

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

L'ALTÉRATION D'EXPRESSION DE MARQUEURS MOLÉCULAIRES DU
MÉTABOLISME DU CHOLESTÉROL HÉPATIQUE SOUS L'EFFET À COURT TERME
D'UNE DIÈTE À HAUTE TENEUR LIPIDIQUE

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN KINANTHROPOLOGIE

PAR
LILYA MELBOUCI

SEPTEMBRE 2018

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.10-2015). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je voudrais adresser mes sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de mon mémoire et de mes projets tout au long de mon cursus. Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche le Dr David St-Pierre de m'avoir ouvert les portes de son laboratoire en tant qu'étudiante du deuxième cycle. Je le remercie davantage pour son partage de connaissances, son implication et sa contribution dans le développement du projet ainsi qu'à son soutien. Je le remercie aussi pour avoir favorisé le développement de ma pensée critique et pour sa bonne humeur.

L'élaboration de mon mémoire n'aurait pas été possible sans l'aide inestimable de Jocelyne Mercier, ma maman du laboratoire. Je lui dois des remerciements tout particuliers pour son soutien, son aide à l'élaboration des protocoles des expériences, son partage de connaissances et son support et soutien moral. Mes remerciements écrits ne sauraient exprimer la gratitude que j'ai à son égard.

Je remercie mes camarades de laboratoires Ya Ou, Nickolas Auclair et Lucianne Magri-Tomaz avec qui j'ai beaucoup interagi dans plusieurs protocoles et projets. Je les remercie aussi pour la bonne ambiance créée au laboratoire. Sans oublier, nos fous rires et de nos séances de musique Kpop avec Ya Ou. Cet environnement de travail a été propice à mon épanouissement scientifique.

Un remerciement tout particulier aux membres du jury, les Professeurs Mario Leone (Université du Québec à Chicoutimi), Alain Steve Comtois (UQAM) et Joanne Grenier (UQAM), qui ont accepté d'évaluer mon manuscrit de mémoire. Je les remercie davantage pour les discussions très enrichissantes que nous avons pu partager.

Je dédicace ce mémoire à ma maman, qui a toujours suivi mes expériences et qui m'a toujours sagement conseillée sur la réalisation de mes protocoles expérimentaux. Merci pour ses

encouragements et son soutien dans les situations les plus difficiles. Je remercie aussi mon papa et mon mari qui m'ont toujours encouragée et poussée à donner le meilleur de moi-même.

Je remercie aussi mes frères et sœurs ainsi que mes amis, tout particulièrement Jessica Aspilaire, qui m'a soutenue et accompagnée tout au long de mes études.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	iii
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	viii
RÉSUMÉ	xi
CHAPITRE I.....	1
INTRODUCTION	1
1) Étiologie de l'obésité et conséquences sur le foie.	1
1.1.1 Généralités	1
1.1.2 Association entre NAFLD et métabolisme du cholestérol.....	4
1.2 Anabolisme lipidique chez les NAFLDs.....	5
1.2.1 L'implication des acides gras à chaîne longue dans le développement de la stéatose hépatique non-alcoolique.....	6
1.2.2 Biosynthèse des triglycérides.....	6
1.2.3 Les acides gras à chaîne courte.	8
1.2.4 Les fonctions biologiques des cavéoles.	9
1.2.5 Anabolisme lipidique via la lipogenèse <i>de novo</i>	10
1.2.6 Les modes de régulation de la lipogenèse <i>de novo</i>	12
1.3 Les gouttelettes lipidiques.	14
1.3.1 Généralités	14
1.3.2 Biogenèse des gouttelettes lipidiques.	15
1.3.3 PLIN1	16
1.3.4 PLIN2.....	18
1.3.5 PLIN5.....	18
1.3.6 PLIN3.....	18
1.3.7 CIDEC.....	19

1.3.8	HIG2.....	20
1.4	Catabolisme lipidique chez les NAFLD.....	20
1.5	Métabolisme du cholestérol dans le foie.....	22
1.5.1	Synthèse endogène du cholestérol.....	22
1.5.2	Métabolisme du cholestérol.....	25
1.5.3	Transport hépatobiliaire du cholestérol.....	29
1.5.4	L'excrétion transintestinale du cholestérol : le TICE.....	32
1.6	Objectifs et hypothèses de l'étude.....	34
1.6.1	Objectifs.....	34
1.6.2	Hypothèses.....	34
	CHAPITRE II.....	35
	MÉTHODOLOGIE ET RESULTATS EXPERIMENTAUX.....	35
	<i>ARTICLE : Expression of molecular markers of hepatic cholesterol metabolism are altered by a short-term high-fat diet.....</i>	35
	CHAPITRE III.....	58
	DISCUSSION.....	58
	CHAPITRE IV.....	66
	BIBLIOGRAPHIE.....	66

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Comparaison au niveau du stockage lipidique dans le tissu adipeux sous cutané et le tissu adipeux viscéral.	2
Figure 2 : Illustration d'une molécule de triglycéride	5
Figure 3 : Présentation des différentes étapes et différentes enzymes impliqués dans la synthèse des triglycérides dans le foie.....	8
Figure 4 : Illustration des principales étapes de la lipogenèse <i>de novo</i> dans les hépatocytes.....	12
Figure 5 : Illustration de la structure d'une gouttelette lipidique.....	16
Figure 6 : Illustration des mécanismes de régulation de la lipolyse (ATGL) par PLIN1.....	17
Figure 7 : Niveaux protéiques en périlipines à différents stades de stéatoses hépatiques non-alcooliques.	19
Figure 8 : Illustration des différentes étapes de la β -oxydation mitochondriale au niveau du foie.	21
Figure 9 : Illustration des principales étapes de la biosynthèse du cholestérol dans le foie.	24
Figure 10 : Illustration de la voie classique et de la voie alternative dans le processus de biosynthèse des acides biliaires au niveau du foie.	31

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABCG5	ATP Binding Cassette G5
ABCG8	ATP Binding Cassette G8
ACACA	Acétyl-coA carboxylase
ACAT2	Acylcoenzyme 17 cholesteryl acyltransferase 2
ACLY	ATP-citrate lyase
ACS	acyl-coA synthase
ADP	Adénosine diphosphate
AGCC	Acide gras à chaîne courte
AGLC	Acide gras à chaîne longue
Akt/PKB	Protéine kinase B
AMP	Adénosine monophosphate
Apo	Apolipoprotéine
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
ChREBP	Carbohydrate-responsive element-binding protein
CMH-I	Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I
CMH-II	Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II
CPT1	Carnitine palmitoyl transférase I
CPT2	Carnitine palmitoyl transférase II
CYP7A1	Cholestérol 7- α hydroxylase
CYP7B1	Oxysterol 7 α -hydroxylase
CYP8B1	Sterol 12- α hydroxylase
CYP27A1	Stérol 27- α hydroxylase
DAG	Diacylglycérol
DGAT	Diglycéride acyltransferase
ELOVL6	Elongase of long-chain fatty acids family member 6
FASN	Synthétase des acides gras
FAT/CD36	Fatty Acid Translocase
FATP2/5	Fatty acid transport protein 2/5
FBS	Fœtal Bovin Serum
G6P	Glucose-6-phosphate
GH	Hormone de croissance
GLUT	Transporteur de glucose
GPAT	Glycerol-3-phosphate acyltransferase
HDL	High Density Lipoprotein

HDLr	HDL reconstituées
HepG2	Liver hepatocellular cells
HMG-CoA	3-hydroxy-3-méthylglutaryl-Coenzyme A
L-FABP	Liver fatty acid binding protein
LCAT	Lecithin-Cholesterol Acyltransferase
LDL	Low Density Lipoprotein
LDLR	Récepteur des LDL
LPA	Acide lysophosphatidique
LPL	Lipoprotéine lipase
LRP	LDL receptor-related protein
LXR	Liver X receptor
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MTP	Microsomal triglyceride transfert Protein
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MUFA	Acide gras monoinsaturé
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
PA ou PAP	Acide phosphatidique
PCSK9	Proprotein Convertase subtilisin/kexin 9
Pi	Phosphate inorganique
PI3k	Phosphoinositide 3-kinase
PKC	Protéine Kinase C
PIP2	Phosphatidyl-inositol-diphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate
PPAR γ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PP2A	Phosphatase 2A
RE	Réticulum endoplasmique
ROS	Dérivés réactifs de l'oxygène
SCAP	SREBP cleavage-activating protein
SCD1	Stearoyl-CoA désaturase
SIRT1	Sirtuin 1
SR-B1	Scavenger Receptor class B1
SRE	SREBP Response element
SREBP	Sterol regulatory element-binding protein
TCA	Cycle de l'acide tricarboxylique (Cycle de Krebs)
TG	Triglycérides
TICE	Transintestinal Cholesterol Excretion
TNF α	Facteur de nécrose tumorale de type α

VLDL Lipoprotéine de très faible densité

RÉSUMÉ

Les désordres métaboliques sont souvent associés à la stéatose hépatique non-alcoolique et à l'augmentation des taux plasmatiques en cholestérol. Cependant, le lien entre l'accumulation excessive de lipides dans le foie et les altérations du métabolisme du cholestérol demeurent mal établis encore à ce jour. Un régime à haute teneur lipidique (HF) a tendance à favoriser l'accumulation lipidique dans le foie, et cet effet est même observable avant le développement de désordres métaboliques. La présente étude avait pour objectif de caractériser les mécanismes par lesquels l'accumulation lipidique altère et modifie l'expression de régulateurs clés du métabolisme du cholestérol hépatique en réponse à une courte exposition à une diète HF. Deux groupes de rats Wistar ont été soumis aléatoirement à une diète HF (N=8) ou à une diète conventionnelle (chow ; N=8) pendant deux semaines. Une augmentation significative ($p < 0,01$) des niveaux de triglycérides hépatiques a été observée chez les rats soumis à la diète HF. Cependant, aucune différence significative des taux en triglycérides plasmatiques n'a été notée chez les deux groupes. En revanche, les taux plasmatiques de cholestérol ont été plus élevés chez le groupe HF ($p < 0,01$), tandis qu'aucune différence n'a été décelée entre les deux groupes dans les taux en cholestérol hépatique. L'expression génique de marqueurs impliqués dans l'absorption du cholestérol (particulièrement pour les particules de LDL) tels LRL-1 (*low density lipoprotein receptor-related protein-1*) ou encore PCSK9 (*proteien convertase subtilisin/kexin type 9*) ainsi que certains gènes impliqués dans transport du cholestérol étaient en hausse ($P < 0.05$) chez le groupe HF.

Cependant, l'expression de 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA (HMGCR), connu pour son implication dans la synthèse du cholestérol, a été régulée à la baisse chez le groupe HF. Ces données suggèrent qu'une accumulation excessive de lipides dans le foie altérerait le métabolisme du cholestérol hépatique. D'un point de vue clinique, ces résultats indiquent qu'une courte exposition à une diète riche en lipides est suffisante pour augmenter les taux plasmatiques de cholestérol.

Mots clés : *métabolisme du cholestérol hépatique ; Les récepteurs LDL ; PCSK9 et régime à haute teneur lipidique.*

ABSTRACT

Metabolic disorders are often associated with liver steatosis and increased plasma cholesterol levels. However, the link between excessive lipid accumulation and impairments in cholesterol metabolism remains uninvestigated in the liver. Short term high-fat diet (HFD) was previously shown to promote excessive lipid accumulation prior to the development of metabolic disorders. The present study intended to characterize how increases in liver fat alter the expression of several key regulators of hepatic cholesterol metabolism in response to a short-term HFD. Wistar rats were randomly submitted either to HFD (N=8) or a regular chow diet (RCD; N=8) for 14 days. Increases in triglycerides were highly significant ($P < 0.01$) in liver but marginal in the plasma of HFD rats. In contrast, the HFD resulted in higher ($P < 0.01$) cholesterol levels in plasma but not in liver samples. Gene expression of key markers involved in cholesterol uptake (LDL particles) including low density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1) and protein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) along with ATP-binding cassette, superfamily G, member 5 (ABCG5) involved in cholesterol export *via* bile ducts were found to be higher ($P < 0.05$) in response to the HFD. In contrast, expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR), involved in cholesterol synthesis, was down-regulated in the liver. The data support the concept that excessive accumulation of lipids promptly alters the expression of key genes regulating cholesterol metabolism in the liver. On a clinical point of view, this indicates that increases in plasma cholesterol occur after a short-term high fat diet.

Key words: liver cholesterol metabolism; LDL receptors; PCSK9 and high-fat diet

CHAPITRE I INTRODUCTION

1) Étiologie de l'obésité et conséquences sur le foie.

1.1.1 Généralités

La prévalence de l'obésité est en hausse continue, alors qu'elle affectait plus de 603 millions d'adultes dans le monde en 2015 (Collaborators et al., 2017). Une mosaïque de facteurs tels la génétique, l'épigénétique, le métabolisme, les composés neuroendocriniens, toxicologiques et pharmacologiques influencent le développement de l'obésité. Les facteurs sociaux, environnementaux ainsi que l'âge, la sédentarité et le microbiote semblent aussi influencer l'obésité.

Les personnes obèses se distinguent par une hyperplasie et une hypertrophie des tissus adipeux. Le volume de ces derniers est modulable et leur poids peut dépasser les 45 kilos chez les personnes obèses (Tordjman J., 2013). La répartition des tissus adipeux se distribue entre les dépôts sous-cutanés (abdominal, glutéal et fémoral) et les tissus viscéraux (les dépôts mésentérique, omental et rétropéritonéal) (Gesta, Tseng, & Kahn, 2007). Lors de la consommation d'un excès d'énergie, les acides gras peuvent être stockés dans un premier temps dans le tissu gras sous cutané (McQuaid et al., 2011). Ce stockage de type hyperplasique et hypertrophique jouerait un rôle de réservoir afin d'empêcher le dépôt ectopique de lipides (Despres et Lemieux, 2006). Lorsque les apports en acides gras sont en excès dû à une hypernutrition et/ou aux fonctions de stockage du tissu adipeux sous-cutané saturé, l'excédent d'acides gras est stocké entre les viscères. Ceci est suivi de formation de dépôts ectopiques qui apparaissent autour des organes comme le cœur, le muscle et le pancréas (Despres & Lemieux, 2006). C'est la théorie du Spill-over (McQuaid et al., 2011). Le foie quant à lui se distingue par une accumulation excessive de lipides aboutissant au développement de la stéatose hépatique non alcoolique.

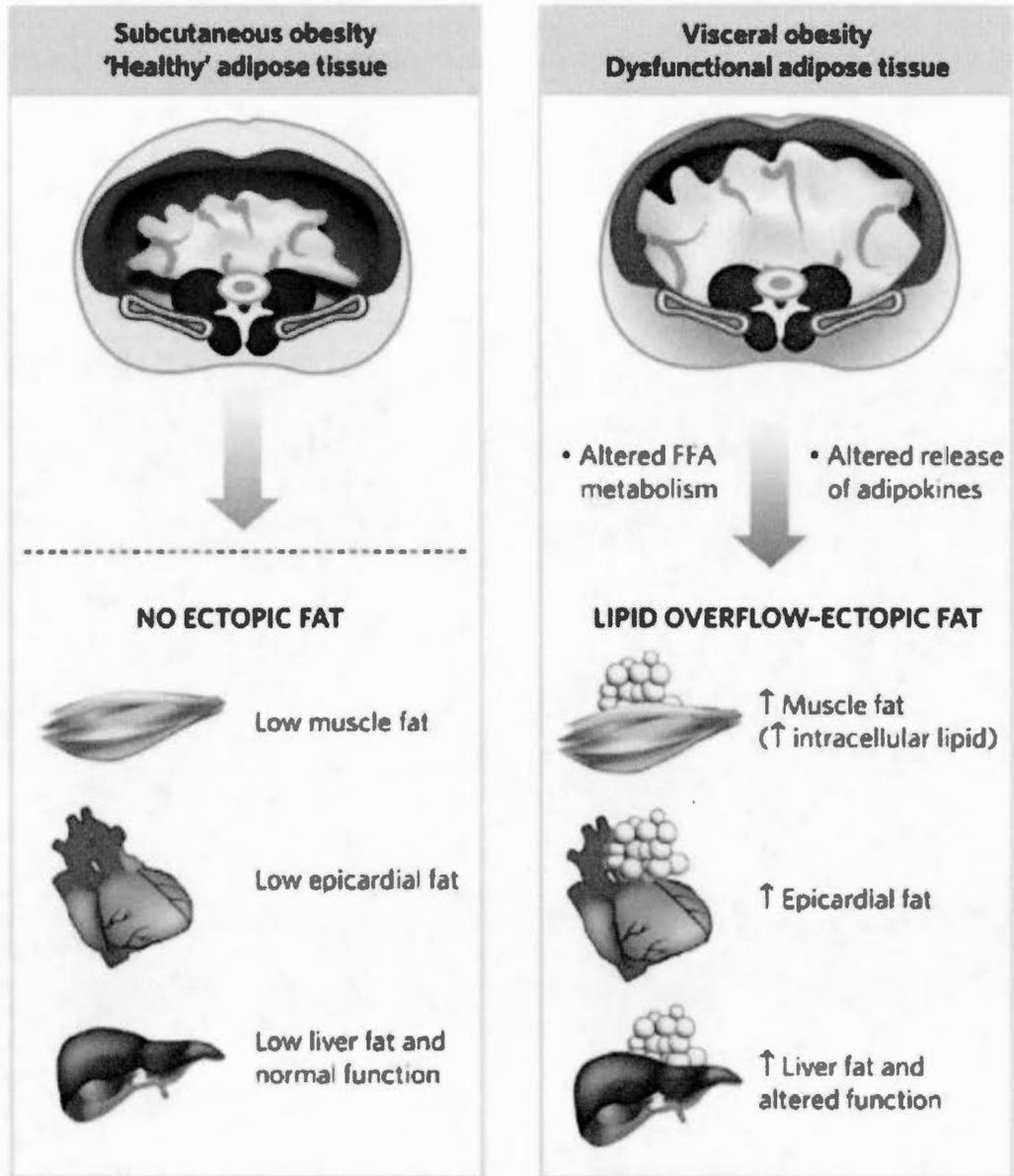


Figure 1 : Comparaison au niveau du stockage lipidique dans le tissu adipeux sous cutané et le tissu adipeux viscéral.

Légende : Image tirée de l'article (Despres & Lemieux, 2006)

Les stéatoses hépatiques non-alcooliques (NAFLD) regroupent un ensemble de maladies commençant par une simple stéatose hépatique non alcoolique. L'accumulation lipidique hépatique peut s'accompagner d'inflammation et de lésions (SHNA : Stéatohépatite non-

alcoolique). La stéatohépatite non- alcoolique prédispose à la cirrhose et au carcinome. Cette dernière étape peut nécessiter une transplantation de foie.

Dans un foie atteint de NAFLD, les fonctions impliquées dans le métabolisme lipidique peuvent être altérées. En effet, une captation excessive d'acides gras et leur entreposage sous la forme de triglycérides (TG) dans les hépatocytes sont observés chez les individus dont le foie est atteint de NAFLD. Ceci résulte d'une activation trop importante de la synthèse d'acides gras (lipogénèse *de novo*) (Diraison, Moulin, & Beylot, 2003). D'autres mécanismes favorisant un apport trop important en acides gras libres vers le foie (la conséquence du phénomène du Spill-over) (Donnelly et al., 2005), la lipolyse des chylomicrons (S. H. Choi & Ginsberg, 2011) et/ou de l'insulino-résistance du tissu adipeux viscéral (Milic, Lulic, & Stimac, 2014) peuvent également être impliqués. Par exemple, l'accroissement de l'activité de la lipase hormono-sensible (HSL) est observé dans les tissus adipeux viscéraux insulino-résistants. Il en résulte une augmentation de la libération d'acides gras non-estérifiés qui seront véhiculés vers des organes comme le foie (Delarue & Magnan, 2007). Une consommation excessive de boissons gazeuses, riches en fructose et en glucose, assure un apport plus important en glucides. Les différentes étapes de la lipogénèse *de novo* transforment les glucides en acides gras afin qu'ils soient estérifiés à leur tour en TG (Ameer, Scanduzzi, Hasnain, Kalbacher, & Zaidi, 2014). Il fut démontré que l'activité lipogénique du foie atteint de NAFLD est augmentée (Lambert, Ramos-Roman, Browning, & Parks, 2014). Dans un foie atteint de stéatose hépatique non alcoolique, l'entreposage excessif de lipides promeut une hypertrophie des gouttelettes lipidiques. Les processus d'infiltration lipidique, d'estérification des acides gras et de lipogénèse *de novo* sont en hausse tandis que la β -oxydation est en baisse.

Une corrélation fut établie entre le développement de la stéatose hépatique et les taux d'expression de peroxyosome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ). Des patients NAFLD présentaient des taux d'ARN messenger (ARNm) plus élevés en PPAR γ comparativement à ceux de patients sains (Pettinelli & Videla, 2011). Deux isoformes de PPAR γ subsistent dans le foie, soit PPAR γ 1 et PPAR γ 2. L'implication de PPAR γ 2 dans la régulation de la lipogénèse *de novo* fut établie (Y. L. Zhang et al., 2006). En effet, une augmentation d'expression de PPAR γ 2 est concomitante à une augmentation d'expression de *sterol regulatory element binding protein* de type 1C (SREBP-1C), dont les répercussions se traduisent par une

augmentation de l'activité lipogénique dans le foie. La modulation d'expression de PPAR γ peut être induite par des diètes à haute teneur lipidique et/ou glucidique (Souza-Mello, 2015).

1.1.2 Association entre NAFLD et métabolisme du cholestérol

Des études menées sur des patients atteints de stéatose hépatique non-alcoolique ont pu établir le lien qui existe entre le NAFLD et les maladies cardiovasculaires. En effet, la stéatose hépatique non-alcoolique aurait tendance à augmenter l'incidence des maladies coronaires, cérébrovasculaires et vasculaires (Brea et al., 2005; Hanley et al., 2005; Schindhelm, Heine, & Diamant, 2007). Or, les NAFLD seraient enclins à augmenter les risques d'incidence des maladies cardiovasculaires, indépendamment des risques de haute pression artérielle ou d'hypercholestérolémie. Par le biais d'autres études, un lien étroit a pu être établi entre l'accumulation lipidique dans le foie et le chamboulement du métabolisme du cholestérol (Min et al., 2012). Cependant, les mécanismes impliqués restent ambigus et mal caractérisés.

Des études menées sur des individus souffrant de NAFLD a pu mettre en relief l'impact de la stéatose hépatique non-alcoolique sur l'homéostasie du métabolisme du cholestérol dans le foie. En effet, chez ces sujets, une augmentation de la synthèse endogène du cholestérol a pu être observée et s'accompagne d'une baisse d'expression des récepteurs de LDL (LDL-R) (Min et al., 2012). L'augmentation de la biosynthèse du cholestérol dans le foie serait associée à une hausse de l'expression du facteur de transcription SREBP-2 (Horton et al., 1998). Ce dernier contribue à l'activation de HMG-CoA reductase (HMGCR), une enzyme-clé dans la synthèse endogène du cholestérol (Horton et al., 1998). En effet, il a été démontré que des sujets NAFLD/NASH présentaient des taux de 2 à 3 fois plus élevés en expression en ARNm de HMGCR (Min et al., 2012). L'augmentation d'expression de cette dernière est concomitante à une réduction de celle de LDL-R. Ceci favorise donc une baisse d'absorption du cholestérol provenant des particules LDL et une élévation des taux de cholestérol plasmatiques (Min et al., 2012).

De ces deux changements au niveau du métabolisme du cholestérol découle une augmentation des taux de cholestérol libre (FC) dans le foie (Devries-Seimon et al., 2005; Ginsberg, 2006). En effet, une augmentation des taux de FC a été rapportée dans le foie des sujets NAFLD via

des études de lipidomique menées par l'équipe de Puri (Puri et al., 2007). Il a été établi que des taux élevés de FC favoriseraient la lipotoxicité cellulaire, l'augmentation de la production des espèces réactives à l'oxygène (ROS), l'inflammation, le stress oxydant ainsi que l'apoptose (Ioannou, 2016; Tomita et al., 2014).

1.2 Anabolisme lipidique chez les NAFLDs

Les lipides dans le foie sont entreposés sous forme de TG principalement et de cholestérol ester. Les TG sont constitués de trois acides gras unis de façon covalente à une molécule de glycérol par des liaisons ester. Ces acides gras importés ou nouvellement produits par lipogénèse *de novo* sont ensuite estérifiés et stockés dans les gouttelettes lipidiques du foie sous forme de TG.

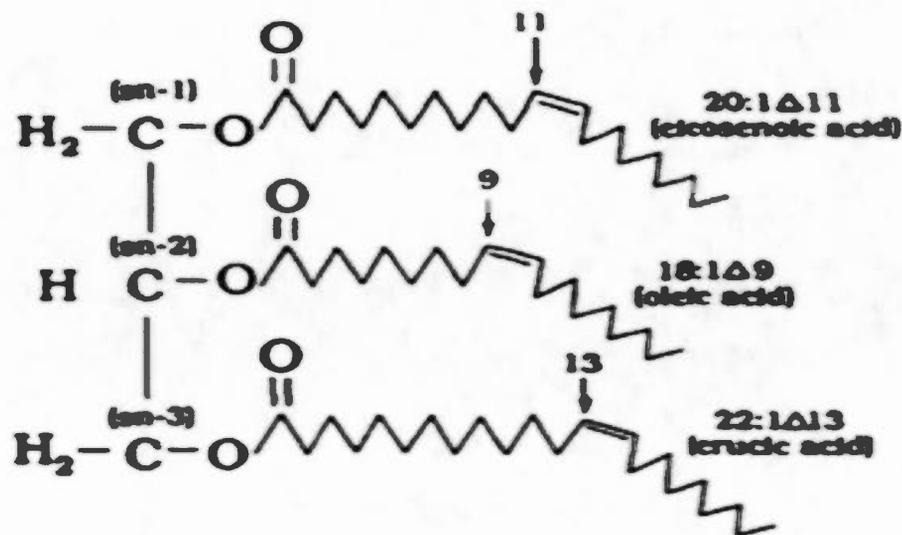


Figure 2 : Illustration d'une molécule de triglycéride

Dans cette figure, une molécule d'acides eicosanoïque, oléique et urique (des acides gras à longue chaîne monoinsaturés) sont estérifiés à un groupement glycérol en positions sn-1, sn-2, sn-3, respectivement.

Légende : Image prise du site (www.hort.purdue.edu).

1.2.1 L'implication des acides gras à chaîne longue dans le développement de la stéatose hépatique non-alcoolique.

L'entrée des acides gras à longue chaîne (AGLC) dans les hépatocytes est assurée par différents récepteurs ou protéines transmembranaires tels le récepteur scavenger FAT/CD36 (Fatty Acid Translocase), les FATP2, FATP5 (Fatty acid transport protein) et les caveolin-1 (Canbay, Bechmann, & Gerken, 2007). Il est vrai qu'une surexpression de CD36 est concomitante à une augmentation de l'entrée d'acides gras à longue chaîne dans les hépatocytes. Les souris atteintes de NAFLD ont tendance à exprimer plus de CD36 en surface de leurs hépatocytes comparativement à des souris saines (Nassir, Adewole, Brunt, & Abumrad, 2013). Or, un apport plus important en acides gras à longue chaîne vers le foie, se traduirait par un stockage plus important sous forme de TG au sein des hépatocytes (Sheedfar et al., 2014). De ces taux élevés en TG peut émaner une stéatose hépatique non alcoolique, une dyslipidémie et éventuellement le diabète de type 2.

Des résultats obtenus chez des souris dont les transporteurs FATP2 (Falcon et al., 2010) et FATP5 (Doege et al., 2006) ont été inactivés suggèrent l'implication de ces derniers dans l'entrée des acides gras à longue chaîne et de leurs retombées sur le développement de la stéatose hépatique non-alcoolique .

1.2.2 Biosynthèse des triglycérides.

L'activation d'un acide gras à chaîne longue s'effectue par l'ajout d'un groupement CoA par les enzymes ACS (acyl-CoA synthase) ou L-FABP (*Liver fatty acid binding protein*) (L. O. Li, Klett, & Coleman, 2010). Une fois activés, les Acyl-CoA sont envoyés vers deux destinations différentes. Ces derniers sont véhiculés par L-FABP, soit vers les mitochondries pour une éventuelle β -oxydation, ou vers le réticulum endoplasmique (RE) afin d'être stockés sous forme de TG dans les gouttelettes lipidiques et/ou secrétés via les VLDL (L. O. Li et al., 2010). Les personnes atteintes de stéatose hépatique non-alcoolique ont tendance à voir leurs mécanismes de β -oxydation mitochondriale altérés, ce qui a pour conséquence de déplacer l'équilibre vers la synthèse des TG au niveau du RE du foie. En effet, l'enzyme GPAT1 est impliquée dans la synthèse des TG alors que CPT1 assure le transport des acides gras dans la

mitochondrie. Ces deux derniers facteurs peuvent compétitionner pour le même substrat, l'acyl-CoA, dans les mitochondries (Lewin, Wang, Nagle, Van Horn, & Coleman, 2005). Il a été établi qu'une surexpression de l'enzyme GPAT1 chez des rats est concomitante à une baisse de production de CPT1 (Linden et al., 2004), tandis que les souris dont le gène de GPAT1 (GPAT1^{-/-}) a été neutralisé expriment une forte activité de β -oxydation dans les mitochondries (Hammond et al., 2007). Les souris GPAT^{-/-} sont moins affectées par la stéatose hépatique non-alcoolique et emmagasinent moins de TG dans le foie comparativement à leurs congénères de type sauvage (contrôles) lorsque les animaux sont soumis à une diète riche en lipides et en glucides (Takeuchi & Reue, 2009).

L'estérification qui est initiée par l'enzyme GPAT1 (glycerol-3-phosphate acyltransferase) assure l'acylation du glycérol-3-phosphate en position sn1 afin de générer de l'acide lysophosphatidique (LPA). Cette première étape d'estérification peut se dérouler au niveau de la membrane externe des mitochondries et/ou du réticulum endoplasmique (Wendel, Lewin, & Coleman, 2009), tandis que les enzymes nécessaires pour la suite des réactions d'estérification agissent exclusivement au niveau du réticulum endoplasmique. La délocalisation des LPA des mitochondries vers le réticulum endoplasmique est assurée par les L-FABP. Les LPA sont à leur tour acylés au niveau sn2 pour former de l'acide phosphatidique (PA) suite à l'intervention du 1-acyl-glycérol-3-phosphate acyltransférase (AGPAT).

Avant que la dernière acylation ait lieu, une déphosphorylation du PA est nécessaire. Cette action est assurée par l'enzyme Lipin 1 (phosphatidate Phosphatase-1). La déphosphorylation est à l'origine de la formation du diacylglycérol (DAG). La dernière étape d'estérification est assurée par l'entrée en action de l'enzyme DGAT1 et/ou DGAT2 qui effectue la dernière acylation sur le DAG pour former des TG (C. S. Choi et al., 2007; Villanueva et al., 2009)

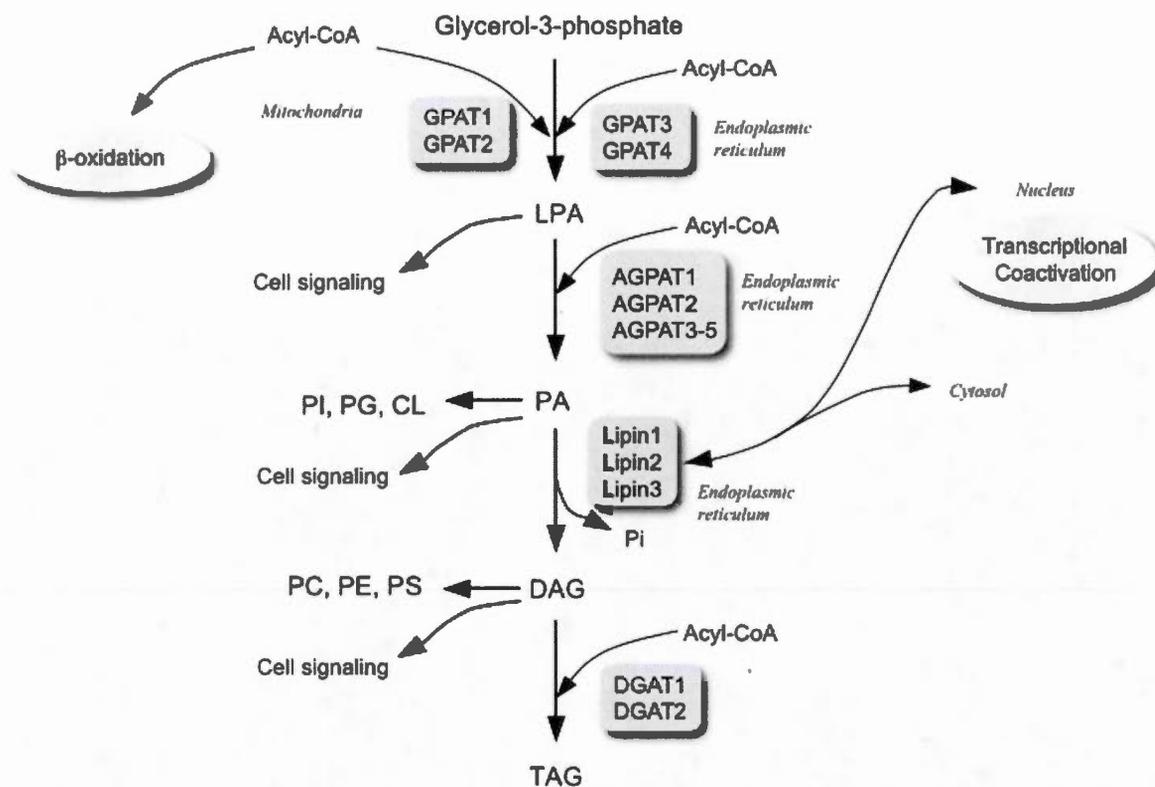


Figure 3 : Présentation des différentes étapes et différentes enzymes impliqués dans la synthèse des triglycérides dans le foie.

Légende : La signification des abréviations est indiquée dans le texte. Image tirée de l'article (Takeuchi & Reue, 2009)

1.2.3 Les acides gras à chaîne courte.

Les acides gras à chaîne courte (AGCC) sont issus de la fermentation bactérienne colique. Les AGCC rassemblent des acides carboxyliques allant de C1 à C6. Le butyrate (C4), le propionate (C3) et l'acétate (C2) sont les plus communément étudiés et connus pour leurs effets préventifs contre l'obésité, le syndrome métabolique, la résistance à l'insuline, les maladies cardiovasculaires, certains cancers (ex : côlon) et la stéatose hépatique non- alcoolique. Contrairement aux acides gras à chaînes longues, les acides gras à courtes chaînes produits dans le côlon ne doivent pas obligatoirement être conjugués à l'albumine pour être transportés vers le foie (Bloemen et al., 2009). Une fois à destination, les AGCC activent les récepteurs

GPR41 et GPR43 des hépatocytes. Il a été démontré que GPR41 (FFA3R) présente une plus forte affinité pour le propionate et le butyrate, tandis que celle du GPR43 (FFA2R) est plus importante pour le propionate et l'acétate (Koh, De Vadder, Kovatcheva-Datchary, & Backhed, 2016).

Le propionate agit sur le foie en réduisant l'activité de l'enzyme limitante de la lipogenèse *de novo* (fatty acid synthase ou FAS) (Weitkunat et al., 2016). Ceci se manifeste par l'atténuation de l'accumulation des TG dans le foie. Le propionate aurait aussi tendance à améliorer la sensibilité à l'insuline, que ce soit chez l'animal ou dans une lignée de cellules dérivées de l'hépatocarcinome humain HepG2 (Weitkunat et al., 2016). En plus de son action sur la régulation du métabolisme lipidique, le propionate agit aussi sur le métabolisme glucidique de l'intestin. Tel que revu, le propionate est un précurseur de la gluconéogenèse dans l'intestin. Ce glucose se déversant dans la veine porte est à l'origine d'une baisse de la production hépatique en glucose (Canfora, Jocken, & Blaak, 2015).

L'acétate et le butyrate sont incorporés par le foie et servent à produire de l'acide palmitique et du cholestérol qui seront stockés dans les gouttelettes lipidiques.

D'autres études ont proposé l'implication des acides gras à chaînes courtes dans la régulation de PPAR α en augmentant son expression dans le foie. Ceci favoriserait le déplacement de l'équilibre vers la β -oxydation et non vers la lipogenèse *de novo* (Canfora et al., 2015).

1.2.4 Les fonctions biologiques des cavéoles.

Les cavéoles sont des invaginations membranaires riches en cholestérol et en sphingolipides et sont communément appelées radeaux lipidiques (*lipid rafts*) (Parton & del Pozo, 2013). Le contenu protéique des cavéoles est retrouvé essentiellement à travers les cavéolines et les cavines. Les cavéolines existent sous 4 isoformes, soit la cavéoline-1 (a-b) et la cavéoline-2 qui se localisent plus particulièrement au niveau des cellules épithéliales et des fibroblastes. La cavéoline-3 est spécifiquement exprimée dans le muscle squelettique. Il a été démontré que l'inactivation de la cavéoline-1 est concomitante à une diminution ou une absence de cavéoles chez les souris (Razani et al., 2001). Cependant, l'expression des cavéoline-1 n'est pas propre

aux cavéoles qui sont aussi présentes dans l'appareil de Golgi (Head & Insel, 2007), le RE (Sala-Vila et al., 2016), les gouttelettes lipidiques (Mastrodonato et al., 2011), les peroxysomes (Mastrodonato et al., 2011) et les mitochondries (Mastrodonato et al., 2011). Les cavéoles et la cavéoline-1 sont impliquées dans le contrôle de plusieurs fonctions cellulaires telles que l'endocytose, la transcytose, le métabolisme des lipides et du glucose ainsi que la signalisation intracellulaire (Parton & del Pozo, 2013). Étant donné que l'expression de la cavéoline-1 n'est pas spécifique aux cavéoles, il est important de souligner que les fonctions des cavéolines sont indépendantes des rôles attribués aux cavéoles.

Un lien étroit entre le métabolisme lipidique dans le foie et la cavéoline-1 a pu être établi grâce à des études *in vivo*. Il a été démontré que des humains déficients en cavéoline-1 ou en cavine-1 étaient prédisposés à développer une stéatose hépatique non-alcoolique. La déficience en cavéoline-1 et cavine-1 a des répercussions jusque dans les tissus adipeux blancs. Ceci se manifeste par une baisse de la capacité des tissus adipeux blancs à entreposer les TG. Les TG non-stockés dans le tissu adipeux blanc seront dirigés vers le foie (C. A. Kim et al., 2008; Patni & Garg, 2015).

Les résultats d'études *in vitro* utilisant des hépatocytes HepG2 ont suggéré que la cavéoline-1 favorise l'accumulation excessive de lipides dans le foie (Davies, Scott, Oishi, Liapis, & Ioannou, 2005; Mitsutake et al., 2011). Les transporteurs d'acides gras à longue chaîne (AGLC) tels le CD36 sont présents au niveau des cavéoles. Ceci indique le rôle des cavéoles dans les mécanismes de régulation de l'entrée des acides gras à longue chaîne dans les hépatocytes (Pohl, Ring, & Stremmel, 2002).

1.2.5 Anabolisme lipidique via la lipogenèse *de novo*.

La lipogenèse *de novo* est un processus anabolique spécifique au foie et au tissu adipeux. Elle assure l'apport en acides gras néo-synthétisés à partir des glucides par condensations de plusieurs molécules d'acétyl-CoA (Ameer et al., 2014). La lipogenèse *de novo* est précédée par la glycolyse qui assure un apport en pyruvate à partir de glucose et/ou de fructose, tous deux

d'origine alimentaire (Schwarz, Neese, Turner, Dare, & Hellerstein, 1995). Le pyruvate est, par la suite, oxydé et décarboxylé dans les mitochondries via le cycle de Krebs (cycle de l'acide tricarboxylique ou TCA), dans le but de produire de l'énergie sous forme d'ATP (Rui, 2014). En présence d'un bilan énergétique positif, le citrate excédant est transporté vers le cytoplasme afin d'être clivé par l'enzyme ACLY (ATP-citrate lyase) pour libérer de l'oxaloacétate et de l'acétyl-CoA. La lipogenèse *de novo* est initiée par la réaction de carboxylation de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA par l'enzyme ACC (Ameer et al., 2014; Bianchi et al., 1990). L'initiation de la synthèse de l'acide gras précurseur de la lipogenèse *de novo* est enclenchée par la condensation de sept molécules de malonyl-CoA et d'une molécule d'acétyl-CoA dans le but de produire une molécule d'acide palmitique (16:0) (Kawano & Cohen, 2013). Ces réactions de condensation sont régulées par le complexe enzymatique FAS (Kawano & Cohen, 2013). Avant toute réaction de formation des TG et des gouttelettes lipidiques, l'acide gras précurseur de la lipogenèse *de novo* subit une réaction d'élongation par l'action de l'enzyme ELOVL6 (Elongase of long-chain fatty acids family member 6) dans le but de produire des acides gras à 18 carbones (acide stéarique, 18:0) (Kawano & Cohen, 2013). La lipogenèse *de novo* se termine par l'entrée en action de l'enzyme SCD1, qui apporte une mono-insaturation aux molécules d'acide stéarique pour former l'acide oléique. Ces derniers sont par la suite prêts à être assemblés en TG.

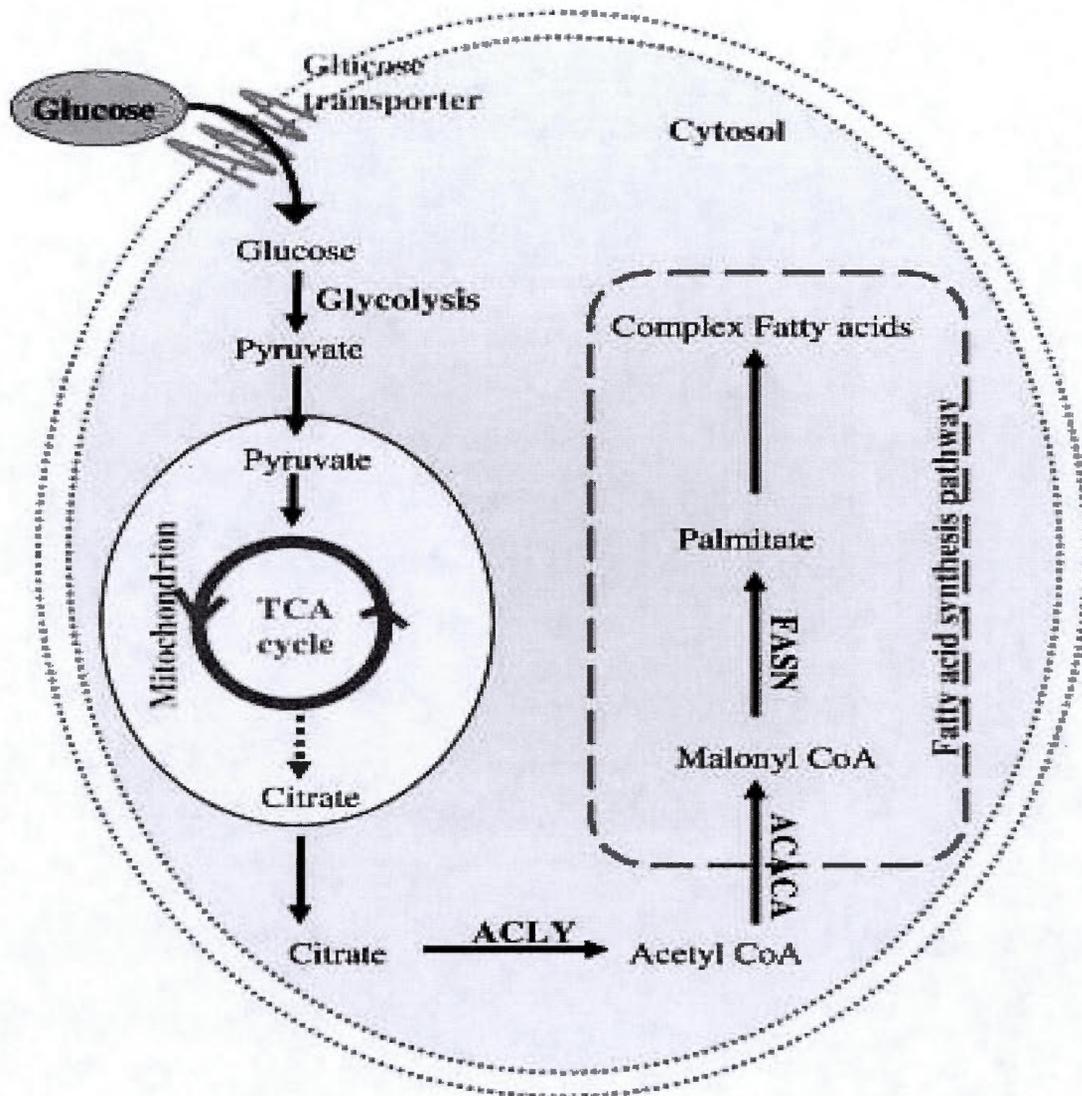


Figure 4 : Illustration des principales étapes de la lipogenèse *de novo* dans les hépatocytes.

Légende : Image tirée de l'article (Ameer & al, 2014)

1.2.6 Les modes de régulation de la lipogenèse *de novo*.

Les individus atteints de NAFLD subissent une forte accumulation lipidique dans leurs hépatocytes (Byrne & Targher, 2015). Pour ce faire, l'équilibre a tendance à se déplacer vers l'entrée intracellulaire des acides gras et la lipogenèse *de novo* plutôt que vers la lipolyse et/ou

la β -oxydation. Il a été établi que les gens atteints de stéatose hépatique expriment une forte activité lipogénique dans leur foie (Donnelly et al., 2005). En effet, la lipogenèse *de novo* est un mécanisme hautement régulé, que ce soit par des facteurs de transcription comme ChREBP, SREBP1c, LXRs, USFs, ou encore par certaines hormones comme l'insuline, l'hormone de croissance (GH) ou bien par une alimentation riche en glucides (Rui, 2014).

Les SREBPs (Sterol regulatory element binding protein) sont une famille de facteurs de transcription qui agissent sur la régulation de la lipogenèse *de novo* par le biais de leur interaction avec les SRE (SREBP Response element). L'isoforme SREBP-1c est celui qui prédomine dans le foie humain (Horton, Goldstein, & Brown, 2002). L'activation de cet isoforme nécessite l'intervention de l'insuline en réponse à la phosphorylation de SREBP-1c par la protéine kinase B (PKB). Cette phosphorylation augmente l'affinité de SREBP-1c pour SCAP (SREBP cleavage-activating protein). La liaison entre SREBP-1c et SCAP contribue à leur translocation vers l'appareil de Golgi afin d'activer SREBP-1c. Il y a alors libération du N-terminal glycosylé de SREBP-1c. Ce dernier est transporté vers le noyau pour interagir avec les régions SRE. La phosphorylation de SREBP-1c par la *protein kinase A* (PKA) promeut son ubiquitination et éventuellement sa dégradation par le protéasome. De plus, la déacétylation de SREBP-1c (par Sirtuin 1 ou SIRT1) inhibe son interaction avec son promoteur lipogénique (Ponugoti et al., 2010; Wang, Viscarra, Kim, & Sul, 2015).

ChREBP peut être activé en réponse à une alimentation à haute teneur glucidique (Ferre & Foufelle, 2010). Une entrée massive de glucose dans les hépatocytes via les GLUT2 est conséquente à cette alimentation. L'activation de ChREBP se fait par deux déphosphorylations consécutives. La première déphosphorylation s'effectue au niveau de la sérine 196. Il a été proposé que le xylulose-5-phosphate, qui est un intermédiaire de la voie des pentoses phosphates, activerait la phosphatase 2A (PP2A) pour assurer cette première déphosphorylation. Des études ont démontré l'implication et l'importance de deux métabolites de la glycolyse : le glucose 6-phosphate et le fructose-2,6-biphosphate dans la translocation vers le noyau du ChREBP mono-déphosphorylé. Toutefois, ce mécanisme n'est pas tout à fait compris. La seconde déphosphorylation qui a lieu au niveau de la thréonine 666 permet à ChREBP d'interagir avec son promoteur CHoRE (Y. Wang et al., 2015).

Ces dernières années, l'ingestion de fructose a augmenté avec la hausse de consommation des boissons sucrées. Un lien de causalité a pu être établi entre la forte consommation de fructose et le développement des tissus adipeux viscéraux. En effet, des sujets obèses et/ou en surpoids soumis à des diètes à fortes concentrations de fructose se voyaient attribuer une augmentation du gras viscéral et présentaient par conséquent un tour de taille plus important comparativement au groupe contrôle (Stanhope et al., 2009).

Or, le fructose est un acteur important impliqué dans le développement de la stéatose hépatique non-alcoolique. Il a été proposé qu'une augmentation de l'activité lipogénique peut résulter d'une élévation de la consommation de fructose (Schwarz et al., 2015). Le fructose aurait tendance à agir en augmentant l'estérification des acides gras. Il a été établi que la vitesse de phosphorylation du fructose en fructose-1-phosphate par la fructokinase est supérieure à la phosphorylation du glucose par son enzyme. La contribution du fructose dans l'augmentation de l'activité lipogénique s'étale sur l'activation deux facteurs de transcriptions ChREBP et SREBP-1c (Softic, Cohen, & Kahn, 2016).

Hormis son application dans l'augmentation de l'activité lipogénique hépatique, une forte consommation de fructose serait enclin à mener à une dyslipidémie et à une insulino-résistance (Theytaz et al., 2014). Il a été observé chez des sujets obèses consommant de fortes quantités de fructose une élévation des taux de chylomicrons et de VLDL plasmatique comparativement au groupe ne consommant pas de fructose (Theytaz et al., 2014). Or, les désordres métaboliques résultants d'une surconsommation de fructose, combiné à l'insulino-résistance prédiraient à une incidence plus importante de maladies cardio-vasculaires.

1.3 Les gouttelettes lipidiques.

1.3.1 Généralités

Les gouttelettes lipidiques sont des vésicules délimitées par une monocouche de phospholipides enclavant un contenu de lipides neutres constitués essentiellement de TG et de cholestérol ester. Dépendamment de la lignée cellulaire, de l'organe ou de l'état pathologique de l'individu, la taille des gouttelettes lipidiques peut varier entre 40nm et 100µm (Stobart, Stymne, & Hoglund, 1986).

1.3.2 Biogenèse des gouttelettes lipidiques.

Tel que revu, le développement de gouttelettes lipidiques s'effectue suite à une accumulation de lipides neutres entre les feuillettes membranaires du RE. Par la suite, le bourgeonnement de gouttelette lipidique s'effectuera à partir d'un feuillet cytoplasmique du RE (Thiam, Farese, & Walther, 2013).

La synthèse des gouttelettes lipidiques a lieu exclusivement au niveau du RE. Ceci fut rapporté grâce à des études de protéomique par la co-expression de certaines protéines propres au RE au niveau de la membrane des gouttelettes lipidiques. Tel que revu, il est suggéré que des molécules propres au RE telles le complexe majeur d'histocompatibilité de type 1, la calnexine et la *immunoglobulin heavy chain binding protein* (BiP) tapissent la monocouche lipidique des gouttelettes lipidiques (Ploegh, 2007).

Tel que revu, des enzymes localisées en surface du RE tels DGAT1 et DGAT2 assurent l'approvisionnement en TG pour le bourgeonnement et l'accroissement des gouttelettes lipidiques. La taille des gouttelettes lipidiques nouvellement produites varie entre 100 et 300 nm (Thiam et al., 2013). Différents mécanismes entrent en action pour assurer la croissance des gouttelettes lipidiques : la fusion des gouttelettes lipidiques par l'intermédiaire des protéines SNAREs (Fujimoto & Parton, 2011), la synthèse *in situ* des lipides (Thiam et al., 2013) et le transfert des lipides neutres d'une gouttelette à une autre s'effectuent par l'intermédiaire de CIDEc (FSP27) (Mashek, Khan, Sathyanarayan, Ploeger, & Franklin, 2015) ou encore par coalescence (Ploegh, 2007).

En dehors de leur contenu lipidique, les gouttelettes lipidiques comprennent plusieurs protéines en leur surface. Tel que revu, en plus des calnexines et de BiP qui sont retrouvées sur le RE, ou encore aux cavéolines qui sont associées à la membrane plasmique et/ou aux gouttelettes lipidiques, d'autres protéines telles les périlipines/ADRP/TIP47 (PAT), le *hypoxia-inducible gene 2* (HIG2) et le *cell death-inducing DFF45-like effector* (CIDE), sont exclusivement

localisées sur les gouttelettes lipidiques (Ploegh, 2007).

Tel que revu par Okumura, la famille des PAT est composée de 5 membres (périlipines1-5) (Okumura, 2011). Ces protéines sont impliquées dans plusieurs mécanismes et processus cellulaires tels la régulation de la lipolyse au niveau des gouttelettes lipidiques ou encore l'accroissement de la taille des gouttelettes lipidiques.

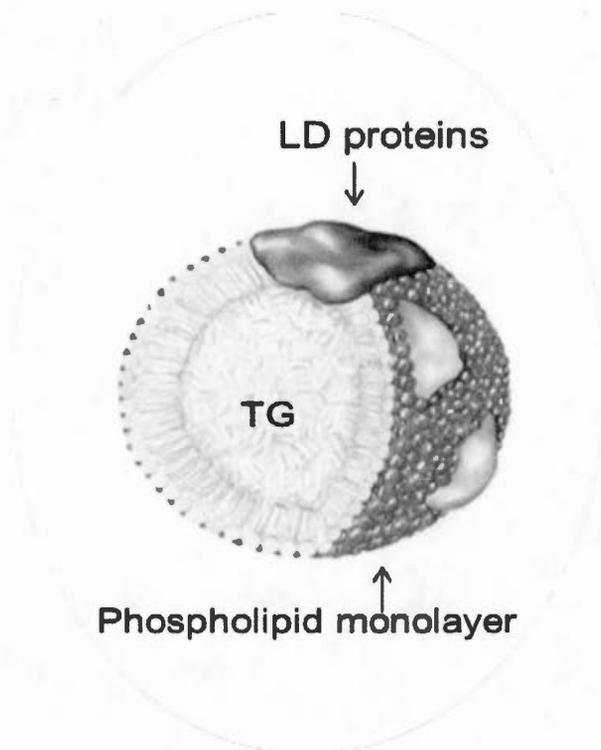


Figure 5 : Illustration de la structure d'une gouttelette lipidique.

Légende : Illustration adaptée du site internet

(<http://www.easdvirtualmeeting.org/resources/induction-of-a-hepatic-lipid-droplet-protein-induces-a-hepatic-steatosis-without-insulin-resistance--2>)

1.3.3 PLIN1

Différents isoformes de périlipines ont été décrits et leur présence varie en fonction de l'organe ou de l'état pathologique de l'individu. Dans le foie, c'est essentiellement, les PLIN2 (ADRP),

PLIN3 (TIP47) et PLIN5 (MLDP) qui sont retrouvés. Un foie gras se distingue d'un foie sain par l'expression de la PLIN1. Il est vrai qu'un foie atteint de stéatose hépatique non-alcoolique présente des gouttelettes lipidiques de type « macro » plutôt que « micro » (Straub, Stoeffel, Heid, Zimbelmann, & Schirmacher, 2008). Or, les PLIN1 ne s'expriment qu'en surface des gouttelettes « macro ». Ceci pourrait expliquer leur absence dans le foie d'individus sains qui ne présentent majoritairement que des microgouttelettes lipidiques (Pawella et al., 2014). La PLIN1 inhibe l'activité lipolytique chez les individus atteints de NAFLD. Cette inhibition est assurée par la liaison entre PLIN1, le cofacteur CGI-58 (connu sous l'appellation d' α - β -hydrolase 5 ou ABHD5) et l'enzyme lipolytique ATGL (Thiam et al., 2013). La régulation positive de la lipolyse dans des hépatocytes humains se fait par la phosphorylation de PLIN1 via PKA.

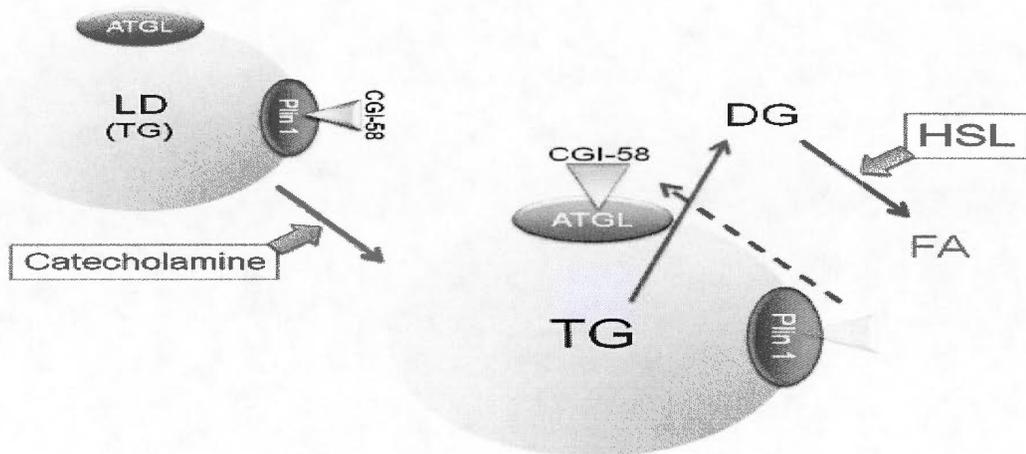


Figure 6 : Illustration des mécanismes de régulation de la lipolyse (ATGL) par PLIN1.

Légende : Image tirée de l'article (Ikura & Caldwell, 2015)

1.3.4 PLIN2

PLIN2 est la périlipine la plus abondante et est exprimée dans différentes lignées cellulaires, dont les hépatocytes HepG2. PLIN2 est une protéine qui recouvre des gouttelettes lipidiques de tailles variées (Straub et al., 2013). Tel que précédemment revu, un lien direct a été établi entre la protéine PLIN2 et le développement de la stéatose hépatique non-alcoolique (Okumura, 2011). Une baisse de 60% du taux de TG hépatocytaire a pu être observée chez des souris déficientes en PLIN2 (Chang et al., 2006). En plus de son implication dans l'augmentation de la formation des gouttelettes lipidiques, PLIN2 est aussi impliquée dans l'absorption du glucose. Une augmentation de l'expression de PLIN2 corrèle avec une augmentation d'absorption du glucose (Carr, Peralta, Yin, & Ahima, 2014). Ceci mènerait à une augmentation de la lipogenèse *de novo* dans le foie.

1.3.5 PLIN5

PLIN5 tapisse les gouttelettes lipidiques de type « micro » et « macro ». Son expression augmente chez les individus atteints de NAFLD. PLIN5 est une protéine-clé dans la régulation de la lipolyse. Sous sa forme active non-phosphorylée, PLIN5 interagit avec les lipases ATGL et/ou CGI-58 afin d'empêcher l'interaction entre la lipase et son cofacteur (C. Wang et al., 2015). Ceci a pour effet de réduire la lipolyse des TG. Sous sa forme active, PLIN5 accroît l'accumulation de TG dans les gouttelettes lipidiques et augmente ainsi l'aire des gouttelettes lipidiques, comme c'est le cas dans le foie d'individus atteints de NAFLD (C. Wang et al., 2015). Une régulation négative de PLIN5 se fait par le biais de PKA, qui phosphoryle la sérine 155 (X. Gao et al., 2017). La phosphorylation de cette périlipine induit le relargage d'ATGL et de CGI-58. Une fois libérés, la lipase et son cofacteur interagissent ensemble afin d'induire leurs actions lipolytiques, favorisant la sortie des acides gras non-estérifiés dans le foie (C. Wang et al., 2015).

1.3.6 PLIN3.

Contrairement aux précédentes périlipines, PLIN3 est localisée en surface des gouttelettes

lipidiques de type «micro» seulement. Ceci indique que cette périlipine n'a pas les mêmes fonctions biologiques et pathologiques que les PLIN5, PLIN2 et PLIN1. L'expression de cette protéine n'est pas modulée par l'état pathologique du foie gras atteint de stéatose hépatique non-alcoolique. Ceci laisse sous-entendre que cette périlipine joue un rôle mineur dans l'étiologie de la stéatose hépatique non-alcoolique.

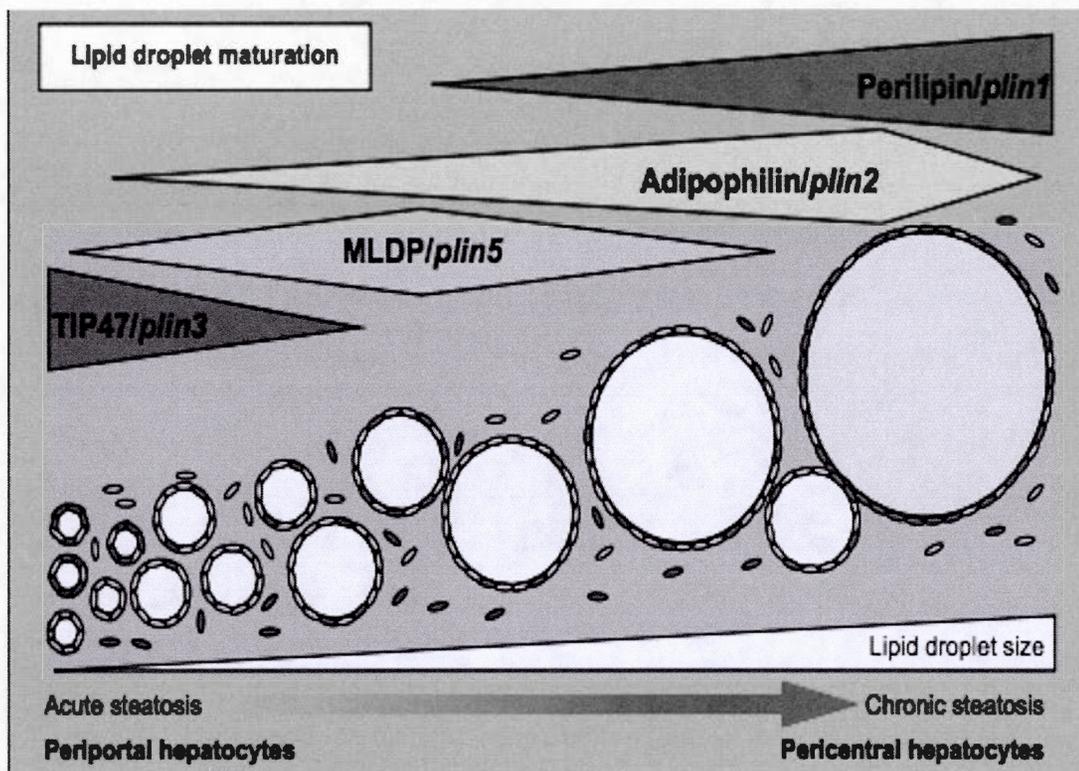


Figure 7 : Niveaux protéiques en périlipines à différents stades de stéatoses hépatiques non-alcooliques.

Légende : Image tirée de l'article (Pawella et al., 2014)

1.3.7 CIDEC.

Les protéines CIDEC sont présentes sur les gouttelettes lipidiques et dans le RE. Des études ont appuyé l'implication de la protéine CIDEC dans l'accroissement de l'aire des gouttelettes lipidiques dans des échantillons de foies stéatosés (Okumura, 2011). Les CIDEC sont situés au niveau des sites de contact entre les gouttelettes lipidiques, ce qui assure le transfert du contenu

lipidique entre les particules et contribue à en augmenter le volume, amenant une réduction de la surface de contact des gouttelettes lipidiques avec les lipases (Fujimoto & Parton, 2011).

1.3.8 HIG2

HIG 2 est une autre famille de protéines tapissant les gouttelettes lipidiques (Carr & Ahima, 2016). Ces protéines contribuent à la régulation du contenu en TG des GL du foie en inhibant la lipolyse (DiStefano et al., 2015). Les résultats d'études menées sur des hépatocytes primaires de souris déficientes en HIG2 indiquent que la délétion du facteur provoque une augmentation de la lipolyse des TG des gouttelettes lipidiques et l'activation de la β -oxydation des acides gras (DiStefano et al., 2015). Il en résulterait une baisse du contenu en TG dans les gouttelettes lipidiques.

1.4 Catabolisme lipidique chez les NAFLD.

Deux avenues s'offrent à l'acide gras à chaîne longue suite à son entrée dans l'hépatocyte. L'acide gras peut être impliqué dans la synthèse des TG au niveau du réticulum endoplasmique et séquestré dans des gouttelettes lipidiques tel que mentionné plus haut. Les acides gras à chaîne longue peuvent également être impliqués dans la production d'énergie via la β -oxydation dans les mitochondries (Nassir & Ibdah, 2014). Plusieurs enzymes interviennent dans le processus de β -oxydation. L'activation de l'acide gras à longue chaîne est nécessaire pour permettre l'initiation du processus de β -oxydation. Dans le cytoplasme des hépatocytes, l'enzyme ACS (acyl-CoA synthétase) catalyse l'activation de l'acide gras à chaîne longue pour générer un AGLC-CoA. La membrane mitochondriale n'étant pas perméable à l'AGLC-CoA, une conversion temporaire de ce dernier est nécessaire pour atteindre la matrice mitochondriale où a lieu la β -oxydation. La conversion de l'acyl-CoA en AGLC-carnitine est assurée par CPT1 (Carnitine palmitoyl transférase I). Une fois à destination, l'AGLC-carnitine retrouve sa forme activée (AGLC-CoA) sous l'action de CPT2 (Carnitine palmitoyl transférase II). La β -

oxydation de l'acyl-CoA permet de générer des corps cétoniques et de l'acétoacétate qui sont des sources d'énergie pour les tissus extra-hépatiques (Begrliche, Igoudjil, Pessayre, & Fromenty, 2006). L'acétyl-CoA est un autre produit de la β -oxydation. Une fois intégré dans le cycle TCA, ce dernier permet la production de citrate et de malonyl-CoA (Wei, 2008).

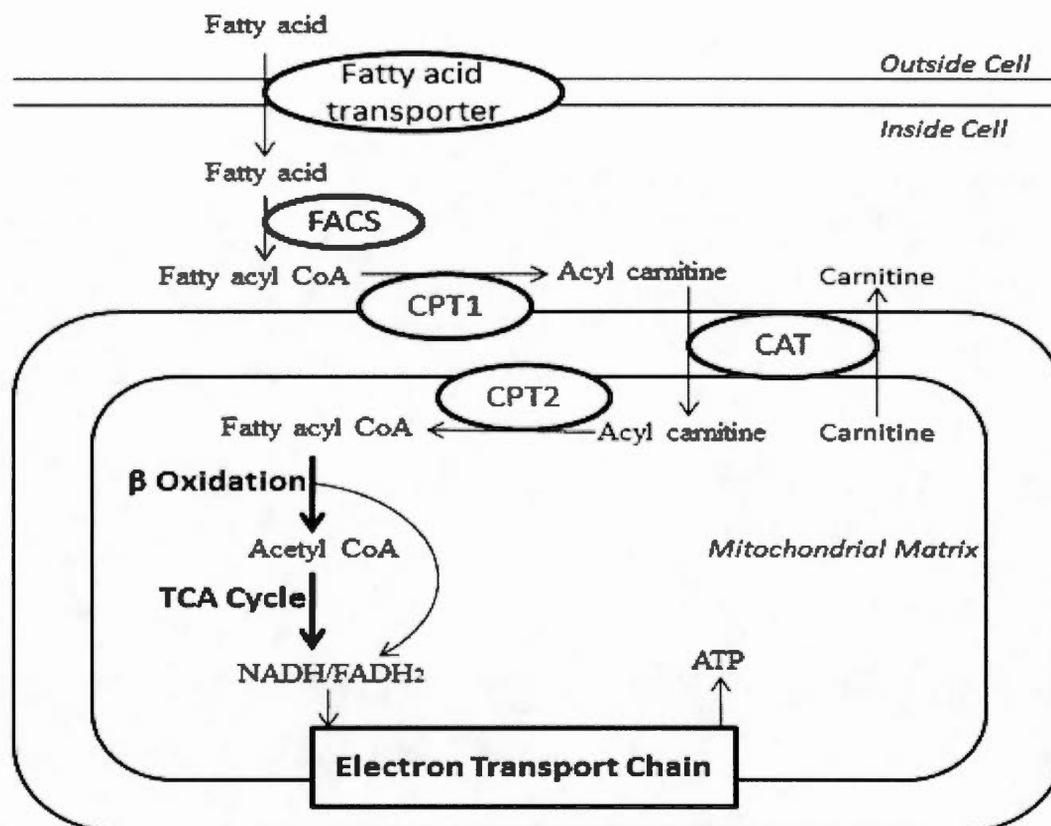


Figure 8 : Illustration des différentes étapes de la β -oxydation mitochondriale au niveau du foie.

Légende : Image tirée du site internet

(<http://lipidlibrary.aocs.org/Biochemistry/content.cfm?ItemNumber=39187>). TCA correspond à tricarboxylic acid cycle, les autres abréviations se retrouvent dans le texte.

Il a été démontré qu'une augmentation des niveaux de malonyl-CoA aurait une action inhibitrice sur CPT1 et que ceci aurait pour effet de ralentir l'entrée d'AGLC-CoA dans la mitochondrie et de réduire la β -oxydation dans le foie (Koo, 2013). Les répercussions de cette baisse du catabolisme lipidique se manifestent par une augmentation de la synthèse de TG et

leur stockage dans les gouttelettes lipidiques. La présence de certaines anomalies mitochondriales a été rapportée chez des patients atteints de stéatose hépatique non-alcoolique. En effet, certaines enzymes impliquées dans le contrôle de la β -oxydation sont moins exprimées chez ces patients. De plus, des changements morphologiques ont pu être observés dans les mitochondries des patients NAFLD. Ces changements impliquent une augmentation de la taille, du gonflement et des inclusions des mitochondries. La quantité de mitochondries est moindre chez ces patients, comparativement aux individus sains (Begriche et al., 2006). Une baisse de la quantité mitochondriale dans le foie, les tissus adipeux ou encore le muscle et le coeur se traduirait par une moindre capacité oxydative des acides gras. De ce défaut d'oxydation émane une augmentation de l'accumulation lipidique dans les tissus concernés (Wei, 2008).

La régulation de plusieurs gènes impliqués dans le catabolisme lipidique peut être modulée par PPAR α (Rakhshandehroo, Knoch, Muller, & Kersten, 2010). Une augmentation d'expression est aussi associée à une plus grande production d'ACS, l'enzyme-clé dans l'activation des acides gras, tel que mentionné plus haut (Burri, Thoresen, & Berge, 2010). De plus, l'activation de PPAR α affecte aussi positivement l'expression de CPT1 et CPT2 (Rakhshandehroo et al., 2010), favorisant la hausse du catabolisme des acides gras dans les mitochondries. Une baisse de l'accumulation de TG du foie est observée suite à l'activation de PPAR α et de la β -oxydation. On doit noter que les patients NAFLD expriment des taux bas de PPAR α alors que leurs taux de PPAR γ sont élevés, ce qui supporte la réduction observée de la β -oxydation.

1.5 Métabolisme du cholestérol dans le foie.

1.5.1 Synthèse endogène du cholestérol

Les origines du cholestérol hépatique sont variées et sa synthèse peut être influencée par l'alimentation ou par l'état pathologique d'un l'organisme.

Dans le foie, la biosynthèse du cholestérol est initiée par la formation d'une molécule de HMG-CoA suite à la condensation de trois molécules d'acétyl-CoA. L'enzyme HMG-CoA réductase

intervient ensuite pour modifier le HMG-CoA en mévalonate (Shapiro & Rodwell, 1970). Cette dernière molécule est subséquemment phosphorylée, décarboxylée et la perte d'un groupe phosphate vient assurer la formation d'un isopentényl-pyrophosphate. Ensuite, trois étapes de condensation vont mener à la production de squalène (Langdon & Bloch, 1952). En présence d'oxygène et de $\text{NADPH} + \text{H}^+$, une réaction de cyclisation viendra former le lanostérol ; finalement, la synthèse de cholestérol sera catalysée par le cytochrome p450 (Atkin et al., 1972).

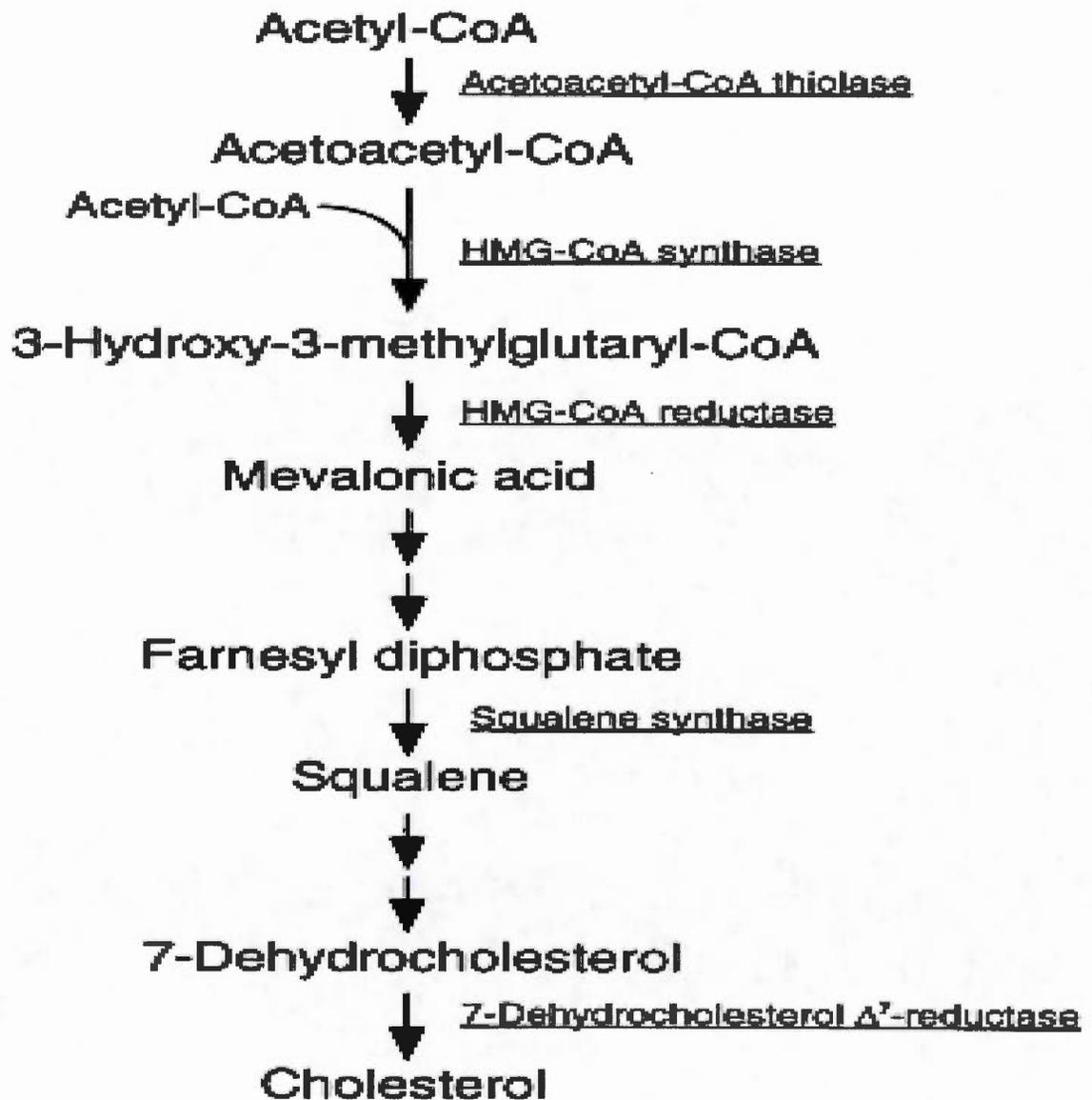


Figure 9 : Illustration des principales étapes de la biosynthèse du cholestérol dans le foie.

Légende : Image tirée de l'article (Honda et al., 1998)

1.5.2 Métabolisme du cholestérol

Le métabolisme du cholestérol se résume en quatre principales voies. La voie entéro-hépatique assure le transport du cholestérol et des lipides (tous deux d'origine exogène) des intestins au foie grâce aux chylomicrons.

La voie d'apport (centrifuge) assure le transport du cholestérol du foie aux tissus périphériques, tout en étant véhiculés par les VLDL et les LDL.

La voie de retour (centripète) assure le transport du cholestérol des tissus périphériques vers le foie grâce aux molécules de HDL.

Finalement le « *trans-intestinal cholesterol excretion* » (TICE) va contrôler l'excrétion du cholestérol du système vers l'intestin.

1.5.2.1 Cycle entéro-hépatique du cholestérol

Les lipides d'origine alimentaire sont absorbés dans les intestins sous leur forme hydrolysée par le biais de récepteurs et transporteurs tels *fatty acid binding proteins/plasma membrane (FABPm)*, CD36, FATP, *scavenger receptor class B1 (SR-B1)*, *ATP binding cassette A1 (ABCA1)*, ABCG5, ABCG8, *microsomal triglyceride transfer protein (MTTP)* et Cavéoline-1 (CAV-1) (Phan & Tso, 2001). Ces lipides sont re-estérifiés et enclavés dans des chylomicrons sous l'action de APO B-48 pour être véhiculés dans la circulation lymphatique mésentérique afin d'atteindre la circulation sanguine par la veine sous clavière gauche (Randolph & Miller, 2014). Dans la circulation sanguine, la taille et le contenu des chylomicrons sont graduellement réduits sous l'action des LPL (BEISIEGEL, W. WEBER, & BENGTSSON-OLIVECRONA, 1991), qui tapissent l'endothélium des vaisseaux et y hydrolysent les TG en acides gras. Ces derniers sont transportés jusqu'aux cellules périphériques pour assurer la production d'énergie dans les cellules des différents organes et tissus.

Les résidus de chylomicrons (*chylomicron remnants*) sont relativement enrichis en cholestérol et des molécules d'apo-E vont s'ajouter à leur surface avant qu'ils n'atteignent le foie. Des souris pour lesquelles le gène de l'apo-E avait été supprimé ont manifesté une baisse de la clairance de ces *chylomicron remnants*. Ceci démontre l'implication d'apo-E dans la

reconnaissance des chylomicrons par les LDL-R (Beisiegel, Weber, Ihrke, Herz, & Stanley, 1989; Kenneth C-W. Yu, Yuan Jiang, Wei Chen, & Cooper, 1999).

Une fois à destination, les *chylomicrons remnants* sont captés et internalisés par le foie grâce aux récepteurs LDL-R et *LDL receptor-related protein* (LRP1). Le rôle de ces deux récepteurs dans l'internalisation des chylomicrons fut découvert grâce à des modèles de souris déficientes en LDL-R. D'ailleurs, ces animaux dont le LDL-R avait été invalidé démontraient une diminution du catabolisme des *chylomicron remnants* dans le foie (Mortimer, Dianne J. Beveridge, Ian J. Martins, & Redgrave, 1995)

Dans les hépatocytes, la fusion avec les lysosomes permet de réaliser la lipolyse et protéolyse des *chylomicron remnants* (Albert L. Jones et al., 1984). Ceux-ci peuvent conséquemment être recyclés par le foie sous forme VLDL et subvenir aux besoins en cholestérol et en TG dans les tissus périphériques. La perte de TG et de cholestérol par les VLDL réduira leur volume et la lipoprotéine deviendra IDL et LDL. Une seconde portion du cholestérol issue des *chylomicron remnants* peut être transformée en acides biliaires et/ou être excrétée directement par les voies biliaires pour entrer à nouveau dans le cycle entero-hépatique.

1.5.2.2 Transport centrifuge du cholestérol.

Le transport du cholestérol du foie vers les tissus périphériques est effectué grâce aux particules VLDL enrichies en TG. Dans le compartiment vasculaire, les VLDL subissent une cascade d'hydrolyse de leurs TG et ces réactions diminuent graduellement leur volume pour former des particules d'IDL et de LDL. Ces particules de LDL sont enrichies en cholestérol ester. Chez des patients NAFLD, il a été rapporté que la dyslipidémie résulte d'une élévation de la sécrétion de VLDL (Cohen & Fisher, 2013). Cependant, l'une des principales fonctions de la sécrétion des VLDL serait d'atténuer et/ou de prévenir l'accumulation des TG dans le foie. D'ailleurs, il a été observé qu'une diète à haute teneur lipidique augmenterait la méthylation du gène du MTP et ceci aurait pour effet d'abaisser le niveau d'expression de ce facteur nécessaire au transport de TG et du cholestérol ester vers les molécules d'ApoB lors de la formation des

particules de VLDL dans le RE du foie (M. Li et al., 2016). Ultiment, ceci diminuerait la production et la sécrétion de VLDL par le foie (M. Li et al., 2016). Un lien a pu être établi entre la régulation du MTTP et la teneur en cholestérol libre dans le foie. En effet, une baisse d'expression du MTTP y augmenterait les niveaux de cholestérol libre (Josekutty, Iqbal, Iwawaki, Kohno, & Hussain, 2013). L'enrichissement des VLDL en cholestérol se fait par le cholestérol ester et cette estérification est effectuée par l'enzyme ACAT (Nagayoshi et al., 1994

). Il est intéressant de noter que l'expression d'ACAT serait stimulée par le captage des particules de LDL par le foie. Toutefois, tel que mentionné plus haut, des patients atteints de NAFLD présentaient une baisse d'expression des LDL-R dans leur foie comparativement à des sujets sains (Min et al., 2012). Ceci indique que l'expression d'ACAT est réduite et ceci résulte en la diminution de l'estérification du cholestérol et l'augmentation des niveaux de cholestérol libre dans le foie. Cette hausse des concentrations de cholestérol libre pourrait induire une lipotoxicité cellulaire, une plus importante production de ROS et, par le fait même, augmenter le stress endoplasmique (Min et al., 2012).

1.5.2.3 Cycle inverse du cholestérol

Les molécules de HDL natives (HDL discoïdales) peuvent être produites par catabolisme des chylomicrons (par l'intervention des LPL) ou bien générées par les hépatocytes et les entérocytes (Patsch, 1998). Il a été établi que l'expression de la LPL était plus importante chez les sujets obèses atteints de NAFLD comparativement aux sujets non atteints de NAFLD (Pardina et al., 2009). Ceci, peut en effet, s'expliquer par l'accroissement de l'apport en acides gras libre vers le foie. Ces acides gras vont être par la suite stockés dans le foie sous forme TG et contribuer ainsi au développement des NAFLD (Pardina et al., 2009).

L'ApoA-I est une apolipoprotéine essentielle à la biogenèse et au fonctionnement des HDL. Une diminution de l'expression ou une mutation au gène de cette protéine abaissera les niveaux plasmatiques de HDL (Rached et al., 2014).

L'efflux du cholestérol des tissus périphériques vers les particules de HDL natives est initié par les transporteurs membranaires (*ATP binding cassette* de type 1) ABC1 (Sparrow et al., 2002). Ceci se manifeste par une interaction directe entre ABC1 et la protéine ApoA-I (Yvan-Charvet, Wang, & Tall, 2010). Dans le foie de souris avec une forme inactive d'ABC1, une baisse des taux plasmatiques de HDL plasmatiques est observée. Ceci confirme l'importance de l'ABC1 dans la biogenèse des HDL plasmatiques (John McNeish, Robert J. Aiello, & Deborah Guyot*, 2000).

Les transporteurs ABCG1 et les récepteurs SR-B1 quant à eux assurent l'enrichissement des particules de HDL en cholestérol dans le foie. En effet, SR-B1 et ABCG1 agissent en synergie avec les transporteurs ABC1. Pour sa part, ABCG1 agit sur des molécules de HDL déjà formées par ABC1 (Kennedy et al., 2005; Yvan-Charvet et al., 2010).

La maturation des particules de HDL est finalisée par l'estérification du cholestérol grâce à l'enzyme LCAT (lecithin cholesterol acyltransferase) (AKANUMA, 1968). Il a été observé qu'une mutation au gène du LCAT diminue les taux de particules de HDL matures tout en augmentant ceux des formes de HDL natives dans le plasma (Xavier Rousset, Boris Vaisman, Marcelo Amar, Amar A. Sethi, & Remaley, 2009).

Le transfert du cholestérol ester des particules de HDL vers le foie serait contrôlé par deux voies principales. Chez les souris, une corrélation directe a été établie entre l'expression de SR-B1 et la captation du cholestérol ester des HDL par le foie (Acton et al., 1996; Arai, Nan Wang, Mikhail Bezouevski, Carrie Welch, & Tall, 1998). En effet, la surexpression de SR-B1 induirait une augmentation de la concentration de cholestérol dans le foie et dans la bile ainsi qu'une baisse des taux de HDL plasmatiques (Karen F. Kozarsky, 1999; Ueda et al., 2000). D'autres informations indiquent que l'implication de SR-B1 dans l'efflux du cholestérol ne nécessiterait pas l'internalisation de la particule de HDL (Acton et al., 1996). Cependant, l'utilisation de HDL radiomarqué sur des cellules hépatique de rats, a révélé une éventuelle internalisation des HDL dans le foie (DeLamatre, T. G. Sarphe, Ronald C. Archibold, & Hornick, 1990). Il a été démontré que l'internalisation des HDL par endocytose était induite suite à une stimulation de la cascade impliquant l'ATPase ectopique et le récepteur purinergique P2Y (Jacquet et al., 2005).

Le transport du cholestérol peut aussi mener à son excrétion vers la vésicule biliaire. Le principal substrat pour la formation des acides biliaires est le cholestérol provenant des HDL et non celui issu des autres lipoprotéines. Des marquages radioactifs menés par l'équipe de Bravo appuient cette théorie (Bravo et al., 1995).

1.5.3 Transport hépatobiliaire du cholestérol

1.5.3.1 Biosynthèse des acides biliaires

Le catabolisme du cholestérol dans le foie est assuré par sa transformation en molécules solubles, tels les acides biliaires primaires. Ces derniers empruntent les canalicules biliaires pour être stockés et finalement secrétés par la vésicule biliaire directement dans l'intestin grêle. La principale fonction des acides biliaires est de permettre l'émulsion des lipides alimentaires et des vitamines liposolubles afin que ceux-ci puissent être absorbés par l'intestin grêle (Hofmann, 1999).

La conversion du cholestérol en acides biliaires primaires nécessite trois grandes étapes. La première étape est réalisée par l'hydroxylation du noyau stérol. Des modifications supplémentaires sont apportés au noyau stérol lors de la seconde étape. L'oxydation de la chaîne latérale termine la biosynthèse des acides biliaires dans le but de former de l'acide cholique via la voie classique (neutre) ou bien de l'acide chénodésoxycholique en utilisant la voie alternative (acide) tel que présenté dans le schémas ci-dessous (Axelson & Sjovall, 1990). En effet, la conversion du cholestérol en acides biliaires peut emprunter deux voies principales : la classique et/ou l'alternative (Axelson & Sjovall, 1990). La distinction entre les deux voies réside essentiellement dans le site cellulaire où a eu lieu la première étape de réaction de biosynthèses des acides biliaires primaires (Chiang, 1998).

La voie classique débute au niveau du RE, où l'enzyme CYP7A1 (*cholesterol 7 alpha hydroxylase*) hydroxyle le noyau stérol (al, 1996). De son côté, la voie alternative implique l'enzyme CYP27A1 (Sterol 27-hydroxylase). Cette dernière agit au niveau de la mitochondrie pour induire la réaction d'hydroxylation (Russell, (Cali and Russell, 1991). Le produit de

l'enzyme CYP27A1 sera subséquentement hydroxylé à son tour dans le RE par le CYP7B1 pour produire du 7 α -hydroxycholestérol (Norlin, 2002). Par la suite, les deux voies se rejoignent pour interagir avec l'isomérase HSD3B7 (Chen et al., 2016). Le produit issu de l'isomérase HSD3B7 peut par la suite emprunter deux voies : soit la voie classique pour former de l'acide cholique sous l'action de l'enzyme CYP8B1 ou bien la voie alternative afin de former de l'acide chénodésoxycholique (Deo & Bandiera, 2008; Javitt & al, 1989; Shea, Head, Setchell, & Russell, 2007).

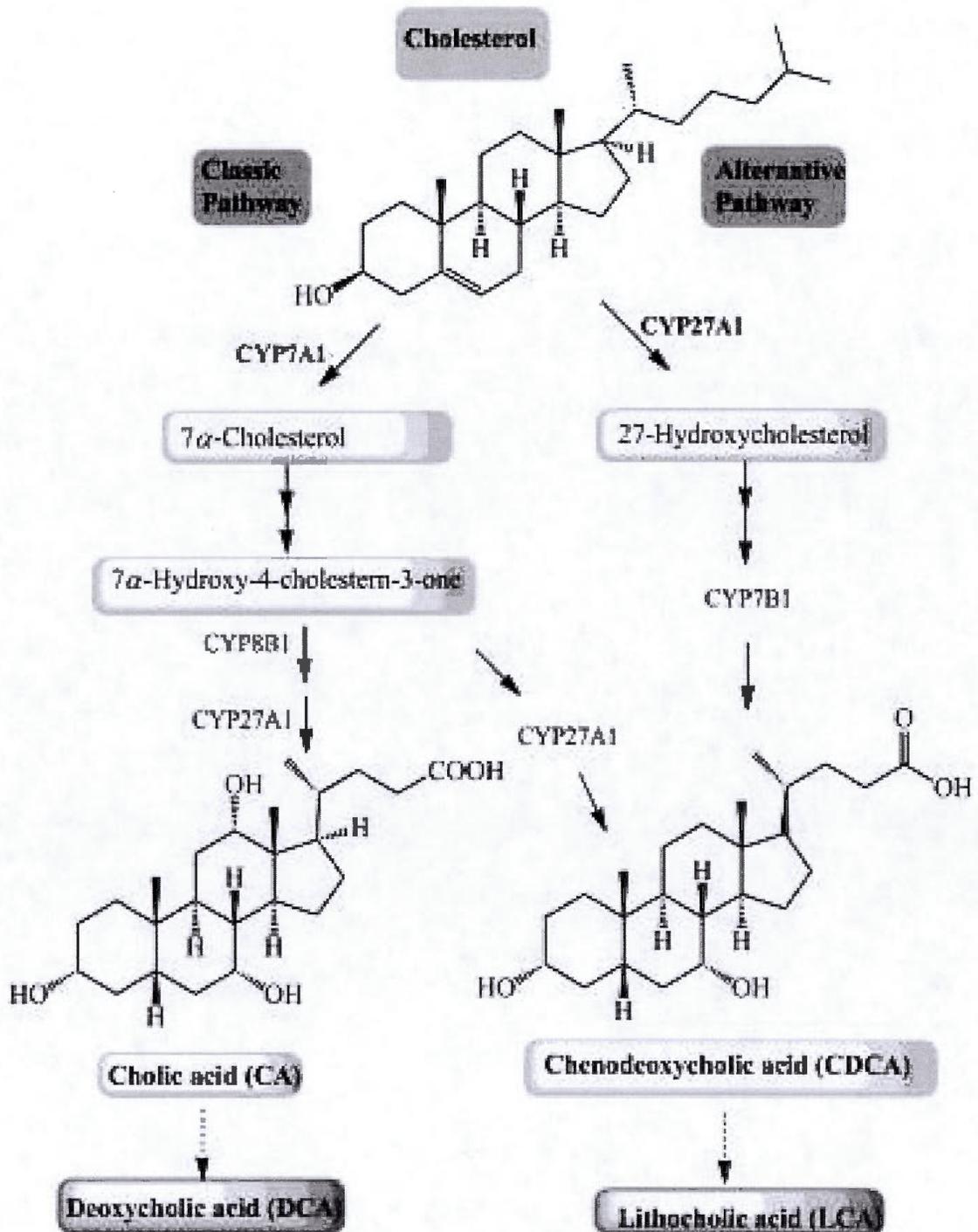


Figure 10 : Illustration de la voie classique et de la voie alternative dans le processus de biosynthèse des acides biliaires au niveau du foie.

Légende : Image tirée de l'article (Kwong, Li, Hylemon, & Zhou, 2015)

1.5.3.2 Cycle entérohépatique des acides biliaires

Pour pouvoir emprunter les canalicules biliaires, les acides biliaires primaires subissent une réaction de conjugaison au niveau de leurs chaînes latérales dans le but d'augmenter leur solubilité. Cette réaction de conjugaison, qui se manifeste par l'ajout d'une molécule de taurine ou de glycine, est catalysée par l'enzyme *Bile Acid Coenzyme A : amino acid N-acyltransferase* (BAT) au niveau du peroxyosome (Falany *et al.*, 1994). Les sels biliaires issues du processus de conjugaison se regroupent en ; glycocholate, glycochénodésoxycholate, taurocholate et taurochénodésoxycholate.

Dans la lumière de l'intestin grêle (dans le duodénum et le jéjunum), les sels biliaires ont pour fonction d'assurer l'émulsion des lipides et des vitamines liposolubles (Maldonado-Valderrama, Wilde, Macierzanka, & Mackie, 2011). Au niveau de l'Iléon et sous l'action de certaines bactéries, une partie des sels biliaires sont déconjugués pour être réabsorbés et transportés par la veine porte vers le foie. Par la suite, la partie non-absorbés au niveau de l'Iléon sera transportée vers le côlon pour subir un processus de transformation en acides biliaires secondaires. Ces derniers peuvent être éliminés par les fèces (Ridlon, Kang, & Hylemon, 2006) ou être à nouveau réabsorbés et transportés vers le foie (Hofmann, 1999). C'est au niveau sinusoidal qu'a lieu la capitation hépatique des acides biliaires. Ces derniers sont par la suite reconjugués et transportés pour réintégrer le cycle hépatobiliaire (Hofmann, 1999).

1.5.4 **L'excrétion transintestinale du cholestérol : le TICE**

Cheng et Stanley en 1959 ont rapporté la présence de stérols d'origine non-alimentaire dans les fèces de patients atteints d'obstruction des voies biliaires (Cheng & Stanley, 1959). Ceci révéla l'existence d'une autre voie que celle impliquant la production de sels biliaires hépatiques. En effet, l'inactivation des transporteurs ABCG5 et ABCG8 a induit une réduction importante des sécrétions biliaires de cholestérol n'entraînant pas une absence de cholestérol dans les fèces (L. Yu *et al.*, 2002). Ceci suggéra l'utilisation d'une autre voie impliquée dans le catabolisme ou l'excrétion du cholestérol. L'équipe de Groen a mis en

évidence l'implication de la voie TICE (Trans-intestinal cholesterol excretion) dans le catabolisme du cholestérol provenant des tissus périphériques (van der Velde et al., 2007). Toutefois, les modes d'action ainsi que les mécanismes impliqués dans le contrôle de la voie TICE sont encore mal caractérisés à ce jour.

L'implication des récepteurs LDL-R dans la voie TICE a été suggérée (Le May et al., 2013). L'inactivation de PCSK9 favorise l'augmentation de l'expression des LDL-R au niveau de la membrane basolatérale des entérocytes tout en stimulant le TICE. *In vivo*, des injections de statines ont aussi haussé les niveaux d'expression du LDL-R et activé le TICE.

Il a également été démontré que TICE pouvait être influencé par la nutrition. Les diètes enrichies en lipides (HFD) ou de type occidental (*Western Diet*) stimuleraient le TICE. Ceci peut en partie s'expliquer par la capacité de ces diètes à activer PPAR α (van der Velde et al., 2008) et LXR (M. Gao, Bu, Ma, & Liu, 2013). Ces dernières induisent une augmentation de la quantité de stérols neutres présents dans les fèces et ce, indépendamment des sécrétions biliaires (Vrins et al., 2009).

1.6 Objectifs et hypothèses de l'étude

1.6.1 Objectifs

L'objectif principal de la présente étude repose sur l'établissement du lien subsistant entre l'accumulation lipidique dans le foie et l'homéostasie du cholestérol et ce indépendamment du désordre métabolique.

1.6.2 Hypothèses

Des rats soumis à une diète à haute teneur lipidique, se voient attribuer une rapide accumulation lipidiques dans leurs foies. Or, ce dernier, est le siège central de la régulation de métabolisme du cholestérol. Il en découle qu'une rapide accumulation lipidique serait enclin d'induire des perturbations au niveau du métabolisme du cholestérol dans le foie.

CHAPITRE II
MÉTHODOLOGIE ET RESULTATS EXPERIMENTAUX

ARTICLE ACCEPTÉ: Expression of molecular markers of hepatic cholesterol metabolism are altered by a short-term high-fat diet.

**Expression of molecular markers of hepatic cholesterol metabolism are altered by a
short-term high-fat diet**

L. Magri-Tomaz ^{*1,2,3}, L. Melbouci ^{*1,2}, J. Mercier ^{1,2}, Ya Ou ^{1,2}, N. Auclair ^{1,2}
F.S. Lira ⁴, J-M. Lavoie ³, and D.H. St-Pierre ^{1,2}

- 1) Département des Sciences de l'Activité Physique, UQAM;
- 2) Centre de Recherche du CHU Sainte-Justine, Montréal, Québec, Canada;
- 3) Département de Kinésiologie, Université de Montréal, Montréal, Québec Canada;
- 4) Department of Physical Education, State University of São Paulo, Presidente Prudente, São Paulo, Brazil

***Both of these authors equally contributed to this manuscript and must be recognized as
first author**

ABSTRACT

Metabolic disorders are often associated with liver steatosis and increased plasma cholesterol levels. However, the link between excessive lipid accumulation and impairments in cholesterol metabolism remains uninvestigated in the liver. Short term of high-fat diet (HFD) was previously shown to promote excessive lipid accumulation prior to the development of metabolic disorders. The present study intended to characterize how increases in liver fat alter the expression of several key regulators of hepatic cholesterol metabolism in response to a short-term HFD. Wistar rats were randomly submitted either to HFD (n = 8) or a regular chow diet (RCD; n = 8) for 14 days. Increases in triglycerides were highly significant ($P < 0.01$) in liver but marginal in plasma of HFD rats. In contrast, the HFD resulted in higher ($P < 0.01$) cholesterol levels in plasma but not in liver samples. Gene expression of key markers involved in cholesterol uptake (LDL particles) including low density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1) and protein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) along with ATP-binding cassette, superfamily G, member 5 (ABCG5) involved in cholesterol exportation *via* bile ducts were found to be higher ($P < 0.05$) in response to the HFD. In contrast, expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR), involved in cholesterol synthesis was down-regulated in liver. The data support the concept that excessive accumulation of lipids promptly alters the expression of key genes regulating cholesterol metabolism in liver. On a clinical point of view, this indicates that increases in plasma cholesterol occur after a short-term high fat diet.

Key words: liver cholesterol metabolism; LDL receptors; PCSK9 and high-fat diet

INTRODUCTION

Ectopic fat accumulation in liver (5 to 10% per weight) has been implicated in several metabolic disorders. For instance, there has been some increasing evidence that NAFLD is a risk factor for diabetes and cardiovascular diseases independently of other usual risk factors (i.e. obesity, metabolic syndrome, plasma lipid levels)^{1, 2}. Hepatic steatosis by itself is also associated with an increased production of proinflammatory markers and the development of a proatherogenic lipid profile^{3, 4}.

Although there is good evidence that NAFLD is associated with the development of cardiovascular diseases the impact of such lipid accumulation on hepatic cholesterol metabolism has not been considered. There are indications that metabolic perturbations leading to fat accumulation in liver are associated with increased plasma cholesterol levels^{5, 6}. However, whether liver fat accumulation is associated with perturbations of metabolic pathways regulating cholesterol metabolism in liver has not been considered. The liver is involved in cholesterol synthesis, uptake from chylomicron remnants and re-uptake through low density lipoprotein receptors (LDL-R). The liver also regulates cholesterol metabolism via HDL synthesis/uptake while regulating VLDL and biliary acids production/release. All these pathways may contribute to changes in plasma cholesterol levels, thus, justifying the interest in a possible association between liver fat accumulation and perturbations in hepatic cholesterol metabolism.

Animal models have been used repeatedly to study the mechanisms and the consequences of liver fat accumulation (for a review see⁷). Among them, high fat or Western-style diets have been particularly useful to induce liver fat accumulation in rodents⁸. Some indications that such high fat diets may affect hepatic cholesterol metabolism came from

the report of Ghoneim et al ⁵ who found an increase in hepatic expression of nuclear receptors LXRs and their target genes hepatic transporters ATP-binding cassette, superfamily A, member 1 (ABCA1) and ATP-binding cassette, superfamily G, member 5 (ABCG5) ⁵. In a recent paper we also found that 3-hydroxy-3methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR) the main enzyme responsible for cholesterol synthesis in liver was increased following a six-week high-fat diet ⁹. This prompted us to question if cholesterol metabolism is indeed altered with a HFD-induced hepatic fat accumulation targeting especially the important mechanism of cholesterol re-uptake from LDLs. Our group recently reported evidence that a high cholesterol diet reduced gene expression of the important low density lipoprotein receptor (LDL-R) in liver ⁹. It is not known, however, if a high fat diet affect the gene expression of the LDL-R and its post-transcriptionally regulator of protein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) along with their transcription factor, sterol regulatory element-binding protein-2 (SREBP-2). Such information might lead to a better understanding of the link between hepatic fat accumulation and regulation of cholesterol metabolism.

The purpose of the present study was to determine if a short Western-style high fat diet leading to an increase in liver fat accumulation is associated with changes in hepatic gene expression of several key molecules of cholesterol metabolism. We choose a short high fat diet (2 weeks) because it has been shown that fat can accumulate rapidly in liver without inducing the overall metabolic disorders normally observed following longer treatment periods with such obesogenic diets ^{10,11}.

MATERIAL AND METHODS

Animal and treatments

Four-week old male Wistar strain rats (Charles River, St-Constant, Que., Canada) weighing 100-120 g upon their arrival were housed individually. Their environment was controlled in terms of light (12 h light-12 h dark cycle starting at 06:00), humidity, and room temperature (20-23 C). After a 3-day acclimatization period, rats were randomly submitted either to high fat (HFD; n = 8) or regular chow (RCD; n = 8) diets for 14 days. The protocol was approved by the *Comité Institutionnel de Protection des Animaux* (CIPA) of UQAM (Permit Number: 0515-R3-759-0516) and developed in accordance with recommendations of the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals.

The harvest of tissues was performed after a 4h fast to standardize the feeding status of each animal. The animals were anesthetized by inhalation of isoflurane (3% at induction and 1.5% at maintenance). Blood was collected in tubes containing 25uL EDTA and 10uL AEBSF at 400mM / mL blood. Blood samples were drawn from the heart and liver medium lobe was collected and stored in micro tubes for assessment of lipid content. A small piece of liver (always collected from the same lobe) was also mounted on a cork disc with 10%w/v tragacanth gum (Sigma), flash frozen in cold isopentane and stored at -80°C until analyses were carried out. Perirenal, epididymal and subcutaneous fat pads were then collected and weighed.

Diets

The regular chow diet (Charles River Rodent Diet # 5075, Cargill Animal Nutrition, MN, USA) had a physiological fuel value (calculated using a modified Atwater factor) of 2.89 kcal/g and a macronutrient weight content of 55.2% carbohydrate (65.6% kcal), 18% protein (21.4% kcal) and 4.5% fat (13% kcal). The high fat diet was prepared from purified food-grade reagents according to a commercial formulation (D12492 diet, Research Diets Inc., New Brunswick, NJ, USA). It had a physiological fuel value of 4.80 kcal/g and a macronutrient weight content of 26.3% carbohydrate (19.2% kcal), 26.2% protein (19% kcal) and 34.9% fat (61.8% kcal).

Biochemical analyses

Liver mounted on the cork plug were sliced with the cryostat at a thickness of 8 μm at -20°C and adhered to the slides (FisherBrand® Superfrost Plus Microscope Slides). For lipid staining, liver sections were defrosted for 15 min. Slides were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min. Samples were then washed 3 times in PBS before being placed in a DAPI (Thermo Fisher, D3571) 300nM for 5 min. After 3 additional PBS washes, the slides were incubated during 30 min in PBS solution containing 1 μl /mL of HCS LipidTOX Green Neutral Lipid Stain (Thermo Fisher, H34475). Later, samples were washed again 3 times in PBS and cover slipped with a DABCO (50% glycerol and 50% DABCO dissolved in PBS) mounting medium. Images showing liver cells were obtained using 60X oil immersion objective. Sets of 10 stacks were used to image all the sections of liver. Sections were imaged on a Nikon TE300 microscope (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) at UQAM's imaging facility. Excitation images were

acquired every second with an excitation wavelength of 404.3 nm for DAPI (blue color) and 640.1 nm for LipidTox (green color). The images were randomly sampled across each liver section using the ImageJ software (NIH, USA). For lipid content, area covered by lipids and sizes of lipid droplets were measured.

Hepatic triglyceride (TG) and cholesterol levels were quantified with ~100 mg of tissue. Lipids were extracted by overnight 2:1 chloroform/methanol solution. After centrifugation, the lower phase was dried up under nitrogen flux and resuspended with floch and thesit solution 20%. Quantification of total cholesterol from liver and plasma was obtained with the use of Cholesterol E kits (Wako Diagnostics, Mountain View, California, USA) and the TG from plasma and liver were quantified with kits from Randox Laboratories Ltd, Crumlin, United Kingdom.

Real time polymerase chain reaction (RT-qPCR)

Collected tissue samples were stored in stabilization solution RNAlater (Ambion) and stored at -20 °C for later use. Approximately 10 mg of tissue was homogenized in 1mL of TRIzol Reagent (Ambion) with a Tissue LyserII homogenizer (Qiagen) and extracted according to the manufacturer's instructions. Samples were further processed using the PureLink RNA Mini Kit (Ambion) and contaminating DNA was removed via DNase on-column digestion. A BioDrop spectrophotometer was used to determine RNA concentrations and the ratio of absorbance at 260 nm and 280 nm used to assess purity. RNA integrity was evaluated by visualization of intact 18S and 28S RNA bands following agarose gel electrophoresis. SuperScript VILO Master Mix (Invitrogen) was used to synthesize cDNA with 1µg of RNA per 20 µL reaction. Real-time qPCR reactions were performed in triplicate using 384-well plates in the QuantStudio6 system (Life

Technologies) with SYBR Select Master Mix kit (Applied Biosystems). Reaction conditions consisted of 2 μ L of a 1:10 cDNA dilution and 0.3 μ M primers in a final volume of 10 μ L. The following cycling protocol was used: 2 min at 50° C, 2 min at 95° C, followed by 40 cycles of 15 s at 95° C, 15 s at 58° C and 1 min at 72° C. The reaction's specificity was verified by melt curve analysis. Negative controls (RT) and no template controls (NTC) were included in the PCR runs. Reference genes were identified by testing 10 different genes (picked from literature) and running TaqMan Array Rat Endogenous Control Plates (Applied Biosystems) on all samples. The 2 reference genes with the best gene expression stability measure (Expression Suite, Applied Biosystems) were selected for normalization: PPIA and HPRT1. Primers used (Table 1) were designed using Primer-BLAST (NCBI). Whenever possible, intron-spanning primers were selected to avoid amplification of genomic DNA. A standard curve obtained by scalar dilution of a cDNA pool was generated to verify PCR efficiency. The triplicate average values of cycle threshold (Ct) were used for quantification and target genes were determined by $2^{\Delta\Delta Ct}$ calculation method.

Statistical Analyses

All values are presented as means \pm SD. Distribution normality was assessed using the Shapiro-Wilk test. Unpaired Student's *t* tests were used to compare the 14-day average values between the two groups. Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 6.0 Software MacKiev © 1994-2015 Inc. The significant value for all statistical analyses was set at $P < 0.05$.

RESULTS

Body weight gain was similar in animals fed the RCD or the HFD (Table 2). However, the sum of 3 intra-abdominal fat depots was higher ($P < 0.01$) while liver weight was lower ($P < 0.001$) in the HFD than in the RCD rats. Despite lower liver weight, fluorescent markers of lipids (in green) revealed an abundant lipid accumulation in hepatocytes in the 2-week high-fat fed rats (Fig. 1). The lipid accumulation was characterized by a higher ($P < 0.001$) average and size of lipid droplets in HFD than in RCD animals (Fig. 1).

The higher TG accumulation in liver of HFD compared to RCD fed rats was confirmed by biochemical analyses ($P < 0.001$) while in plasma, TG levels only showed a tendency ($P = 0.09$) to be lower in HFD than in RCD animals (Fig. 2). The opposite was, however, observed with the cholesterol values with an absence of effects of the high-fat feeding on liver cholesterol levels and higher ($P < 0.01$) cholesterol levels in plasma (Fig. 2).

In spite of the observation that the high-fat feeding did not change hepatic cholesterol levels, there was a higher gene expression of several markers of hepatic cholesterol metabolism. Gene expressions of PCSK9 ($P < 0.01$), known to regulate LDL-R, along with LRP-1 ($P < 0.05$), involved in hepatic cholesterol uptake, were higher in HFD than in RCD fed rats (Fig. 3). Gene expression of the transcription factor SREBP-2, which activates both PCSK9 and LDL receptor (LDL-R) gene transcription, was also higher ($P < 0.01$) in animals fed the 2-week high-fat diet. On the other hand, gene expression of LDL-R only shows a tendency ($P = 0.11$) to be overexpressed following the high-fat diet (Fig. 3).

ATP-binding cassette, superfamily G, member 5 (ABCG5), involved in cholesterol exportation and other sterols from hepatocytes to the bile ducts was also found to be higher ($P < 0.001$) in HFD than in RCD fed animals (Fig. 4). On the opposite, HMGCR, the main regulatory enzyme in cholesterol synthesis, was lower in animals fed the 2-week high-fat diet while the lower levels of acetyl-CoA acetyltransferase-2 (ACAT-2), involved in cholesterol esterification, did not reach statistical significance ($P = 0.09$; Fig. 4).

DISCUSSION

In the present study we submitted young rats to a short period of high fat feeding to test the hypothesis that a rapid increase in liver fat accumulation may be associated with perturbations of hepatic cholesterol metabolic pathways. Two weeks of high fat feeding resulted in a large increase in liver fat accumulation. That cholesterol metabolism was also affected by this short period of high fat feeding is first supported by the finding of higher concentrations of plasma cholesterol under this diet condition. Findings of the present study add to this observation by showing that gene expressions of key molecular markers of hepatic cholesterol metabolism involved in uptake of LDL and exportation into bile ducts were increased while the key marker of cholesterol synthesis was decreased by the high-fat diet. It is suggested that fat accumulation in liver may indeed be associated with rapid perturbations of hepatic cholesterol metabolism thus contributing to accumulation of plasma cholesterol levels.

The present results confirm previous findings^{10, 12, 13, 14} that two weeks of high fat feeding is appropriate to rapidly increase fat content in liver. Gauthier et al¹¹ even reported that liver fat accumulation increases rapidly after 2 weeks to decrease in subsequent weeks (4 to 8) and re-increased if the high-fat diet is pursued for a longer duration (6 to 16 weeks). In the present study, we used histological and biochemical approaches to show that indeed liver fat accumulation is largely increased following the present two week high-fat feeding. We choose such a short period of high-fat feeding because under this condition fat accumulation in liver, although probably a transitory phenomenon, is rapid and massive and, therefore, constitute an interesting model to test if hepatic cholesterol metabolism, often seen as a long-term regulation, is also perturbed. We also choose to

conduct this study with young rats (4 weeks) to reduce the chances that cholesterol metabolism alterations, whether in plasma or liver, may be associated with aging.

One of the major determinant of plasma LDL-cholesterol is hepatic LDL-R activity, involved in the removal of the atherogenic particles in circulation ¹⁵. The LDL-R activity is downregulated post-transcriptionally by PCSK9 both of these molecules being transcriptionally regulated by the transcription factor SREBP-2 ^{16,17}. The present high-fat feeding-induced liver fat accumulation was associated with higher gene expression of PCSK9 and SREBP-2 while a tendency ($P = 0.11$) was observed for higher levels of LDL-R indicating a perturbation of the hepatic pathway responsible for the hepatic uptake of LDL particles. In addition to LDL-R, plasma remnant LDL particles are taken up by low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1), a protein that has structural and biochemical similarities to LDL-R ¹⁸. LRP-1 gene expression was also increased by the present 2 weeks high-fat diet, supporting the interpretation that indeed hepatic cholesterol transport was altered in link with the hepatic fat accumulation.

Since the liver possesses several metabolic pathways regulating the influx and outflow of cholesterol, it is difficult to precisely determine the hepatic mechanism responsible for the present increase in circulating plasma cholesterol. The potential increase in the transport of LDL cholesterol particles might be related to transient reductions in liver cholesterol levels ¹⁷. It is interesting to note in this regard that HMGCR gene expression, the main enzyme responsible for cholesterol synthesis was reduced following the high-fat diet, possibly in line with transient higher levels of liver cholesterol. Supporting the hypothesis of higher transient cholesterol levels in the present high-fat fed animals is the increase in gene expression of ABCG5 one of the transporter responsible for the exit of

cholesterol in the bile ducts. If indeed LDL particles transport is increased in liver following the present short high-fat diet, this would not, however, explain the present increase in circulating plasma cholesterol. On the other hand, even though LDL-R mRNA might have been increased, it is not so sure that LDL-R protein level was also increased since PCSK9, a protease that stimulates the degradation of the LDL-R protein, had its gene expression upregulated by the high-fat diet. The LDL-R activity is regulated at both transcriptional and post-translational levels. The post-translational regulation of LDL-R is mediated by PCSK9 intra- and extracellularly^{19,20}. It is thus possible that effectively the uptake of LDL particles by liver transporters might have been reduced, thus contributing to the observed increase in plasma total cholesterol. In spite of several counteractions that complicate the interpretation, the present data do indicate that a short high-fat diet in young rats leading to a large increase in liver fat accumulation results in a perturbation of key markers of liver cholesterol metabolism suggesting that the liver is indeed involved in the subsequent increase in plasma total cholesterol levels.

There have been previous reports that several metabolic pathways of hepatic cholesterol homeostasis are dysregulated in NAFLD (for a review see²¹). These associations have been reported in human patients as well as in animal models. These models that have sometimes led to contradictory results, for instance on the expression of LDL-R^{22,23}, all have the characteristic to be on a long-term basis. NAFLD results in several disorders including insulin resistance and inflammation, making difficult the close association between liver fat accumulation and dysregulation of cholesterol metabolism. The present two-week high-fat diet that may be considered as a non-inflammatory fat accumulation

(isolated steatosis), therefore, supports the interpretation of a link between a rapid accumulation of fat in liver and dysregulation of cholesterol metabolism.

The association between hepatic steatosis and cholesterol metabolism is most of the time seen as how dysregulation of cholesterol metabolism contribute to NAFLD ²¹. The present results using a short duration high-fat diet support the concept that liver fat accumulation may in turn disturb hepatic cholesterol pathways. Although identification of the exact mechanism is beyond the scope of the present study, there are connecting pathways between triglycerides and cholesterol in the liver that may be pointed at. VLDL production is increased in men with NAFLD ²⁴. To our knowledge, it is unknown if an increase in VLDL production stimulates incorporation of cholesterol into this particle. This in turn might transiently reduce liver cholesterol levels and stimulate a change in LDLR. The exact underlying mechanism by which fat accumulated in liver disturbs metabolic pathways of cholesterol remains to be elucidated.

In summary, results of the study indicate that a short period of high-fat diet in young rats results in a large accumulation of lipid in liver along with a dysregulation of several key markers of cholesterol metabolism and an increase in plasma cholesterol level. The present data support the recent concept that liver fat accumulation is associated with perturbations of cholesterol metabolism in liver and suggest, on a clinical point of view, that an increase in plasma cholesterol levels may result from an increase in dietary fat.

REFERENCES

1. S. Chitturi and G. C. Farrell. Fatty liver now, diabetes and heart attack later? The liver as a barometer of metabolic health. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 22: 967–969, 2007.
2. N. Alkhouri, T. A. R. Tamimi, L. Yerian, R. Lopez, N. N. Zein, and A. E. Feldstein. The inflamed liver and atherosclerosis: a link between histologic severity of nonalcoholic fatty liver disease and increased cardiovascular risk. *Digestive Diseases and Sciences*, 55: 2644–2650, 2010.
3. A. M. G. Cali, T. L. Zern, S. E. Taksali, A.M. Cali, J. Dziura, G.I. Shulman, B.M. Pierpont, and S. Caprio. Intrahepatic fat accumulation and alterations in lipoprotein composition in obese adolescents: a perfect proatherogenic state. *Diabetes Care*, 30: 3093–3098, 2007.
4. A. Wieckowska, B. G. Papouchado, Z. Li, R. Lopez, N. N. Zein, and A. E. Feldstein. Increased hepatic and circulating interleukin-6 levels in human nonalcoholic steatohepatitis. *American Journal of Gastroenterology*, 103: 1372–1379, 2008.
5. R.H. Ghoneim, E.T. Ngo Sock, J-M. Lavoie, and M. Piquette-Miller. Effect of high-fat diet on the hepatic expression of nuclear receptors and their target genes : relevance to drug disposition. *British Journal of Nutrition*. 113: 507-516, 2015.
6. E. T. Ngo Sock, I. Côté, J.S. Mentor, D. Prud'homme, R. Bergeron, and J-M. Lavoie. Ovariectomy stimulates hepatic fat and cholesterol accumulation in high-fat diet-fed rats. *Hormone Metabolic Research* 45: 283-290, 2013.
7. JM. Lavoie, and A. Pighon. NAFLD, estrogens and physical exercise: the animal model. *Journal Nutrition Metabolism*, doi: 10.1155/2012/914938, 2012.
8. M. Schaalán, HS El-Abhar, M. Barakat, and E.S. Densharry. Westernized-like diet-fed rats: effect on glucose homeostasis, lipid profile, and adipocyte hormones and their modulation by rosiglitazone and glimepiride. *Journal Diabetes Complications* 23: 199-208, 2008.
9. I. Côté, N.A. Chapados, and J-M. Lavoie. Impaired VLDL assembly: a novel mechanism contributing to hepatic lipid accumulation following ovariectomy and high-fat/high-cholesterol diets? *British Journal of Nutrition*. 112: 1592-1600, 2014.
10. A. Paquette, M. Shinoda, R. Rabasa Lhoret, D. Prud'homme, and J-M. Lavoie. Time course of liver lipid infiltration in ovariectomized rats: Impact of a high-fat diet. *Maturitas*, 58: 182-190, 2007.
11. M.S. Gauthier, R. Favier, and J-M. Lavoie. Time course of the development of non-alcoholic hepatic steatosis in response to high-fat diet-induced obesity in rats. *British Journal of Nutrition*, 95: 273-281, 2006.

12. G. Jakobsdottir, J. Xu, G. Molin, S. Ahrné, and M. Nyman. High-fat diet reduces the formation of butyrate, but increases succinate, inflammation, liver fat and cholesterol in rats, while dietary fibre counteracts these effects. *PLoS One* 13; 8 (11): e80476. 2013.
13. E.W. Kraegen, P.W. Clark, A.B. Jenkins, E.A. Daley, D.J. Chisholm, and L.H. Storlien. Development of muscle insulin resistance after liver insulin resistance in high-fat-fed rats. *Diabetes* 40: 1387-1403.
14. V.T. Samuel, Z.-X. Liu, X. Qu, B.D. Elder, S. Bilz, D. Befroy, A.J. Romanelli, and G.I. Shulman. Mechanism of insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Biological Chemistry* 279: 32345-32353, 2004.
15. K. Ouguerram, M. Chetiveaux, Y. Zair, P. Costet, M. Abifadel, M. Varret, C. Boileau, T. Magot, and M. Krempf. Apolipoprotein B100 metabolism in autosomal-dominant hypercholesterolemia related to mutations in PCSK9. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24: 1448-1453, 2004.
16. M. Abifadel, M. Varret, J.P. Rabes, D. Allard, K. Ouguerram, M. Devillers, C. Cruaud, S. Benjannet, L. Wickham, D. Erlich, A. Derre, L. Villegier, M. Farnier, I. Beucler, E. Bruckert, J. Chambaz, B. Chanu, J.M. Lecerf, G. Luc, P. Moulin, J. Weissenbach, A. Prat, M. Krempf, C. Junien, N.G. Seidah, and C. Boileau, Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia, *Nature Genetics* 34: 154-156, 2003.
17. G. Dubuc, A. Chamberland, H. Wassef, J. Davignon, N.G. Seidah, L. Bernier, and A. Prat. Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24: 1454-1459, 2004.
18. A. Rohlmann, M. Gotthardt, R.E. Hammer, and J. Herz. Inducible inactivation of hepatic LRP gene by cre-mediated recombination confirms role of LRP in clearance of chylomicron remnants, *Journal of Clinical Investigation* 101: 689-695, 1998.
19. D.W. Zhang, T.A. Lagace, R. Garuti, Z. Zhao, M. McDonald, J.D. Horton, Jonathan C. Cohen and Helen H. Hobbs. Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeats A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation. *Journal of Biological Chemistry* 282:18602-18612, 2007.
20. L. Shan, L. Pang, R. Zhang, N.J. Murgolo, H. Lan, and J.A. Hedrick. PCSK9 binds to multiple receptors and can be functionally inhibited by an EGF-A peptide. *Biochemical and Biophysical Research Commun.* 2008: 375:69-73, 2008.
21. G. Arguello, E. Balboa, M. Arrese, and S. Zanlungo. Recent insights on the role of cholesterol in non-alcoholic fatty liver disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1852: 1765-1778, 2015.

22. D.M. Van Rooyen, C.Z. Larter, W.G. Haigh, M.M. Yeh, G. Ioannou, R. kuver, S.P. Lee, N.C. Teoh, and G.C. Farrell. Hepatic free cholesterol accumulates in obese diabetic mice and causes non-alcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 141: 1393-1403, 2011.
23. H.K. Min, A. Kapoor, M. Fuchs, F. Mirshahi, H. Zhou, J. Maher, J. Kellum, R. Warnick, M.J. Contos, and A.J. Sanyal. Increased hepatic synthesis and dysregulation of cholesterol metabolism is associated with the severity of non-alcoholic fatty liver disease. *Cell Metabolism* 15: 665-674, 2012.
24. A. M. Umpleby, F. Shojae-Moradie, B. Fielding, X. Li, A. Marino, N. Alsini, C. Isherwood, N. Jackson, A. Ahmad, M. Stolinski, J. A. Lovegrove, S. Johnsen, A.S. Jeewaka R. Mendis, J. Wright, M. E. Wilinska, R. Hovorka, J. D. Bell, E. L. Thomas, G. S. Frost, and B. A. Griffin. Impact of liver fat on the differential partitioning of hepatic triacylglycerol into VLDL subclasses on high and low sugar diets. *Clinical Science* 131:2561-2573.

LEGENDS

Figure 1. Confocal images from liver cells with readings of lipid droplets (green) and nucleus (blue). Underneath are the size, area covered by lipids, and number of lipid droplets in rats fed a regular control diet (RCD) or high fat diet (HFD) for 14-days. **** Significantly different from diet counterparts ($P < 0.0001$).

Figure 2. Liver and plasma triglycerides (TG) and cholesterol levels in rats fed a regular control diet (RCD) or high fat diet (HFD) for 14-days. ** Significantly different from diet counterparts ($P < 0.001$), **** ($P < 0.0001$).

Figure 3. Hepatic gene expression of low density lipoprotein receptors (LDL-R), protein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9), low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1), and sterol regulatory element-binding protein-2 (SREBP-2) in rats fed a regular control diet (RCD) or high fat diet (HFD) for 14-days. * Significantly different from diet counterparts ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$).

Figure 4. Hepatic gene expression of acetyl-CoA acetyltransferase 2 (ACAT-2), 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR), and ATP-binding cassette, subfamily G, member 5 and 8 (ABCG5, ABCG8) in rats fed a regular control diet (RCD) or high fat diet (HFD) for 14-days. * Significantly different from diet counterparts ($P < 0.05$), *** ($P < 0.001$).

TABLES

Table 1. Oligonucleotide primers used for quantitative real-time polymerase chain reaction.

Gene	Access Number	Forward 5' -- 3'	Reverse 3' -- 5'
LDL-R	NM_175762.2	ATCAATGTGACCCAGTGCGA	GTCCAAGCACTCGTTGGTCT
LRP-1	NM_001130490.1	GCGGTGTGACAACGACAA	TCTGCCACTGTTGCACTGA
SREBP-2	NM_001033694.1	CCGAACTGGGCGATGGATG	TGTAGCATCTCGTCGATGTCC
PCSK-9	NM_199253.2	GTTGCCCATGTGGAGTACA	ACTTCCGTCAGGGGAGCTAT
ABCG5	NM_053754.2	GGGTTGCTCATTGGATCTGGA	GGAGCCACCACAAGTGAAGT
ABCG8	NM_130414.2	CAGACCCTCACACAGGACAC	ATCTGACGACGGATCAGGGT
ACAT2	NM_001006995.1	TGAGACCAGAGGACCAACCTG	AACAGTGTCAAGTGCAATGTCTC
HMGCR	NM_013134.2	TCGACAGCACGAGCAGATTT	CGTTTTGGACTGGAGACGGA
HPRT1	NM_001032376	AACCTTGCTTTCCTTGGTCA	TCAAGGGCATAGCCTACCAC
PPIA	NM_214353	CACAAACGGTCCCAGTTTT	TGTCCACAGTCAGCAATGGT

Table 2. Body weight, sum of fat (perirenal, epididymal and inguinal fat pads), and liver weight in rats fed a regular control diet (RCD) or high fat diet (HFD) for 14 days. * Significantly different from the diet counterparts ($P < 0.05$), **($P < 0.01$).

Groups	Body Weight (g)		Sum of Fat Pads (g)	Liver Weight (g)
	<i>Pre</i>	<i>Post</i>		
RCD	141.2 ± 10.6	284.5 ± 12.2	5.26 ± 0.47	12.1 ± 0.20
HFD	140.6 ± 10.9	278.1 ± 16.1	7.7 ± 0.69**	10.1 ± 0.43*

Figure 1.

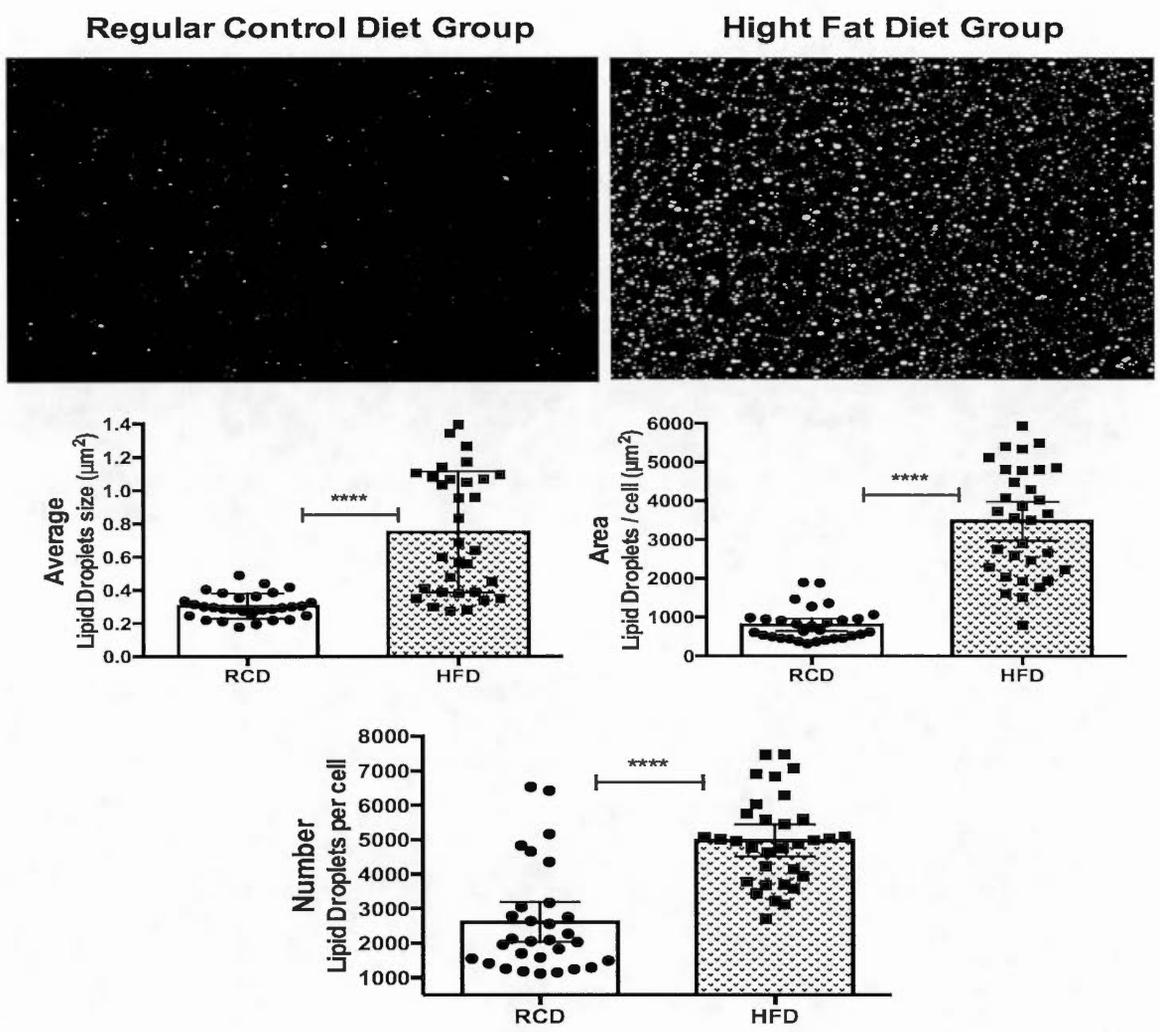


Figure 2.

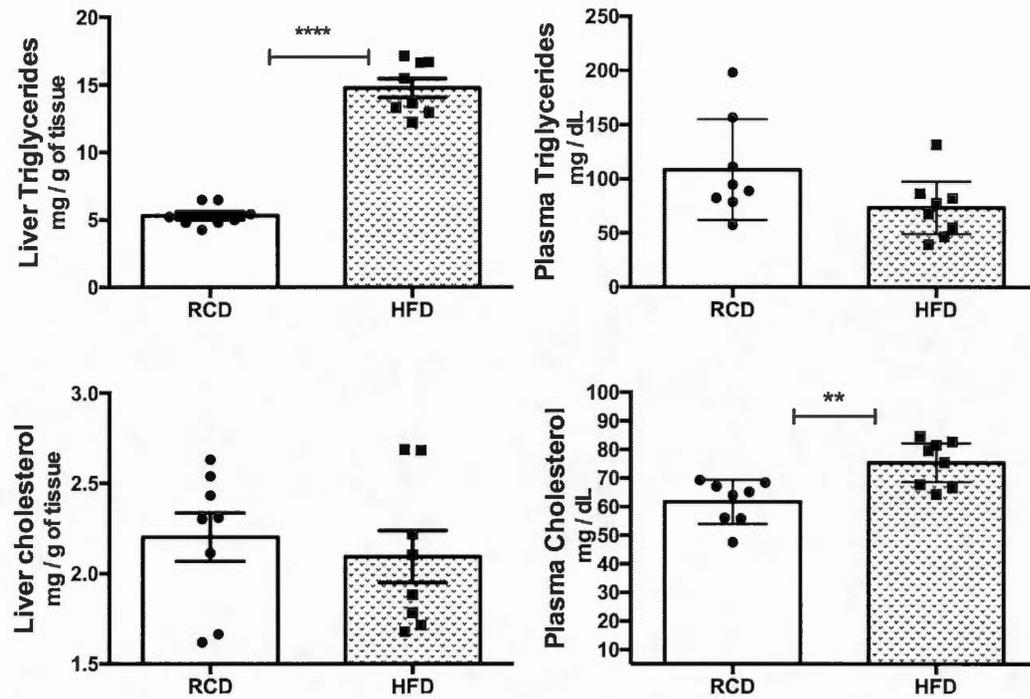


Figure3.

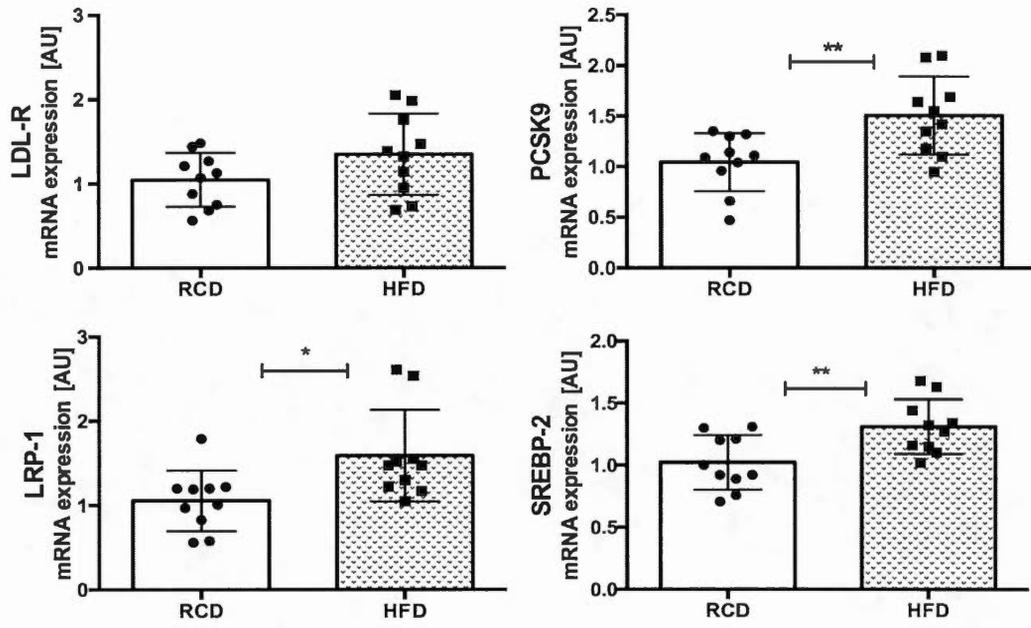
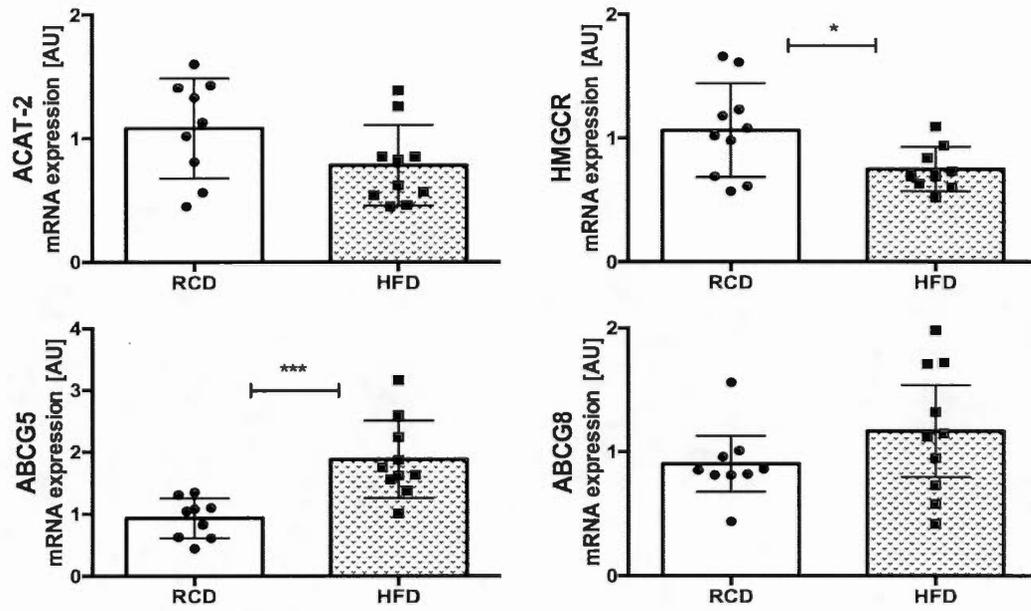


Figure 4.



CHAPITRE III DISCUSSION

De jeunes rats Wistar ont été soumis à deux semaines de diète HF pour évaluer l'impact d'une accumulation rapide de lipides sur le métabolisme du cholestérol dans le foie. Au bout de deux semaines de cette diète, une accumulation significative de lipides a pu être observée dans le foie de ces rats. Cette dernière se manifestait par l'hypertrophie des gouttelettes lipidiques. Cette accumulation excessive de lipides fut accompagnée d'une hausse des taux plasmatiques de cholestérol. Les données issues de cette étude suggèrent l'impact de l'accumulation excessive de lipides sur l'altération du métabolisme du cholestérol hépatique. Il est vrai que l'expression des gènes impliquant la captation/internalisation des LDL a été augmentée chez les animaux soumis à la diète HF, alors que la synthèse du cholestérol a été réduite dans ce même groupe. Ces données suggèrent qu'un lien étroit existe entre l'accumulation rapide de lipides et l'altération du métabolisme du cholestérol chez le rat.

Deux semaines de diète HF n'ont pas été suffisantes pour induire une prise de poids plus importante chez les animaux du groupe HF (tableau II) (Andrich et al., 2018). Cependant, cette diète obésogène a altéré la distribution de la masse adipeuse chez ces animaux. Il a été observé que les rats soumis à la diète HF présentaient un poids en tissus adipeux viscéraux plus élevé que ceux du groupe contrôle.

Le foie des rats soumis à une diète HF pour une durée de 2 semaines a subi une augmentation significative des niveaux de lipides. Nous avons associé cette augmentation à une hausse significative de l'aire des gouttelettes lipidiques et de leur nombre. Or, cette hypertrophie des

gouttelettes lipidiques avait déjà été reliée au développement de la stéatose hépatique non-alcoolique (Liang et al., 2014; Takahashi & Fukusato, 2014). Par ailleurs, le poids du foie des animaux soumis à la diète HF était significativement plus bas que celui du groupe contrôle. Nous n'avons pas été en mesure d'expliquer les mécanismes impliqués dans ce processus (Andrich et al., 2018). Bien que nous n'ayons pas effectué de mesures pouvant confirmer cette hypothèse, nous postulons que la diète HF ait pu induire un retard du développement du foie ou même une perte protéique chez ces rats en croissance. Ces hypothèses sont supportées par l'observation d'une corrélation inverse entre les niveaux plasmatiques de cholestérol et le poids du foie chez des souris femelles ayant été soumises à une diète obésogène avant et après la naissance de leur progéniture (J. Kim, Kim, & Kwon, 2016). De plus, il a été observé que le contenu protéique et en ADN du foie est réduit chez les femelles ayant été soumises à la diète riche en lipides. Ceci indiquerait qu'une diète obésogène peut non seulement altérer le métabolisme des lipides et du cholestérol, mais aussi sur le contenu en protéines et en ADN du foie.

Plusieurs études *in vivo* menées chez des souris ou des rats témoignent que les conséquences d'une diète HF se manifestaient, en partie, par une augmentation du stockage de lipides dans le foie (Koppe, Elias, Moseley, & Green, 2009; Meli et al., 2013). Chez les rats, une augmentation du stockage lipidique dans le foie a pu être observée après seulement une semaine de diète HF (Kleemann et al., 2010). Ces études suggèrent qu'à court terme, les diètes HF peuvent induire des perturbations dans le métabolisme lipidique du foie. Or, le stockage lipidique dans le foie se manifeste sous forme de gouttelettes lipidiques. Ces vésicules lipidiques renferment des lipides neutres, soit des TG et du cholestérol estérifié. Des dosages

de TG dans le foie de ces animaux démontrent que la quantité de TG est trois fois plus élevée chez le groupe HF comparativement aux animaux du groupe contrôle. Toutefois, les niveaux de cholestérol hépatique ne sont pas significativement différents entre les deux groupes. D'autre part, chez l'humain, une étude récente indique que la sécrétion de VLDL est plus élevée chez des patients atteints de NAFLD (Umpleby et al., 2017). Cette augmentation de la sécrétion de VLDL suggère une séquestration plus importante du cholestérol hépatique dans ces lipoprotéines, et donc une réduction des niveaux de cholestérol dans le foie. En addition, il a été démontré que la capacité de recaptage hépatique du cholestérol en circulation via les LDLR était en baisse chez des sujets atteints NAFLD (Kerr & Davidson, 2012).

L'accumulation lipidique dans le foie des rats a entraîné des perturbations au niveau des taux de cholestérol plasmatiques des animaux soumis à la diète HF. En effet, des niveaux plus élevés de cholestérol plasmatique ont été observés chez ces animaux comparativement à ceux soumis à la diète conventionnelle. Tel que revu par notre collaborateur, la perte de TG et le transfert des Apo-AI et Apo-C des HDL contre les Apo-E va faire en sorte que les chylomicrons et les VLDL deviennent des *remnants* avec une faible affinité pour la lipase de lipoprotéine (LPL) (Lavoie, 2016). La présence d'Apo-E est critique pour le re-captage des lipoprotéines dans le foie et ce mécanisme implique la présence de LDL-R et de LRP-1. Alors que les Apo-B48 des chylomicrons *remnants* sont pratiquement captés à 100% par le foie dû à leur affinité importante pour le LDL-R et le LRP-1, l'Apo-B100 des VLDL *remnants* en permet un captage hépatique à 50% seulement. Par la suite, les VLDL *remnants* vont continuer d'être hydrolysés et de perdre des TG dans la circulation pour devenir des IDL et des LDL (Lavoie, 2016). Pendant ce processus, les LDL vont transférer leur protéines Apo-E et Apo-CII vers les HDL

pour seulement conserver leur Apo-B100. Un lien de causalité a pu être établi entre les taux d'Apo-B100 circulant ainsi que les maladies cardio-vasculaires tels l'athérosclérose. En effet, l'Apo-B100 via deux liaisons protéoglycanes permet la rétention des LDL dans les parois artérielles engendrant ainsi le développement de l'athérosclérose (Olofsson & Boren, 2005).

Bien que son affinité ne soit pas très importante, LDL-R sera le seul récepteur capable de capter les LDL et de les internaliser afin qu'ils puissent être dégradés par le foie. PCSK9, qui se retrouve dans les entérocytes et dans la circulation, joue un rôle important dans la dégradation du LDL-R (Lavoie, 2016). En effet, PCSK9 en circulation peut se lier au LDL-R à la surface des hépatocytes pour forcer son ubiquitination et sa dégradation par les lysosomes et endosomes (Poirier & Mayer, 2013; D. W. Zhang et al., 2007). Les présents résultats indiquent que l'augmentation de l'expression de PCSK9 observée chez les animaux traités avec la diète obésogène favoriserait une dégradation du LDL-R, ce qui engendrerait un captage moins important de LDL par le foie. Ceci favoriserait donc l'augmentation des niveaux de cholestérol plasmatique. Toutefois, les données de la présente étude indiquent que les niveaux d'expression de LDL-R n'augmentent que marginalement ($P = 0.11$) chez les animaux soumis à la diète obésogène. Ceci suggère que le foie tente de contrer l'effet de la surexpression de PCSK9 pour maintenir sa capacité d'internaliser les particules de LDL grâce à une production accrue de LDL-R. LRP-1, qui présente des similitudes fonctionnelles avec LDL-R, a également vu son expression augmenter chez le groupe HF. Il serait important de valider cette hypothèse dans une prochaine série d'expériences en mesurant les niveaux protéiques de PCSK9, LDL-R et LRP-1 dans le même modèle de rats.

L'expression du gène de PCSK9 est positivement contrôlée par SREBP-2 (Abifadel et al., 2003; Dubuc et al., 2004). Par ailleurs, SREBP-2 a été significativement plus exprimé chez les rats soumis à la diète HF. Tel que revu, par son interaction avec le *SREBP cleavage-activated protein* (SCAP), SREBP-2 est considéré comme un transporteur et biosenseur de cholestérol dans l'ER (Lavoie, 2016). De plus, SREBP-2 agit en tant que facteur de transcription dans le noyau en stimulant l'expression de son gène ainsi que celle d'autres facteurs critiques pour la synthèse et le métabolisme du cholestérol tels que HMGCR, PCSK9 ainsi que LDL-R (Kato, Ogawa, Kishida, & Ebihara, 2009; Ngo Sock, Chapados, & Lavoie, 2014). Il est aussi intéressant de noter que les résultats tirés du présent travail de maîtrise indiquent que le foie des animaux soumis à la diète riche en lipides diminue son expression de HMGCR afin de diminuer la biosynthèse de cholestérol. Or, il est important de noter que ce phénomène s'apparente au mode d'action des statines qu'on administre aux patients présentant des maladies cardio-vasculaires et ayant des taux élevés de cholestérol. En effet, les statines agissent autant qu'inhibiteur d'HMGCR, réduisant ainsi la biosynthèse du cholestérol au niveau hépatique (Endo, Kuroda, & Tsujita, 1976; Naylor & Vasani, 2016). En effet, les statines joueraient un rôle protecteur contre les maladies cardio-vasculaires. Suite à une diète HF à court terme, il semblerait que le foie présente encore les capacités requises pour protéger contre les maladies cardio-vasculaire, par modulation de l'activité de certains gènes tels HMGCR.

Chez les rats soumis au régime HF, une augmentation de l'expression de ABCG5 a été observée. Ce transporteur est impliqué dans l'exportation du cholestérol du foie vers les canaux et la vésicule biliaire (L. Yu et al., 2002; Liqing Yu et al., 2002). Suite à sa contraction, le cholestérol et les acides biliaires seront expulsés vers l'intestin grêle où ils pourront être soit

absorbés ou excrétés dans les fèces. L'augmentation de l'expression d'ABCG5 indique que le foie essaie de limiter les excédents nutritionnels de cholestérol en les envoyant vers la vésicule biliaire. Les présents résultats sont supportés par l'observation de l'augmentation de l'expression d'ABCG5 chez des souris nourries avec une diète de type occidental pendant plus de 20 semaines (Basso et al., 2007; Liqing Yu et al., 2002). Ces observations sont toutefois contraires à celles obtenues chez des sujets atteints de NAFLD où l'augmentation de l'expression d'ABCG5 et ABCG8 était également associée à celle de HMGCR (Min et al., 2012). Toutefois, contrairement aux résultats observés chez l'humain, les niveaux d'expression de HMGCR hépatique ont été réduits en réponse à la diète obésogène chez les rats. Ceci indique qu'après 2 semaines de diète enrichie en lipides, les rats étaient encore en mesure de contrôler leurs niveaux hépatiques de cholestérol en réduisant sa biosynthèse et en exportant les surplus vers la vésicule biliaire et la circulation sanguine. De plus, cette période de 2 semaines de soumission à la diète enrichie en gras pourrait en être une de transition (Gauthier, Favier, & Lavoie, 2006) pendant laquelle les niveaux d'accumulation de lipides dans le foie ne seraient pas encore assez élevés pour induire une réponse similaire à celle observée chez les patients NAFLD. Finalement, il ne faut pas négliger le fait que le métabolisme des lipoprotéines est différent chez l'homme et les rongeurs. Ceci pourrait également avoir une influence sur les présents résultats.

Ces changements au niveau de PCSK9, HMGCR et LRP-1 témoignent d'une perturbation du métabolisme du cholestérol hépatique responsable de la captation/internalisation des particules de LDL et ces observations sont en lien direct avec l'accumulation lipidique dans le foie. Pour résumer, les expériences effectuées sur les rats soumis à deux semaines de diète HF témoignent

de la rapidité avec laquelle ces diètes peuvent induire des changements dans le métabolisme lipidique et le métabolisme du cholestérol dans le foie. En effet, après seulement deux semaines de diète HF, le foie des rats avait une capacité de stockage lipidique beaucoup plus importante comparativement à celle des animaux soumis à la diète conventionnelle.

Les besoins énergétiques durant les périodes de disette pourraient être puisés au niveau des lipides stockés dans les organes. Cependant, chroniquement, cette accumulation lipidique dans le foie aurait tendance à s'accompagner d'inflammations. A ce niveau, l'incidence de développer des désordres métaboliques ainsi que des maladies cardio-vasculaire serait plus élevés.

Cette accumulation excessive de lipides a été accompagnée d'une augmentation significative des taux de cholestérol dans le plasma. Par ailleurs, certaines voies du métabolisme du cholestérol ont été affectées dans le foie des animaux traités avec la diète HF. L'expression de gènes impliqués dans l'internalisation et la captation du LDL ainsi que dans la production d'acides biliaires a été augmentée chez les rats ayant subi une accumulation excessive de lipides dans leurs tissus hépatiques. Une diminution de la synthèse *de novo* de cholestérol a également été observée chez les animaux soumis à la diète HF. Ceci suggère que des quantités suffisantes de cholestérol étaient présentes dans la diète obésogène pour induire une réduction de la production endogène et du captage hépatique du LDL tout en augmentant l'excrétion biliaire du cholestérol chez ces animaux.

Pour conclure, les données présentées dans ce mémoire soutiennent l'existence d'un lien entre l'accumulation excessive de lipides et l'altération du métabolisme du cholestérol dans le foie qui se développerait avant même que les animaux aient significativement augmenté leur masse

corporelle ou soient devenus obèses. D'un point de vue clinique, la stéatose hépatique non alcoolique pourraient continuer à progresser silencieusement, sans pour autant qu'il n'y est de signes alarmants tels l'obésité. Ceci peut mener au développement de maladies cardiovasculaires et de diabète de types II, qui sont tous deux des maladies à caractère irréversibles.

Néanmoins, dans un premier temps, il serait important de noter que le modèle étudié est de type pédiatrique. En second lieu, la durée de l'étude, sous l'effet d'une diète à haute teneur lipidique (60%) témoigne d'un état transitoire pour lequel, les animaux ont développé un foie gras avant même de développer une quelconque prise de poids comparativement à leurs congénères. Or, il est vrai que le régime alimentaire testé au cours de cette étude n'est pas représentative des diètes westerns qui elles sont à haute teneur lipidique (moins que 60%), de glucose et de fructose.

CHAPITRE IV
BIBLIOGRAPHIE

- Abifadel, M., Varret, M., Rabes, J. P., Allard, D., Ouguerram, K., Devillers, M., . . . Boileau, C. (2003). Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet*, *34*(2), 154-156. doi:10.1038/ng1161
- Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K. T., Xu, S., Hobbs, H. H., & Krieger, M. (1996). Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science*, *271*(5248), 518-520.
- AKANUMA, J. G. A. Y. (1968). In vitro incorporation of cholesterol-¹⁴C into very low density lipoprotein cholesteryl esters
- al, I. e. (1996). <Disruption of cholesterol 7alpha-hydroxylase gene in mice.pdf>.
- Albert L. Jones, Gary T. Hradek, Conrad Hornick, Guy Renaud, Eberhard E. T. Windier, & Havel, a. R. (1984). <Uptake and processing of remnants of chylomicrons and very low density lipoproteins by rat liver.pdf>.
- Ameer, F., Scandiuzzi, L., Hasnain, S., Kalbacher, H., & Zaidi, N. (2014). De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism*, *63*(7), 895-902. doi:10.1016/j.metabol.2014.04.003
- Andrich, D. E., Melbouci, L., Ou, Y., Leduc-Gaudet, J.-P., Chabot, F., Lalonde, F., . . . St-Pierre, D. H. (2018). Altered Feeding Behaviors and Adiposity Precede Observable Weight Gain in Young Rats Submitted to a Short-Term High-Fat Diet. *Journal of Nutrition and Metabolism*, *2018*, 1-10. doi:10.1155/2018/1498150
- Arai, Nan Wang, Mikhail Bezouevski, Carrie Welch, & Tall, a. A. R. (1998). <Decreased Atherosclerosis in Heterozygous Low Density Lipoprotein Receptor-deficient Mice Expressing the Scavenger Receptor BI Transgene.pdf>.
- Atkin, EILEEN D. PALMER, P. D. ENGLISH, B. MORGAN, M.A.CAWTHORNE, & andJ.GREEN. (1972). <The Role of Cytochrome P450 in Cholesterol Biogenesis and Catabolism.pdf>.

- Axelsson, M., & Sjoval, J. (1990). Potential bile acid precursors in plasma--possible indicators of biosynthetic pathways to cholic and chenodeoxycholic acids in man. *J Steroid Biochem*, 36(6), 631-640.
- Basso, F., Freeman, L. A., Ko, C., Joyce, C., Amar, M. J., Shamburek, R. D., . . . Brewer, H. B., Jr. (2007). Hepatic ABCG5/G8 overexpression reduces apoB-lipoproteins and atherosclerosis when cholesterol absorption is inhibited. *J Lipid Res*, 48(1), 114-126. doi:10.1194/jlr.M600353-JLR200
- Begriche, K., Igoudjil, A., Pessayre, D., & Fromenty, B. (2006). Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion*, 6(1), 1-28. doi:10.1016/j.mito.2005.10.004
- BEISIEGEL, W. WEBER, & BENGTTSSON-OLIVECRONA, A. G. (1991). <Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein.pdf>.
- Beisiegel, U., Weber, W., Ihrke, G., Herz, J., & Stanley, K. K. (1989). The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. *Nature*, 341(6238), 162-164. doi:10.1038/341162a0
- Bianchi, A., Evans, J. L., Iverson, A. J., Nordlund, A. C., Watts, T. D., & Witters, L. A. (1990). Identification of an isozymic form of acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem*, 265(3), 1502-1509.
- Bloemen, J. G., Venema, K., van de Poll, M. C., Olde Damink, S. W., Buurman, W. A., & Dejong, C. H. (2009). Short chain fatty acids exchange across the gut and liver in humans measured at surgery. *Clin Nutr*, 28(6), 657-661. doi:10.1016/j.clnu.2009.05.011
- Bravo, E., Ortu, G., Cantafora, A., Lambert, M. S., Avella, M., Mayes, P. A., & Botham, K. M. (1995). Comparison of the hepatic uptake and processing of cholesterol from chylomicrons of different fatty acid composition in the rat in vivo. *Biochim Biophys Acta*, 1258(3), 328-336.
- Brea, A., Mosquera, D., Martin, E., Arizti, A., Cordero, J. L., & Ros, E. (2005). Nonalcoholic fatty liver disease is associated with carotid atherosclerosis: a case-control study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25(5), 1045-1050. doi:10.1161/01.ATV.0000160613.57985.18
- Burri, L., Thoresen, G. H., & Berge, R. K. (2010). The Role of PPARalpha Activation in Liver and Muscle. *PPAR Res*, 2010. doi:10.1155/2010/542359

- Byrne, C. D., & Targher, G. (2015). NAFLD: a multisystem disease. *J Hepatol*, *62*(1 Suppl), S47-64. doi:10.1016/j.jhep.2014.12.012
- Canbay, A., Bechmann, L., & Gerken, G. (2007). Lipid metabolism in the liver. *Z Gastroenterol*, *45*(1), 35-41. doi:10.1055/s-2006-927368
- Canfora, E. E., Jocken, J. W., & Blaak, E. E. (2015). Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nat Rev Endocrinol*, *11*(10), 577-591. doi:10.1038/nrendo.2015.128
- Carr, R. M., & Ahima, R. S. (2016). Pathophysiology of lipid droplet proteins in liver diseases. *Exp Cell Res*, *340*(2), 187-192. doi:10.1016/j.yexcr.2015.10.021
- Carr, R. M., Peralta, G., Yin, X., & Ahima, R. S. (2014). Absence of perilipin 2 prevents hepatic steatosis, glucose intolerance and ceramide accumulation in alcohol-fed mice. *PLoS One*, *9*(5), e97118. doi:10.1371/journal.pone.0097118
- Chang, B. H., Li, L., Paul, A., Taniguchi, S., Nannegari, V., Heird, W. C., & Chan, L. (2006). Protection against fatty liver but normal adipogenesis in mice lacking adipose differentiation-related protein. *Mol Cell Biol*, *26*(3), 1063-1076. doi:10.1128/MCB.26.3.1063-1076.2006
- Chen, C., Hu, B., Wu, T., Zhang, Y., Xu, Y., Feng, Y., & Jiang, H. (2016). Bile acid profiles in diabetic (db/db) mice and their wild type littermates. *J Pharm Biomed Anal*, *131*, 473-481. doi:10.1016/j.jpba.2016.09.023
- Cheng, S. H., & Stanley, M. M. (1959). Secretion of cholesterol by intestinal mucosa in patients with complete common bile duct obstruction. *Proc Soc Exp Biol Med*, *101*(2), 223-225.
- Chiang, J. Y. (1998). Regulation of bile acid synthesis. *Front Biosci*, *3*, d176-193.
- Choi, C. S., Savage, D. B., Kulkarni, A., Yu, X. X., Liu, Z. X., Morino, K., . . . Shulman, G. I. (2007). Suppression of diacylglycerol acyltransferase-2 (DGAT2), but not DGAT1, with antisense oligonucleotides reverses diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *J Biol Chem*, *282*(31), 22678-22688. doi:10.1074/jbc.M704213200
- Choi, S. H., & Ginsberg, H. N. (2011). Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab*, *22*(9), 353-363. doi:10.1016/j.tem.2011.04.007

- Cohen, D. E., & Fisher, E. A. (2013). Lipoprotein metabolism, dyslipidemia, and nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis*, 33(4), 380-388. doi:10.1055/s-0033-1358519
- Collaborators, G. B. D. O., Afshin, A., Forouzanfar, M. H., Reitsma, M. B., Sur, P., Estep, K., . . . Murray, C. J. L. (2017). Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. *N Engl J Med*, 377(1), 13-27. doi:10.1056/NEJMoa1614362
- Davies, J. P., Scott, C., Oishi, K., Liapis, A., & Ioannou, Y. A. (2005). Inactivation of NPC1L1 causes multiple lipid transport defects and protects against diet-induced hypercholesterolemia. *J Biol Chem*, 280(13), 12710-12720. doi:10.1074/jbc.M409110200
- DeLamatre, T. G. Sarphie, Ronald C. Archibold, & Hornick, a. C. A. (1990). <Metabolism of apoE-free high density lipoproteins in rat hepatoma cells-evidence for a retroendocytic pathway.pdf>.
- Delarue, J., & Magnan, C. (2007). Free fatty acids and insulin resistance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 10(2), 142-148. doi:10.1097/MCO.0b013e328042ba90
- Deo, A. K., & Bandiera, S. M. (2008). Identification of human hepatic cytochrome p450 enzymes involved in the biotransformation of cholic and chenodeoxycholic acid. *Drug Metab Dispos*, 36(10), 1983-1991. doi:10.1124/dmd.108.022194
- Despres, J. P., & Lemieux, I. (2006). Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*, 444(7121), 881-887. doi:10.1038/nature05488
- Devries-Seimon, T., Li, Y., Yao, P. M., Stone, E., Wang, Y., Davis, R. J., . . . Tabas, I. (2005). Cholesterol-induced macrophage apoptosis requires ER stress pathways and engagement of the type A scavenger receptor. *J Cell Biol*, 171(1), 61-73. doi:10.1083/jcb.200502078
- Diraison, F., Moulin, P., & Beylot, M. (2003). Contribution of hepatic de novo lipogenesis and reesterification of plasma non esterified fatty acids to plasma triglyceride synthesis during non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Metab*, 29(5), 478-485.
- DiStefano, M. T., Danai, L. V., Roth Flach, R. J., Chawla, A., Pedersen, D. J., Guilherme, A., & Czech, M. P. (2015). The Lipid Droplet Protein Hypoxia-inducible Gene 2 Promotes Hepatic Triglyceride Deposition by Inhibiting Lipolysis. *J Biol Chem*, 290(24), 15175-15184. doi:10.1074/jbc.M115.650184

- Doerge, H., Baillie, R. A., Ortegon, A. M., Tsang, B., Wu, Q., Punreddy, S., . . . Stahl, A. (2006). Targeted deletion of FATP5 reveals multiple functions in liver metabolism: alterations in hepatic lipid homeostasis. *Gastroenterology*, *130*(4), 1245-1258. doi:10.1053/j.gastro.2006.02.006
- Donnelly, K. L., Smith, C. I., Schwarzenberg, S. J., Jessurun, J., Boldt, M. D., & Parks, E. J. (2005). Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*, *115*(5), 1343-1351. doi:10.1172/jci23621
- Dubuc, G., Chamberland, A., Wassef, H., Davignon, J., Seidah, N. G., Bernier, L., & Prat, A. (2004). Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *24*(8), 1454-1459. doi:10.1161/01.ATV.0000134621.14315.43
- Endo, A., Kuroda, M., & Tsujita, Y. (1976). ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinium*. *J Antibiot (Tokyo)*, *29*(12), 1346-1348.
- Falcon, A., Doerge, H., Fluitt, A., Tsang, B., Watson, N., Kay, M. A., & Stahl, A. (2010). FATP2 is a hepatic fatty acid transporter and peroxisomal very long-chain acyl-CoA synthetase. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *299*(3), E384-393. doi:10.1152/ajpendo.00226.2010
- Ferre, P., & Foufelle, F. (2010). Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes Obes Metab*, *12 Suppl 2*, 83-92. doi:10.1111/j.1463-1326.2010.01275.x
- Fujimoto, T., & Parton, R. G. (2011). Not just fat: the structure and function of the lipid droplet. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *3*(3). doi:10.1101/cshperspect.a004838
- Gao, M., Bu, L., Ma, Y., & Liu, D. (2013). Concurrent activation of liver X receptor and peroxisome proliferator-activated receptor alpha exacerbates hepatic steatosis in high fat diet-induced obese mice. *PLoS One*, *8*(6), e65641. doi:10.1371/journal.pone.0065641
- Gao, X., Nan, Y., Zhao, Y., Yuan, Y., Ren, B., Sun, C., . . . Ye, J. (2017). Atorvastatin reduces lipid accumulation in the liver by activating protein kinase A-mediated phosphorylation of perilipin 5. *Biochim Biophys Acta*, *1862*(12), 1512-1519. doi:10.1016/j.bbaliip.2017.09.007

- Gauthier, M. S., Favier, R., & Lavoie, J. M. (2006). Time course of the development of non-alcoholic hepatic steatosis in response to high-fat diet-induced obesity in rats. *Br J Nutr*, *95*(2), 273-281.
- Gesta, S., Tseng, Y. H., & Kahn, C. R. (2007). Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell*, *131*(2), 242-256. doi:10.1016/j.cell.2007.10.004
- Ginsberg, H. N. (2006). Is the slippery slope from steatosis to steatohepatitis paved with triglyceride or cholesterol? *Cell Metab*, *4*(3), 179-181. doi:10.1016/j.cmet.2006.08.010
- Hammond, L. E., Albright, C. D., He, L., Rusyn, I., Watkins, S. M., Doughman, S. D., . . . Coleman, R. A. (2007). Increased oxidative stress is associated with balanced increases in hepatocyte apoptosis and proliferation in glycerol-3-phosphate acyltransferase-1 deficient mice. *Exp Mol Pathol*, *82*(2), 210-219. doi:10.1016/j.yexmp.2006.12.004
- Hanley, Ken Williams, Andreas Festa, E., L., Wagenknecht, Ralph B. D'Agostino, J., & Haffner, a. S. M. (2005). <Liver Markers and Development of the Metabolic Syndrome.pdf>.
- Head, B. P., & Insel, P. A. (2007). Do caveolins regulate cells by actions outside of caveolae? *Trends Cell Biol*, *17*(2), 51-57. doi:10.1016/j.tcb.2006.11.008
- Hofmann, A. F. (1999). The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease. *Archives of Internal Medicine*, *159*(22), 2647-2658. doi:10.1001/archinte.159.22.2647
- Honda, A., Salen, G., Nguyen, L. B., Tint, G. S., Batta, A. K., & Shefer, S. (1998). Down-regulation of cholesterol biosynthesis in sitosterolemia: diminished activities of acetoacetyl-CoA thiolase, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase, reductase, squalene synthase, and 7-dehydrocholesterol delta7-reductase in liver and mononuclear leukocytes. *J Lipid Res*, *39*(1), 44-50.
- Horton, J. D., Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*, *109*(9), 1125-1131. doi:10.1172/jci15593
- Horton, J. D., Shimomura, I., Brown, M. S., Hammer, R. E., Goldstein, J. L., & Shimano, H. (1998). Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2. *J Clin Invest*, *101*(11), 2331-2339. doi:10.1172/jci2961

- Ikura, Y., & Caldwell, S. H. (2015). Lipid droplet-associated proteins in alcoholic liver disease: a potential linkage with hepatocellular damage. *Int J Clin Exp Pathol*, 8(8), 8699-8708.
- Ioannou, G. N. (2016). The Role of Cholesterol in the Pathogenesis of NASH. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 27(2), 84-95. doi:10.1016/j.tem.2015.11.008
- Jacquet, S., Malaval, C., Martinez, L. O., Sak, K., Rolland, C., Perez, C., . . . Barbaras, R. (2005). The nucleotide receptor P2Y13 is a key regulator of hepatic high-density lipoprotein (HDL) endocytosis. *Cell Mol Life Sci*, 62(21), 2508-2515. doi:10.1007/s00018-005-5194-0
- Javitt & al. (1989). <Bile Acid Synthesis in Cell Cultur.pdf>.
- John McNeish, Robert J. Aiello, & Deborah Guyot*, T. T., Christopher Gabel*, Charles Aldinger*, Kenneth L. Hoppe*, Marsha L. Roach*, Lori J. Royer*, Jeffery de Wet*, Cyril Broccardo†, Giovanna Chimini†, and Omar L. Francone. (2000). <High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1.pdf>.
- Josekutty, J., Iqbal, J., Iwawaki, T., Kohno, K., & Hussain, M. M. (2013). Microsomal triglyceride transfer protein inhibition induces endoplasmic reticulum stress and increases gene transcription via Ire1alpha/cJun to enhance plasma ALT/AST. *J Biol Chem*, 288(20), 14372-14383. doi:10.1074/jbc.M113.459602
- Karen F. Kozarsky, M. H. D., Jane M. Glick, Monty Krieger, Daniel J. Rader. (1999). <Gene transfer and hepatic overexpression of the HDL receptor SR-BI reduces atherosclerosis in the cholesterol-fed LDL receptor-deficient mouse.pdf>.
- Kato, M., Ogawa, H., Kishida, T., & Ebihara, K. (2009). The mechanism of the cholesterol-lowering effect of water-insoluble fish protein in ovariectomised rats. *Br J Nutr*, 102(6), 816-824. doi:10.1017/S0007114509316153
- Kawano, Y., & Cohen, D. E. (2013). Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol*, 48(4), 434-441. doi:10.1007/s00535-013-0758-5
- Kennedy, M. A., Barrera, G. C., Nakamura, K., Baldan, A., Tarr, P., Fishbein, M. C., . . . Edwards, P. A. (2005). ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol

efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab*, 1(2), 121-131. doi:10.1016/j.cmet.2005.01.002

Kenneth C-W. Yu, Yuan Jiang, Wei Chen, & Cooper, a. A. D. (1999). <Evaluation of the components of the chylomicron remnant removal mechanism by use of the isolated perfused mouse liver.pdf>.

Kim, C. A., Delepine, M., Boutet, E., El Mourabit, H., Le Lay, S., Meier, M., . . . Magre, J. (2008). Association of a homozygous nonsense caveolin-1 mutation with Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab*, 93(4), 1129-1134. doi:10.1210/jc.2007-1328

Kim, J., Kim, J., & Kwon, Y. H. (2016). Effects of disturbed liver growth and oxidative stress of high-fat diet-fed dams on cholesterol metabolism in offspring mice. *Nutr Res Pract*, 10(4), 386-392. doi:10.4162/nrp.2016.10.4.386

Kleemann, R., van Erk, M., Verschuren, L., van den Hoek, A. M., Koek, M., Wielinga, P. Y., . . . Kooistra, T. (2010). Time-resolved and tissue-specific systems analysis of the pathogenesis of insulin resistance. *PLoS One*, 5(1), e8817. doi:10.1371/journal.pone.0008817

Koh, A., De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., & Backhed, F. (2016). From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell*, 165(6), 1332-1345. doi:10.1016/j.cell.2016.05.041

Koo, S. H. (2013). Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis. *Clin Mol Hepatol*, 19(3), 210-215. doi:10.3350/cmh.2013.19.3.210

Koppe, S. W., Elias, M., Moseley, R. H., & Green, R. M. (2009). Trans fat feeding results in higher serum alanine aminotransferase and increased insulin resistance compared with a standard murine high-fat diet. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 297(2), G378-384. doi:10.1152/ajpgi.90543.2008

Kwong, E., Li, Y., Hylemon, P., & Zhou, H. (2015). *Bile acids and sphingosine-1-phosphate receptor 2 in hepatic lipid metabolism* (Vol. 69).

Lambert, J. E., Ramos-Roman, M. A., Browning, J. D., & Parks, E. J. (2014). Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 146(3), 726-735. doi:10.1053/j.gastro.2013.11.049

- Langdon, & Bloch, A. (1952). <THE UTILIZATION OF SQUALENE IN THE BIOSYNTHESIS OF CHOLESTEROL* .pdf>.
- Lavoie, J. M. (2016). Dynamics of hepatic and intestinal cholesterol and bile acid pathways: The impact of the animal model of estrogen deficiency and exercise training. *World J Hepatol*, 8(23), 961-975. doi:10.4254/wjh.v8.i23.961
- Le May, C., Berger, J. M., Lespine, A., Pillot, B., Prieur, X., Letessier, E., . . . Costet, P. (2013). Transintestinal cholesterol excretion is an active metabolic process modulated by PCSK9 and statin involving ABCB1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 33(7), 1484-1493. doi:10.1161/atvbaha.112.300263
- Lewin, T. M., Wang, S., Nagle, C. A., Van Horn, C. G., & Coleman, R. A. (2005). Mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase-1 directs the metabolic fate of exogenous fatty acids in hepatocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 288(5), E835-844. doi:10.1152/ajpendo.00300.2004
- Li, L. O., Klett, E. L., & Coleman, R. A. (2010). Acyl-CoA synthesis, lipid metabolism and lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta*, 1801(3), 246-251. doi:10.1016/j.bbailip.2009.09.024
- Li, M., Ye, T., Wang, X. X., Li, X., Qiang, O., Yu, T., . . . Liu, R. (2016). Effect of Octreotide on Hepatic Steatosis in Diet-Induced Obesity in Rats. *PLoS One*, 11(3), e0152085. doi:10.1371/journal.pone.0152085
- Liang, W., Menke, A. L., Driessen, A., Koek, G. H., Lindeman, J. H., Stoop, R., . . . van den Hoek, A. M. (2014). Establishment of a general NAFLD scoring system for rodent models and comparison to human liver pathology. *PLoS One*, 9(12), e115922. doi:10.1371/journal.pone.0115922
- Linden, D., William-Olsson, L., Rhedin, M., Asztely, A. K., Clapham, J. C., & Schreyer, S. (2004). Overexpression of mitochondrial GPAT in rat hepatocytes leads to decreased fatty acid oxidation and increased glycerolipid biosynthesis. *J Lipid Res*, 45(7), 1279-1288. doi:10.1194/jlr.M400010-JLR200
- Maldonado-Valderrama, J., Wilde, P., Macierzanka, A., & Mackie, A. (2011). The role of bile salts in digestion. *Adv Colloid Interface Sci*, 165(1), 36-46. doi:10.1016/j.cis.2010.12.002
- Mashek, D. G., Khan, S. A., Sathyanarayan, A., Ploeger, J. M., & Franklin, M. P. (2015). Hepatic lipid droplet biology: Getting to the root of fatty liver. *Hepatology*, 62(3), 964-967. doi:10.1002/hep.27839

- Mastrodonato, M., Calamita, G., Rossi, R., Mentino, D., Bonfrate, L., Portincasa, P., . . . Liquori, G. E. (2011). Altered distribution of caveolin-1 in early liver steatosis. *Eur J Clin Invest*, *41*(6), 642-651. doi:10.1111/j.1365-2362.2010.02459.x
- McQuaid, S. E., Hodson, L., Neville, M. J., Dennis, A. L., Cheeseman, J., Humphreys, S. M., . . . Karpe, F. (2011). Downregulation of adipose tissue fatty acid trafficking in obesity: a driver for ectopic fat deposition? *Diabetes*, *60*(1), 47-55. doi:10.2337/db10-0867
- Meli, R., Mattace Raso, G., Irace, C., Simeoli, R., Di Pascale, A., Paciello, O., . . . Santamaria, R. (2013). High Fat Diet Induces Liver Steatosis and Early Dysregulation of Iron Metabolism in Rats. *PLoS One*, *8*(6), e66570. doi:10.1371/journal.pone.0066570
- Milic, S., Lulic, D., & Stimac, D. (2014). Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: biochemical, metabolic and clinical presentations. *World J Gastroenterol*, *20*(28), 9330-9337. doi:10.3748/wjg.v20.i28.9330
- Min, H. K., Kapoor, A., Fuchs, M., Mirshahi, F., Zhou, H., Maher, J., . . . Sanyal, A. J. (2012). Increased hepatic synthesis and dysregulation of cholesterol metabolism is associated with the severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Cell Metab*, *15*(5), 665-674. doi:10.1016/j.cmet.2012.04.004
- Mitsutake, S., Zama, K., Yokota, H., Yoshida, T., Tanaka, M., Mitsui, M., . . . Igarashi, Y. (2011). Dynamic modification of sphingomyelin in lipid microdomains controls development of obesity, fatty liver, and type 2 diabetes. *J Biol Chem*, *286*(32), 28544-28555. doi:10.1074/jbc.M111.255646
- Mortimer, Dianne J. Beveridge, Ian J. Martins, & Redgrave, a. T. G. (1995). <Intracellular Localization and Metabolism of Chylomicron Remnants in the Livers of Low Density Lipoprotein Receptor-deficient Mice and ApoE-deficient Mice.pdf>.
- Nagayoshi, Satoko Tamio, Kazuko Suga, Teramoto•ō, Bunkyo-ku, Kaga, I.-k., & Hiroshi. (1994). Role of Acyl Coenzyme A Cholesterol Acyltransferase in Intrahepatic Processing of apo B-Lipoprotein in Suncus.pdf>.
- Nassir, F., Adewole, O. L., Brunt, E. M., & Abumrad, N. A. (2013). CD36 deletion reduces VLDL secretion, modulates liver prostaglandins, and exacerbates hepatic steatosis in ob/ob mice. *J Lipid Res*, *54*(11), 2988-2997. doi:10.1194/jlr.M037812

- Nassir, F., & Ibdah, J. A. (2014). Role of mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci*, *15*(5), 8713-8742. doi:10.3390/ijms15058713
- Nayor, M., & Vasan, R. S. (2016). Recent Update to the US Cholesterol Treatment Guidelines: A Comparison With International Guidelines. *Circulation*, *133*(18), 1795-1806. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.116.021407
- Ngo Sock, E. T., Chapados, N. A., & Lavoie, J. M. (2014). LDL receptor and Pcsk9 transcripts are decreased in liver of ovariectomized rats: effects of exercise training. *Horm Metab Res*, *46*(8), 550-555. doi:10.1055/s-0034-1370910
- Norlin, M. (2002). Expression of key enzymes in bile acid biosynthesis during development: CYP7B1-mediated activities show tissue-specific differences. *J Lipid Res*, *43*(5), 721-731.
- Okumura, T. (2011). Role of lipid droplet proteins in liver steatosis. *J Physiol Biochem*, *67*(4), 629-636. doi:10.1007/s13105-011-0110-6
- Olofsson, S. O., & Boren, J. (2005). Apolipoprotein B: a clinically important apolipoprotein which assembles atherogenic lipoproteins and promotes the development of atherosclerosis. *J Intern Med*, *258*(5), 395-410. doi:10.1111/j.1365-2796.2005.01556.x
- Pardina, E., Baena-Fustegueras, J. A., Catalan, R., Galard, R., Lecube, A., Fort, J. M., . . . Peinado-Onsurbe, J. (2009). Increased expression and activity of hepatic lipase in the liver of morbidly obese adult patients in relation to lipid content. *Obes Surg*, *19*(7), 894-904. doi:10.1007/s11695-008-9739-9
- Parton, R. G., & del Pozo, M. A. (2013). Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *14*(2), 98-112. doi:10.1038/nrm3512
- Patni, N., & Garg, A. (2015). Congenital generalized lipodystrophies--new insights into metabolic dysfunction. *Nat Rev Endocrinol*, *11*(9), 522-534. doi:10.1038/nrendo.2015.123
- Patsch, J. (1998). Influence of lipolysis on chylomicron clearance and HDL cholesterol levels. *Eur Heart J*, *19 Suppl H*, H2-6.
- Pawella, L. M., Hashani, M., Eiteneuer, E., Renner, M., Bartenschlager, R., Schirmacher, P., & Straub, B. K. (2014). Perilipin discerner chronic from acute hepatocellular steatosis. *J Hepatol*, *60*(3), 633-642. doi:10.1016/j.jhep.2013.11.007

- Pettinelli, P., & Videla, L. A. (2011). Up-regulation of PPAR-gamma mRNA expression in the liver of obese patients: an additional reinforcing lipogenic mechanism to SREBP-1c induction. *J Clin Endocrinol Metab*, *96*(5), 1424-1430. doi:10.1210/jc.2010-2129
- Phan, C. T., & Tso, P. (2001). Intestinal lipid absorption and transport. *Front Biosci*, *6*, D299-319.
- Ploegh, H. L. (2007). A lipid-based model for the creation of an escape hatch from the endoplasmic reticulum. *Nature*, *448*(7152), 435-438. doi:10.1038/nature06004
- Pohl, J., Ring, A., & Stremmel, W. (2002). Uptake of long-chain fatty acids in HepG2 cells involves caveolae: analysis of a novel pathway. *J Lipid Res*, *43*(9), 1390-1399.
- Poirier, S., & Mayer, G. (2013). The biology of PCSK9 from the endoplasmic reticulum to lysosomes: new and emerging therapeutics to control low-density lipoprotein cholesterol. *Drug Des Devel Ther*, *7*, 1135-1148. doi:10.2147/DDDT.S36984
- Ponugoti, B., Kim, D. H., Xiao, Z., Smith, Z., Miao, J., Zang, M., . . . Kemper, J. K. (2010). SIRT1 deacetylates and inhibits SREBP-1C activity in regulation of hepatic lipid metabolism. *J Biol Chem*, *285*(44), 33959-33970. doi:10.1074/jbc.M110.122978
- Puri, P., Baillie, R. A., Wiest, M. M., Mirshahi, F., Choudhury, J., Cheung, O., . . . Sanyal, A. J. (2007). A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, *46*(4), 1081-1090. doi:10.1002/hep.21763
- Rached, F., Santos, R. D., Camont, L., Miname, M. H., Lhomme, M., Dauteuille, C., . . . Kontush, A. (2014). Defective functionality of HDL particles in familial apoA-I deficiency: relevance of alterations in HDL lipidome and proteome. *J Lipid Res*, *55*(12), 2509-2520. doi:10.1194/jlr.M051631
- Rakhshandehroo, M., Knoch, B., Muller, M., & Kersten, S. (2010). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *PPAR Res*, *2010*. doi:10.1155/2010/612089
- Randolph, G. J., & Miller, N. E. (2014). Lymphatic transport of high-density lipoproteins and chylomicrons. *J Clin Invest*, *124*(3), 929-935. doi:10.1172/JCI71610

- Razani, B., Engelman, J. A., Wang, X. B., Schubert, W., Zhang, X. L., Marks, C. B., . . . Lisanti, M. P. (2001). Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J Biol Chem*, 276(41), 38121-38138. doi:10.1074/jbc.M105408200
- Ridlon, J. M., Kang, D. J., & Hylemon, P. B. (2006). Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res*, 47(2), 241-259. doi:10.1194/jlr.R500013-JLR200
- Rui, L. (2014). Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol*, 4(1), 177-197. doi:10.1002/cphy.c130024
- Russell, C. a. ((Cali and Russell, 1991). <J. Biol. Chem.-1991-Cali-7774-8 (1).pdf>. Sala-Vila, A., Navarro-Lerida, I., Sanchez-Alvarez, M., Bosch, M., Calvo, C., Lopez, J. A., . . . Del Pozo, M. A. (2016). Interplay between hepatic mitochondria-associated membranes, lipid metabolism and caveolin-1 in mice. *Sci Rep*, 6, 27351. doi:10.1038/srep27351
- Schindhelm, R. K., Heine, R. J., & Diamant, M. (2007). Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*, 30(9), e94; author reply e95. doi:10.2337/dc07-0982
- Schwarz, J. M., Neese, R. A., Turner, S., Dare, D., & Hellerstein, M. K. (1995). Short-term alterations in carbohydrate energy intake in humans. Striking effects on hepatic glucose production, de novo lipogenesis, lipolysis, and whole-body fuel selection. *J Clin Invest*, 96(6), 2735-2743. doi:10.1172/jci118342
- Schwarz, J. M., Noworolski, S. M., Wen, M. J., Dyachenko, A., Prior, J. L., Weinberg, M. E., . . . Mulligan, K. (2015). Effect of a High-Fructose Weight-Maintaining Diet on Lipogenesis and Liver Fat. *J Clin Endocrinol Metab*, 100(6), 2434-2442. doi:10.1210/jc.2014-3678
- Shapiro, & Rodwell, A. (1970). <Regulation of Hepatic 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Reductase and Cholesterol Synthesis* .pdf>.
- Shea, H. C., Head, D. D., Setchell, K. D., & Russell, D. W. (2007). Analysis of HSD3B7 knockout mice reveals that a 3 α -hydroxyl stereochemistry is required for bile acid function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(28), 11526-11533. doi:10.1073/pnas.0705089104

- Sheedfar, F., Sung, M. M., Aparicio-Vergara, M., Kloosterhuis, N. J., Miquilena-Colina, M. E., Vargas-Castrillon, J., . . . Koonen, D. P. (2014). Increased hepatic CD36 expression with age is associated with enhanced susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Aging (Albany NY)*, 6(4), 281-295. doi:10.18632/aging.100652
- Softic, S., Cohen, D. E., & Kahn, C. R. (2016). Role of Dietary Fructose and Hepatic De Novo Lipogenesis in Fatty Liver Disease. *Dig Dis Sci*, 61(5), 1282-1293. doi:10.1007/s10620-016-4054-0
- Souza-Mello, V. (2015). Peroxisome proliferator-activated receptors as targets to treat non-alcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol*, 7(8), 1012-1019. doi:10.4254/wjh.v7.i8.1012
- Sparrow, C. P., Baffic, J., Lam, M. H., Lund, E. G., Adams, A. D., Fu, X., . . . Menke, J. G. (2002). A potent synthetic LXR agonist is more effective than cholesterol loading at inducing ABCA1 mRNA and stimulating cholesterol efflux. *J Biol Chem*, 277(12), 10021-10027. doi:10.1074/jbc.M108225200
- Stanhope, K. L., Schwarz, J. M., Keim, N. L., Griffen, S. C., Bremer, A. A., Graham, J. L., . . . Havel, P. J. (2009). Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J Clin Invest*, 119(5), 1322-1334. doi:10.1172/JCI37385
- Stobart, A. K., Stymne, S., & Hoglund, S. (1986). Safflower microsomes catalyze oil accumulation in vitro: A model system. *Planta*, 169(1), 33-37. doi:10.1007/BF01369772
- Straub, B. K., Gyoengyoesi, B., Koenig, M., Hashani, M., Pawella, L. M., Herpel, E., . . . Schirmacher, P. (2013). Adipophilin/perilipin-2 as a lipid droplet-specific marker for metabolically active cells and diseases associated with metabolic dysregulation. *Histopathology*, 62(4), 617-631. doi:10.1111/his.12038
- Straub, B. K., Stoeffel, P., Heid, H., Zimbelmann, R., & Schirmacher, P. (2008). Differential pattern of lipid droplet-associated proteins and de novo perilipin expression in hepatocyte steatogenesis. *Hepatology*, 47(6), 1936-1946. doi:10.1002/hep.22268
- Takahashi, Y., & Fukusato, T. (2014). Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol*, 20(42), 15539-15548. doi:10.3748/wjg.v20.i42.15539

- Takeuchi, K., & Reue, K. (2009). Biochemistry, physiology, and genetics of GPAT, AGPAT, and lipin enzymes in triglyceride synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 296(6), E1195-1209. doi:10.1152/ajpendo.90958.2008
- Theytaz, F., de Giorgi, S., Hodson, L., Stefanoni, N., Rey, V., Schneiter, P., . . . Tappy, L. (2014). Metabolic fate of fructose ingested with and without glucose in a mixed meal. *Nutrients*, 6(7), 2632-2649. doi:10.3390/nu6072632
- Thiam, A. R., Farese, R. V., Jr., & Walther, T. C. (2013). The biophysics and cell biology of lipid droplets. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14(12), 775-786. doi:10.1038/nrm3699
- Tomita, K., Teratani, T., Suzuki, T., Shimizu, M., Sato, H., Narimatsu, K., . . . Hibi, T. (2014). Free cholesterol accumulation in hepatic stellate cells: mechanism of liver fibrosis aggravation in nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Hepatology*, 59(1), 154-169. doi:10.1002/hep.26604
- Ueda, Y., Gong, E., Royer, L., Cooper, P. N., Francone, O. L., & Rubin, E. M. (2000). Relationship between expression levels and atherogenesis in scavenger receptor class B, type I transgenics. *J Biol Chem*, 275(27), 20368-20373. doi:10.1074/jbc.M000730200
- Umpleby, A. M., Shojaee-Moradie, F., Fielding, B., Li, X., Marino, A., Alsini, N., . . . Griffin, B. A. (2017). Impact of liver fat on the differential partitioning of hepatic triacylglycerol into VLDL subclasses on high and low sugar diets. *Clin Sci (Lond)*, 131(21), 2561-2573. doi:10.1042/CS20171208
- van der Velde, A. E., Vrans, C. L., van den Oever, K., Kunne, C., Oude Elferink, R. P., Kuipers, F., & Groen, A. K. (2007). Direct intestinal cholesterol secretion contributes significantly to total fecal neutral sterol excretion in mice. *Gastroenterology*, 133(3), 967-975. doi:10.1053/j.gastro.2007.06.019
- van der Velde, A. E., Vrans, C. L., van den Oever, K., Seemann, I., Oude Elferink, R. P., van Eck, M., . . . Groen, A. K. (2008). Regulation of direct transintestinal cholesterol excretion in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 295(1), G203-G208. doi:10.1152/ajpgi.90231.2008
- Villanueva, C. J., Monetti, M., Shih, M., Zhou, P., Watkins, S. M., Bhanot, S., & Farese, R. V., Jr. (2009). Specific role for acyl CoA:Diacylglycerol acyltransferase 1 (Dgat1) in hepatic steatosis due to exogenous fatty acids. *Hepatology*, 50(2), 434-442. doi:10.1002/hep.22980

- Vrins, C. L., van der Velde, A. E., van den Oever, K., Levels, J. H., Huet, S., Oude Elferink, R. P., . . . Groen, A. K. (2009). Peroxisome proliferator-activated receptor delta activation leads to increased transintestinal cholesterol efflux. *J Lipid Res*, *50*(10), 2046-2054. doi:10.1194/jlr.M800579-JLR200
- Wang, C., Zhao, Y., Gao, X., Li, L., Yuan, Y., Liu, F., . . . Ye, J. (2015). Perilipin 5 improves hepatic lipotoxicity by inhibiting lipolysis. *Hepatology*, *61*(3), 870-882. doi:10.1002/hep.27409
- Wang, Y., Viscarra, J., Kim, S. J., & Sul, H. S. (2015). Transcriptional regulation of hepatic lipogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *16*(11), 678-689. doi:10.1038/nrm4074
- Wei, Y. (2008). Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction. *World Journal of Gastroenterology*, *14*(2). doi:10.3748/wjg.14.193
- Weitkunat, K., Schumann, S., Nickel, D., Kappo, K. A., Petzke, K. J., Kipp, A. P., . . . Klaus, S. (2016). Importance of propionate for the repression of hepatic lipogenesis and improvement of insulin sensitivity in high-fat diet-induced obesity. *Mol Nutr Food Res*, *60*(12), 2611-2621. doi:10.1002/mnfr.201600305
- Wendel, A. A., Lewin, T. M., & Coleman, R. A. (2009). Glycerol-3-phosphate acyltransferases: rate limiting enzymes of triacylglycerol biosynthesis. *Biochim Biophys Acta*, *1791*(6), 501-506. doi:10.1016/j.bbali.2008.10.010
- Xavier Rousset, Boris Vaisman, Marcelo Amar, Amar A. Sethi, & Remaley, a. A. T. (2009). Lecithin-Cholesterol Acyltransferase- From Biochemistry to Role in Cardiovascular Disease.
- Yu, L., Hammer, R. E., Li-Hawkins, J., Von Bergmann, K., Lutjohann, D., Cohen, J. C., & Hobbs, H. H. (2002). Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(25), 16237-16242. doi:10.1073/pnas.252582399
- Yu, L., Li-Hawkins, J., Hammer, R. E., Berge, K. E., Horton, J. D., Cohen, J. C., & Hobbs, H. H. (2002). Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *Journal of Clinical Investigation*, *110*(5), 671-680. doi:10.1172/jci0216001
- Yvan-Charvet, L., Wang, N., & Tall, A. R. (2010). Role of HDL, ABCA1, and ABCG1 transporters in cholesterol efflux and immune responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *30*(2), 139-143. doi:10.1161/ATVBAHA.108.179283

- Zhang, D. W., Lagace, T. A., Garuti, R., Zhao, Z., McDonald, M., Horton, J. D., . . . Hobbs, H. H. (2007). Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation. *J Biol Chem*, *282*(25), 18602-18612. doi:10.1074/jbc.M702027200
- Zhang, Y. L., Hernandez-Ono, A., Siri, P., Weisberg, S., Conlon, D., Graham, M. J., . . . Ginsberg, H. N. (2006). Aberrant hepatic expression of PPARgamma2 stimulates hepatic lipogenesis in a mouse model of obesity, insulin resistance, dyslipidemia, and hepatic steatosis. *J Biol Chem*, *281*(49), 37603-37615. doi:10.1074/jbc.M604709200