKVLVLTG-NIKAAQSMFEGLMNTLEKISFKLA	3488
Dr_beta2	-----	2577

```

humain    DYNKYYHWEHTGLTLREVSSKLRRLQNNAEWVYQGAIRQIDDDIDVRFQKAASGTTGTYQ 4142
souris    DYANKYHLEYVSSELRKSLQVNAEHAR-----RMVDEMMSFQRVAR----- 4097
poulet    KCVNRYKYKEHMGLDISDATVIMKNILQNNADKAYMFAARQVDQMDVQLRTAANEASEKYQ 3711
Dr_alpha  KFINQYHIDHLGMDINRAALKLKNALSNNGIDKAYLEIPRMFDATHTSFEQVKQHG---- 4118
Dr_beta1  GLAREYGLAFP----IFVADDVYGVISNGLSAARRATP-GVSELSQLERNVVV----- 3536
Dr_beta2  ----- 2577

humain    EWKDKAQONLYQELLTQEQASFOGLKDNVDFGLVRVTQKFHMKVKHLLDLSLIDFNFPRF 4202
souris    ---DTYQONLYEEMLAQKSLSPENLKKRVLDIVHVTQKYHMVMMWMSFIHFLKFNRV 4154
poulet    EMVKARQLYKRAEQAEQIDYQRIKARLLDATVDLMEEYHSKIRHLLDSVIEFLKTKF 3771
Dr_alpha  -----NKMWRKMLESFPQDDLQEFRRFFSSANEFIRTYESNMRAALLAALKFLRNTKF 4172
Dr_beta1  -----TSQKTIQVLLIDNALVVLVKEISQ 3558
Dr_beta2  ----- 2577

humain    Q-FPGKPGIYTRREELCTMFIREVGTVLSQVYSKVHNGSEILFSYFQ-----DLVI 4251
souris    Q-FPGYAGTYTVDELYTIVMKETKKSLSQLF----NGLGNLLSYVQNQVEKSRLINDITF 4209
poulet    Q-IPGLSEKYTGEEYLMATEKAAKTAD-----ICLSKLQEYFD---ALIAAINELEV 3820
Dr_alpha  H-LPGLLEEKLTGQELYNKFREYVSKAIDRVTTFRFYSLMEAIVD-----TISGHINKVEF 4225
Dr_beta1  YKLPGMNEA-TLAEICCKKIQLVVVEML-RNF-----GNNLEVYF----- 3595
Dr_beta2  ----- 2577

humain    TLFELRKHKLIDVISMYRELLKDLKSKEAQEVFKAIQSLKTTEVLRNLQDLLQFIFQLIE 4311
souris    KCFFSKPKCKLKDILIFREELNILSNIGQ-----QDIKFTTILSSIQGFLERVLDIE 4263
poulet    RVFASETILRGRNVLDQIKEMLKHLQEKIRQTFVTLQEADFAGKLNQIKQVVQKTFQKAG 3880
Dr_alpha  TLFGTTEVISGKKILKDLRSAMKSAKDTIMQAMEEWEKLRSEEVFEDIMNYLKVYTQRAE 4285
Dr_beta1  -SIFMDNFN-----TIQLTFPNGKVMTVAE 3619
Dr_beta2  ----- 2577

humain    DNIKQIKEMKFTYLINYIQDEINTIFNDYIPYVFKL--LKENLCLNLHKFNEFIQNELQE 4369
souris    EQIKCKLKN----ESTCVADHINMVFKIQVPYAFKS--LREDIYFVLGEFNDFLQSILOE 4317
poulet    NMVRSLSQSKNF--EDIKVQMQLYKDAMASDYAHKLRSLAENVKKYISQMKNFSQKTLQK 3938
Dr_alpha  DFLNSLKTEK--LEEISSRVSGIYKEAGNLEVMMKIREWMKEAKIGLTELKDESKGVVQE 4343
Dr_beta1  -FQQNVQSIL--RSNLVMIADAMKQIESPDVVLKLLGQTLQEVVEKQGEFVDKMNLSLLE 3676
Dr_beta2  ----- 2577

humain    ASQELQQIHQYIMALREEYFDPSIVGWTVKYYELEEKIVSLIKNLLVALKDFHSEYIVSA 4429
souris    GSYKLQQVHQYMKALREEYFDPSMVGWTVKYYEIEENMVELIKTLLVSFRDVYSEYSVTA 4377
poulet    VSENLQQLVLYIKALREEYFDPTTLGWSVKYYEVEDKVLGLLKNLMDTLVIWYNEYAKDL 3998
Dr_alpha  LYNQMSMEKLNKLNLDLLMAVESYIDSLFKSYLAFMKSLSYTEPYVRVSNKKTVDV DPL 4403
Dr_beta1  D-IAAAINTFYQELMKIIEDISEAVIFGFSIPAikiYEISQNIgKVLNANNGIHQFELPL 3735
Dr_beta2  ----- 2577

humain    SNFTSQQSSQVEQFLHRNIQEYLSILTPDPGKGEKIAELSATAQEIIKSQAIATKKIIS 4489
souris    ADFASKMSTQVEQFVSRDIREYLSMLTDINGKWMKIAELSIVAKE TMKSWVTAVAKIMS 4437
poulet    SDLVTRLTDQVRELVENYRQEYYDLITDVEGKGRQKVMELSSAAQEKIRYWSAVAKRKIN 4058
Dr_alpha  PFYWKSFSSEWPSMA----- 4412
Dr_beta1  PFFQ----- 3739
Dr_beta2  ----- 2577

humain    DYHQQFRYKQLQDFSDQLSDYIEKFAESKRLIDLSIQNYHTFLIYITELLKQLQSTVMN 4549
souris    DYPQQFHSNLQDFSDQLSSYIEKFGESTRLIDLSIQNYHVFLRYITELLRKLQVATANN 4497
poulet    EHNQVQKAKLQEIYQQLSDSQEKLINVAKMLIDLTVKEYSTFMKYIFELLRWFEQATADS 4118
Dr_alpha  ----- 4412
Dr_beta1  ----- 3739
Dr_beta2  ----- 2577

```


humain	--PVMKLAGELTIIL-----	4563
souris	VSPYIKLAQGELMITF-----	4513
poulet	IKPYIAVREGELRIDVPFDWEYINQMPQKSREALRNKVELTRALIQQGVEQGTRKWEEMQ	4178
Dr_alpha	-----	4412
Dr_beta1	-----	3739
Dr_beta2	-----	2577

humain	-----	4563
souris	-----	4513
poulet	AFIDEQLATEQLSFQQIVENIQKRMKT	4204
Dr_alpha	-----	4412
Dr_beta1	-----	3739
Dr_beta2	-----	2577

Annexe 8 : Alignement des séquences protéiques des apoB de vertébrés.

L'alignement des séquences d'apoB de vertébrés a été réalisé avec le programme ClustalW et réajusté manuellement. Les numéros d'accèsion des séquences sont [NP_000375](#) pour l'apoB humaine (Hum_apoB), [XP_137955](#) pour l'apoB de souris (Mou_apoB), [XP_419979](#) pour l'apoB de poulet (Chi_apoB), [xenopus|TC227219](#), [xenopus|TC220865](#) et [xenopus|TC220409](#) pour l'apoB de *Xenopus laevis* (Xen_apoB), [r_trout|TC54764](#) pour l'apoB α 1 de truite (Tro_apoB α 1), [r_trout|TC46671](#) pour l'apoB β de truite (Tro_apoB β), [fugu|TC1583](#) pour l'apoB α de *Fugu* (Fug_apoB α), [CAA57449.1](#) pour l'apoB de saumon (Sal_apoB β), [CAG03661](#) pour l'apoB β de tétraodon (Tet_apoB β), [zfish|TC238656](#) pour l'apoB α de poisson zèbre (Zeb_apoB α), [zfish|TC238656](#) pour l'apoB β 1 de poisson zèbre (Zeb_apoB β 1), [zfish|TC253856](#) pour l'apoB β 2 de poisson zèbre (Zeb_apoB β 2) et [SINFRUT00000170294](#) pour l'apoB β de *Fugu* (Fug_apoB β). Les séquences d'anguille (Eel_apoB α 1 et Eel_apoB α 2) et la séquence apoB α 2 de truite (Tro_apoB α 2) sont indiquées bien qu'elles ne soient pas encore déposées dans la base de donnée Genbank. Les positions conservées dans au moins 8 de ces séquences sont surlignées en gris. Les régions A et B du domaine de liaison au récepteur aux LDL sont indiquées comme décrit par Babin *et al.* (1997). Les substitutions conservatives utilisées sont : A, G; S, T; E, D; R, K, H; Q, N; V, I, L, M; Y, F; W; P; C.

Hum_apoB	NQYKYNQNE SAGNNENIMEAHVGINGEANLDFINIPLTIPEMRLBYTI--ITTEPLKDFS	3152
Mou_apoB	NQYKYNQNE SAINNEHNIEASIGMNGDANLDFINIPLTIPENLBYTE--FKTEPLLKDFS	3155
Chi_apoB	TQAEVHNTTASANSPEFIEAHVEMSGDANLDFINIPLTIPQLHIFYTG--IQTFQLKDYS	2718
Xen_apoB	NQYKVSHHTISVGNNEESIEAMVAMNGEANLDFITIPISIPEMQVFIYS--VNTPEVRDFS	84
Zeb_apoB α	NQYKYKHNLTFDNNENEAGIYTSVDCEANLEFITVPIISIPPIPIYLG--IKTEPKINEFS	3059
Fug_apoB α	NQYKYSHYFTMDNGEREITFLTRMNGEANLDVILKELITIPEMRLPFAG--IKTEPKVEDFS	363
Tro_apoB α 2	NQYKYSHYFTMDNGEQEVHVFAQINGEVNLDALKEPISIPKRAVEFIFIG--R-----TEFS	97
Tro_apoB α 1YLR--LKTPHIQELS	13
Eel_apoB α 2	--YKYSHRFTMDNNKNVIALYTAMNGEANLDFINIPITIPMTVELID--MKTEPVVEEFS	56
Eel_apoB α 1	--YKYFHNFKVDNKNQNTGIYAAMNGEANLDFITVPLTIPMDVBYTD--MKTEPILEFS	56
Sal_apoB β	NQYKYSYNFTVDNNEKEAGIFATVNSEANLEFLTTPISIPPIKLSFLN--MRTEPAINDLN	418
Zeb_apoB β 1	NQYKYSHNFTLANNEDDEAGIYAAMNGEANLEFLTTPFSIPAMELETLTMTVIEIPEISNIN	747
Fug_apoB β	NQYKAFYNFTVDNNEQAGVFVVMSEADLDFLRTPINIPNFDLPPFVD--FRTEPSVSDLN	417
Tro_apoB β	NQYKYSYNFTIDNNKKEAGIFATVNSEANLEFLTTPISIPPIELLSFLN--MRTEPAINDLN	325
Tet_apoB β	NQYKAFYNLTADNNEQAGVFVVMSEADLETLRIPVDIPISIALPPFVD--FRTEAVTNLN	2367
Zeb_apoB β 2	NHYKYSHNLTANNNAEIGVYAGVNSFGILN-----NAVQFVPEV---FKK-AVVEY-	182

	A	
Hum_apoB	LWEK TGLKEFLKTTKQSFDLSVKAQYKKNKHRHSITNPLAVLCEFIISQ----SIKSFDRH	3208
Mou_apoB	IWEETGLKEFLKTTKQSFDLSVKAQYKKNSDKHSIVVPLGMFYEFILN----NVNSWDRK	3211
Chi_apoB	LWEQAGLKNLKTTRQSFDLNLNAQYKKNKDMHVIPLPLATVHEALNK----YIIFFNKY	2774
Xen_apoB	LWEQAGLKKLLTTTKQNVLDLVKLYQYKKNMDVHSIQPLPLDSLSDSINANMKILSKKFEKK	144
Zeb_apoB α	FWEDYRLKDLLTTPKQTIIDILFKLLYQKNPEKHTFDLNLNLEPIYEAFFNE----NAKILRLH	3115
Fug_apoB α	LWTD TGLSCLTTPQOTFDMNSKLYLKNPEVITIDLNMEPLVNAINT----NVKTLHKK	419
Tro_apoB α 2	LWED TGLSVLLTTPQOTFDMTKLYKKNPEMITIGIDMDPIFNAINK----HTRSLNKN	153
Tro_apoB α 1	LWEHAGLKELLTTPROSFEMNLKLYQYKKNPDMHTIAYDLQPFYNAISN----LDIFRAH	69
Eel_apoB α 2	LWED TGLKSLTATQOSFDLNFKLYQYKKNPEMYNININMEPVYKAIIDV----SAKIINQN	112
Eel_apoB α 1	LWED TGLKNLSTTRQSFDMLFKLYLKNPDSHTIGFDLEPIYGAINE----NAKVLNAN	112
Sal_apoB β	LYEHTGLKNLTTTTEQSLDLSKILYQKLSQ-FHS-----	451

Zeb_apoBβ1 LYEQTGLKHVLTDFDQAI DVAKMVYQK----- 775
 Fug_apoBβ VFEQTGLRNILGTTEQVNI DAKVVYQKSQE----- 448
 Tro_apoBβ LYEHTGLKNILTTTEQSLDVPKILYQKGG-FYS----- 358
 Tet_apoBβ LYDLTGLRNILKTTEQVNV DAKVVYQKSQE----- 2398
 Zeb_apoBβ2 LKDESGIWHDFTTNNOAT DLNAKLVYQKTTTVLG----- 216

Hum_apoB FEKNRNNALDFVTKSYNETKIKFDKYKAEKSHDELPRTFQIPGYTVPVNVNIEVSPFTIEM 3268
 Mou_apoB FEKVRNNALHFLTTSYNEAKIKVDKYKTENSLNQPSGTFQNHGYTIPVNVNIEVSPFAVET 3271
 Chi_apoB FERGRNTALDFLTKSYNEAKTKFDKYKIQTSLNKLPRTRFIPGYTIPVNVNIEVSPFTAEM 2834
 Xen_apoB FEKGRDSTLKLMDSYNEAKAKFDKYKVANSVGKAPRTL RVPGYTIPLLNIEVSPFSAEL 204
 Zeb_apoBα FELGRDHIFDALTNSYNQARIQHEKYKIDTSN-HPPRYFTVPGYTIPILNIEVSAFRAEL 3174
 Fug_apoBα MLIGKDKAAAMMAESYNRAKAEYEKYSI-----ELPNTITVPAVRVPGMNVEVSTFTIPV 474
 Tro_apoBα2 MIVGRDKAVAILSTSFDOAKAEYEKYNI-----ELPKTLTVPAHIVPVLNIEVSGFTIPV 208
 Tro_apoBα1 FELGRNKLVLNLLTTSYNEAKTHFDKYKIDTSN-QPFRFVTVPGYKIPILHIEVSEFRAEL 128
 Eel_apoBα2 FVLGRDIAVALVTSSYIQAEQYEFKIDTSN-SLHRRFTIPGYTVP LLNIDVAPFAEL 171
 Eel_apoBα1 FELARDKAFSLLTESYNQAKAQFEKFRIDTTD-QPFRIFTIPGYTVPILDIEVSPFAEL 171
 Sal_apoBβ ----- 451
 Zeb_apoBβ1 ----- 775
 Fug_apoBβ ----- 448
 Tro_apoBβ ----- 358
 Tet_apoBβ ----- 2398
 Zeb_apoBβ2 ----- 216

Hum_apoB SAFGYVFPKAVSMPSFSILGSDVRVPSYTLILP SLELPVLHVPENL-KLSLPHFKELECTI 3327
 Mou_apoB LASSHVIPTAISTPSVTIPGNIMVPSYKLVLP PLELPVFFHGPGLNLFKFFLPDFKGFNTI 3331
 Chi_apoB PAFGYVLPKEISTTGFTVPFIFGFSVPSYTLVLP SLELPVLHVPQDLRTIKLPRFRINSPS 2894
 Xen_apoB PAFGYVLPKEVRTPSFRLPVIGFSIPTTYTVVLP SLELPVLHVVENTLRKLTLPKLLPSGP 264
 Zeb_apoBα PAFGYFIPKEVSTPSFKTPLLGFVPSYTLVLP SLALPVLHVPELDRDLTLPFTTIPDIQ 3234
 Fug_apoBα PDESLVT-----VPSLYIP SALS KLTIPKITLPKVT 505
 Tro_apoBα2 PDESLIT-----MPTMHVPSALS KLTLPKITLPKMQ 239
 Tro_apoBα1 PAFGFFIPKEVSTPGFKVPTMGFSVPSYTLVLP SLELPVLHVPETLSELTLP SFTLPAIQ 188
 Eel_apoBα2 PALS FVIPKEIRTPSFVKVPIVGFVPSYIILVLP IQLPVIHVPVTLNLTLP SLLTLP TIQ 231
 Eel_apoBα1 PAFSFLIPKEVSTPSFRVPMMGFSVPSYTLVLP AMTLPVLHVPELDRDLTLPFTTLP TTQ 231
 Sal_apoBβ ----- 451
 Zeb_apoBβ1 ----- 775
 Fug_apoBβ -----APLADVM 455
 Tro_apoBβ ----- 358
 Tet_apoBβ -----APLAVFG 2405
 Zeb_apoBβ2 -----DSDG 220

Hum_apoB SHIFIPAMGNITYDFSFKSSVITLNTNAELFNQSDIVAHLLSSSSVIDALQYKLEGTTTR 3387
 Mou_apoB DNIYIPAMGNFTYDFSFKSSVITLNTNAGLYNQSDIVAHFLSSSSSFTVDALQYKLEGTSR 3391
 Chi_apoB NQLLIPAMGNITYDFSFKSSVITLTANAGLFNQSDIAGHLSISSSSVIDALQFKLDGSTS 2954
 Xen_apoB HTISIPAMGNLTYDFSFKSNVSLTTSAGLYNQSDISARISVASTSIIDALQFTIDGTTG 324
 Zeb_apoBα NNIMIPAFGNLTYEFSIKSPVLSLNSNGGLYNHSDMVIKFDVSSTSVFDVLEKGLDG SAT 3294
 Fug_apoBα S-IRIPVLGDLTYEFD MKTAMIALKT DASLLNQLKLVKLDASSTSEFNLLNGKIEASTS 564
 Tro_apoBα2 SNIMIPIFGDLTYEFSMKTAVLTVKANAAVLNQDDIIVRFDASSTSEFDALKKIDG SAT 299
 Tro_apoBα1 NNIMIPAMGNMTCDFSFKSTVITLTANVGLYNQSDIVARFGASSTSMFDILKGLDGSTS 248
 Eel_apoBα2 NRIMIPAMGNMTEYFSFKSAVLTLSNAGLYNHDDIVAQFGVTSTSVFEILKSKLDGTST 291
 Eel_apoBα1 NTIMIPAMGNMTEYFSFKSVITLNLNAGVFNHSDIVARFAASTSEFDILKGLDATTG 291
 Sal_apoBβ -----LGNLIAELSLKSPIFNLNANAGLYTEDDLVFRIGATTASIFEALKSKLDGTSS 504
 Zeb_apoBβ1 -----NDLTSELSFKSIFNLNANAGFYQKDNPVIRFGVITASEFESLAKLEGTS 827
 Fug_apoBβ GVIQIPVSGDLTTELSFKSAIVNLNVIAAMTKDDLIIIRLGGTSSGDFDNGKLDGTSS 515
 Tro_apoBβ -----LGNLITELSLKSPIFNLNANAGLYTEDDVVFRIGATTASVFEALKVKLDGTSS 411
 Tet_apoBβ -MIQIPAVGNLITELSFKSAIHLNVNAGMYTEDDLLIRLKGSTSSDFDINAKLDGTTSS 2464
 Zeb_apoBβ2 LAVVVPSLGNLVSEVSSTSSILNLNANAGVVP-DDYLMRISGTATSAFQQLRAKLYGATI 279

B

Hum_apoB LTRKRGLKLATALSLSN-KFVREGSHNSTVSLTKK--NMEVSVAKTTKAEIPIIRMNFKQE 3444
Mou_apoB LMRKRGLKLATAVSLTN-KFVKGSHDSTISLTKK--NMEASVRTANLHAPIFSMNFKQE 3448
Chi_apoB LTRKRGLKLATALSLNKKFLGGSHDNSISLTKK--NLEASMMTNAKINTPVFKMNFSE 3012
Xen_apoB LTRKRGLKLATALAVKT-AFDGKHESSMSLGKR--NIEASVLTNAKISLPILQITLKE 381
Zeb_apoBa INKRRGLKMATSLSLVH-MCAECSHESTVSLTKR--NMEASLTNLAKIKCPVIMMDLNQV 3351
Fug_apoBa LDKLGGFKMVSLVAAKH-SLLEGKHDSTIVLNFE--DVATAIANSKINLFRQSVFIYQE 621
Tro_apoBa2 LNRNNGKLKASIIINLEA-MYVEGSHDSTISLNSD--GMDASITNTA----TLWTLVNOE 352
Tro_apoBa1 LTRSRLGLKLATALSWEH-KNIEGSHDCTVSLSKR--NMEAILATVARVNLPPVSLLELSE 305
Eel_apoBa2 LTTKRGLKIVITMSLEH-TNVQGTHESTIALNPK--GMETVMENYGMIMLPTKTLEFDOK 348
Eel_apoBa1 LTKKRGLKLATAISIDH-KNIEGTHDSTISLART--SIEASVATAKLKLPLVHIDFNQE 348
Sal_apoBβ LTTKRGLKLATSLLEN-PHIEGNHDSTISLNTDRLEAAVSVATIAKITLPIFNLEANQO 563
Zeb_apoBβ1 LSTKSGFKLANSLLLEN-RHIEGTHESTATMNLNNFEVTLSMATDAKMNLPIITANANHQ 886
Fug_apoBβ LSTKRGLMLANSVLEN-NHIEGTHEGTFVNTETFDTTASVTTVAKIALPVLISLEGTON 574
Tro_apoBβ LTTKRGLKLATSLLEN-PHIEGNHDSTISLNTDNLEAAVSVATGAKIALPIINLEVSQO 470
Tet_apoBβ LSTARAVKLASSVLEN-NHIEGTHESTFVLSPELDTAASITTAAKIALPVLIMLEANQH 2523
Zeb_apoBβ2 ITTESGLKLASTLFLDN-SQIIGGTHNSSVTLQDN-YEVVLVSDIIAKINLTFISIEADHQ 337

Hum_apoB LINGNTKSKPTVSSSMEFKYDFNSSMLYSTAKGAVDHLKLSLESLTSYFSIESSTKGDVKGS 3504
Mou_apoB LINGNTKSKPTVSSSIELNYDFNSSKLHSTATGGIDHKFSLLESLTSYFSIESFTKGNIKSS 3508
Chi_apoB LSGNTKSKPTISSGLKVTYDFTTEKHGISAKGGVAHKLALETTLTSYLSVETSFKGNIDGA 3072
Xen_apoB LINGNTKTKPTVSSKIIILNYDLNDSLNRNNARGTIDHTLTIESLTSYFSMETKLYGDIIVGT 441
Zeb_apoBa LRGNTKSKPNIASNIKVSYSYDLHIIETQGTSIDHNFALALSSYISLESARKGTTDST 3411
Fug_apoBa MTASPE----- 627
Tro_apoBa2 VFGNAQ----- 358
Tro_apoBa1 LLGNTKTKPNVASKIKLKYMLNMLIEAVGKNIDQNLALEGLTSYVSLETSFKGKTDIT 365
Eel_apoBa2 LTGNSK----- 354
Eel_apoBa1 LLGTTKTKPNVASKLKLKYSFDLFLIDVTGKGNIEQNLALEGLSSYISLETSFKGNIDGR 408
Sal_apoBβ LVADTKTKPNAASTLKLKGFDFNPLLIKAIGKAEADHSLKLEGTLEYISVESSEIKGNIDGT 623
Zeb_apoBβ1 LTADNKANPKADSTFKMDYDFDVPPIIKLVGKNAETILKGGTRTFISAETLTKSNIDGT 946
Fug_apoBβ FVADTRTKANTLSTFTTIKGFDFNIPVIKAVGKANAHYSLKLEGTLDRVSMESARASLNAT 634
Tro_apoBβ LVADTKTKPNAASTLKLKGFDFNPLIKTIKAEADHSLKLEGTLEYISVESSEIQGTIDGI 530
Tet_apoBβ FVVDTKTKTPASTFTVNSEFDIPVIKAVGKADAYCKVLEALDYVSVASETRASVNGT 2583
Zeb_apoBβ2 LSADTKTHLKALSNLKIKYSIDHP--DSRGGDAENTLKMNAYLSITVESSTQVTTNST 395

Hum_apoB VLS-REYSGTIASEANTYLNLSKSTRSSVQLQGTSKID----DIWNLEVKENFAGEATLQR 3559
Mou_apoB FLS-QEYSGSVANEANVYLNLSKSTRSSVRLQGASKVD----GIWNVEVGENFAGEATLQR 3563
Chi_apoB IYTGNSFSGALDHEANTYLHANGVRSSLKLEANSKVD----GLWNSEMKEILAVEASTSR 3128
Xen_apoB LLAHQGFSGKFTNEANTYLNLSGLRSSMKFVGSSKAD----SVGTLDDVAETLAVEATTSR 497
Zeb_apoBa IMESGNLAASLNNEVTIYLNANGLRSTLKTQVNSKVYHQKAGSWNIDVTKNLALASLRR 3471
Fug_apoBa ----- 627
Tro_apoBa2 ----- 358
Tro_apoBa1 VKR-IVYYGAIIDNEANIYLNANGLRSTVKTDLDSNLVHDKVTILNLNINDNLALASLRR 424
Eel_apoBa2 ----- 354
Eel_apoBa1 VKAHVNFAGAVDNEATVYLNANGLRSTIKTDTTSKLDYKKNVWDLVMNANQAMEASLRR 468
Sal_apoBβ ILEYNAVLGALDNEANIYLNADGLRSTSKI IANAKLNGGETTILEMDVDENLAVEASVSR 683
Zeb_apoBβ1 FLDRGILKGTINNYDESLYVNGNSLRVYALKTGNGDLYG-DFKVAFDVDENLAVEATANEH 1005
Fug_apoBβ VLEDYVLFVLDNVLDLSLNDMGLQATSKI TADGKLHQGPTKIISMDVNNELGVEVSLGH 694
Tro_apoBβ ILEYNAVLGALDNEANIYLNADGLRSTSKI IANAKLNGGETIVLEMDVDESLAVEASVSR 590
Tet_apoBβ VLEDYVVFVLDNVLVGVS LNMGLRSTKTNAGGKLVQDTTTIISMDVIENLAVEVSLNR 2643
Zeb_apoBβ2 LPDGGALKTLLSDANISVNVAVGLKSNVKASANGYYDYR-NNKLSFDMNDQVILEGNFNR 454

Hum_apoB	IYSLWEHSTKN-HLQLEGLFFTNGEHTSKATLELSPWQ-MSALVQVHASQPSFHFDPD-	3616
Mou_apoB	IYTTWEHNMKN-HLQVYSYFFTKGKQTCRATLELSPWT-MSTLLQVHVSQLESLLDLHH-	3620
Chi_apoB	VYAVWEHNGKN-FARYTPLFTTTGSQKCKATFELAPWT-VSADLQIQVTOFNSFLDT---	3183
Xen_apoB	IYAVWEHNGEN-YLRVTPXFQNPQKAKLKATFELALWS-LLANLQVKIDQPSFFENV--	553
Zeb_apoBa	IYATMAYTSSN--AASIASFSINGKQNVRALEFVPLTTLSANLDTDISOPTNYG---H-	3525
Fug_apoBa	-----	627
Tro_apoBa2	-----	358
Tro_apoBa1	VYATLNYTCNNMVNIVWAGFDINGKHSVKANLDEVPLTTVTAKVDIGATOPFNYMLPGD	484
Eel_apoBa2	-----	354
Eel_apoBa1	VYMTLSYTSNN--MAAMGSFDIKGTHAKATLEH IPLTTLTTKVEIIVSQQPSIGI----	522
Sal_apoBβ	VYAVLKFSVSN--EANVLTFNIN GKHIAQATIDFSPLTSLTADVEIDMSQPSNVGDIS--	739
Zeb_apoBβ1	VYATMKFTSNN--EANVGSFNTKGVHSSQATLDMALLKSLVADMKIDLSQPSITFGELS--	1061
Fug_apoBβ	LSVMLDYISNN--EANLLNMKTINGIHLAKAKIHFIRASLLTADIEIDIGQPSMGGFT--	750
Tro_apoBβ	MYAVLKFMSTN--KANVITFNIN GKHVAHATIDFAPLTSLTADVEIDMFQPSNMGDIS--	646
Tet_apoBβ	VYAMLEYLSNN--EANLFSMNINGKHLAKAKVDF.....	2677
Zeb_apoBβ2	IHYLLDIDSN--YTHKYRREEVAVKHTAHGKTTIIPMSTFMAVDFFLTQPDHDDFEHR-	511
Hum_apoB	--LGQEVAlNANTKNQKIRWKNEVRIHSGSFQSQVELSNDQEKALHLDIAGSLEGHLRFLK	3674
Mou_apoB	--FDQEVILKANTKNQKISWKGGVQVESRVLQHNAQFSNDQEEIRLDLAGSLDGLQWLDLE	3678
Chi_apoB	ASVNQVVLKVSPTDQKVGWKGEGQIQSLSLRHDMQLSNEKSNKAFDISGSLGYMDFLK	3243
Xen_apoB	-AYNQEIILLSANTDKQEFGLNGHGIFHTIILAHNVKLSNDETDARFQIDGSLQGHASMLN	612
Zeb_apoBa	AGIVENIDLSITSDKQRFWSGKEQLATLIHSADLILSNTQSEIRVEMSESVEGKVAFLK	3585
Fug_apoBa	-----	627
Tro_apoBa2	-----	358
Tro_apoBa1	AGVDQKCYLSIAADKQTFWSWGREQLASVVHSCDLLLSNDEAEVKIDIAESVEGSLAFLK	544
Eel_apoBa2	-----	354
Eel_apoBa1	ASMDQITIDLEITTDKQKFTWTGKEQVMSIIHIGNLVLSNDETEVRMELADTVKGNVAFLK	582
Sal_apoBβ	-----	739
Zeb_apoBβ1	-----	1061
Fug_apoBβ	-----	750
Tro_apoBβ	-----	646
Tet_apoBβ	2677
Zeb_apoBβ2	GEG-----	514
Hum_apoB	NIILPVYDKSLWDFLKLVDVTSIGRRQHLRVSTAFVYTKNPNGYSFSPVQVLAD--KFI	3732
Mou_apoB	AIIFLPVYGKSLQELLQMDG-----KRQYLQASTSLLYTKNPNGYLLSLPVQELAD--RFI	3731
Chi_apoB	RINCAISKSLWDILKLDVTTVADRKHLYLNASASFYRKSDDGYPFMPVIRLSDGFTFS	3303
Xen_apoB	YIFLPVYEKSIWEVLKFDVTTSEDEKQYLNVSTSVTYTKNKEGFFFPPIPKVADGV---	669
Zeb_apoBa	SIKLPVYQKSLWDIFKFGVSVSTGELQFFNVSTVVIYTKSMEGTLFAIPTKLFENGVSFN	3645
Fug_apoBa	-----	627
Tro_apoBa2	-----	358
Tro_apoBa1	SVRLPVYQKTIWDVLKLEQVSRMDEMQLNLSTTVVYTKNKEGLIFTLPKLFENGVTFN	604
Eel_apoBa2	-----	354
Eel_apoBa1	TVKLPVYQKTIWDVLKFDEVMAEDQLQSLTSTVTVVYKKNMEGLHFTLPKIFEDGVTF	642
Sal_apoBβ	-----	739
Zeb_apoBβ1	-----	1061
Fug_apoBβ	-----	750
Tro_apoBβ	-----	646
Tet_apoBβ	2677
Zeb_apoBβ2	-----	514

Hum_apoB	TPGLKLNLDLNSVLVMPPTFHVPFTDLQVPSCKLDFREIQIYKKLRTSSFALN-----	3783
Mou_apoB	IPGIKLN-----DFSGVKIYKKLSTSPFALN-----	3757
Chi_apoB	IPELHLKAPSPVLSTPEFRVPFSTLQVPAYTIDLNRNIKIQTNLNIMPFVDN-----	3354
Xen_apoB	ADGFIIKFPVAVTLKPPQWMKNLNPNTMRDMELPEIPNVLEIPSFVKVPFTNLNVNVPATNMDLS	729
Zeb_apoBa	IPQITFGVPDLFKTIPQMIREVDMRFEEPDLPDYISIPPVITIPFEFSIPFTTLHVPTFVI	3705
Fug_apoBa	-----	627
Tro_apoBa2	-----	358
Tro_apoBa1	IPELTLAVPSWVKEIPKAVRTIDMRFNIDLPDQVSVPPVIDVPAFDVPFTTLHVPAFSI	664
Eel_apoBa2	-----	354
Eel_apoBa1	FPEISLAVPSWVQDIPLTIRDIDMRNFENIRFPDEVSVPPAISIPSEFVPFTNLQVPSYTL	702
Sal_apoBβ	-----	739
Zeb_apoBβ1	-----	1061
Fug_apoBβ	-----	750
Tro_apoBβ	-----	646
Tet_apoBβ	2677
Zeb_apoBβ2	-----	514
Hum_apoB	-----LPTLPEVKFPEVDVLTKYSQPEDSLIPFFEITVPESQLTVSQFT	3827
Mou_apoB	-----LTMLPKVKFPFGIDLTLQYSTPEGSSVPIFEATIPPIHLTVSQFT	3801
Chi_apoB	-----LPTLPKLRFPRVDVGANYITLVEEYKIPYFEVTVPEYQITVTSQFT	3398
Xen_apoB	NIKIREMMSTLFPDISLPSLPQVTFPKVDITTKYITVEEYKIPFFEVTIPQYQITLARYT	789
Zeb_apoBa	DLTNLEVPNEISTPSFDIMLPGLPKVEIPSNARTKYLKDKMAHLFVSLPQYEITISPFN	3765
Fug_apoBa	-----	627
Tro_apoBa2	-----	358
Tro_apoBa1	DLKNLEIPTMISTTGFDIMLPGLPKVEIPRFDIDIQLLQNRMSFLSVKLPQYEI IISSTF	724
Eel_apoBa2	-----	354
Eel_apoBa1	DLKNLEVLKVIISTPGFDVLEPGLPKVEVPSINIDTEYIAQKMSLLVKIPRYEITVPSFS	762
Sal_apoBβ	-----	739
Zeb_apoBβ1	-----	1061
Fug_apoBβ	-----	750
Tro_apoBβ	-----	646
Tet_apoBβ	2677
Zeb_apoBβ2	-----	514
Hum_apoB	LPKSVSDGIAALDLNAVANKIADFELPTIIVPEQTIEIPSIKFSVPAGIVIPSFQALTAR	3887
Mou_apoB	LPKSLPVGNTVFDLNKLANMIADVLDLPSVTLPEQTIVIPPLEFSVPAGIFIPFFGELTAR	3861
Chi_apoB	LPKISISLGSFHVLDDEVANKIADFDLPTITITPEQKIEIPPLKVSLPAGIYIPSFGALTGS	3458
Xen_apoB	LPKSFYN---VDFNSMVNKIADIDLPTIEIPEQNIIEIPPIKMNLPAGIFIPAFGALAGT	845
Zeb_apoBa	LPKAFDIGDYPIRLDDITNTLYHFELPTI I IPEQKIDVPEISLHLPAGVFIKPKFGDLSAT	3825
Fug_apoBa	-----	627
Tro_apoBa2	-----	358
Tro_apoBa1	FSKSITIGEHTINLDEIASQISNFEMPTITISEQKIEIPEISLNLVSVFIPAFGALSTT	784
Eel_apoBa2	-----	354
Eel_apoBa1	LPKSFTVGDHNLDLDEIANRISNFEMPTITIPQQRIDVPETSLLYPTGVFIPYFGALSTT	822
Sal_apoBβ	-----LFEKTAVEMTGTKQKISTT	758
Zeb_apoBβ1	-----IFETMKVDLSAPKQKIDIL	1080
Fug_apoBβ	-----FLMKTVADLASRQKASTS	769
Tro_apoBβ	-----LFEKTAVELTCTKQKISTT	665
Tet_apoBβ	2677
Zeb_apoBβ2	-----FGYINKT	521

Hum_apoB	FEVDS	SPVYNATWSASLKNKA	-----	DYVETVLDST	--	CSSTVQFLEYEINVLGT	3934
Mou_apoB	AGMAS	PLYNVTWSAGWKTKA	-----	DHVFETFLDSM	--	CTSTLQFLEYALKVVET	3908
Chi_apoB	LKVAS	PLYNVTWRDTLTKK	-----	ESFEVSDST	--	CSSTLQFLEYDLNVVSN	3505
Xen_apoB	VQLF	SPVYNLTWTTKMTNDS	-----	NSFVASLDAS	--	SSSTLRFLEYDLSDASAS	892
Zeb_apoBa	FKMAS	PIYNNWTWGNVENTE	-----	AGTVCTLKST	--	CTSTMVFLEYNDAIAT	3872
Fug_apoBa	-----	-----	-----	-----	-----	-----	627
Tro_apoBa2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	358
Tro_apoBa1	VKVS	SPIYNGTSTANLENKE	-----	SNVVTSLKSI	--	CTSTMIFLEYDLIDATAT	831
Eel_apoBa2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	354
Eel_apoBa1	VKVQ	SPIYSNSWDVKLENKD	-----	SALVSSLKSS	--	CTSTIKLLEYSLTEATAT	869
Sal_apoBβ	AKID	TPVYTTDMAAELEGDS	-----	PVFKATLKSS	--	ATSAIVLVDYDMDASIK	805
Zeb_apoBβ1	STIK	SPVYTTDVRAKLDGNA	-----	PDYKTVLKAS	--	ATSPVVRQYDLDSSMS	1127
Fug_apoBβ	MRFAS	PVYTTILEAVAEGNA	-----	PVFKVTLKST	--	GSSDIKFVDYDMDVSST	816
Tro_apoBβ	AKIAT	PVYTTDMAAELEGDS	-----	PVFKATLKSS	--	ATSAIVLVDYDMDASIK	712
Tet_apoBβ	2677
Zeb_apoBβ2	----	SLNGQIYSRWFNSSTAI	SVESDNDSPDRKFL	LECSFNFI	APSVLVE	ESELRSI	576

Hum_apoB	HKIE	DGTLASKTKGTLAHR	FSAEYEEDGKFEGLQEWEG	-----	KAHLN	IKSPAFT	3985	
Mou_apoB	HKIE	EDLLTYNIKGTLOHCD	FNVEYNEDGLFKGLWDWQG	-----	EAHL	DTSPALT	3968	
Chi_apoB	TKYE	EKGKFKKTVGSFAHR	LSANYIEDLALQGFGTVEN	-----	TASL	VIISPTFA	3556	
Xen_apoB	TAPEN	GLILEG	---TFAHS	LMSNWKEDIYFNGLRIP	-----	RHNINI	DKSPTFT	940
Zeb_apoBa	ILLEN	GALGLDAKSTFNHR	DMNINWKHDLRQNLSPS	-----	RHTLGI	DIASQTFS	3923	
Fug_apoBa	-----	-----	-----	-----	-----	-----	627	
Tro_apoBa2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	358	
Tro_apoBa1	LRFE	NGAVRMNGKCNLVHS	DINVNWQHVFSQNLRMKRQVSPDAIVSRHTLNV	DI	TSPTFV		891	
Eel_apoBa2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	354	
Eel_apoBa1	TRLE	DGTLNLIGTSLFTHS	DLKVDWQHVFTHN	---MRAKRQASSDDSSRHTLSVD	DI	ISPTFI	928	
Sal_apoBβ	ANVD	NEALGLTGKIILTHAD	LTMDIQNVITHSMRKKRQD	---EGSVSRHTLNV	DI	ISPTFT	863	
Zeb_apoBβ1	STMEN	GALVVGANAVLTHQ	DTMDISNAIRMSER	-----	SHILNV	DI	ISQTFI	1176
Fug_apoBβ	SNFEN	AQNLIKSVILT	HSELSVDFNQAL	-----	SSSQHTINVG	IASPSES	862	
Tro_apoBβ	ANVNE	AXGLDWQDYPDPCXP	DPVPTW	-----	-----	-----	738	
Tet_apoBβ	2677	
Zeb_apoBβ2	PIKI	IIDDYY	585	

Hum_apoB	DLHL	RYQKDKK	ISTSAASEAVG	TVGMDMDEDDDFSKWNFY	---SPQSS	PFDKKLT	IFKTEL	3944		
Mou_apoB	DFHL	YKEDKTSLSASAAS	STIGTVGLDSSDDQ	SVELNVYF	---HPQSP	PPEKLS	IFKTEW	4027		
Chi_apoB	DVHV	RYQMTDNMIS	STVSSPSAGILGFLV	QIETDTLKEKFY	---RTLSAP	QKDI	DI	IKSEI	3615	
Xen_apoB	DVQI	RQCQENNKMT	STVSSPSAGTLGLVLEKES	---TTLKGLFS	SLT	PGKDTL	IMKGEV	999		
Zeb_apoBa	DVSFR	YASHNNG	ITSSVSSPAAGF	IGFQFTRRS	PSQFYAKLFS	RYLSTSDKDT	DL	SLKM	3983	
Fug_apoBa	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	677		
Tro_apoBa2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	408		
Tro_apoBa1	DVSFR	YASRKDGITTS	MASPSIGFLGFLFTWRS	PSQVYGKVF	SRYLSS	PFDKDT	DI	VSVKA	951	
Eel_apoBa2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	404		
Eel_apoBa1	DANFR	YTSRKDGLSASLSS	PSAGFVGLLLQKR	SPSQVYAKL	FARYASAP	DKDVE	IL	SFKA	988	
Sal_apoBβ	DVNF	RYAARRDGV	SASISTPSTGLL	GLELGRI	PSQLSARLY	SRYASAP	EDD	VD	ILVIRV	923
Zeb_apoBβ1	DVNL	RYAARSDGIS	SGSVSTPGSGLL	GFLQGNIP	SQMNARLY	CRYAFAP	DD	VD	ILSVRA	1236
Fug_apoBβ	DVSL	RYAGSRDGIS	SASVSSPTG	FLGLQVNGV	PSQKTVRVY	GRYLSAPE	VD	IL	GIRS	922
Tro_apoBβ	738		
Tet_apoBβ	2677		
Zeb_apoBβ2	585		

Hum_apoB	RVRESDEETQIKVNWEEFAASGLITSLKDNVFKATGVLYDYVNKYHWEHTGLTLREVSSK	4004
Mou_apoB	RYKESDGERYIKINWEEFAASRLIGSLKSNVFKASKAIYDYANKYHLEYVSSELKSLQV	4087
Chi_apoB	SFRNSD-IIQIKLNWKEDAADLLGLKEKVPKMTSAVYKCVNRYKHEHMGDISDATVI	3674
Xen_apoB	TLKNPE-RIQYKINWREFAAMDVLNGLKERLEKTSNSIHDCVNKYHKEHFGMEMSEASLK	1058
Zeb_apoBa	TLKNSE-KLSVQVGYHFSGLSDMINGLKDRLPSILAAALQKFINQYHIDHLGMDINRAALK	4042
Fug_apoBa	SVMESK-RNLNQTWNTTELPYEMMLQVKKQVPVVTKMVS-----	715
Tro_apoBa2	SVINSE-KLNIGTTWNTMEVPTMILLVVKAKVPEIMSAVC-----	446
Tro_apoBa1	TLKNSE-KLSFQVAWNMNTMHYTIEGLKERMEAITDALLKFINKYHTAHFGFSVNRASIK	1010
Eel_apoBa2	SLKHPE-KLNLCQTSWNTTEVPYEMMLGLKESVPEITAAALD-----	442
Eel_apoBa1	TLRNSE-KLALQGTGNLQAQLDMFTTELKERVPAITSAALLKFANKHHTAQFGMDLNRASLK	1047
Sal_apoBβ	TTKDAG-NLKLQVADNKEVLHDMFLGLKERLEAITSTLN-----	961
Zeb_αpoBβ1	VPKGDE-KVLL-VTGNIAAQSMEFGLMN-----	1263
Fug_apoBβ	TMKDGG-RVRLQIVYNMEVPTTVLFELEKTRIPSSLSAVT-----	960
Tro_apoBβ	738
Tet_apoBβ	2677
Zeb_apoBβ2	585

BIBLIOGRAPHIE

- Abo-Hashema, K. A., Cake, M. H., Power, G. W. and Clarke, D.** (1999) Evidence for triacylglycerol synthesis in the lumen of microsomes via a lipolysis-esterification pathway involving carnitine acyltransferases, *J Biol Chem.* 274, 35577-82.
- Ackman, R. G.** (1989) Absorption of omega-3 fatty acids, *Nutrition.* 5, 251-3.
- Agaba, M., Tocher, D. R., Dickson, C. A., Dick, J. R. and Teale, A. J.** (2004) Zebrafish cDNA Encoding Multifunctional Fatty Acid Elongase Involved in Production of Eicosapentaenoic (20:5n-3) and Docosahexaenoic (22:6n-3) Acids, *Mar Biotechnol (NY).*
- Agellon, L. B., Toth, M. J. and Thomson, A. B.** (2002) Intracellular lipid binding proteins of the small intestine, *Mol Cell Biochem.* 239, 79-82.
- Alaupovic, P.** (1971) Apolipoproteins and lipoproteins, *Atherosclerosis.* 13, 141-6.
- Alaupovic, P.** (1991) Apolipoprotein composition as the basis for classifying plasma lipoproteins. Characterization of ApoA- and ApoB-containing lipoprotein families, *Prog Lipid Res.* 30, 105-38.
- Alaupovic, P.** (2003) The concept of apolipoprotein-defined lipoprotein families and its clinical significance, *Curr Atheroscler Rep.* 5, 459-67.
- Altmann, S. W., Davis, H. R., Jr., Zhu, L. J., Yao, X., Hoos, L. M., Tetzloff, G., Iyer, S. P., Maguire, M., Golovko, A., Zeng, M., Wang, L., Murgolo, N. and Graziano, M. P.** (2004) Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption, *Science.* 303, 1201-4.
- Amatruda, J. F., Shepard, J. L., Stern, H. M. and Zon, L. I.** (2002) Zebrafish as a cancer model system, *Cancer Cell.* 1, 229-31.
- Ameen, C., Edvardsson, U., Ljungberg, A., Asp, L., Akerblad, P., Tuneld, A., Olofsson, S. O., Linden, D. and Oscarsson, J.** (2004) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha increases the expression and activity of microsomal triglyceride transfer protein in the liver, *J Biol Chem.*, in press.
- Amsterdam, A., Sadler, K. C., Lai, K., Farrington, S., Bronson, R. T., Lees, J. A. and Hopkins, N.** (2004) Many ribosomal protein genes are cancer genes in zebrafish, *PLoS Biol.* 2, E139.
- Anant, S. and Davidson, N. O.** (2001) Molecular mechanisms of apolipoprotein B mRNA editing, *Curr Opin Lipidol.* 12, 159-65.
- Anant, S. and Davidson, N. O.** (2002) Identification and regulation of protein components of the apolipoprotein B mRNA editing enzyme. A complex event, *Trends Cardiovasc Med.* 12, 311-7.
- Anderson, C. M., Townley, R. R., Freemanm and Johansen, P.** (1961) Unusual causes of steatorrhea in infancy and childhood, *Med J Aust.* 48(2), 617-22.
- Anderson, T. A., Levitt, D. G. and Banaszak, L. J.** (1998) The structural basis of lipid interactions in lipovitellin, a soluble lipoprotein, *Structure.* 6, 895-909.
- André, M., Ando, S., Ballagny, C., Durliat, M., Poupard, G., Briancon, C. and Babin, P. J.** (2000) Intestinal fatty acid binding protein gene expression reveals the cephalocaudal patterning during zebrafish gut morphogenesis, *Int J Dev Biol.* 44, 249-52.
- Arnault, F., Etienne, J., Noe, L., Raisonier, A., Brault, D., Harney, J. W., Berry, M. J., Tse, C., Fromental-Ramain, C., Hamelin, J. and Galibert, F.** (1996) Human lipoprotein lipase last exon is not translated, in contrast to lower vertebrates, *J. Mol Evol.* 43, 109-15.
- Athar, H., Iqbal, J., Jiang, X. C. and Hussain, M. M.** (2004) A simple, rapid, and sensitive fluorescence assay for microsomal triglyceride transfer protein, *J Lipid Res.* 45, 764-72.

- Atzel, A. and Wetterau, J. R.** (1993) Mechanism of microsomal triglyceride transfer protein catalyzed lipid transport, *Biochemistry*. 32, 10444-50.
- Atzel, A. and Wetterau, J. R.** (1994) Identification of two classes of lipid molecule binding sites on the microsomal triglyceride transfer protein, *Biochemistry*. 33, 15382-8.
- Babin, P. J.** (1987a) Apolipoproteins and the association of egg yolk proteins with plasma high density lipoproteins after ovulation and follicular atresia in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*), *J Biol Chem*. 262, 4290-6.
- Babin, P. J.** (1987b) Plasma lipoprotein and apolipoprotein distribution as a function of density in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*), *Biochem J*. 246, 425-9.
- Babin, P. J., Bogerd, J., Kooiman, F. P., Van Marrewijk, W. J. and Van der Horst, D. J.** (1999) Apolipoprotein II/I, apolipoprotein B, vitellogenin, and microsomal triglyceride transfer protein genes are derived from a common ancestor, *J Mol Evol*. 49, 150-60.
- Babin, P. J., Deryckere, F. and Gannon, F.** (1995) Presence of an extended duplication in the putative low-density-lipoprotein receptor-binding domain of apolipoprotein B. Cloning and characterization of the domain in salmon, *Eur J Biochem*. 230, 45-51.
- Babin, P. J., Thisse, C., Durliat, M., Andre, M., Akimenko, M. A. and Thisse, B.** (1997) Both apolipoprotein E and A-I genes are present in a nonmammalian vertebrate and are highly expressed during embryonic development, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94, 8622-7.
- Babin, P. J. and Vernier, J. M.** (1989) Plasma lipoproteins in fish, *J Lipid Res*. 30, 467-89.
- Bakillah, A. and Hussain, M. M.** (2001) Binding of microsomal triglyceride transfer protein to lipids results in increased affinity for apolipoprotein B: evidence for stable microsomal MTP-lipid complexes, *J Biol Chem*. 276, 31466-73.
- Barlowe C, Orci L, Yeung T, Hosobuchi M, Hamamoto S, Salama N, Rexach MF, Ravazzola M, Amherdt M, Schekman R.** (1994) COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell*. 77(6), 895-907.
- Bartman, T., Walsh, E. C., Wen, K. K., McKane, M., Ren, J., Alexander, J., Rubenstein, P. A. and Stainier, D. Y.** (2004) Early myocardial function affects endocardial cushion development in zebrafish, *PLoS Biol*. 2, E129.
- Barter, P. J.** (2002) Hugh sinclair lecture: the regulation and remodelling of HDL by plasma factors, *Atheroscler Suppl*. 3, 39-47.
- Bass, N. M.** (1985) Function and regulation of hepatic and intestinal fatty acid binding proteins, *Chem Phys Lipids*. 38, 95-114.
- Bass, N. M.** (1990) Fatty acid-binding protein expression in the liver: its regulation and relationship to the zonation of fatty acid metabolism, *Mol Cell Biochem*. 98, 167-76.
- Bassett, D. I. and Currie, P. D.** (2003) The zebrafish as a model for muscular dystrophy and congenital myopathy, *Hum Mol Genet*. 12 Spec No 2, R265-70.
- Bassett, D. and Currie, P. D.** (2004) Identification of a zebrafish model of muscular dystrophy, *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 31, 537-40.
- Bennett, A. J., Billett, M. A., Salter, A. M. and White, D. A.** (1995) Regulation of hamster hepatic microsomal triglyceride transfer protein mRNA levels by dietary fats, *Biochem Biophys Res Commun*. 212, 473-8.

- Benoist, F. and Grand-Perret, T.** (1997) Co-translational degradation of apolipoprotein B100 by the proteasome is prevented by microsomal triglyceride transfer protein. Synchronized translation studies on HepG2 cells treated with an inhibitor of microsomal triglyceride transfer protein, *J Biol Chem.* 272, 20435-42.
- Bergot, P.** (1981) Absorption des lipides, *Nutrition des poissons*, Fontaine M., Edition du CNRS, Paris, France, 123-9.
- Bergot, P. and Fléchon, J. E.** (1970) Forme et voie d'absorption intestinale des acides gras à chaîne longue chez la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdnerii*), *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 10, 473-80.
- Besnard, P., Niot, I., Poirier, H., Clement, L. and Bernard, A.** (2002) New insights into the fatty acid-binding protein (FABP) family in the small intestine, *Mol Cell Biochem.* 239, 139-47.
- Bi, X., Corpina, R. A. and Goldberg, J.** (2002) Structure of the Sec23/24-Sar1 pre-budding complex of the COPII vesicle coat. *Nature* 419(6904), 271-7.
- Bjorkegren, J., Beigneux, A., Bergo, M. O., Maher, J. J. and Young, S. G.** (2002) Blocking the secretion of hepatic very low density lipoproteins renders the liver more susceptible to toxin-induced injury, *J Biol Chem.* 277, 5476-83.
- Blackhart, B. D., Ludwig, E. M., Pierotti, V. R., Caiati, L., Onasch, M. A., Wallis, S. C., Powell, L., Pease, R., Knott, T. J. and Chu, M. L.** (1986) Structure of the human apolipoprotein B gene, *J Biol Chem.* 261, 15364-7.
- Bogerd, J., Babin, P. J., Kooiman, F. P., Andre, M., Ballagny, C., van Marrewijk, W. J. and van der Horst, D. J.** (2000) Molecular characterization and gene expression in the eye of the apolipoprotein II/I precursor from *Locusta migratoria*, *J Comp Neurol.* 427, 546-58.
- Bolanos-Garcia, V. M. and Miguel, R. N.** (2003) On the structure and function of apolipoproteins: more than a family of lipid-binding proteins, *Prog Biophys Mol Biol.* 83, 47-68.
- Bone, Q., Marshall, N. B. and Blaxter, J. H. S.** (1995) *Biology of fishes. Tertiary level biology*, Second edition, Chapman and Hall.
- Borchardt, R. A. and Davis, R. A.** (1987) Intrahepatic assembly of very low density lipoproteins. Rate of transport out of the endoplasmic reticulum determines rate of secretion, *J Biol Chem.* 262, 16394-402.
- Boren, J., Ekstrom, U., Agren, B., Nilsson-Ehle, P. and Innerarity, T. L.** (2001) The molecular mechanism for the genetic disorder familial defective apolipoprotein B100, *J Biol Chem.* 276, 9214-8.
- Boren, J., Veniant, M. M. and Young, S. G.** (1998) Apo B100-containing lipoproteins are secreted by the heart, *J Clin Invest.* 101, 1197-202.
- Borgstrom, B., Dahlqvist, A., Lundh, G. and Sjovall, J.** (1957) Studies of intestinal digestion and absorption in the human, *J Clin Invest.* 36, 1521-36.
- Borgstrom, B., Erlanson-Albertsson, C. and Wieloch, T.** (1979) Pancreatic colipase: chemistry and physiology, *J Lipid Res.* 20, 805-16.
- Bouma, M. E., Beucler, I., Aggerbeck, L. P., Infante, R. and Schmitz, J.** (1986) Hypobetalipoproteinemia with accumulation of an apoprotein B-like protein in intestinal cells. Immunochemical and biochemical characterization of seven cases of Anderson's disease, *J Clin Invest.* 78, 398-410.
- Bouma, M. E., Beucler, I., Pessah, M., Heinzmann, C., Lusic, A. J., Naim, H. Y., Ducastelle, T., Leluyer, B., Schmitz, J. and Infante, R.** (1990) Description of two different patients with abetalipoproteinemia: synthesis of a normal-sized apolipoprotein B-48 in intestinal organ culture, *J Lipid Res.* 31, 1-15.

- Bradbury, P., Mann, C. J., Kochl, S., Anderson, T. A., Chester, S. A., Hancock, J. M., Ritchie, P. J., Amey, J., Harrison, G. B., Levitt, D. G., Banaszak, L. J., Scott, J. and Shoulders, C. C.** (1999) A common binding site on the microsomal triglyceride transfer protein for apolipoprotein B and protein disulfide isomerase, *J Biol Chem.* 274, 3159-64.
- Breathnach, R. and Chambon, P.** (1981) Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins, *Annu Rev Biochem.* 50, 349-83.
- Brown, M. S. and Goldstein, J. L.** (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis, *Science.* 232(4746), 34-47.
- Buhman, K. K., Smith, S. J., Stone, S. J., Repa, J. J., Wong, J. S., Knapp, F. F. Jr, Burri, B. J., Hamilton, R. L., Abumrad, N. A. and Farese, R. V. Jr.** (2002) DGAT1 is not essential for intestinal triacylglycerol absorption or chylomicron synthesis, *J Biol Chem,* 277, 25474-9.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. and Short, J. M.** (1987) *Biotechniques* 5(4):376–378.
- Burnett, J. R., Shan, J., Miskie, B. A., Whitfield, A. J., Yuan, J., Tran, K., McKnight, C. J., Hegele, R. A. and Yao, Z.** (2003) A novel nontruncating APOB gene mutation, R463W, causes familial hypobetalipoproteinemia, *J Biol Chem.* 278, 13442-52.
- Caballero, M. J., Izquierdo, M. S., Kjorsvik, E., Fernandez, A. J. and Rosenlund, G.** (2004) Histological alterations in the liver of sea bream, *Sparus aurata* L., caused by short- or long-term feeding with vegetable oils. Recovery of normal morphology after feeding fish oil as the sole lipid source, *J Fish Dis.* 27(9), 531-41.
- Cahu, C. L., Zambonino Infante, J. L. and Barbosa, V.** (2003) Effect of dietary phospholipid level and phospholipid:neutral lipid value on the development of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae fed a compound diet, *Br J Nutr.* 90, 21-8.
- Carroll, R. L.** (1996) Vertebrate paleontology and evolution, *Freeman W. H. and Company edition*, New York.
- Cartwright, I. J. and Higgins, J. A.** (2001) Direct evidence for a two-step assembly of ApoB48-containing lipoproteins in the lumen of the smooth endoplasmic reticulum of rabbit enterocytes, *J Biol Chem.* 276, 48048-57.
- Chang, B. H., Liao, W., Li, L., Nakamuta, M., Mack, D. and Chan, L.** (1999) Liver-specific inactivation of the abetalipoproteinemia gene completely abrogates very low density lipoprotein/low density lipoprotein production in a viable conditional knockout mouse, *J Biol Chem.* 274, 6051-5.
- Chapman, M. J.** (1980) Animal lipoproteins: chemistry, structure, and comparative aspects, *J Lipid Res.* 21, 789-853.
- Chateau, D., Pauquai, T., Delers, F., Rousset, M., Chambaz, J. and Demignot, S.** (2004) Lipid micelles stimulate the secretion of triglyceride-enriched apolipoprotein B48-containing lipoproteins by Caco-2 cells, *J Cell Physiol.*
- Chaves, C. R., Elias, P. R., Cheng, W., Zaltman, C., Iglesias, A. C. and Braulio, V. B.** (2003) Long chain fatty acid uptake by human intestinal mucosa in vitro: mechanisms of transport, *Digestion.* 67, 32-6.
- Chen, M., Yang, Y., Braunstein, E., Georgeson, K. E. and Harmon, C. M.** (2001) Gut expression and regulation of FAT/CD36: possible role in fatty acid transport in rat enterocytes, *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 281, E916-23.
- Chen, J. Y., Chen, J. C. and Wu, J. L.** (2003) Molecular cloning and functional analysis of zebrafish high-density lipoprotein-binding protein, *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 136, 117-30.
- Chen, S. H., Habib, G., Yang, C. Y., Gu, Z. W., Lee, B. R., Weng, S. A., Silberman, S. R., Cai, S. J., Deslypere, J. P. and Rosseneu, M.** (1987) Apolipoprotein B-48 is the product of a messenger RNA with an organ-specific in-frame stop codon, *Science.* 238, 363-6.

- Chen, W. J., Orti, G. and Meyer, A.** (2004) Novel evolutionary relationship among four fish model systems, *Trends Genet.* 20, 424-31.
- Cohn, S. M., Simon, T. C., Roth, K. A., Birkenmeier, E. H. and Gordon, J. I.** (1992) Use of transgenic mice to map cis-acting elements in the intestinal fatty acid binding protein gene (Fabpi) that control its cell lineage-specific and regional patterns of expression along the duodenal-colonic and crypt-villus axes of the gut epithelium, *J Cell Biol*, 119(1), 27-44
- Coticello, S. G., Thomas, C. J., Petersen-Mahrt, S. and Neuberger, M. S.** (2004) Evolution of the AID/APOBEC Family of Polynucleotide (Deoxy)Cytidine Deaminases, *Mol Biol Evol*, in press.
- Coutteau, P., Geurden, I., Camara, M. R., Bergot, P. and Sorgeloos, P.** (1997) Review on the dietary effects of phospholipids in fish and crustacean larviculture, *Aquaculture*. 155, 149-64.
- Cowey, C. B. and Sargent, J. R.** (1977). Lipid nutrition in fish, *Comp. Biochem. Physiol.* 57B, 269-273.
- Dashti, N.** (1992) The effect of low density lipoproteins, cholesterol, and 25-hydroxycholesterol on apolipoprotein B gene expression in HepG2 cells, *J Biol Chem.* 267, 7160-9.
- Davis, C. G., van Driel, I. R., Russell, D. W., Brown, M. S. and Goldstein, J. L.** (1987) The low density lipoprotein receptor. Identification of amino acids in cytoplasmic domain required for rapid endocytosis, *J Biol Chem.* 262, 4075-82.
- Davis, R. A., Thrift, R. N., Wu, C. C. and Howell, K. E.** (1990) Apolipoprotein B is both integrated into and translocated across the endoplasmic reticulum membrane. Evidence for two functionally distinct pools, *J Biol Chem.* 265(17), 10005-11.
- Davis, R. A. and Vance, J. E.** (1996). Chapter 17. Structure, assembly, secretion of lipoproteins. In: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, ed. D.E. Vance, and J.E. Vance, Amsterdam, Elsevier.
- De Lalla, O. F. and Gofman, J. W.** (1954) Ultracentrifugal analysis of serum lipoproteins, *Methods Biochem Anal.* 1, 459-78.
- Demmer, L. A., Levin, M. S., Elovson, J., Reuben, M. A., Lusic, A. J. and Gordon, J. I.** (1986) Tissue-specific expression and developmental regulation of the rat apolipoprotein B gene, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83, 8102-6.
- Denovan-Wright, E. M., Pierce, M. and Wright, J. M.** (2000a) Nucleotide sequence of cDNA clones coding for a brain-type fatty acid binding protein and its tissue-specific expression in adult zebrafish (*Danio rerio*), *Biochim Biophys Acta.* 1492, 221-6.
- Denovan-Wright, E. M., Pierce, M., Sharma, M. K. and Wright, J. M.** (2000b) cDNA sequence and tissue-specific expression of a basic liver-type fatty acid binding protein in adult zebrafish (*Danio rerio*), *Biochim Biophys Acta.* 1492, 227-32.
- Deplano, M., Diaz, J. P., Connes, R., Kentouri-Divanach, M., and Cavalier, F.** (1991) Appearance of lipid-absorption capacities in larvae of the sea bass *Dicentrarchus labrax* during transition to the exotrophic phase, *Marine Biotech.* 108, 361-71
- Diaz, J. P., Guyot, E., Vigier, S. and Connes, R.** (1997) First events in lipid absorption during post-embryonic development of the anterior intestine in gilt-head sea bream, *Journal of Fish Biology.* 51, 180-92.
- Dooley, K. and Zon, L. I.** (2000) Zebrafish: a model system for the study of human disease, *Curr Opin Genet Dev.* 10, 252-6.
- Driever, W., Solnica-Krezel, L., Schier, A. F., Neuhauss, S. C., Malicki, J., Stemple, D. L., Stainier, D. Y., Zwartkruis, F., Abdelilah, S., Rangini, Z., Belak, J. and Boggs, C.** (1996) A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish, *Development.* 123, 37-46.

- Dugaiczky, A., Law, S. W. and Dennison, O. E.** (1982) Nucleotide sequence and the encoded amino acids of human serum albumin mRNA, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79, 71-5.
- Ebeling, W., Hennrich, N., Klockow, M., Metz, H., Orth, H. D. and Lang, H.** (1974) Proteinase K from *Tritirachium album Limber*, *Eur J Biochem.* 47, 91-7.
- Edman, J. C., Ellis, L., Blacher, R. W., Roth, R. A. and Rutter, W. J.** (1985) Sequence of protein disulphide isomerase and implications of its relationship to thioredoxin, *Nature.* 317, 267-70.
- Efron, B., Halloran, E. and Holmes, S.** (1996) Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 13429-34.
- Fainaru, M., Schafer, Z., Gavish, D., Harel, A. and Schwartz, M.** (1988) Interactions between human and carp (*Cyprinus carpio*) low density lipoproteins (LDL) and LDL receptors. *Comp Biochem Physiol B*, 91, 331-8.
- Farber, S. A., Pack, M., Ho, S. Y., Johnson, I. D., Wagner, D. S., Dosch, R., Mullins, M. C., Hendrickson, H. S., Hendrickson, E. K. and Halpern, M. E.** (2001) Genetic analysis of digestive physiology using fluorescent phospholipid reporters, *Science.* 292, 1385-8.
- Farese, R. V., Jr., Cases, S., Ruland, S. L., Kayden, H. J., Wong, J. S., Young, S. G. and Hamilton, R. L.** (1996) A novel function for apolipoprotein B: lipoprotein synthesis in the yolk sac is critical for maternal-fetal lipid transport in mice, *J Lipid Res.* 37, 347-60.
- Farese, R. V., Jr., Ruland, S. L., Flynn, L. M., Stokowski, R. P. and Young, S. G.** (1995) Knockout of the mouse apolipoprotein B gene results in embryonic lethality in homozygotes and protection against diet-induced hypercholesterolemia in heterozygotes, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92, 1774-8.
- Field, H. A., Dong, P. D., Beis, D. and Stainier, D. Y.** (2003) Formation of the digestive system in zebrafish. II. Pancreas morphogenesis, *Dev Biol.* 261, 197-208.
- Fidge, N. H.** (1999) High density lipoprotein receptors, binding proteins, and ligands, *J Lipid Res.* 40, 187-201.
- Fontagné, S.** (2000) Utilisation des acides gras à chaîne moyenne par les larves de poisson, Thèse de 3^{ème} cycle, Université de Bordeaux 1.
- Fontagné, S., Corraze, G. and Bergot, P.** (2000) Tricaproin, tricaprén and trilaurin are utilized more efficiently than tricaprén by carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae, *J Nutr.* 130, 2009-15.
- Fontagné, S., Geurden, I., Escaffre, A. M. and Bergot, P.** (1998) Histological changes induced by dietary phospholipids in intestine and liver of common carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae, *Aquaculture.* 161, 213-23.
- Franke, H., Plonne, D., Winkler, L. and Dargel, R.** (1992) Synthesis, secretion and immunoelectron microscopic demonstration of apolipoprotein B-containing lipoprotein particles in the visceral rat yolk sac, *Histochemistry.* 97, 283-92.
- Fredrickson, D. S.** (1969) The regulation of plasma lipoprotein concentrations as affected in human mutants, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 64, 1138-46.
- Fujimoto, K., Cardelli, J. A. and Tso, P.** (1992) Increased apolipoprotein A-IV in rat mesenteric lymph after lipid meal acts as a physiological signal for satiation, *Am J Physiol.* 262, G1002-6.
- Gaffney, D., Pullinger, C. R., O'Reilly, D. S., Hoffs, M. S., Cameron, I., Vass, J. K., Kulkarni, M. V., Kane, J. P., Schumaker, V. N., Watts, G. F. and Packard, C. J.** (2002) Influence of an asparagine to lysine mutation at amino acid 3516 of apolipoprotein B on low-density lipoprotein receptor binding, *Clin Chim Acta.* 321, 113-21.
- Gaffney, D., Reid, J. M., Cameron, I. M., Vass, K., Caslake, M. J., Shepherd, J. and Packard, C. J.** (1995) Independent mutations at codon 3500 of the apolipoprotein B gene are associated with hyperlipidemia, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 15, 1025-9.

- Gandemer, G.** (1992) Les lipides de la viande : vers une estimation précise de leurs apports nutritionnels dans l'alimentation de l'Homme. *Les cahiers de l'ENSBANA*. 8, 25-48.
- Gauthier, G. F. and Landis, S. C.** (1972) The relationship of ultrastructural and cytochemical features to absorptive activity in the goldfish intestine, *Anat Rec*. 172, 675-701.
- Gerhard, G. S., Kauffman, E. J., Wang, X., Stewart, R., Moore, J. L., Kasales, C. J., Demidenko, E. and Cheng, K. C.** (2002) Life spans and senescent phenotypes in two strains of Zebrafish (*Danio rerio*), *Exp Gerontol*. 37, 1055-68.
- Geurden, I., Radünz-Neto, J. and Bergot P.** (1995) Essentiality of dietary phospholipids for carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae, *Aquaculture*. 131, 303-14.
- Geurden, I., Marion, D., Charlon, N., Coutteau, P. and Bergot P.** (1998) Comparison of different soybean phospholipidic fractions as dietary supplements for common carp, *Cyprinus carpio*, larvae, *Aquaculture*. 161, 225-35.
- Giannoni, F., Chou, S. C., Skarosi, S. F., Verp, M. S., Field, F. J., Coleman, R. A. and Davidson, N. O.** (1995) Developmental regulation of the catalytic subunit of the apolipoprotein B mRNA editing enzyme (APOBEC-1) in human small intestine, *J Lipid Res*. 36, 1664-75.
- Gibbons, G. F., Wiggins, D., Brown, A. M. and Hebbachi, A. M.** (2004) Synthesis and function of hepatic very-low-density lipoprotein, *Biochem Soc Trans*. 32, 59-64.
- Gillian-Daniel, D. L., Bates, P. W., Tebon, A. and Attie, A. D.** (2002) Endoplasmic reticulum localization of the low density lipoprotein receptor mediates presecretory degradation of apolipoprotein B. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(7), 4337-42.
- Gimeno, R. E., Hirsch, D. J., Punreddy, S., Sun, Y., Ortegon, A. M., Wu, H., Daniels, T., Stricker-Krongrad, A., Lodish, H. F. and Stahl, A.** (2003) Targeted deletion of fatty acid transport protein-4 results in early embryonic lethality, *J Biol Chem*. 278, 49512-6.
- Glickman, R. M., Rogers, M. and Glickman, J. N.** (1986) Apolipoprotein B synthesis by human liver and intestine in vitro, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83, 5296-300.
- Goldberg, I. J.** (1996) Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis, *J Lipid Res*. 37, 693-707.
- Goldstein, J. L. and Brown, M. S.** (1974) Expression of the familial hypercholesterolemia gene in heterozygotes: model for a dominant disorder in man, *Trans Assoc Am Physicians*. 87, 120-31.
- Gotto, A. M., Brown, W. V., Levy, R. I., Birnbaumer, M. E. and Fredrickson, D. S.** (1972) Evidence for the identity of the major apoprotein in low density and very low density lipoproteins in normal subjects and patients with familial hyperlipoproteinemia, *J Clin Invest*. 51, 1486-94.
- Graham, D. L. and Oram, J. F.** (1987) Identification and characterization of a high density lipoprotein-binding protein in cell membranes by ligand blotting, *J Biol Chem*. 262, 7439-42.
- Green, P. H. and Riley, J. W.** (1981) Lipid absorption and intestinal lipoprotein formation, *Aust N Z J Med*. 11, 84-90.
- Gretch, D. G., Sturley, S. L., Wang, L., Lipton, B. A., Dunning, A., Grunwald, K. A., Wetterau, J. R., Yao, Z., Talmud, P. and Attie, A. D.** (1996) The amino terminus of apolipoprotein B is necessary but not sufficient for microsomal triglyceride transfer protein responsiveness, *J Biol Chem*. 271, 8682-91.
- Gusarova, V., Caplan, A. J., Brodsky, J. L. and Fisher, E. A.** (2001) Apoprotein B degradation is promoted by the molecular chaperones hsp90 and hsp70, *J Biol Chem*. 276, 24891-900.

- Gutières, S., Damon, M., Panserat, S., Kaushik, S. and Medale, F.** (2003) Cloning and tissue distribution of a carnitine palmitoyltransferase I gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 135, 139-51.
- Hamilton, R. L., Wong, J. S., Cham, C. M., Nielsen, L. B. and Young, S. G.** (1998) Chylomicron-sized lipid particles are formed in the setting of apolipoprotein B deficiency, *J Lipid Res.* 39(8), 1543-57.
- Hansen, R. J. and Walzem, R. L.** (1993) Avian fatty liver hemorrhagic syndrome: a comparative review, *Adv Vet Sci Comp Med.* 37, 451-68.
- Hastings, N., Agaba, M., Tocher, D. R., Leaver, M. J., Dick, J. R., Sargent, J. R. and Teale, A. J.** (2001) A vertebrate fatty acid desaturase with Delta 5 and Delta 6 activities, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 14304-9.
- Havel, R. J. and Kane, J. P.** (1995). Introduction: structure and metabolism of plasma lipoproteins and disorders of the biogenesis and secretion of lipoproteins containing the B apolipoproteins. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, ed. C.E. Scriver, A.L. Beaudet, W.E. Sly, and D. Valle, New York McGraw-Hill, 1841-1885.
- Henderson, R. J. and Tocher, D. R.** (1987) The lipid composition and biochemistry of freshwater fish, *Prog. Lipid Res.* 26, 281-347.
- Hegele, R. A. and Miskie, B. A.** (2002) Acanthocytosis in a patient with homozygous familial hypobetalipoproteinemia due to a novel APOB splice site mutation, *Clin Genet.* 61, 101-3.
- Her, G. M., Chiang, C. C., Chen, W. Y. and Wu, J. L.** (2003a) In vivo studies of liver-type fatty acid binding protein (L-FABP) gene expression in liver of transgenic zebrafish (*Danio rerio*), *FEBS Lett.* 538, 125-33.
- Her, G. M., Yeh, Y. H. and Wu, J. L.** (2003b) 435-bp liver regulatory sequence in the liver fatty acid binding protein (L-FABP) gene is sufficient to modulate liver regional expression in transgenic zebrafish, *Dev Dyn.* 227, 347-56.
- Her, G. M., Chiang, C. C. and Wu, J. L.** (2004a) Zebrafish intestinal fatty acid binding protein (I-FABP) gene promoter drives gut-specific expression in stable transgenic fish, *Genesis.* 38, 26-31.
- Her, G. M., Yeh, Y. H. and Wu, J. L.** (2004b) Functional conserved elements mediate intestinal-type fatty acid binding protein (I-FABP) expression in the gut epithelia of zebrafish larvae, *Dev Dyn.* 230, 734-42.
- Herbert, P. N., Hyams, J. S., Bernier, D. N., Berman, M. M., Saritelli, A. L., Lynch, K. M., Nichols, A. V. and Forte, T. M.** (1985) Apolipoprotein B-100 deficiency. Intestinal steatosis despite apolipoprotein B-48 synthesis, *J Clin Invest.* 76, 403-12.
- Herbomel, P., Thisse, B. and Thisse, C.** (2001) Zebrafish early macrophages colonize cephalic mesenchyme and developing brain, retina, and epidermis through a M-CSF receptor-dependent invasive process, *Dev Biol.* 238, 274-88.
- Hermann, M., Mahon, M. G., Lindstedt, K. A., Nimpf, J. and Schneider, W. J.** (2000) Lipoprotein receptors in extraembryonic tissues of the chicken, *J Biol Chem.* 275, 16837-44.
- Hermier, D.** (1997) Lipoprotein metabolism and fattening in poultry, *J Nutr.* 127, 805S-808S.
- Hermier, D., Rousselot-Pailley, D., Peresson, R. and Sellier, N.** (1994) Influence of orotic acid and estrogen on hepatic lipid storage and secretion in the goose susceptible to liver steatosis, *Biochim Biophys Acta.* 1211, 97-106.
- Hermier, D., Salichon, M. R., Guy, G. and Peresson, R.** (1999) Differential channelling of liver lipids in relation to susceptibility to hepatic steatosis in the goose, *Poult Sci.* 78, 1398-406.
- Higgins, M. J., Lecamwasam, D. S. and Galton, D. J.** (1975) A new type of familial hypercholesterolaemia, *Lancet.* 2, 737-40.

- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. and Watson, R.** (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions, *Biotechnology (N Y)*. 11, 1026-30.
- Hirschberg, C. B. and Snider, M. D.** (1987) Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus, *Annu Rev Biochem.* 56, 63-87.
- Ho, S. Y. and Storch, J.** (2001) Common mechanisms of monoacylglycerol and fatty acid uptake by human intestinal Caco-2 cells, *Am J Physiol Cell Physiol.* 281, C1106-17.
- Honkanen, R. E., Rigler, M. W. and Patton, J. S.** (1985) Dietary fat assimilation and bile salt absorption in the killifish intestine, *Am J Physiol.* 249, G399-407.
- Horne-Badovinac, S., Rebagliati, M. and Stainier, D. Y.** (2003) A cellular framework for gut-looping morphogenesis in zebrafish, *Science.* 302, 662-5.
- Horwitz, J.P., Chuna, J., Curby, R. J., Tomson, A. J., DaRooge, M. A., Fisher, B. E., Mauricio, J. and Klundt.** (1964) Substrates for cytochemical demonstration of enzyme activity. I. Some substituted 3-indolyl- β -D-glycopyranosides, *J Med Chem.* 7, 574
- Hoshijima, K., Metherall, J. E. and Grunwald, D. J.** (2002) A protein disulfide isomerase expressed in the embryonic midline is required for left/right asymmetries, *Genes Dev.* 16, 2518-29.
- Huang, X. F. and Shelness, G. S.** (1997) Identification of cysteine pairs within the amino-terminal 5% of apolipoprotein B essential for hepatic lipoprotein assembly and secretion, *J. Biol. Chem.* 272(50), 31872-318726.
- Huang, L. S., Voyiaziakis, E., Markenson, D. F., Sokol, K. A., Hayek, T. and Breslow, J. L.** (1995) apo B gene knockout in mice results in embryonic lethality in homozygotes and neural tube defects, male infertility, and reduced HDL cholesterol ester and apo A-I transport rates in heterozygotes, *J Clin Invest.* 96, 2152-61.
- Hussain, M. M.** (2000) A proposed model for the assembly of chylomicrons, *Atherosclerosis.* 148, 1-15.
- Hussain, M. M., Bakillah, A. and Jamil, H.** (1997) Apolipoprotein B binding to microsomal triglyceride transfer protein decreases with increases in length and lipidation: implications in lipoprotein biosynthesis, *Biochemistry.* 36, 13060-7.
- Hussain, M. M., Bakillah, A., Nayak, N. and Shelness, G. S.** (1998) Amino acids 430-570 in apolipoprotein B are critical for its binding to microsomal triglyceride transfer protein, *J Biol Chem.* 273, 25612-5.
- Hussain, M. M., Shi, J. and Dreizen, P.** (2003a) Microsomal triglyceride transfer protein and its role in apoB-lipoprotein assembly, *J Lipid Res.* 44, 22-32.
- Hussain, M. M., Iqbal, J., Anwar, K., Rava, P. and Dai, K.** (2003b) Microsomal triglyceride transfer protein: a multifunctional protein, *Front Biosci.* 8, s500-6.
- Huyseune, A., Van der heyden, C. and Sire, J. Y.** (1998) Early development of the zebrafish (*Danio rerio*) pharyngeal dentition (Teleostei, Cyprinidae), *Anat Embryol (Berl)*. 198, 289-305.
- Innerarity, T. L., Boren, J., Yamanaka, S. and Olofsson, S. O.** (1996) Biosynthesis of apolipoprotein B48-containing lipoproteins. Regulation by novel post-transcriptional mechanisms, *J Biol Chem.* 271, 2353-6.
- Innerarity, T. L., Weisgraber, K. H., Arnold, K. S., Mahley, R. W., Krauss, R. M., Vega, G. L. and Grundy, S. M.** (1987) Familial defective apolipoprotein B-100: low density lipoproteins with abnormal receptor binding, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84, 6919-23.
- Iwai, T.** (1969) Fine structure of gut epithelial cells of larval and juvenile carp during absorption of fat and protein, *Arch Histol Jpn.* 30, 183-99.
- Izquierdo, M. S., Socorro, J., Arantzamendi, L., and Hernandez-Cruz, C. M.** (2000) Recent advances in lipid nutrition in fish larvae, *Fish Phys and Bioch.* 22, 97-107.

- Jackson, T. K., Salhanick, A. I., Elovson, J., Deichman, M. L. and Amatruda, J. M.** (1990) Insulin regulates apolipoprotein B turnover and phosphorylation in rat hepatocytes, *J Clin Invest.* 86(5), 1746-51.
- Jaillon O, Aury JM, Brunet F, Petit JL, Stange-Thomann N, Mauceli E, Bouneau L, Fischer C, Ozouf-Costaz C, Bernot A, Nicaud S, Jaffe D, Fisher S, Lutfalla G, Dossat C, Segurens B, Dasilva C, Salanoubat M, Levy M, Boudet N, Castellano S, Anthouard V, Jubin C, Castelli V, Katinka M, Vacherie B, Biemont C, Skalli Z, Cattolico L, Poulain J, De Berardinis V, Cruaud C, Duprat S, Brottier P, Coutanceau JP, Gouzy J, Parra G, Lardier G, Chapple C, McKernan KJ, McEwan P, Bosak S, Kellis M, Volff JN, Guigo R, Zody MC, Mesirov J, Lindblad-Toh K, Birren B, Nusbaum C, Kahn D, Robinson-Rechavi M, Laudet V, Schachter V, Quetier F, Saurin W, Scarpelli C, Wincker P, Lander ES, Weissenbach J, Roest Crolius H.** (2004) Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype, *Nature* 431(7011), 946-957.
- Jamil, H., Dickson, J. K., Jr., Chu, C. H., Lago, M. W., Rinehart, J. K., Biller, S. A., Gregg, R. E. and Wetterau, J. R.** (1995) Microsomal triglyceride transfer protein. Specificity of lipid binding and transport, *J Biol Chem.* 270, 6549-54.
- Jamil, H., Gordon, D. A., Eustice, D. C., Brooks, C. M., Dickson, J. K., Jr., Chen, Y., Ricci, B., Chu, C. H., Harrity, T. W., Ciosek, C. P., Jr., Biller, S. A., Gregg, R. E. and Wetterau, J. R.** (1996) An inhibitor of the microsomal triglyceride transfer protein inhibits apoB secretion from HepG2 cells, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 11991-5.
- Jendrisak, J., Young, R.A. and Engel, J.D.** (1987) In Berger, S.R. and Kimmel, A.R. (eds), *Methods in Enzymology 152, Guide to Molecular Cloning Techniques.* Academic Press, San Diego, CA
- Jersild, R. A., Jr. and Clayton, R. T.** (1971) A comparison of the morphology of lipid absorption in the jejunum and ileum of the adult rat, *Am J Anat.* 131, 481-503.
- Jollie, W. P.** (1990) Development, morphology, and function of the yolk-sac placenta of laboratory rodents, *Teratology.* 41, 361-81.
- Jones, B., Jones, E. L., Bonney, S. A., Patel, H. N., Mensenkamp, A. R., Eichenbaum-Voline, S., Rudling, M., Myrdal, U., Annesi, G., Naik, S., Meadows, N., Quattrone, A., Islam, S. A., Naoumova, R. P., Angelin, B., Infante, R., Levy, E., Roy, C. C., Freemont, P. S., Scott, J. and Shoulders, C. C.** (2003) Mutations in a Sar1 GTPase of COPII vesicles are associated with lipid absorption disorders, *Nat Genet.* 34, 29-31.
- Kane, J. P., Hardman, D. A. and Paulus, H. E.** (1980) Heterogeneity of apolipoprotein B: isolation of a new species from human chylomicrons, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77, 2465-9.
- Kang, S., Spann, N. J., Hui, T. Y. and Davis, R. A.** (2003) ARP-1/COUP-TF II determines hepatoma phenotype by acting as both a transcriptional repressor of microsomal triglyceride transfer protein and an inducer of CYP7A1, *J Biol Chem.* 278, 30478-86.
- Karpe, F., Lundahl, B., Ehrenborg, E., Eriksson, P. and Hamsten, A.** (1998) A common functional polymorphism in the promoter region of the microsomal triglyceride transfer protein gene influences plasma LDL levels, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 18, 756-61.
- Kim, E. and Young, S. G.** (1998) Genetically modified mice for the study of apolipoprotein B, *J Lipid Res.* 39, 703-23.
- Kimmel, C. B.** (1989) Genetics and early development of zebrafish, *Trends Genet.* 5, 283-8.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. and Schilling, T. F.** (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish, *Dev Dyn.* 203, 253-310.
- Kirchgesner, T. G., Heinzmann, C., Svenson, K. L., Gordon, D. A., Nicosia, M., Lebherz, H. G., Lusic, A. J. and Williams, D. L.** (1987) Regulation of chicken apolipoprotein B: cloning, tissue distribution, and estrogen induction of mRNA, *Gene.* 59, 241-51.

- Knott, T. J., Pease, R. J., Powell, L. M., Wallis, S. C., Rall, S. C., Jr., Innerarity, T. L., Blackhart, B., Taylor, W. H., Marcel, Y. and Milne, R.** (1986) Complete protein sequence and identification of structural domains of human apolipoprotein B, *Nature*. 323, 734-8.
- Kuge, O., Dascher, C., Orci, L., Rowe, T., Amherdt, M., Plutner, H., Ravazzola, M., Tanigawa, G., Rothman, J. E. and Balch, W. E.** (1994) Sar1 promotes vesicle budding from the endoplasmic reticulum but not Golgi compartments, *J Cell Biol.* 125(1), 51-65.
- Kulinski, A., Rustaeus, S. and Vance, J. E.** (2002) Microsomal triacylglycerol transfer protein is required for luminal accretion of triacylglycerol not associated with ApoB, as well as for ApoB lipidation, *J Biol Chem.* 277, 31516-25.
- Kumar, S. and Gadagkar, S. R.** (2000) Efficiency of the neighbor-joining method in reconstructing deep and shallow evolutionary relationships in large phylogenies, *J Mol Evol.* 51, 544-53.
- Kumar, N. S. and Mansbach, C. M.** (1997) Determinants of triacylglycerol transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi in intestine, *Am J Physiol.* 273, G18-30.
- Kumar, N. S. and Mansbach, C. M., 2nd.** (1999) Prechylomicron transport vesicle: isolation and partial characterization, *Am J Physiol.* 276, G378-86.
- Laboissiere, M. C., Sturley, S. L. and Raines, R. T.** (1995) The essential function of protein-disulfide isomerase is to unscramble non-native disulfide bonds, *J Biol Chem.* 270, 28006-9.
- Lancellotti, S., Di Leo, E., Penacchioni, J. Y., Balli, F., Viola, L., Bertolini, S., Calandra, S. and Tarugi, P.** (2004) Hypobetalipoproteinemia with an apparently recessive inheritance due to a "de novo" mutation of apolipoprotein B, *Biochim Biophys Acta.* 1688, 61-7.
- Langheinrich, U.** (2003) Zebrafish: a new model on the pharmaceutical catwalk, *Bioessays.* 25, 904-12.
- Langille, R. M. and Youson, J. H.** (1984) Morphology of the intestine of prefeeding and feeding adult lampreys *Petromyzon marinus* L.: the mucosa of the diverticulum, anterior intestine, and the transition zone, *J Morph.* 182, 39-61.
- Langille, R. M. and Youson, J. H.** (1985) Protein and lipid absorption in the intestinal mucosa of adult lampreys (*Petromyzon marinus* L.) following induced feeding, *Can J Zool.* 63, 691-702.
- Larsson, S. L., Skogsberg, J. and Bjorkegren, J.** (2004) The low density lipoprotein receptor prevents secretion of dense apoB100-containing lipoproteins from the liver. *J Biol Chem.* 279(2), 831-6.
- Law, A. and Scott, J.** (1990) A cross-species comparison of the apolipoprotein B domain that binds to the LDL receptor, *J Lipid Res.* 31, 1109-20.
- Ledmyr, H., McMahon, A. D., Ehrenborg, E., Nielsen, L. B., Neville, M., Lithell, H., MacFarlane, P. W., Packard, C. J. and Karpe, F.** (2004) The microsomal triglyceride transfer protein gene-493T variant lowers cholesterol but increases the risk of coronary heart disease, *Circulation.* 109, 2279-84.
- Leger, C., Bauchart, D. and Flanzy, J.** (1977) Some properties of pancreatic lipase in *Salmo gairdnerii* Rich.: Km, effects of bile salts and Ca²⁺, gel filtrations, *Comp Biochem Physiol B.* 57, 359-63.
- Lehninger, A. L., Nelson, N. D. and Cox, M. M.** (1993) Principles of Biochemistry (2nd edition) Worth, New York.
- Levy, E. and Menard, D.** (2000) Developmental aspects of lipid and lipoprotein synthesis and secretion in human gut, *Microsc Res Tech.* 49, 363-73.
- Levy, E., Marcel, Y., Deckelbaum, R. J., Milne, R., Lepage, G., Seidman, E., Bendayan, M. and Roy, C. C.** (1987) Intestinal apoB synthesis, lipids, and lipoproteins in chylomicron retention disease, *J Lipid Res.* 28, 1263-74.

- Levy, E., Stan, S., Delvin, E., Menard, D., Shoulders, C., Garofalo, C., Slight, I., Seidman, E., Mayer, G. and Bendayan, M.** (2002) Localization of microsomal triglyceride transfer protein in the Golgi: possible role in the assembly of chylomicrons, *J Biol Chem.* 277, 16470-7.
- Levy, E., Stan, S., Garofalo, C., Delvin, E. E., Seidman, E. G. and Menard, D.** (2001) Immunolocalization, ontogeny, and regulation of microsomal triglyceride transfer protein in human fetal intestine, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 280, G563-71.
- Levy, R. I., Fredrickson, D. S. and Laster, L.** (1966) The lipoproteins and lipid transport in abetalipoproteinemia, *J Clin Invest.* 45, 531-41.
- Liang, Y. Q., Kinoshita, M., Muto, T., Fujimaki, Y., Matsuki, N., Saito, H., Yamanaka, M. and Teramoto, T.** (1998) Defect in an intrahepatic degradation of apolipoprotein B in suncus: an animal model of hypobetalipoproteinemia, *J Biochem.* 123, 28-32.
- Liao, W., Hui, T. Y., Young, S. G. and Davis, R. A.** (2003a) Blocking microsomal triglyceride transfer protein interferes with apoB secretion without causing retention or stress in the ER, *J Lipid Res.* 44, 978-85.
- Liao, W., Chang, B. H., Mancini, M. and Chan, L.** (2003b) Ubiquitin-dependent and -independent proteasomal degradation of apoB associated with endoplasmic reticulum and Golgi apparatus, respectively, in HepG2 cells, *J Cell Biochem.* 89, 1019-29.
- Lin, M. C., Arbeeny, C., Bergquist, K., Kienzle, B., Gordon, D. A. and Wetterau, J. R.** (1994) Cloning and regulation of hamster microsomal triglyceride transfer protein. The regulation is independent from that of other hepatic and intestinal proteins which participate in the transport of fatty acids and triglycerides, *J Biol Chem.* 269, 29138-45.
- Lin, M. C., Wang, E. J., Lee, C., Chin, K. T., Liu, D., Chiu, J. F. and Kung, H. F.** (2002) Garlic inhibits microsomal triglyceride transfer protein gene expression in human liver and intestinal cell lines and in rat intestine, *J Nutr.* 132, 1165-8.
- Lindberg, A. and Olivecrona, G.** (2002) Lipoprotein lipase from rainbow trout differs in several respects from the enzyme in mammals, *Gene.* 292, 213-23.
- Linden, D., Lindberg, K., Oscarsson, J., Claesson, C., Asp, L., Li, L., Gustafsson, M., Boren, J. and Olofsson, S. O.** (2002) Influence of peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists on the intracellular turnover and secretion of apolipoprotein (Apo) B-100 and ApoB-48, *J Biol Chem.* 277, 23044-53.
- Linton, M. F., Farese, R. V., Jr. and Young, S. G.** (1993) Familial hypobetalipoproteinemia, *J Lipid Res.* 34, 521-41.
- Liu, J. J., Nilsson, A. and Duan, R. D.** (2002) In vitro effects of fat, FA, and cholesterol on sphingomyelin hydrolysis induced by rat intestinal alkaline sphingomyelinase, *Lipids.* 37, 469-74.
- Liu, R. Z., Denovan-Wright, E. M. and Wright, J. M.** (2003a) Structure, mRNA expression and linkage mapping of the brain-type fatty acid-binding protein gene (FABP7) from zebrafish (*Danio rerio*), *Eur J Biochem.* 270, 715-25.
- Liu, R. Z., Denovan-Wright, E. M. and Wright, J. M.** (2003b) Structure, linkage mapping and expression of the heart-type fatty acid-binding protein gene (fabp3) from zebrafish (*Danio rerio*), *Eur J Biochem.* 270, 3223-34.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.** (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J Biol Chem.* 193, 265-75.
- Lu, S., Huffman, M., Yao, Y., Mansbach, C. M., 2nd, Cheng, X., Meng, S. and Black, D. D.** (2002) Regulation of MTP expression in developing swine, *J Lipid Res.* 43, 1303-11.
- Macheboeuf, M. and Rebeyrotte, P.** (1951) Study of lipoprotein acid precipitable fractions of horse serum by salting out, electrophoresis and ultracentrifugation. *Bull Soc Chim Biol (Paris)*, 33, 998-1002.

Madsen, E. M., Lindegaard, M. L., Andersen, C. B., Damm, P. and Nielsen, L. B. (2004) Human placenta secretes apolipoprotein B-100-containing lipoproteins, *J Biol Chem*.

Mahmood, A., Shao, J. S. and Alpers, D. H. (2003) Rat enterocytes secrete SLPs containing alkaline phosphatase and cubilin in response to corn oil feeding, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 285, G433-41.

Manchekar, M., Richardson, P. E., Forte, T. M., Datta, G., Segrest, J. P. and Dashti, N. (2004) Apolipoprotein B-containing lipoprotein particle assembly: lipid capacity of the nascent lipoprotein particle, *J Biol Chem*. 279, 39757-66.

Mani-Ponset, L., Guyot, E., Diaz, J. P. and Connes, R. (1996) Utilisation of yolk reserves during post-embryonic development of three teleostean species : the sea bream *Sparus aurata*, the sea bass *Dicentrarchus labrax*, and the pike-perch *Stizostedion lucioperca*, *Mar Biol*. 126, 539-47.

Mann, C. J., Anderson, T. A., Read, J., Chester, S. A., Harrison, G. B., Kochl, S., Ritchie, P. J., Bradbury, P., Hussain, F. S., Amey, J., Vanloo, B., Rosseneu, M., Infante, R., Hancock, J. M., Levitt, D. G., Banaszak, L. J., Scott, J. and Shoulders, C. C. (1999) The structure of vitellogenin provides a molecular model for the assembly and secretion of atherogenic lipoproteins, *J Mol Biol*. 285, 391-408.

Mansbach, C. M., 2nd and Nevin, P. (1998) Intracellular movement of triacylglycerols in the intestine, *J Lipid Res*. 39, 963-8.

Mars, H., Lewis, L. A., Robertson, A. L., Jr., Butkus, A. and Williams, G. H., Jr. (1969) Familial hypo-beta-lipoproteinemia: a genetic disorder of lipid metabolism with nervous system involvement, *Am J Med*. 46, 886-900.

Marza, E., Barthe, C., André, M., Villeneuve, L., Helou, C. and Babin, P. J. (2005) Developmental expression and nutritional regulation of a zebrafish gene homologous to mammalian microsomal triglyceride transfer protein large subunit, *Dev. Dyn.*, 232(2), 506-18.

Meinelt, T., Schulz, C., Wirth, M., Kurzinger, H. and Steinberg, C. (1999) The fatty acid composition of diet influences the quality of fish eggs, *J Appl Ichthyol*, 15, 19-23.

Meinelt, T., Schulz, C., Wirth, M., Kurzinger, H. and Steinberg, C. (2000) Correlation of diets high in n-6 polyunsaturated fatty acids with high growth rate in zebrafish (*Danio rerio*), *Comp. Med*. 50(1), 43-45.

Merrill, A. H., Jr. (1993) Apo A-IV: a new satiety signal, *Nutr Rev*. 51, 273-5.

Metcalf, V. J., Brennan, S. O., Chambers, G. K. and George, P. M. (1998) The albumin of the brown trout (*Salmo trutta*) is a glycoprotein, *Biochim Biophys Acta*. 1386, 90-6.

Metcalf, V. J., Brennan, S. O. and George, P. M. (1999a) The Antarctic toothfish (*Dissostichus mawsoni*) lacks plasma albumin and utilises high density lipoprotein as its major palmitate binding protein, *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 124, 147-55.

Metcalf, V. J., Brennan, S. O., Chambers, G. and George, P. M. (1999b) High density lipoprotein (HDL), and not albumin, is the major palmitate binding protein in New Zealand long-finned (*Anguilla dieffenbachii*) and short-finned eel (*Anguilla australis schmidtii*) plasma, *Biochim Biophys Acta*. 1429, 467-75.

Monnot, M. J., Babin, P. J., Poleo, G., Andre, M., Leforest, L., Ballagny, C. and Akimenko, M. A. (1999) Epidermal expression of apolipoprotein E gene during fin and scale development and fin regeneration in zebrafish, *Dev Dyn*. 214, 207-15.

Morais, S., Cahu, C., Zambonino-Lnfante, J. L., Robin, J., Ronnestad, I., Dinis, M. T. and Conceicao, L. E. (2004) Dietary TAG source and level affect performance and lipase expression in larval sea bass (*Dicentrarchus labrax*), *Lipids*. 39, 449-58.

Morel, E., Demignot, S., Chateau, D., Chambaz, J., Rousset, M. and Delers, F. (2004) Lipid-dependent bidirectional traffic of apolipoprotein B in polarized enterocytes, *Mol Biol Cell*. 15, 132-41.

- Morrison, T. B., Weis, J. J. and Wittwer, C. T.** (1998) Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification, *Biotechniques*. 24, 954-8, 960, 962.
- Namikawa, C., Shu-Ping, Z., Vyselaar, J. R., Nozaki, Y., Nemoto, Y., Ono, M., Akisawa, N., Saibara, T., Hiroi, M., Enzan, H. and Onishi, S.** (2004) Polymorphisms of microsomal triglyceride transfer protein gene and manganese superoxide dismutase gene in non-alcoholic steatohepatitis, *J Hepatol*. 40, 781-6.
- Narayanan, V. S. and Storch, J.** (1996) Fatty acid transfer in taurodeoxycholate mixed micelles, *Biochemistry*. 35, 7466-73.
- Narcisi, T. M., Shoulders, C. C., Chester, S. A., Read, J., Brett, D. J., Harrison, G. B., Grantham, T. T., Fox, M. F., Povey, S. and de Bruin, T. W.** (1995) Mutations of the microsomal triglyceride-transfer-protein gene in abetalipoproteinemia, *Am J Hum Genet*. 57, 1298-310.
- Naupert, C. and Rommel, K.** (1975) Absorption of short and medium chain fatty acids in the jejunum of the rat, *Z Klin Chem Klin Biochem*. 13, 553-62.
- Nielsen, L. B., Veniant, M., Boren, J., Raabe, M., Wong, J. S., Tam, C., Flynn, L., Vanni-Reyes, T., Gunn, M. D., Goldberg, I. J., Hamilton, R. L. and Young, S. G.** (1998) Genes for apolipoprotein B and microsomal triglyceride transfer protein are expressed in the heart: evidence that the heart has the capacity to synthesize and secrete lipoproteins, *Circulation*. 98, 13-6.
- Noaillac-Depeyre, J. and Gas, N.** (1973) Absorption of protein macromolecules by the enterocytes of the carp (*Cyprinus carpio* L.). Ultrastructural and cytochemical study, *Z Zellforsch Mikrosk Anat*. 146, 525-41.
- Noaillac-Depeyre, J. and Gas, N.** (1976) Electron microscopic study on gut epithelium of the tench (*Tinca tinca* L.) with respect to its absorptive functions, *Tissue Cell*. 8, 511-30.
- Noble, R. P.** (1968) Electrophoretic separation of plasma lipoproteins in agarose gel, *J Lipid Res*. 9, 693-700.
- Ober, E. A., Field, H. A. and Stainier, D. Y.** (2003) From endoderm formation to liver and pancreas development in zebrafish, *Mech Dev*. 120, 5-18.
- Ohashi, K., Ishibashi, S., Osuga, J., Tozawa, R., Harada, K., Yahagi, N., Shionoiri, F., Iizuka, Y., Tamura, Y., Nagai, R., Illingworth, D. R., Gotoda, T. and Yamada, N.** (2000) Novel mutations in the microsomal triglyceride transfer protein gene causing abetalipoproteinemia, *J Lipid Res*. 41, 1199-204.
- Oku, H., Ogata, H. Y. and Liang, X. F.** (2002) Organization of the lipoprotein lipase gene of red sea bream *Pagrus major*, *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 131, 775-85.
- Pack, M., Solnica-Krezel, L., Malicki, J., Neuhauss, S. C., Schier, A. F., Stemple, D. L., Driever, W. and Fishman, M. C.** (1996) Mutations affecting development of zebrafish digestive organs, *Development*. 123, 321-8.
- Pan, M., Liang Js, J. S., Fisher, E. A. and Ginsberg, H. N.** (2002) The late addition of core lipids to nascent apolipoprotein B100, resulting in the assembly and secretion of triglyceride-rich lipoproteins, is independent of both microsomal triglyceride transfer protein activity and new triglyceride synthesis, *J Biol Chem*. 277, 4413-21.
- Patel, S. B. and Grundy, S. M.** (1996) Interactions between microsomal triglyceride transfer protein and apolipoprotein B within the endoplasmic reticulum in a heterologous expression system, *J Biol Chem*. 271, 18686-94.
- Patton, J. S. and Carey, M. C.** (1979) Watching fat digestion, *Science*. 204, 145-8.
- Patton, E. E. and Zon, L. I.** (2001) The art and design of genetic screens: zebrafish, *Nat Rev Genet*. 2, 956-66.
- Phillips, C., Bennett, A., Anderton, K., Owens, D., Collins, P., White, D. and Tomkin, G. H.** (2002) Intestinal rather than hepatic microsomal triglyceride transfer protein as a cause of postprandial dyslipidemia in diabetes, *Metabolism*, 51, 847-52.

- Phung, T. L., Roncone, A., Jensen, K. L., Sparks, C. E. and Sparks, J. D.** (1997) Phosphoinositide 3-kinase activity is necessary for insulin-dependent inhibition of apolipoprotein B secretion by rat hepatocytes and localizes to the endoplasmic reticulum, *J Biol Chem.* 272(49):30693-702.
- Postlethwait, J. H., Woods, I. G., Ngo-Hazelett, P., Yan, Y. L., Kelly, P. D., Chu, F., Huang, H., Hill-Force, A. and Talbot, W. S.** (2000) Zebrafish comparative genomics and the origins of vertebrate chromosomes, *Genome Res.* 10, 1890-902.
- Poupard, G., Andre, M., Durliat, M., Ballagny, C., Boeuf, G. and Babin, P. J.** (2000) Apolipoprotein E gene expression correlates with endogenous lipid nutrition and yolk syncytial layer lipoprotein synthesis during fish development, *Cell Tissue Res.* 300, 251-61.
- Powell, L. M., Wallis, S. C., Pease, R. J., Edwards, Y. H., Knott, T. J. and Scott, J.** (1987) A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine, *Cell.* 50, 831-40.
- Puchois, P., Alaupovic, P. and Fruchart, J. C.** (1985) [Focus on the classification of plasma lipoproteins], *Ann Biol Clin (Paris).* 43, 831-40.
- Pullinger, C. R., Hennessy, L. K., Chatterton, J. E., Liu, W., Love, J. A., Mendel, C. M., Frost, P. H., Malloy, M. J., Schumaker, V. N. and Kane, J. P.** (1995) Familial ligand-defective apolipoprotein B. Identification of a new mutation that decreases LDL receptor binding affinity, *J Clin Invest.* 95, 1225-34.
- Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E. and Werner, T.** (1995) MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data, *Nucleic Acids Res.* 23, 4878-84.
- Quessada, J.** (1987) Aspects lipidiques des développements embryonnaires et larvaires du loup, *Dicentrarchus labrax*, du sar, *Diplodus sargus*, et de la daurade, *Sparus auratus*, en relation avec les réserves endogènes et les conditions trophiques. Thèse 3^{ème} cycle, Université de Montpellier II.
- Raabe, M., Flynn, L. M., Zlot, C. H., Wong, J. S., Veniant, M. M., Hamilton, R. L. and Young, S. G.** (1998) Knockout of the abetalipoproteinemia gene in mice: reduced lipoprotein secretion in heterozygotes and embryonic lethality in homozygotes, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 8686-91.
- Raabe, M., Veniant, M. M., Sullivan, M. A., Zlot, C. H., Bjorkegren, J., Nielsen, L. B., Wong, J. S., Hamilton, R. L. and Young, S. G.** (1999) Analysis of the role of microsomal triglyceride transfer protein in the liver of tissue-specific knockout mice, *J Clin Invest.* 103, 1287-98.
- Raag, R., Appelt, K., Xuong, N. H. and Banaszak, L.** (1988) Structure of the lamprey yolk lipid-protein complex lipovitellin-phosvitin at 2.8 Å resolution, *J Mol Biol.* 200, 553-69.
- Radünz-Neto, J., Corraze, G., Charlon, N. and Bergot, P.** (1994) Lipid supplementation of casein-based purified diets for carps (*Cyprinus carpio* L.) larvae, *Aquaculture.* 128, 153-161.
- Rauh, G., Keller, C., Schuster, H., Wolfram, G. and Zollner, N.** (1992) Familial defective apolipoprotein B-100: a common cause of primary hypercholesterolemia, *Clin Investig.* 70, 77-84.
- Read, J., Anderson, T. A., Ritchie, P. J., Vanloo, B., Amey, J., Levitt, D., Rosseneu, M., Scott, J. and Shoulders, C. C.** (2000) A mechanism of membrane neutral lipid acquisition by the microsomal triglyceride transfer protein, *J Biol Chem.* 275, 30372-7.
- Reed, K. C. and Mann, D. A.** (1985) Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes, *Nucleic Acids Res.* 13, 7207-21.
- Rehberg, E. F., Samson-Bouma, M. E., Kienzle, B., Blinderman, L., Jamil, H., Wetterau, J. R., Aggerbeck, L. P. and Gordon, D. A.** (1996) A novel abetalipoproteinemia genotype. Identification of a missense mutation in the 97-kDa subunit of the microsomal triglyceride transfer protein that prevents complex formation with protein disulfide isomerase, *J Biol Chem.* 271, 29945-52.

- Richardson, P. E., Manchekar, M., Dashti, N., Jones, M. K., Beigneux, A., Young, S. G., Harvey, S. C. and Segrest, J.P.** (2005) Assembly of Lipoprotein Particles Containing Apolipoprotein-B: Structural Model for the Nascent Lipoprotein Particle, *Biophys. J.*
- Ricci, B., Sharp, D., O'Rourke, E., Kienzle, B., Blinderman, L., Gordon, D., Smith-Monroy, C., Robinson, G., Gregg, R. E. and Rader, D. J.** (1995) A 30-amino acid truncation of the microsomal triglyceride transfer protein large subunit disrupts its interaction with protein disulfide-isomerase and causes abetalipoproteinemia, *J Biol Chem.* 270, 14281-5.
- Ringseis, R. and Eder, K.** (2004) Dietary oxidized cholesterol decreases expression of hepatic microsomal triglyceride transfer protein in rats, *J Nutr Biochem.* 15, 103-11.
- Rodriguez, M. D., Kalogeris, T. J., Wang, X. L., Wolf, R. and Tso, P.** (1997) Rapid synthesis and secretion of intestinal apolipoprotein A-IV after gastric fat loading in rats, *Am J Physiol.* 272, R1170-7.
- Rogie, A. and Skinner, E. R.** (1978) The roles of the intestine and liver in the biosynthesis of plasma lipoproteins in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, *Comp Biochem Physiol*, 81B, 285-9.
- Rombout, J. H., Stroband, H. W. and Taverne-Thiele, J. J.** (1984) Proliferation and differentiation of intestinal epithelial cells during development of *Barbus conchonus* (Teleostei, Cyprinidae), *Cell Tissue Res.* 236, 207-16.
- Roy, C. C., Levy, E., Green, P. H., Sniderman, A., Letarte, J., Buts, J. P., Orquin, J., Brochu, P., Weber, A. M. and Morin, C. L.** (1987) Malabsorption, hypocholesterolemia, and fat-filled enterocytes with increased intestinal apoprotein B. Chylomicron retention disease, *Gastroenterology.* 92, 390-9.
- Rubinstein, A. L.** (2003) Zebrafish: from disease modeling to drug discovery, *Curr Opin Drug Discov Devel.* 6, 218-23.
- Rustaeus, S., Lindberg, K., Stillemark, P., Claesson, C., Asp, L., Larsson, T., Boren, J. and Olofsson, S. O.** (1999) Assembly of very low density lipoprotein: a two-step process of apolipoprotein B core lipidation, *J Nutr.* 129, 463S-466S.
- Sabesin, S. M. and Frase, S.** (1977) Electron microscopic studies of the assembly, intracellular transport, and secretion of chylomicrons by rat intestine, *J Lipid Res.* 18, 496-511.
- Salhi, M., Hernandez-Cruz, C. M., Bessonart, M., Izquierdo, M. S. and Fernandez-Palacios, H.** (1999) Effect of different dietary polar lipid levels and different n-3 HUFA content in polar lipids on gut and liver histological structure of gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae, *Aquaculture.* 179, 253-63.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.** (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd edition. Cold spring harbor laboratory press.
- Samson-Bouma, M. E., Verthier, N., Ginsel, L. A., Feldmann, G., Fransen, J. A. and Aggerbeck, L. P.** (1996) Ultrastructural immunogold labeling of lipid-laden enterocytes from patients with genetic malabsorption syndromes, *Biol Cell.* 87, 189-96.
- Santamarina-Fojo, S. and Brewer, H. B., Jr.** (1994) Lipoprotein lipase: structure, function and mechanism of action, *Int J Clin Lab Res.* 24, 143-7.
- Sargent, J. R.** (1997) Fish oils and human diet, *British Journal of Nutrition*, 78, Suppl.1, S5-S13.
- Sargent, J., Henderson, R. J. and Tocher, D. R.** (1989) The lipids. In *Fish Nutrition*, Second Edition, Academic Press, 153-218.
- Sargent, J., McEvoy, L., Estevez, A., Bell, M., Henderson, R. J. and Tocher, D. R.** (1999) Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions, *Aquaculture.* 179, 217-29.
- Scanu, A. M., Aggerbeck, L. P., Kruski, A. W., Lim, C. T. and Kayden, H. J.** (1974) A study of the abnormal lipoproteins in abetalipoproteinemia, *J Clin Invest.* 53, 440-53.

- Schaffer, J. E. and Lodish, H. F.** (1994) Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein, *Cell*. 79, 427-36.
- Schonfeld, G., Patterson, B. W., Yablonskiy, D. A., Tanoli, T. S., Averna, M., Elias, N., Yue, P. and Ackerman, J.** (2003) Fatty liver in familial hypobetalipoproteinemia: triglyceride assembly into VLDL particles is affected by the extent of hepatic steatosis, *J Lipid Res*. 44, 470-8.
- Schumaker, V. N., Phillips, M. L. and Chatterton, J. E.** (1994) Apolipoprotein B and low-density lipoprotein structure: implications for biosynthesis of triglyceride-rich lipoproteins, *Adv Protein Chem*. 45, 205-48.
- Segrest, J. P., Jones, M. K. and Dashti, N.** (1999) N-terminal domain of apolipoprotein B has structural homology to lipovitellin and microsomal triglyceride transfer protein: a "lipid pocket" model for self-assembly of apob-containing lipoprotein particles, *J Lipid Res*. 40, 1401-16.
- Segrest, J. P., Jones, M. K., De Loof, H. and Dashti, N.** (2001) Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins, *J Lipid Res*. 42, 1346-67.
- Segrest, J. P., Jones, M. K., Mishra, V. K., Anantharamaiah, G. M. and Garber, D. W.** (1994) apoB-100 has a pentapartite structure composed of three amphipathic alpha-helical domains alternating with two amphipathic beta-strand domains. Detection by the computer program LOCATE, *Arterioscler Thromb*. 14, 1674-85.
- Selby, S. L. and Yao, Z.** (1995) Level of apolipoprotein B mRNA has an important effect of the synthesis and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins. Studies on transfected hepatoma cell lines expressing recombinant human apolipoprotein B, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15(11), 1900-10.
- Sellers, J. A., Hou, L., Athar, H., Hussain, M. M. and Shelness, G. S.** (2003) A Drosophila microsomal triglyceride transfer protein homolog promotes the assembly and secretion of human apolipoprotein B. Implications for human and insect transport and metabolism, *J Biol Chem*. 278, 20367-73.
- Selman, K. and Wallace, R. A.** (1983) Oogenesis in *Fundulus heteroclitus*. III. Vitellogenesis, *J Exp Zool*. 226, 441-57.
- Sharma, M. K., Denovan-Wright, E. M., Degrave, A., Thisse, C., Thisse, B. and Wright, J. M.** (2004) Sequence, linkage mapping and early developmental expression of the intestinal-type fatty acid-binding protein gene (fabp2) from zebrafish (*Danio rerio*), *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 138(4), 391-8.
- Sharp, D., Blinderman, L., Combs, K. A., Kienzle, B., Ricci, B., Wager-Smith, K., Gil, C. M., Turck, C. W., Bouma, M. E. and Rader, D. J.** (1993) Cloning and gene defects in microsomal triglyceride transfer protein associated with abetalipoproteinemia, *Nature*. 365, 65-9.
- Sharp, D., Ricci, B., Kienzle, B., Lin, M. C. and Wetterau, J. R.** (1994) Human microsomal triglyceride transfer protein large subunit gene structure, *Biochemistry*. 33, 9057-61.
- Shelness, G. S., Hou, L., Ledford, A. S., Parks, J. S. and Weinberg, R. B.** (2003) Identification of the lipoprotein initiating domain of apolipoprotein B, *J Biol Chem*. 278, 44702-7.
- Shelton, J. M., Lee, M. H., Richardson, J. A. and Patel, S. B.** (2000) Microsomal triglyceride transfer protein expression during mouse development, *J Lipid Res*. 41, 532-7.
- Shen, Y., Lindberg, A. and Olivecrona, G.** (2000) Apolipoprotein CII from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is functionally active but structurally very different from mammalian apolipoprotein CII, *Gene*, 254, 189-98.
- Shepherd, J., and Fruchart, J. C.** (1989) Human plasma lipoproteins. Clinical Biochemistry Principles. Methods. Applications. Vol. 3. *Fruchart et Shepherd edition*. Walter de Gruyter. Berlin.
- Short, J. M., Fernandez, J. M., Sorge, J. A. and Huse, W. D.** (1988) Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acids Res*. 16(15), 7583-600.

- Shoulders, C. C., Brett, D. J., Bayliss, J. D., Narcisi, T. M., Jarmuz, A., Grantham, T. T., Leoni, P. R., Bhattacharya, S., Pease, R. J. and Cullen, P. M.** (1993) Abetalipoproteinemia is caused by defects of the gene encoding the 97 kDa subunit of a microsomal triglyceride transfer protein, *Hum Mol Genet.* 2, 2109-16.
- Shoulders, C. C., Stephens, D. J. and Jones, B.** (2004) The intracellular transport of chylomicrons requires the small GTPase, Sar1b, *Curr Opin Lipidol.* 15, 191-7.
- Siddiqi, S. A., Gorelick, F. S., Mahan, J. T. and Mansbach, C. M., 2nd.** (2003) COPII proteins are required for Golgi fusion but not for endoplasmic reticulum budding of the pre-chylomicron transport vesicle, *J Cell Sci.* 116, 415-27.
- Singh, K., Batuman, O. A., Akman, H. O., Kedees, M. H., Vakil, V. and Hussain, M. M.** (2002) Differential, tissue-specific, transcriptional regulation of apolipoprotein B secretion by transforming growth factor beta, *J Biol Chem.* 277, 39515-24.
- Sire, M. F., Lutton, C. and Vernier, J. M.** (1981) New views on intestinal absorption of lipids in teleostean fishes: an ultrastructural and biochemical study in the rainbow trout, *J Lipid Res.* 22, 81-94.
- Sire, M. F. and Vernier, J. M.** (1979) Formation de VLDL intestinales endogènes. Etude ultrastructurale sur un nouveau modèle, l'embryon et l'adulte, à jeun, de Truite, *Biol Cell.* 35, 271-80.
- Skinner, E. R. and Rogie, A.** (1978) The isolation and partial characterization of the serum lipoproteins and apolipoproteins of the rainbow trout, *Biochem J.* 173, 507-20.
- Slight, I., Bendayan, M., Malo, C., Delvin, E., Lambert, M. and Levy, E.** (2004) Identification of microsomal triglyceride transfer protein in intestinal brush-border membrane, *Exp Cell Res.* 300, 11-22.
- Smart, E. J., De Rose, R. A. and Farber, S. A.** (2004) Annexin 2-caveolin 1 complex is a target of ezetimibe and regulates intestinal cholesterol transport, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 3450-5.
- Smith, L. S.** (1989) Digestive functions in teleost fishes. In *Fish Nutrition*, Second Edition, Academic Press, 331-421.
- Soria, L. F., Ludwig, E. H., Clarke, H. R., Vega, G. L., Grundy, S. M. and McCarthy, B. J.** (1989) Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86, 587-91.
- Soufi, M., Sattler, A. M., Maerz, W., Starke, A., Herzum, M., Maisch, B. and Schaefer, J. R.** (2004) A new but frequent mutation of apoB-100-apoB His3543Tyr, *Atherosclerosis.* 174, 11-6.
- Sparks, J. D., Sparks, C. E., Bolognino, M., Roncone, A. M., Jackson, T. K., Amatruda, J. M.** (1988) Effects of nonketotic streptozotocin diabetes on apolipoprotein B synthesis and secretion by primary cultures of rat hepatocytes, *J. Clin. Invest.* 82(1), 37-43.
- Speake, B. K., Murray, A. M. and Noble, R. C.** (1998) Transport and transformations of yolk lipids during development of the avian embryo, *Prog Lipid Res.* 37, 1-32.
- Spring, D. J., Chen-Liu, L. W., Chatterton, J. E., Elovson, J. and Schumaker, V. N.** (1992) Lipoprotein assembly. Apolipoprotein B size determines lipoprotein core circumference, *J Biol Chem.* 267, 14839-45.
- Springer, S., Spang, A. and Schekman, R.** (1999) A primer on vesicle budding, *Cell.* 97(2), 145-8.
- Sternby, B., Engstrom, A. and Hellman, U.** (1984) Purification and characterization of pancreatic colipase from the dogfish (*Squalus acanthius*), *Biochim Biophys Acta.* 789, 159-63.
- Storch, J. and Thumser, A. E.** (2000) The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins, *Biochim Biophys Acta.* 1486, 28-44.
- Stremmel, W.** (1988) Uptake of fatty acids by jejunal mucosal cells is mediated by a fatty acid binding membrane protein, *J Clin Invest.* 82, 2001-10.

- Swift, L. L.** (1996) Role of the Golgi apparatus in the phosphorylation of apolipoprotein B, *J. Biol. Chem.* 271(49), 31491- 31495.
- Swift, L. L., Zhu, M. Y., Kakkad, B., Jovanovska, A., Neely, M. D., Valyi-Nagy, K., Roberts, R. L., Ong, D. E. and Jerome, W. G.** (2003) Subcellular localization of microsomal triglyceride transfer protein, *J Lipid Res.* 44, 1841-9.
- Takahashi, S., Kawarabayasi, Y., Nakai, T., Sakai, J. and Yamamoto, T.** (1992) Rabbit very low density lipoprotein receptor: a low density lipoprotein receptor-like protein with distinct ligand specificity, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(19), 9252-6.
- Takahashi, S., Sakai, J., Fujino, T., Hattori, H., Zenimaru, Y., Suzuki, J., Miyamori, I. and Yamamoto, T. T.** (2004) The very low-density lipoprotein (VLDL) receptor: characterization and functions as a peripheral lipoprotein receptor. *J Atheroscler Thromb.* 11(4), 200-8.
- Takeuchi, T.** (1996) Essential fatty acid requirements in carp, *Arch Tierernahr.* 49(1), 23-32.
- Tarugi, P., Albertazzi, L., Nicolini, S. and Calandra, S.** (1990) Absence of apolipoprotein B-48 in the chick, *Gallus domesticus*, *J Lipid Res.* 31, 417-27.
- Tarugi, P., Ballarini, G., Pinotti, B., Franchini, A., Ottaviani, E. and Calandra, S.** (1998) Secretion of apoB- and apoA-I-containing lipoproteins by chick kidney, *J Lipid Res.* 39, 731-43.
- Teng, B. and Davidson, N. O.** (1992) Evolution of intestinal apolipoprotein B mRNA editing. Chicken apolipoprotein B mRNA is not edited, but chicken enterocytes contain in vitro editing enhancement factor(s), *J Biol Chem.* 267, 21265-72.
- Terasawa, Y., Cases, S. J., Wong, J. S., Jamil, H., Jothi, S., Traber, M. G., Packer, L., Gordon, D. A., Hamilton, R. L. and Farese, R. V., Jr.** (1999) Apolipoprotein B-related gene expression and ultrastructural characteristics of lipoprotein secretion in mouse yolk sac during embryonic development, *J Lipid Res.* 40, 1967-77.
- Thisse, C., Thisse, B., Schilling, T. F. and Postlethwait, J. H.** (1993) Structure of the zebrafish *snail1* gene and its expression in wild-type, spadetail and no tail mutant embryos, *Development.* 119, 1203-15.
- Thisse, C. and Zon, L. I.** (2002) Organogenesis--heart and blood formation from the zebrafish point of view, *Science.* 295, 457-62.
- Thompson, J. R. and Banaszak, L. J.** (2002) Lipid-protein interactions in lipovitellin, *Biochemistry.* 41, 9398-409.
- Timmins, P. A., Poliks, B. and Banaszak, L.** (1992) The location of bound lipid in the lipovitellin complex, *Science.* 257, 652-5.
- Tocher, D. R., Agaba, M., Hastings, N., Bell, J. G., Dick, J. R. and Teale, A. J.** (2002) Nutritional regulation of hepatocyte fatty acid desaturation and polyunsaturated fatty acid composition in zebrafish (*Danio rerio*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*), *Fish Phys Biochem.* 24, 309-20.
- Tomasiewicz, H. G., Flaherty, D. B., Soria, J. P. and Wood, J. G.** (2002) Transgenic zebrafish model of neurodegeneration, *J Neurosci Res.* 70, 734-45.
- Tran, K., Boren, J., Macri, J., Wang, Y., McLeod, R., Avramoglu, R. K., Adeli, K. and Yao, Z.** (1998) Functional analysis of disulfide linkages clustered within the amino terminus of human apolipoprotein B, *J Biol Chem.* 273, 7244-51.
- Trotter, P. J., Ho, S. Y. and Storch, J.** (1996) Fatty acid uptake by Caco-2 human intestinal cells, *J Lipid Res.* 37, 336-46.
- Tsai, S. C. and Gaylor, J. L.** (1966) Testicular sterols. V. Preparation and partial purification of a microsomal prenyl pyrophosphate pyrophosphohydrolase, *J Biol Chem.* 241, 4043-50.

- Twisk, J., Gillian-Daniel, D. L., Tebon, A., Wang, L., Barrett, P. H. and Attie, A. D.** (2000) The role of the LDL receptor in apolipoprotein B secretion. *J Clin Invest.* 105(4), 521-32.
- Ullmann, A., Jacob, F. and Monod, J.** (1967) Characterization by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the beta-galactosidase structural gene of *Escherichia coli*, *J Mol Biol.* 24, 339-43.
- Valyi-Nagy, K., Harris, C. and Swift, L. L.** (2002) The assembly of hepatic very low density lipoproteins: evidence of a role for the Golgi apparatus, *Lipids.* 37, 879-84.
- Van der Heyden, C. and Huysseune, A.** (2000) Dynamics of tooth formation and replacement in the zebrafish (*Danio rerio*) (Teleostei, Cyprinidae), *Dev Dyn.* 219, 486-96.
- Van Tilbeurgh, H., Egloff, M. P., Martinez, C., Rugani, N., Verger, R. and Cambillau, C.** (1993) Interfacial activation of the lipase-procolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography, *Nature.* 362, 814-20.
- Vernier, J. M. and Sire, M. F.** (1977). Lipoprotéines de très basse densité et glycogène dans le syncytium vitellin, l'épithélium intestinal et le foie, aux stades précoces du développement embryonnaire chez la truite arc-en-ciel, *Biol. Cell.* 29, 45-53.
- Vetter, R. D., Carey, M. C. and Patton, J. S.** (1985) Coassimilation of dietary fat and benzo(a)pyrene in the small intestine: an absorption model using the killifish, *J Lipid Res.* 26, 428-34.
- Vilas, G. L. and Berthiaume, L. G.** (2004) A role for palmitoylation in the quality control, assembly and secretion of apolipoprotein B. *Biochem J.* 377, 121-30.
- Voet, D. and Voet, J. G.** (1995) *Biochemistry.* 2nd edition. John Wiley and sons.
- Vukmirica, J., Tran, K., Liang, X., Shan, J., Yuan, J., Miskie, B. A., Hegele, R. A., Resh, M. D. and Yao, Z.** (2003) Assembly and secretion of very low density lipoproteins containing apolipoprotein B48 in transfected McA-RH7777 cells. Lack of evidence that palmitoylation of apolipoprotein B48 is required for lipoprotein secretion, *J Biol Chem.* 278(16), 14153-61
- Wallace, K. N. and Pack, M.** (2003) Unique and conserved aspects of gut development in zebrafish, *Dev Biol.* 255, 12-29.
- Wallace, K. N., Akhter, S., Smith, E. M., Lorent, K. and Pack, M.** (2005) Intestinal growth and differentiation in zebrafish, *Mech. Dev.* 122(2), 157-173.
- Wallaert, C. and Babin, P. J.** (1992) Effects of 17 β – estradiol and starvation on trout plasma lipoproteins, *Lipids* 27, 1032-41.
- Wallaert, C. and Babin, P. J.** (1994a) Age-related, sex-related, and seasonal changes of plasma lipoprotein concentrations in trout, *J Lipid Res.* 35, 1619-33.
- Wallaert, C. and Babin, P. J.** (1994b) Effects of temperature variations on dietary lipid absorption and plasma lipoprotein concentrations in trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Comp. Biochem. Physiol.* 109B, 473-87.
- Walzer, C. and Schonenberger, N.** (1979a) Ultrastructure and cytochemistry study of the yolk syncytial layer in the alevin of trout (*Salmo fario trutta* L.) after hatching. I. The vitellolysis zone, *Cell Tissue Res.* 196, 59-73.
- Walzer, C. and Schonenberger, N.** (1979b) Ultrastructure and cytochemistry of the yolk syncytial layer in the alevin of trout (*Salmo fario trutta* L. and *Salmo gairdneri* R.) after hatching. II. The cytoplasmic zone, *Cell Tissue Res.* 196, 75-93.
- Wang, L., Fast, D. G. and Attie, A. D.** (1997) The enzymatic and non-enzymatic roles of protein-disulfide isomerase in apolipoprotein B secretion, *J Biol Chem.* 272, 27644-51.

- Wang, S., McLeod, R. S., Gordon, D. A. and Yao, Z.** (1996) The microsomal triglyceride transfer protein facilitates assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins and decreases cotranslational degradation of apolipoprotein B in transfected COS-7 cells, *J Biol Chem.* 271, 14124-33.
- Wang, Y., Tran, K. and Yao, Z.** (1999) The activity of microsomal triglyceride transfer protein is essential for accumulation of triglyceride within microsomes in McA-RH7777 cells. A unified model for the assembly of very low density lipoproteins, *J Biol Chem.* 274, 27793-800.
- Warga, R. M. and Nusslein-Volhard, C.** (1999) Origin and development of the zebrafish endoderm, *Development.* 126, 827-38.
- Washington, L., Cook, G. A. and Mansbach, C. M., 2nd.** (2003) Inhibition of carnitine palmitoyltransferase in the rat small intestine reduces export of triacylglycerol into the lymph, *J Lipid Res.* 44, 1395-403.
- Watanabe, T.** (1992) Lipid nutrition in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 73B, 3-15.
- Ways, P. O., Parmentier, C. M., Kayden, H. J., Jones, J. W., Saunders, D. R. and Rubin, C. E.** (1967) Studies on the absorptive defect for triglyceride in abetalipoproteinemia, *J Clin Invest.* 46, 35-46.
- Wetterau, J. R., Aggerbeck, L. P., Bouma, M. E., Eisenberg, C., Munck, A., Hermier, M., Schmitz, J., Gay, G., Rader, D. J. and Gregg, R. E.** (1992) Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinemia, *Science.* 258, 999-1001.
- Wetterau, J. R., Combs, K. A., McLean, L. R., Spinner, S. N. and Aggerbeck, L. P.** (1991) Protein disulfide isomerase appears necessary to maintain the catalytically active structure of the microsomal triglyceride transfer protein, *Biochemistry.* 30, 9728-35.
- Wetterau, J. R., Combs, K. A., Spinner, S. N. and Joiner, B. J.** (1990) Protein disulfide isomerase is a component of the microsomal triglyceride transfer protein complex, *J Biol Chem.* 265, 9801-7.
- Wetterau, J. R., Lin, M. C. and Jamil, H.** (1997) Microsomal triglyceride transfer protein, *Biochim Biophys Acta.* 1345, 136-50.
- Wetterau, J. R. and Zilversmit, D. B.** (1984) A triglyceride and cholesteryl ester transfer protein associated with liver microsomes, *J Biol Chem.* 259, 10863-6.
- Wetterau, J. R. and Zilversmit, D. B.** (1985) Purification and characterization of microsomal triglyceride and cholesteryl ester transfer protein from bovine liver microsomes, *Chem Phys Lipids.* 38, 205-22.
- Whitfield, A. J., Marais, A. D., Robertson, K., Barrett, P. H., van Bockxmeer, F. M. and Burnett, J. R.** (2003) Four novel mutations in APOB causing heterozygous and homozygous familial hypobetalipoproteinemia, *Hum Mutat.* 22, 178.
- Wiegand, M. D.** (1996) Utilization of yolk fatty acids by goldfish embryos and larvae, *Fish Physiol Biochem.* 15, 21-7.
- Wilcox, L. J., Borradaile, N. M., de Dreu, L. E. and Huff, M. W.** (2001) Secretion of hepatocyte apoB is inhibited by the flavonoids, naringenin and hesperetin, via reduced activity and expression of ACAT2 and MTP, *J Lipid Res.* 42, 725-34.
- Williams, C. M., Bateman, P. A., Jackson, K. G. and Yaqoob, P.** (2004) Dietary fatty acids and chylomicron synthesis and secretion, *Biochem Soc Trans.* 32, 55-8.
- Wilson, C., Wardell, M. R., Weisgraber, K. H., Mahley, R. W. and Agard, D. A.** (1991) Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E, *Science.* 252(5014), 1817-22.
- Wilson, R. P.** (1994) Utilisation of dietary carbohydrate by fish, *Aquaculture.* 124, 67-80.

- Wu, X., Zhou, M., Huang, L. S., Wetterau, J. and Ginsberg, H. N.** (1996) Demonstration of a physical interaction between microsomal triglyceride transfer protein and apolipoprotein B during the assembly of ApoB-containing lipoproteins, *J Biol Chem.* 271, 10277-81.
- 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. and Rosseneu, M.** (1986) Sequence, structure, receptor-binding domains and internal repeats of human apolipoprotein B-100, *Nature.* 323, 738-42.
- Yang, C. Y., Gu, Z. W., Weng, S. A., Kim, T. W., Chen, S. H., Pownall, H. J., Sharp, P. M., Liu, S. W., Li, W. H., Gotto, A. M. Jr. et al.** (1989) Structure of apolipoprotein B-100 of human low density lipoproteins, *Arteriosclerosis*, 9, 96-108.
- Yang, C. Y., Kim, T. W., Weng, S. A., Lee, B. R., Yang, M. L. and Gotto, A. M. Jr.** (1990) Isolation and characterization of sulfhydryl and disulfide peptides of human apolipoprotein B-100, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(14), 5523-7.
- Yang, X. P., Inazu, A., Yagi, K., Kajinami, K., Koizumi, J. and Mabuchi, H.** (1999) Abetalipoproteinemia caused by maternal isodisomy of chromosome 4q containing an intron 9 splice acceptor mutation in the microsomal triglyceride transfer protein gene, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19, 1950-5.
- Yao, Z. and McLeod, R. S.** (1994) Synthesis and secretion of hepatic apolipoprotein B-containing lipoproteins, *Biochim Biophys Acta.* 1212(2), 152-66.
- Young, R. A., and R. W. Davis.** 1983. Efficient isolation of genes by using antibody probes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 1194–1198.
- Young, S. G., Cham, C. M., Pitas, R. E., Burri, B. J., Connolly, A., Flynn, L., Pappu, A. S., Wong, J. S., Hamilton, R. L. and Farese, R. V., Jr.** (1995) A genetic model for absent chylomicron formation: mice producing apolipoprotein B in the liver, but not in the intestine, *J Clin Invest.* 96, 2932-46.
- Yu, F. G., Ando, S. and Hayashi, S.** (1991) Characterization of lipoprotein secreted by cultured eel hepatocytes and its comparison with serum lipoproteins, *Cell Struct Funct*, 16, 347-55.
- Yu, W., Nohara, A., Higashikata, T., Lu, H., Inazu, A. and Mabuchi, H.** (2002) Molecular genetic analysis of familial hypercholesterolemia: spectrum and regional difference of LDL receptor gene mutations in Japanese population, *Atherosclerosis.* 165, 335-42.
- Yuan, B., Neuman, R., Duan, S. H., Weber, J. L., Kwok, P. Y., Saccone, N. L., Wu, J. S., Liu, K. Y. and Schonfeld, G.** (2000) Linkage of a gene for familial hypobetalipoproteinemia to chromosome 3p21.1-22, *Am J Hum Genet.* 66, 1699-704.
- Yue, P., Yuan, B., Gerhard, D. S., Neuman, R. J., Isley, W. L., Harris, W. S. and Schonfeld, G.** (2002) Novel mutations of APOB cause ApoB truncations undetectable in plasma and familial hypobetalipoproteinemia, *Hum Mutat.* 20, 110-6.
- Yufera, M., Pascual, E., Polo, A. and Sarasquete, M.** (1993) Effect of starvation on the feeding ability of ngilthead seabream (*Sparus aurata* L.) larvae at first feeding, *J Exp Mar Biol. Ecol.* 169, 259-72.
- Zambonino Infante, J. L. and Cahu, C. L.** (1999) High dietary lipid levels enhance digestive tract maturation and improve dicentrarchus labrax larval development, *J Nutr.* 129, 1195-200.
- Zambonino Infante, J. L. and Cahu, C. L.** (2001) Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae, *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 130, 477-87.
- Zhao, Y., McCabe, J. B., Vance, J. and Berthiaume, L. G.** (2000) Palmitoylation of apolipoprotein B is required for proper intracellular sorting and transport of cholesteryl esters and triglycerides, *Mol Biol Cell.* 11(2), 721-34.
- Zhang, Z., Sniderman, A. D., Kalant, D., Vu, H., Monge, J. C., Tao, Y. and Cianflone, K.** (1993) The role of amino acids in ApoB100 synthesis and catabolism in human HepG2 cells, *J Biol Chem.* 268, 26920-6.