

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

RÔLE DE L'APOLIPOPROTÉINE D DANS LE MÉTABOLISME DES LIPIDES

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

MARILYNE LABRIE

FÉVRIER 2012

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.01-2006). 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.»

AVANT-PROPOS

1. Contribution de l'étudiante à l'expérimentation et à la rédaction

La rédaction de l'article ainsi que toutes les expériences ont été réalisées par l'étudiante.

2. Liste des auteurs de l'article scientifique

Labrie M, Desnoyers M A, Najib O, Mounier C et RassartE

3. Statut de la publication

L'article sera prochainement soumis dans EMBO molecular medicine

REMERCIEMENTS

J'aimerais d'abord remercier mon directeur de recherche Éric Rassart et ma codirectrice Catherine Mounier pour m'avoir donné la chance de faire ma maîtrise dans leur laboratoire. Vous m'avez tous les deux apportée beaucoup dans mon apprentissage de la biologie moléculaire et de la signalisation cellulaire, mais aussi dans mon développement personnel. Vous m'avez aidée à devenir plus critique et plus autonome, ce qui me sera utile tout au long de ma carrière.

J'aimerais également remercier tous les étudiants et stagiaires des deux laboratoires, plus particulièrement Marc-André Desnoyers, Ouafa Najib, Louis-Charles Levros, Daniel Mauvoisin et Cyndia Charfi qui m'ont aidée à développer mon projet. Un grand merci à Mirianne Lemire, François Desautels, Evemie Dubé et Cynthia Torresilla pour vos conseils, mais également pour votre amitié.

Merci à Julie Lafond, Louise Brissette et Benoit Barbeau pour le prêt du matériel et pour leurs nombreux conseils. Finalement, un grand merci à tous mes collègues des autres laboratoires et aux techniciens pour leur dévouement et leur esprit d'équipe.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	viii
RÉSUMÉ	xii
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I	
ÉTAT DES CONNAISSANCES.....	2
1.1 L'apolipoprotéine D	2
1.1.1 Structure et régulation du gène	2
1.1.2 Structure de la protéine	3
1.1.3 Profil d'expression	4
1.1.4 Ligands	5
1.1.5 Roles de l'apolipoprotéine D	6
1.1.5.1 Le cancer	6
1.1.5.2 Le système nerveux	7
1.1.5.2.1 Le système nerveux périphérique.....	7
1.1.5.2.2 Le système nerveux central	7
1.1.5.3 Le métabolisme des lipides	8
1.1.5.3.1 Polymorphismes de l'apoD	8
1.1.5.3.2 L'apod et le récepteur de la leptine	9
1.1.5.3.3 Métabolisme des lipoprotéines.....	10
1.1.5.4 Modèles transgéniques	11
1.1.5.4.1 Souris transgéniques.....	11
1.1.5.4.2 Adénovirus apoD.....	12
1.1.5.4.3 Souris KO	13
1.2 La stéatose hépatique	14
1.2.1 Le métabolisme des lipoprotéines	14

1.2.1.1 Les chylomicrons	15
1.2.1.2 Les VLDL, les iDL et les LDL	17
1.2.1.3 Les HDL	18
1.2.1.4 La captation des acides gras libres	19
1.2.1.5 Les lipoprotéines, les acides gras libres et la stéatose hépatique	21
1.2.2 Le métabolisme des gouttelettes lipidiques.....	23
1.2.2.1 Formation des gouttelettes lipidiques.....	23
1.2.2.2 Lipolyse	25
1.2.2.3 Cide a, cide b et cide c.....	26
1.2.2.4 Régulation du métabolisme des gouttelettes lipidiques	30
1.2.2.5 PPAR γ	30
1.2.2.6 Les gouttelettes lipidiques et la stéatose hépatique.....	33
1.2.3 Synthèse <i>de novo</i> des acides gras.....	35
1.2.3.1 Les enzymes lipogéniques.....	36
1.2.3.2 La régulation de la lipogénèse.....	37
1.2.3.3 La lipogénèse et la stéatose hépatique.....	38
1.2.4 Le métabolisme du glucose.....	40
1.2.4.1 Le métabolisme du glucose et la stéatose hépatique	41
1.2.5 Oxydation des acides gras.....	42
1.2.5.1 La β -oxydation	42
1.2.5.2 Régulation de l'oxydation des acide gras.....	44
1.2.5.3 La β -oxydation et la stéatose hépatique	45
1.2.6 Rôle de l'AMPK dans la stéatose hépatique	46
1.3 Objectif.....	48
CHAPITRE II	
ARTICLE SCIENTIFIQUE.....	50
2.1 Abstract	52

2.2 Introduction.....	53
2.3 Results.....	55
2.4 Discussion.....	58
2.5 Materials and methods.....	63
2.5.1 Materials.....	63
2.5.2 Animals.....	64
2.5.3 Cell culture.....	64
2.5.4 RNA extraction and semiquantitative rt-pcr.....	64
2.5.5 Immunoblotting.....	65
2.5.6 Lipid staining.....	65
2.5.7 Statistical analysis.....	66
2.6 Acknowledgments.....	66
2.7 References.....	66
2.8 Figure legends.....	71
CHAPITRE III	
DISCUSSION ET CONCLUSION.....	84
DISCUSSION.....	84
CONCLUSION.....	93
CHAPITRE IV	
BIBLIOGRAPHIE.....	94
APPENDICE A	
FIGURE COMPLÉMENTAIRE.....	110

LISTE DES FIGURES

Figure.....	Page
1.1 Structure de l'apod complexée à la progestérone	4
1.2 Métabolisme des lipoprotéines.....	15
1.3 Assimilation et gestion des AG par les hépatocytes	16
1.4 Enzymes impliqués dans la formation des acides biliaires	19
1.5 Principales molécules impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines qui peuvent causer une stéatose hépatique.....	21
1.6 Protéines liées aux GL et impliquées dans la lipolyse	25
1.7 Fonctions des protéines cide a, b et c dans le métabolisme des lipides	29
1.8 Rôle de PPAR γ dans l'adipogenèse	32
1.9 Enzymes impliqués dans la lipogenèse	35
1.10 Métabolisme du glucose hépatique	40
1.11 Entrée des acides gras dans la mitochondrie.....	43
1.12 Schématisation de la β -oxydation	44
1.13 Voies métaboliques régulées par l'AMPK.....	46
2.1 PPAR γ expression in H-apoD Tg mice liver	74
2.2 Analysis of genes involved in FFA uptake and hydrolysis in the liver of H-apoD Tg mice.....	75
2.3 Lipid droplets metabolism in H-apoD Tg mice liver	76
2.4 Analysis of lipases gene expression associated with LD in liver of H-apoD Tg mice	77
2.5 Analysis of proteins involved in lipogenesis in the liver H-apoD Tg mice...	78

2.6 Analysis of genes involved in gluconeogenesis in the liver of H-apoD Tg mice.....	79
2.7 Analysis of genes involved in β -oxidation in the liver of H-apoD Tg mice..	80
2.8 PPAR γ transcriptional activity by arachidonic acid in presence or absence of apoD.....	81
2.9 Schematic model of the role of apoD overexpression on hepatic lipid metabolism.....	82
A.2.1 Niveau d'expression du gène CYP7A1 dans le foie de souris Tg H-apoD	111

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

AA	acide arachidonique
ABCA1	<i>ATP-binding cassette, sub-family A, member 1</i>
ABCG1	<i>ATP-binding cassette, sub-family G, member 1</i>
ACC	acétyl-CoA carboxylase
ADRP	<i>adipose differentiation-related protein</i>
AG	acide gras
AGLC	acide gras à longue chaîne
AKT	serine/threonine protéine kinase B
AMP	adénosine monophosphate
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
APEX1	<i>redox factor/AP endonuclease Ref-1</i>
Apo	apolipoprotéine
ATGL	<i>adipose triglyceride lipase</i>
ATP	adénosine triphosphate
BAT	tissu adipeux brun
C/EBP	<i>CCAAT-enhancer-binding protein</i>
CACT	<i>carnitine/acyl-carnitine translocase</i>
CAMKK	<i>Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase</i>
CD36	<i>cluster of differentiation 36</i>
CETP	<i>cholesteryl ester transfer protein</i>
CGI-58	<i>comparative gene identification-58</i>
ChREBP	<i>Carbohydrate responsive element-binding protein</i>

Cide	<i>cell death-inducing DFF45-like effector</i>
Cox	cyclooxygénase
CPT	carnitine-palmitoyltransférase
CYP7A1	<i>cytochrome P450, family7, subfamily A, polypeptide 1</i>
DFF	<i>DNA fragmentation factor</i>
DG	diglycéride
Dgat	diacylglycérol acyltransferase
E3M2H	<i>E-3-methyl-2-hexenoic acid</i>
ELOVL	<i>elongase of long chain fatty acids</i>
ERK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
FAS	synthétase des acides gras
G6Pase	glucose-6-phosphatase
GK	glucokinase
GL	gouttelette lipidique
GLaz	<i>Glial Lazarillo</i>
GLUT	transporteur de glucose
H-apoD	apoD humaine
HCD	régime riche en sucre
HDL	lipoprotéine de haute densité
HEK	cellules rénales embryonnaires humaines
HFD	régime riche en gras
HL	lipase hépatique
HMG-CoA	<i>hydroxyl-methyl-glutaryl-coenzyme A</i>
HNF	<i>hepatic nuclear factor</i>
HSL	lipase hormone-sensible

IDL	lipoprotéine de densité intermédiaire
JAK2	<i>janus kinase 2</i>
KO	<i>knockout</i>
LCAS	<i>long chain acyl-CoA synthase</i>
LCAT	<i>lecithin-cholesterol acyltransferase</i>
LDL	lipoprotéine de basse densité
LDLr	récepteur de lipoprotéine de basse densité
LFABP	<i>liver fatty acid binding protein</i>
LKB1	<i>liver kinase B1</i>
LPL	<i>lipoprotein lipase</i>
LXR	<i>liver-x-receptor</i>
MG	monoglycéride
MGL	monoglycéride lipase
MTP	<i>microsomal triglyceride transfer protein</i>
NAFLD	stéatose hépatique non-alcoolique
NASH	stéatohépatite non-alcoolique
PARP	<i>poly ADP-ribose polymerase 1</i>
PEPCK	phosphoénolpyruvate carboxykinase
PGC-1	<i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1</i>
PK	pyruvate kinase
PKA	protéine kinase A
Plin	pénilipine
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PPRE	<i>peroxisome proliferator-activated receptor response element</i>
PUFA	acides gras polyinsaturés

RE	réticulum endoplasmique
RT-PCR	<i>reverse transcription-polymerase chain reaction</i>
RXR	<i>retinoid X receptor</i>
SCD	stéaroyl-CoA désaturase
SNC	système nerveux central
SNP	système nerveux périphérique
SREBP	<i>sterol-regulatory element binding protein</i>
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
TAK1	<i>TGF-beta activated kinase 1</i>
Tg	transgénique
TG	triglycéride
TIP-47	<i>tail-interacting protein, 47 kDa</i>
TZD	thiazolidinédione
VLDL	lipoprotéine de très basse densité
WT	type sauvage

RÉSUMÉ

L'apolipoprotéine D (apoD) est une glycoprotéine qui transporte plusieurs molécules hydrophobes, telles que l'acide arachidonique, le cholestérol et la progestérone. Afin d'étudier le rôle neuroprotecteur de l'apoD, des souris transgéniques (Tg) surexprimant l'apoD humaine (H-apoD) principalement au niveau du cerveau ont été générées. Bien que les souris Tg H-apoD résistent mieux à la neurodégénérescence, elles souffrent de stéatose hépatique et musculaire et sont résistantes à l'insuline.

Le but de ce projet est de caractériser les mécanismes moléculaires associés à l'accumulation de lipides dans le foie des souris Tg H-apoD.

L'expression de plusieurs gènes hépatiques impliqués dans le métabolisme lipidique ainsi que dans le stockage de ces lipides dans des gouttelettes lipidiques (GL) a été mesurée par RT-PCR semi-quantitative et par Western Blot.

Notre étude a révélé une augmentation de plus de deux fois du facteur de transcription PPAR γ 1 dans le foie des souris Tg H-apoD par rapport aux souris sauvages. Plusieurs études suggèrent qu'une modulation de PPAR γ 1 peut mener à des troubles métaboliques, puisque PPAR γ induit la transcription de gènes impliqués dans l'accumulation de lipides et dans la formation des GL. Afin de mesurer son niveau d'activation, le niveau d'expression de ses gènes cibles a été mesuré. Le transporteur d'acides gras CD36, impliqué dans la captation des acides gras circulants par les hépatocytes, est surexprimé de 20 %. Cide a et Cide c, deux protéines impliquées dans la stabilisation des GL sont surexprimées de 50 %. Plin2, aussi localisée au niveau des GL et impliquée dans l'inhibition de la lipolyse, est aussi surexprimée (2 fois). Cela induit la formation de GL plus larges et donc la stéatose hépatique. Probablement en compensation, le récepteur nucléaire PPAR α et son gène cible CPT1, enzyme limitant de la β -oxydation, sont surexprimés de 2,5 fois et de 20 % respectivement, augmentant ainsi la dégradation des lipides accumulés. L'AMPK est également activée, ce qui semble causer une diminution du niveau de lipogenèse (surtout par la phosphorylation de l'ACC) et de la néoglucogenèse.

Ces résultats démontrent que la surexpression de l'apoD induit une surexpression et une activation de PPAR γ 1. En induisant la transcription de ses gènes cibles, PPAR γ provoque l'accumulation de lipides, menant à une stéatose hépatique. Par contre, nos résultats démontrent qu'un mécanisme compensatoire est aussi induit (augmentation de la β -oxydation et diminution de la lipogenèse et néoglucogenèse) expliquant le phénotype peu sévère de la stéatose observée. Cette étude permettra de mieux comprendre le rôle de l'apoD dans le métabolisme des lipides.

Mots Clés : ApoD, PPAR γ , stéatose hépatique

INTRODUCTION

L'apolipoprotéine D (apoD) est une lipocaline exprimée dans presque tous les tissus humains. Elle transporte de petites molécules hydrophobes telles que l'acide arachidonique (AA), la progestérone, la prégnénone, la bilirubine, le cholestérol et l'acide E-3-méthyl-2-hexénoïque (Perdomo et Dong, 2009). Au cours des dernières années, il a été démontré que l'apoD a un rôle neuroprotecteur. En effet, des souris Tg surexprimant l'apoD humaine, principalement au niveau du cerveau, résistent mieux au stress oxydatif et à la peroxydation des lipides induits par un agent chimique, le paraquat (Do Carmo *et al.* 2008). De plus, ces souris transgéniques survivent plus longtemps que les souris de type sauvage, suite à l'infection par le coronavirus humain OC43 qui induit l'expression de protéines inflammatoires (Do Carmo *et al.* 2008).

Bien qu'elles aient une espérance de vie plus longue, ces souris révèlent, avec l'âge, certains troubles métaboliques, dont une résistance à l'insuline, une intolérance au glucose et une stéatose hépatique et musculaire. Cet effet est aussi associé à une augmentation du niveau d'expression hépatique du récepteur nucléaire adipogénique PPAR γ , ce qui suggère fortement que le stockage des acides gras est augmenté (Do Carmo *et al.* 2009).

L'apoD pourrait s'avérer une bonne cible thérapeutique dans le traitement des maladies neurodégénératives, mais son association avec des troubles métaboliques pourrait compromettre son utilisation. Il est donc important de bien comprendre son rôle dans l'organisme. L'objectif de ce projet de maîtrise est de caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans l'accumulation de lipides intrahépatiques chez des souris transgéniques qui surexpriment l'apoD humaine.

CHAPITRE I

ÉTATS DES CONNAISSANCES

1.1 L'APOLIPOPROTÉINE D

1.1.1 STRUCTURE ET RÉGULATION DU GÈNE

L'apoD est une glycoprotéine de 29 kDa exprimée dans presque tous les tissus humains. Le gène de l'apoD est situé sur le chromosome 3 chez l'humain et sur le chromosome 16 chez la souris (Drayna, McLean et al. 1987; Warden, Diep et al. 1992). Cette séquence de 855 pb s'étend sur six exons, dont un premier exon qui est non codant.

Dans plusieurs situations, notamment lors d'un stress, le niveau d'expression de l'apoD est modulé. C'est l'étude de ces phénomènes qui a permis de démontrer que le promoteur de l'apoD contient de nombreux éléments de réponse. Parmi ceux-ci se trouvent des éléments de réponse au sérum, aux œstrogènes, à la progestérone, aux glucocorticoïdes, à l'hormone thyroïdienne et au stress (Lambert, Provost et al. 1993). Les facteurs de transcription qui lient le promoteur de l'apoD sont très peu connus. Cependant, Levros *et al.* (2010) ont récemment découvert plusieurs facteurs qui modulent l'expression de l'apoD lorsque des fibroblastes NIH/3T3 sont en arrêt

de croissance. Parmi ceux-ci PARP-1, APEX-1 et ERK1/2 régissent la transcription du gène de l'apoD.

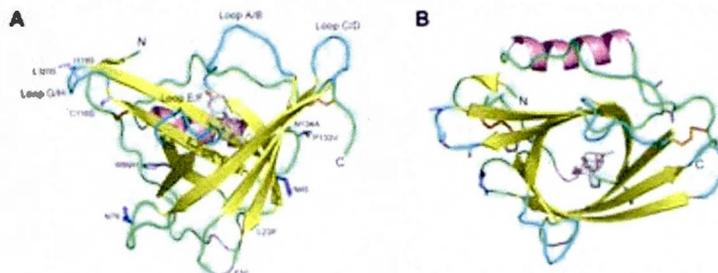
Ainsi, la complexité du promoteur de l'apoD met en évidence qu'il s'agit d'un gène complexe qui est probablement impliqué dans plusieurs mécanismes cellulaires.

1.1.2 STRUCTURE DE LA PROTÉINE

Malgré son nom, l'apoD a une séquence et une structure très différentes des autres apolipoprotéines. En fait, de par sa structure, cette glycoprotéine fait partie des lipocalines. Ces dernières sont des protéines impliquées dans le transport de petits ligands hydrophobes.

L'apoD est constituée d'une simple chaîne de polypeptides contenant 169 acides aminés dont 20 sont hydrophobes. Cette protéine fait environ 18,1 kDa, mais atteint de 19 à 32 kDa selon son niveau de glycosylation sur ses résidus asparagine 45 et 178 (Drayna, Fielding et al. 1986; Weech, Camato et al. 1986). Contenant cinq résidus cystéines, l'apoD forme plusieurs liens disulfides intramoléculeaires et extramoléculeaires. Les liens intramoléculeaires proviennent des cystéines 41 et 165 et des cystéines 8 et 114. La cystéine 116, quant à elle, forme des liens disulfides avec d'autres macromolécules. Au moins sept complexes entre l'apoD et d'autres protéines sont retrouvés dans le plasma sanguin humain, l'un d'entre eux étant composé de l'apoA-II (Weech, Provost et al. 1991; Yang, Gu et al. 1994).

Tout comme les autres lipocalines, l'apoD est composée de huit feuillets- β connectés par quatre boucles, formant un baril, flanqué d'une hélice alpha (Eichinger, Nasreen et al. 2007). Ce baril sert au transport des différents ligands de l'apoD. À l'intérieur de cette structure se trouvent des chaînes hydrophobiques, ce qui permet la liaison de petites molécules hydrophobes (Eichinger, Nasreen et al. 2007).



1.1.4 LIGANDS

Jusqu'à maintenant, six ligands hydrophobes de l'apoD ont été identifiés. Le ligand pour lequel l'apoD a le plus d'affinité est l'AA, avec un K_a de $1,6 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ (Morais Cabral, Atkins et al. 1995). L'AA est retrouvé principalement associé aux phospholipides membranaires. La phospholipase A_2 détache l'AA de la membrane, lui permettant d'être transformé en prostaglandine, via Cox1-Cox2, ou en eicosanoïde, via les lipoxygénases (Schaloske and Dennis 2006). Ces dérivés de l'AA ont plusieurs rôles dans la signalisation cellulaire, notamment dans le métabolisme, la migration, la prolifération et la mort cellulaire. Il est donc fort probable que l'apoD influence certaines voies cellulaires via l'AA.

Le cholestérol semble également être un ligand de l'apoD, mais l'affinité serait beaucoup plus faible que pour l'AA, avec un ratio de 1 à 0,16 (Peitsch and Boguski 1990; Patel, Lange et al. 1997). Même si l'affinité semble faible, l'apoD est probablement impliquée dans le métabolisme du cholestérol, notamment dans le transport inverse du cholestérol, puisqu'elle est liée aux HDL.

La bilirubine, une composante de l'hème, est le troisième ligand de l'apoD, avec un ratio molaire de 1:1 (Peitsch and Boguski 1990). Puisque l'apoD est fortement exprimée dans les reins, lieu de destruction des érythrocytes, elle pourrait avoir un rôle dans le recyclage de la bilirubine.

Certains stéroïdes font également partie des ligands de l'apoD. L'apoD peut lier les androgènes et les estrogènes, mais c'est pour la progestérone et la prégnénolone qu'elle a le plus d'affinité, avec un K_a de $1 \times 10^6 \text{ mol/l}$ et de $1,32 \times 10^6$ respectivement (Dilley, Haagensen et al. 1990). Le rôle de la liaison entre l'apoD et ces deux ligands est peu compris encore aujourd'hui, mais certains suggèrent qu'il pourrait s'agir d'un moyen de transport des stéroïdes via le plasma sanguin jusqu'à différents tissus.

L'acide E-3-méthyle-2-hexénoïque (E3M2H) est également transporté par l'apoD, avec un ratio molaire de 2:1. Ce composé est transporté par l'apoD à la surface de la peau, dans la région axillaire (Zeng, Spielman et al. 1996).

1.1.5 RÔLES DE L'APOLIPOPROTÉINE D

1.1.5.1 LE CANCER

Le lien entre l'apoD et le cancer est aujourd'hui encore obscur. Le niveau d'expression de l'apoD est modulé de différentes façons, selon le type de cancer, son niveau de prolifération et son stade de différenciation. Par exemple, alors qu'une forte concentration d'apoD est retrouvée dans le fluide kystique mammaire de femmes atteintes d'une forme bénigne de tumeur du sein, l'apoD est généralement absente des tumeurs du sein malignes. En fait, la présence d'apoD indique généralement une tumeur bénigne, peu agressive et/ou en régression (Balbin, Freije et al. 1990; Diez-Itza, Vizoso et al. 1994). À l'opposé, un niveau d'expression élevé de l'apoD dans une tumeur maligne de la prostate indique plutôt un stade avancé du cancer (Aspinall, Bentel et al. 1995). Les mécanismes impliqués sont peu compris, mais il pourrait s'agir d'une différence au niveau de la différenciation et de la prolifération des cellules cancéreuses.

Bien sûr, puisque l'apoD est exprimée à haut niveau dans certaines régions du cerveau et qu'il semble y avoir une corrélation entre l'augmentation de son expression et l'arrêt de croissance cellulaire, on peut s'attendre à ce que son expression soit modulée dans certains cancers du cerveau. En effet, Hunter *et al.* (2005) ont démontré que l'apoD est fortement exprimée dans des tumeurs à faible prolifération (astrocytomes pilocytiques et gangliogliomes) contrairement aux tumeurs à forte prolifération (astrocytomes). Une modulation de son expression a également été observée dans des medulloblastomes, mais cette fois-ci, il ne semblait pas y avoir de corrélation avec le niveau de prolifération (Hunter, Varma et al. 2005). Ces différences de pronostique, associées à la concentration d'apoD illustre bien la complexité de cette protéine.

1.1.5.2 LE SYSTÈME NERVEUX

1.1.5.2.1 LE SYSTÈME NERVEUX PÉRIPHÉRIQUE

Dans le système nerveux périphérique (SNP), ce sont les fibroblastes qui sécrètent l'apoD. Plusieurs recherches ont démontré qu'elle est impliquée dans la régénération des nerfs périphériques suite à une lésion. En fait, elle accélère la dégradation des débris de myéline par les cellules de Swann et les macrophages, tout en favorisant la régénération des axones ainsi que la remyélinisation (Boyles, Notterpek et al. 1990; Ganfornina, Do Carmo et al. 2010). Plusieurs autres apolipoprotéines (apoA-I, apoA-IV et apoE) semblent également impliquées dans ce processus, ce qui illustre bien la nécessité de redistribuer le cholestérol une fois les débris de myéline nettoyés (Boyles, Notterpek et al. 1990). L'apoD pourrait donc être impliquée dans le rétablissement de l'homéostasie.

1.1.5.2.2 LE SYSTÈME NERVEUX CENTRAL

Dans le SNC, ce sont plutôt les oligodendrocytes et les astrocytes qui sécrètent l'apoD. Vers la fin des années 1990, plusieurs groupes de recherche ont noté une surexpression de l'apoD lors de situations de neurodégénérescence. Ceci a été observé chez des rats qui ont subi des lésions au niveau du cortex cérébral ainsi que dans des modèles de neurodégénérescence de souris transgéniques ou lors de l'induction chimique d'excitotoxicité dans le cerveau des souris. La surexpression de l'ApoD est aussi observée lors de maladies neurodégénératives chez l'humain, comme l'Alzheimer. (Yoshida, Cleaveland et al. 1996; Terrisse, Poirier et al. 1998; Franz, Reindl et al. 1999; Terrisse, Seguin et al. 1999). En fait, plusieurs modèles transgéniques ont permis de démontrer que l'apoD a un rôle protecteur contre le stress oxydatif, via la diminution de la peroxydation des lipides (Ganfornina, Do Carmo et al. 2008).

Chez la drosophile, la Glial Lazarillo (GLaz) qui est l'homologue de l'apoD augmente la longévité de la drosophile en diminuant le niveau de

neurodégénérescence et en augmentant la résistance aux stress (Sanchez, Lopez-Arias et al. 2006; Walker, Muffat et al. 2006).

Chez la souris, une déplétion en apoD cause une réduction de l'activité locomotrice et exploratrice des souris et diminue leur capacité à l'apprentissage. Au niveau moléculaire, ces souris semblent avoir un plus haut taux de peroxydation des lipides que des souris de type sauvage (WT) (Ganformina, Do Carmo et al. 2008). À l'inverse, la surexpression de l'apoD produit des souris légèrement plus actives, mais le niveau de peroxydation des lipides n'est pas différent de celui des souris WT. Ces résultats suggèrent que l'apoD a un rôle à jouer dans le fonctionnement normal du cerveau.

Des expériences utilisant du paraquat (un agent chimique induisant un stress oxydatif au niveau du cerveau) ont démontré que des souris transgéniques (Tg) qui surexpriment l'apoD humaine au niveau du cerveau, résistent mieux au stress oxydatif que des souris WT ou apoD KO. En fait, il semblerait que le niveau de peroxydation des lipides augmente beaucoup moins chez les souris Tg que chez les souris WT lors d'un stress oxydatif, alors qu'il augmente beaucoup plus rapidement chez les souris KO (Ganformina, Do Carmo et al. 2008). Le phénomène est encore mal compris, mais d'autres études utilisant de l'acide kaïnique, un analogue du glutamate neurotoxique, donnent des résultats similaires, c'est-à-dire un rétablissement plus rapide chez les souris Tg que chez les souris WT (résultats non publiés, Najib et Rassart).

1.1.5.3 LE MÉTABOLISME DES LIPIDES

1.1.5.3.1 POLYMORPHISMES DE L'APOD

Plusieurs mutations et polymorphismes sur le gène de l'apoD ont été répertoriés dans la population mondiale. Ces derniers entraînent généralement des anomalies métaboliques, telles qu'une hypertriglycémie et une diminution du taux de HDL circulants. C'est le cas des mutations Phe36Val, Tyr108Cys et Thr158Lys fréquemment retrouvées dans la population africaine (Kamboh, Albers et al. 1989;

Desai, Bunker et al. 2002; Perdomo, Kim et al. 2010). Le polymorphisme TaqI, est bien connu dans la population Sud-Indienne et Britannique caucasienne pour son association avec le développement de la résistance à l'insuline, l'hyperinsulinémie et l'obésité (Hitman, McCarthy et al. 1992; Baker, Hitman et al. 1994; Vijayaraghavan, Hitman et al. 1994).

Ces différents polymorphismes indiquent que l'apoD a un rôle important à jouer dans le métabolisme des lipides et possiblement dans la voie de signalisation de l'insuline. Une mutation dans le gène de l'apoD pourrait impliquer des changements au niveau de la protéine, modifiant son affinité pour certains ligands ou sa capacité à entrer dans certains types cellulaires. Par exemple, une moins grande affinité entre l'apoD et le cholestérol pourrait l'empêcher de contribuer à la formation des HDL, menant à une diminution du transport inverse du cholestérol.

1.1.5.3.2 L'APOD ET LE RÉCEPTEUR DE LA LEPTINE

La leptine est une hormone sécrétée par le tissu adipeux en réponse à une prise alimentaire. Une fois liée à son récepteur, une cascade de signalisation est déclenchée, menant à une diminution de la prise alimentaire et à une augmentation de la dépense énergétique. Une diminution du niveau d'expression de la leptine ou du récepteur de la leptine entraîne l'apparition de troubles métaboliques sévères, dont l'obésité morbide (Montague, Farooqi et al. 1997).

Selon Liu *et al.* (2001), l'apoD pourrait réguler la prise alimentaire en formant un hétérodimère avec la partie cytoplasmique de la forme longue du récepteur de la leptine (Ob-Rb). L'Ob-Rb et l'apoD sont tous les deux exprimés au niveau des neurones hypothalamiques, là où la leptine a le plus d'impact sur l'homéostasie énergétique. Ensuite, il a été démontré que le niveau d'expression de l'apoD augmente lors de la prise alimentaire ou lorsque le niveau de leptine circulante augmente. Il y aurait également un lien entre l'activation du récepteur de la leptine et le niveau d'expression du gène de l'apoD, puisque chez des souris déficientes en leptine (*Ob/Ob*) ou en récepteur de la leptine (*dbdb*), le niveau d'ARNm de l'apoD

est significativement inférieur à celui de souris de type sauvage (Liu, Chang et al. 2001).

Ainsi, il se pourrait que l'apoD aide au bon fonctionnement du récepteur de la leptine, mais aucune étude ne démontre clairement que l'apoD est indispensable dans l'activation de la voie de signalisation induite par la leptine.

1.1.5.3.3 MÉTABOLISME DES LIPOPROTÉINES

Depuis que l'apoD a été isolée des HDL pour la première fois, plusieurs groupes de recherche ont tenté de découvrir le rôle de cette lipocaline dans le transport inverse du cholestérol. Puisque l'apoD lie le cholestérol, on s'est souvent demandé si elle favorise la formation et la maturation des HDL ou s'il s'agit seulement d'un ligand lui permettant de circuler dans le plasma (en association avec les HDL). Jusqu'à aujourd'hui, plusieurs publications indiquent que l'apoD humaine a un rôle à jouer dans la formation et dans la maturation des HDL.

Tout d'abord, deux groupes de recherche ont découvert que l'apoD interagit avec l'acyltransférase lécithine:cholestérol (LCAT) (Albers, Cabana et al. 1976; Holmquist 1989). La LCAT est responsable de convertir le cholestérol libre en ester de cholestérol qui est ensuite utilisé lors de la maturation des HDL (Zannis, Chroni et al. 2006). Il n'est toujours pas clair si l'apoD active ou inhibe la LCAT. Selon Albers *et al.* (1979), l'apoD serait un inhibiteur de la LCAT, ce qui va à l'encontre des résultats de Kostener *et al.* (1974) qui démontrent que l'apoD induit une augmentation de l'activité de la LCAT. Un autre groupe de recherche, de son côté, a déterminé que l'apoD stabilise la LCAT sur les HDL (Steyrer and Kostner 1988), modulant son activité. Il faudra donc plus d'études afin de savoir si une augmentation de la quantité d'apoD à la surface des HDL favorise le transport inverse du cholestérol ou non.

Il existerait une liaison covalente entre l'apoD et l'apoA-II. Cet hétérodimère formé d'un lien disulfide circule librement dans le plasma, mais se retrouve également associé aux HDL. En fait, environ 54 % de l'apoD retrouvée sur les HDL

serait associée à l'apoA-II (Blanco-Vaca, Via et al. 1992). Ce lien permettrait peut-être à l'apoD de contribuer au remodelage des HDL puisque l'apoA-II est, après l'apoA-I, l'apolipoprotéine la plus importante retrouvée à la surface des HDL.

Blanco-Vaca *et al.* (1992) ont également rapporté la présence d'un hétérodimère apoD /apoB100 à la surface des LDL et des VLDL. Il serait donc possible que l'apoD participe au métabolisme d'au moins trois types de lipoprotéines : les HDL, les LDL et les VLDL.

Il se pourrait également que le métabolisme des HDL influence le niveau d'expression de l'apoD. En effet, des gens souffrant de la maladie de Tangier ont un niveau d'expression de l'apoD diminué comparativement à des sujets normaux (Alaupovic, Schaefer et al. 1981). Cette maladie est caractérisée par une mutation dans le gène ABCA1 dont le produit est impliqué dans le transfert du cholestérol intracellulaire vers les HDL en circulation. La perte de fonction d'ABCA1, causée par une mutation, mène à une accumulation du cholestérol dans les tissus périphériques, augmentant les risques de développer l'athérosclérose (Bodzioch, Orso et al. 1999).

1.1.5.4 MODÈLES TRANSGÉNIQUES

Bien que le niveau d'expression de l'apoD ait souvent été corrélé à des troubles métaboliques, l'effet de sa répression ou de sa surexpression sur le métabolisme est très peu connu et reste à ce jour peu étudié.

1.1.5.4.1 SOURIS TRANSGÉNIQUES

Le laboratoire du Dr Éric Rassart est le premier à avoir démontré que des souris Tg surexprimant l'apoD humaine (H-apoD) principalement au niveau du cerveau développent une résistance à l'insuline, une intolérance au glucose, une hyperinsulinémie et une stéatose hépatique et musculaire (Do Carmo, Fournier et al. 2009).

Chez ces souris transgéniques, le transgène de l'H-apoD a été relié au promoteur Thy-1, promoteur spécifique au système nerveux central. Cependant, dans ces souris, l'ARNm de l'H-apoD est aussi présent dans le sang, les yeux, la moelle, le cortex, l'hippocampe, le cervelet, la colonne vertébrale, le bulbe olfactif, le thymus, le cœur, le foie, les ovaires et les testicules. Aucune expression n'a été détectée dans le mésencéphale, les muscles, la rate, les glandes surrénales, les reins et le pancréas (Do Carmo, Fournier et al. 2009).

Il faut près d'un an avant de détecter les troubles métaboliques chez les souris Tg H-apoD. Ces souris ne sont pas obèses et ont des niveaux circulants de HDL, triglycérides, acides gras (AG) libres, cholestérol et glucose normaux. Le niveau circulant de leptine est également normal et la prise alimentaire ne semble pas affectée, ce qui indique que le tissu adipeux peut avoir conservé ses fonctions.

Un test intrapéritonéal de tolérance au glucose et de tolérance à l'insuline a permis de démontrer que ces souris sont intolérantes au glucose et résistantes à l'insuline, ce qui explique l'hyperinsulinémie. Ce trouble métabolique n'est pas associé à l'inflammation. Cette résistance à l'insuline proviendrait d'une diminution de la phosphorylation d'AKT (Do Carmo, Fournier et al. 2009).

Une augmentation de la masse du foie est observée et serait associée à une augmentation de la quantité de triglycérides stockés. Une étude préalable a permis de démontrer que la stéatose hépatique est associée à une augmentation de l'expression (ARNm) du facteur de transcription lipogénique SREBP-1 et du récepteur nucléaire adipogénique PPAR γ ainsi que de l'enzyme lipogénique, la synthétase des AG (FAS). Une augmentation du niveau d'expression du facteur de transcription PPAR α , impliqué dans l'activation de la β -oxydation, et du transporteur d'AG LFABP est aussi observée dans le foie de ces souris.

1.1.5.4.2 ADÉNOVIRUS ApoD

Un autre groupe de recherche s'est intéressé à l'effet d'une surexpression de l'apoD sur le métabolisme des lipides. Perdormo *et al.* (2010) ont injecté un

adénovirus contenant le gène de l'apoD murin à des souris et ont noté des changements au niveau du métabolisme des lipides. Deux semaines après l'injection, les souris ont trois fois plus d'apoD circulant que des souris injectées avec un adénovirus témoin. Leurs résultats démontrent qu'une augmentation transitoire du niveau d'apoD ne modifie pas la composition lipidique du foie, mais perturbe les niveaux lipidiques dans la circulation sanguine. En effet, les niveaux circulants de triglycérides et de cholestérol sont inférieurs chez les souris apoD à jeun que chez les souris témoins. En association avec ces résultats, les niveaux de VLDL-TG et de HDL-cholestérol sont également diminués.

Une recherche plus approfondie leur a permis de déterminer que la sécrétion des VLDL-TG n'est pas affectée par la surexpression hépatique de l'apoD, mais que la lipoprotéine lipase est plus active. Ainsi, les lipoprotéines en circulation seraient plus rapidement catabolisées, ce qui expliquerait la diminution du taux circulants de HDL et de VLDL.

La lipase hépatique ne semble pas suractivée dans leur modèle et les auteurs suggèrent que seule la lipoprotéine lipase serait en cause. Cependant, chez la souris, la lipase hépatique est aussi présente dans la circulation sanguine (Peterson, Bengtsson-Olivecrona et al. 1986). Les auteurs n'ayant mesuré que la lipase hépatique sur des extraits de foie ne peuvent exclure une suractivation de la lipase hépatique circulante dans leur modèle.

1.1.5.4.3 SOURIS KO

À ce jour, aucun laboratoire de recherche n'a publié de résultats concernant le métabolisme lipidique de souris apoD KO. Il serait intéressant de comparer leur métabolisme du cholestérol avec celui de souris de type sauvage et de souris Tg, puisque l'apoD a un rôle à jouer dans la formation et la maturation des HDL et donc dans le transport inverse du cholestérol.

1.2 LA STÉATOSE HÉPATIQUE

La stéatose hépatique consiste en une accumulation de lipides dans le foie, à la fois dans les hépatocytes et dans les cellules de Kupffer. Généralement accompagné d'un dérèglement de la voie de signalisation de l'insuline, ce trouble métabolique peut se transformer en NASH (*Non alcoholic steatohepatitis*) ou en fibrose du foie, favorisant l'apparition de certains cancers (Marchesini, Brizi et al. 2001; Sanyal, Campbell-Sargent et al. 2001; Ratziu, Bonyhay et al. 2002). Plusieurs mécanismes peuvent mener à la stéatose hépatique, dont une diminution de l'exportation ou de la dégradation des lipides, une augmentation de l'assimilation des AG ou une augmentation de la lipogenèse (Chirieac, Chirieac et al. 2000; Schuler and Wood 2002; Diehl 2005; Rinella, Elias et al. 2008). Le tissu adipeux a également une forte influence sur le métabolisme lipidique hépatique. Autant l'obésité que la lipodystrophie (absence totale ou partielle de tissus adipeux) peuvent mener à une stéatose hépatique. Ceux-ci sont caractérisés par une augmentation des lipides en circulation. Ces lipides sont facilement captés et accumulés dans le foie, d'où l'apparition d'une stéatose (Huang-Doran, Sleight et al. 2010).

1.2.1 LE MÉTABOLISME DES LIPOPROTÉINES

Toutes les cellules ont besoin de lipides pour leur bon fonctionnement. Leur approvisionnement en lipides peut se faire via l'alimentation ou via les AG présents dans la circulation sanguine. En effet, lorsque le contenu en lipide est trop élevé dans un tissu, l'excès est envoyé sous forme de lipoprotéines dans la circulation sanguine (fig. 2). Ces lipoprotéines pourront ensuite fournir les lipides nécessaires aux autres tissus. Les quatre principaux types de lipoprotéines sont les chylomicrons, les VLDL, les LDL et les HDL. Toutes les lipoprotéines ont la même structure de base, c'est-à-dire un cœur riche en triglycérides (TG) et en esters de cholestérol, entouré d'une monocouche de phospholipides, d'apolipoprotéines (apo) et de cholestérol non estérifié (Tian and Fu 2010).

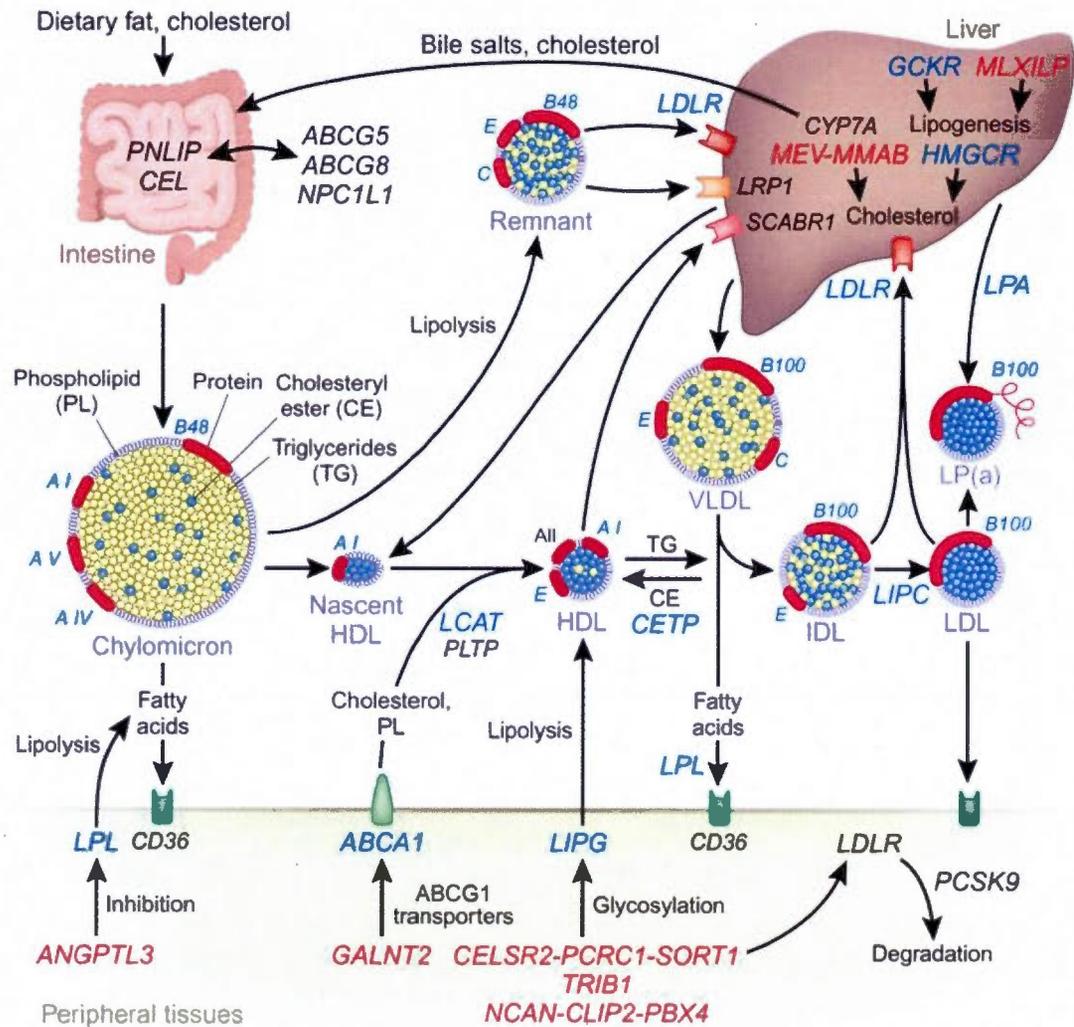


Figure 2 : Métabolisme des lipoprotéines (Lusis and Pajukanta 2008)

1.2.1.1 LES CHYLOMICRONS

Les lipides alimentaires, principalement des TG, sont la plus grande source de lipides pour le foie. Chez l'humain, leur digestion en AG libres et en diglycérides (DG) est amorcée au niveau de l'estomac, via la lipase acide (DeNigris, Hamosh et al. 1988). Les DG sont ensuite dégradés par la lipase pancréatique en monoglycérides (MG), en AG libres et en glycérols (Borgstroem 1964). Les produits de cette digestion enzymatique sont émulsifiés en micelles par les sels biliaires, puis captés

par les anthérocytes. Les AG à 10 carbones ou moins diffusent directement vers la circulation sanguine, puis ils sont transportés jusqu'au foie par l'albumine. Lorsque ces AG entrent dans les hépatocytes (par diffusion ou avec l'aide de transporteurs d'AG), ils sont utilisés comme source d'énergie dans la voie de la β -oxydation ou encore, ils sont estérifiés en TG.

Puisque les hépatocytes ne sont pas spécialisés dans le stockage des lipides, la majorité des TG sont envoyés dans la circulation sanguine sous forme de lipoprotéines de très basse densité (VLDL). Seule une petite quantité de TG est conservée dans les hépatocytes. Pour éviter la lipotoxicité des TG, ces derniers sont incorporés dans des GL. Ils pourront ainsi être utilisés ultérieurement comme source d'énergie ou pour la formation de membranes (Tso and Balint 1986).

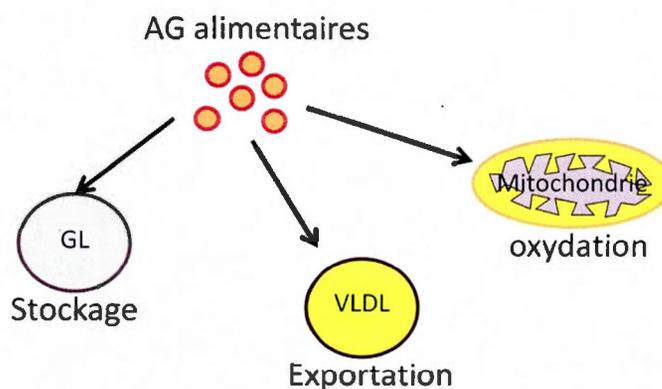


Figure 3 : Assimilation et gestion des AG par les hépatocytes.

Pour ce qui est des AG ayant une chaîne égale ou supérieure à 12 carbones, ils sont transformés en TG à même les anthérocytes, pour ensuite s'associer à l'apoB48 et former des chylomicrons. D'autres apolipoprotéines (apoA-I et apoA-IV) se lient par la suite aux chylomicrons, qui sont exportés des anthérocytes par exocytose et envoyés, par la lymphe, jusqu'à la circulation sanguine (Tso and Balint 1986). Lorsque les chylomicrons sont dans la circulation sanguine, l'apoA-I et l'apoA-IV sont graduellement remplacées par des apoC-I, C-II et E (Havel, Kane et al. 1973). Ces apolipoprotéines permettent la liaison des chylomicrons en circulation aux

lipoprotéines lipases (LPL). Il s'agit d'enzymes capables d'hydrolyser les TG contenus dans les lipoprotéines. Les AG libres libérés par cette réaction enzymatique sont ensuite absorbés, en majorité par le tissu adipeux et les muscles squelettiques, mais aussi par tous les autres tissus (Goldberg 1996). Les chylomicrons qui n'auront pas été complètement hydrolysés par les lipases seront captés et dégradés par le foie (Mahley, Innerarity et al. 1984).

1.2.1.2 LES VLDL, LES IDL ET LES LDL

Les VLDL sont composées principalement de TG, mais aussi de cholestérol. Elles sont produites et sécrétées par le foie et leur contenu est redistribué aux tissus périphériques. La formation des VLDL s'amorce au niveau des hépatocytes lorsque l'apoB100 est traduite et transloquée dans la lumière du réticulum endoplasmique rugueux. La protéine microsomale de transfert des TG (MTP) ajoute une petite quantité de TG à la molécule d'apoB100. Ceci a pour effet de stabiliser et de protéger cette nouvelle lipoprotéine dense et pauvre en TG contre la dégradation par le protéasome (Boren, Graham et al. 1992; Fisher and Ginsberg 2002). Lors de la maturation de la VLDL, celle-ci est transférée au golgi où des TG et du cholestérol sont ajoutés graduellement, menant à la formation d'une lipoprotéine riche en Tg. À cette lipoprotéine mature se lie d'autres apolipoprotéines, dont l'apoE et l'apoC-III. Les VLDL sont ensuite exportées vers la circulation sanguine où des lipases hydrolyseront leur contenu pour alimenter les tissus périphériques en AG.

Au cours de sa dégradation, la VLDL devient une lipoprotéine de densité intermédiaire (IDL), puis une lipoprotéine de basse densité (LDL), composée principalement de cholestérol (Phair, Hammond et al. 1975; Gaw, Packard et al. 1995). Ces lipoprotéines sont captées par les différents tissus via le récepteur de LDL (LDLr). L'apoB et l'apoE facilitent la liaison des lipoprotéines aux LDLr alors que l'apoC-III empêche cette liaison et inhibe les lipoprotéines lipases. La proportion d'apoB, d'apoE et d'apoC-III détermine donc la vitesse à laquelle les VLDL, IDL et LDL sont éliminées de la circulation sanguine (Tomiyasu, Walsh et al. 2001).

1.2.1.3 LES HDL

Les HDL sont des lipoprotéines de haute densité, utilisées pour le transport inverse du cholestérol, c'est-à-dire un mouvement du cholestérol provenant de tissus périphériques vers le foie. Ce dernier sécrètera et éliminera ce cholestérol par les acides biliaires (Fievet and Staels 2009). La formation du HDL est amorcée lorsque des accepteurs membranaires de cholestérol (ABCA1) transfèrent le cholestérol intracellulaire vers des apolipoprotéines (apoA-I principalement) en circulation ou lorsque du cholestérol est transféré à partir d'autres lipoprotéines (par exemple des LDL) (Francis, Knopp et al. 1995). En effet, des échanges se font entre le contenu des différentes lipoprotéines. La protéine de transfert de l'ester de cholestérol (CETP) est spécialisée dans le transfert du cholestérol provenant des lipoprotéines riches en cholestérol (LDL, HDL) vers les lipoprotéines riches en TG (chylomicrons et VLDL). Elle permet également le transfert des TG des lipoprotéines riches en TG vers les lipoprotéines pauvres en TG (Ishigami, Yamashita et al. 1994; Inazu, Nakajima et al. 2008).

Lors de sa maturation, plusieurs autres protéines se lient aux HDL : apoA-II, apoA-IV, apoC-I, apoC-II, apoC-III, apoD, apoE, apoJ, apoL-I, apoM, ceruloplasmines, transferrines et la lécithine : cholestérol acyltransférase (LCAT) (Lewis and Rader 2005). La LCAT est importante pour le processus de maturation des HDL, puisqu'elle estérifie le cholestérol qui ensuite peut migrer vers le centre du HDL (Chen and Albers 1982). Cette modification permet au HDL mature d'être plus stable et donc d'avoir une demi-vie plus longue dans la circulation sanguine et donc d'éliminer plus de cholestérol. Le HDL circulera donc ensuite dans le plasma jusqu'à ce que son contenu soit capté par le foie et éliminé dans les intestins via les acides biliaires (Fidge 1999).

Bien qu'il existe une voie alternative, CYP7A1 est l'enzyme limitant de la formation des acides biliaires (fig. 4) (Chiang 2009). Cet enzyme est régulé principalement via le niveau d'expression de son ARNm. Les principaux facteurs de

transcriptions qui induisent l'expression de CYP7A1 sont LXR α et HNF4 α , alors que PPAR α et SREBP-1c réprime son expression (Janowski, Willy et al. 1996; Marrapodi and Chiang 2000). Plusieurs composés peuvent inhiber la transcription de CYP7A1, tels que les acides biliaries, les hormones stéroïdiennes, les cytokines inflammatoires, l'insuline et les facteurs de croissance (Crestani, Sadeghpour et al. 1998; Li, Jahan et al. 2006; Li, Kong et al. 2006; Song and Chiang 2006; Song, Ellis et al. 2007; Song, Li et al. 2009).

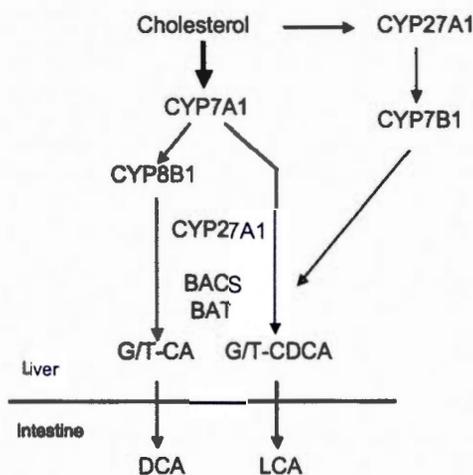


Figure 4: Enzymes impliqués dans la formation des acides biliaries (Chiang 2009)

1.2.1.4 LA CAPTATION DES ACIDES GRAS LIBRES

Trois lipases sont associées à l'hydrolyse des lipoprotéines circulantes : la lipoprotéine lipase, la lipase hépatique, et la lipase endothéliale. Ces dernières sont indispensables à la redistribution des lipides entre les différents organes.

La lipoprotéine lipase est synthétisée par les cellules parenchymateuses de plusieurs types de tissus, dont le tissu adipeux, les muscles squelettiques et le cœur. Une fois synthétisée, la LPL est transloquée au niveau de l'endothélium, rattachée à des protéoglycanes de sulfates d'héparanes (Mead, Irvine et al. 2002). Lorsqu'elle est

activée, elle dégrade les lipoprotéines riches en TG, telles que les chylomicrons et les VLDL. Elle permet ainsi de libérer des AG libres qui seront captés par les tissus.

La lipase hépatique, quant à elle, est produite dans les hépatocytes. Chez l'humain, elle est sécrétée à la surface des cellules parenchymateuses et endothéliales du foie. Pour ce qui est de la souris, la lipase hépatique est sécrétée dans la circulation sanguine, où elle circule librement (Peterson, Bengtsson-Olivecrona et al. 1986). Tout comme la LPL, la HL dégrade les TG contenus dans les lipoprotéines riches en TG.

La lipase endothéliale est différente des deux autres lipases, puisqu'elle est spécifique aux HDL et qu'elle dégrade plus facilement les phospholipides que les TG (Strauss, Hayn et al. 2003). Cette lipase est principalement synthétisée par les cellules endothéliales vasculaires. Les macrophages et les cellules musculaires lisses la produisent également, mais à plus faible niveau. Une fois synthétisée, la lipase endothéliale est exportée à la surface des cellules vasculaires, rattachées à des protéoglycanes (Yasuda, Ishida et al. 2010).

L'activation des lipases, et donc l'hydrolyse des TG, augmente la quantité d'AG libres circulants. Ceci mène à l'assimilation des AG, majoritairement par le tissu adipeux, mais aussi par tous les autres tissus. Les AG à courte chaîne ont la capacité de diffuser passivement dans la membrane cellulaire, alors que les AG à longue chaîne (AGLC) doivent s'associer à un transporteur d'AG. Dans les hépatocytes, CD36 fait partie de ces transporteurs. Il s'agit d'une translocase d'AGLC, située à la surface de la membrane cellulaire, qui facilite l'assimilation des AG ainsi que leur oxydation. Les AG assimilés pourront ainsi être redirigés vers la mitochondrie où ils seront utilisés pour la β -oxydation ou encore être utilisés au niveau du RE pour la formation de VLDL et ainsi être exportés de nouveau dans la circulation sanguine. Les AG qui n'auront pas été éliminés de la cellule seront estérifiés en TG par une glycérol-P-acyltransférase, puis stockés dans des gouttelettes lipidiques pour une utilisation future (Schlossman and Bell 1976; Tso and Balint 1986).

1.2.1.5 LES LIPOPROTÉINES, LES ACIDES GRAS LIBRES ET LA STÉATOSE HÉPATIQUE

La capacité des hépatocytes à capter des AG dépend de deux facteurs : la disponibilité des AG et la possibilité de les faire entrer dans la cellule (disponibilité des transporteurs d'AG) (fig. 5) (Bradbury 2006).

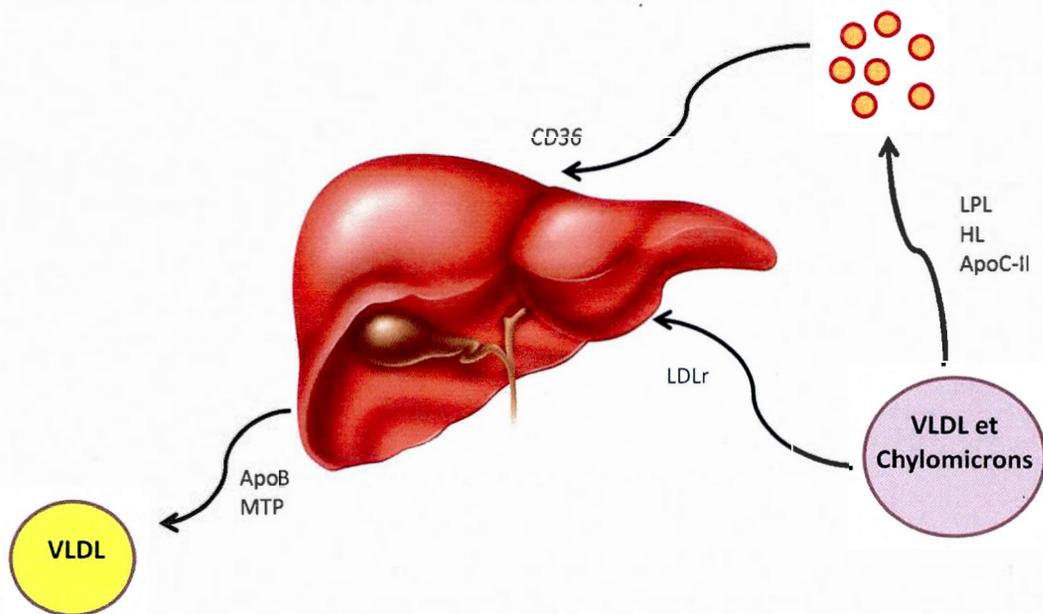


Figure 5 : Principales molécules impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines qui peuvent causer une stéatose hépatique.

Les AG alimentaires sont la plus grande source d'AG libres. Puisque le rôle du tissu adipeux est de stocker les lipides, il s'agit du premier tissu à être affecté par une augmentation de la quantité d'AG ou de sucre alimentaires, d'où l'apparition de l'obésité chez des souris déficientes en leptine ou nourries avec une diète riche en gras ou en sucre (Surwit, Feinglos et al. 1995; Bowles and Kopelman 2001). Pour ce qui est du foie, il y a une plus grande assimilation d'AG et de sucre tout au long de ce mécanisme, puisqu'une partie des AG alimentaires vont directement au foie et que les chylomicrons non métabolisés retourneront eux aussi au foie. Il y aura donc

l'apparition d'une stéatose hépatique (Surwit, Feinglos et al. 1995; Bowles and Kopelman 2001).

Un autre dérèglement qui peut causer une augmentation de l'assimilation des AG au niveau hépatique concerne les lipases et les transporteurs d'AG. Une diminution de l'activité des lipases, causée par une mutation dans le gène de la LPL ou dans le gène de l'ApoC-II, son coactivateur, peut entraîner une chylomicronémie. Ce syndrome est caractérisé par une forte concentration plasmatique de lipoprotéines riches en TG (VLDL et chylomicrons) et une faible concentration de HDL et de LDL (Brunzell and Fujimoto 1995). Puisque les chylomicrons ne sont pas dégradés par les lipases, ils seront éventuellement captés par le foie. Cette forte accumulation de TG hépatique amène donc une stéatose hépatique.

À l'opposé, une augmentation de l'activité des lipases perturbe aussi les niveaux lipidiques sériques. L'hydrolyse accélérée des lipoprotéines riches en TG cause une augmentation des AG libres qui seront captés par les différents tissus, dont par le foie. Une surexpression ou une activation de la LPL ou de la HL, localisée au niveau du foie, peut assurément causer la stéatose hépatique, puisque les AG libérés seront plus rapidement assimilés par le foie (Pardina, Baena-Fustegueras et al. 2009).

Pour ce qui est du transport des AG, CD36, qui est responsable de la captation des AG au niveau hépatique, semble avoir une grande importance dans la régulation du métabolisme des lipides. En effet, une augmentation de son niveau d'expression peut entraîner l'apparition de troubles métaboliques, tels que la stéatose hépatique, l'obésité, la résistance à l'insuline et l'inflammation (Hajri and Abumrad 2002). Une diminution de son expression, quant à elle, peut causer d'autres troubles métaboliques tels qu'une hypertriglycémie et une hyperglycémie (Hajri and Abumrad 2002; Hirano, Kuwasako et al. 2003; Love-Gregory, Sherva et al. 2008). Une surexpression de CD36 au niveau hépatique aura un effet local. Une plus grande assimilation d'AG libres circulants provoquera une accumulation de TG et éventuellement une stéatose hépatique.

Finalement, la formation des VLDL est très importante pour le foie puisqu'elle permet d'exporter les lipides synthétisés de novo dans la circulation sanguine. Une diminution du taux d'expression de l'apoB ou de la MTP provoque une diminution du taux de formation et de sécrétion de VLDL, pouvant ainsi causer une stéatose hépatique, puisque les AG ne seront pas éliminés assez rapidement et donc s'accumuleront (Pereira, Stefano et al. 2011).

1.2.2 LE MÉTABOLISME DES GOUTTELETTES LIPIDIQUES

Les AG peuvent devenir cytotoxiques, c'est pourquoi ils sont estérifiés en TG, puis stockés dans des gouttelettes lipidiques (GL). Ces lipides peuvent ensuite être utilisés lorsque le besoin énergétique augmente ou lors de synthèse de membranes, des hormones, etc.

1.2.2.1 FORMATION DES GOUTTELETTES LIPIDIQUES

Les GL ont une structure similaire aux lipoprotéines. Elles sont formées d'un cœur de lipides neutres, généralement des TG et/ou des esters de cholestérol, entouré d'une monocouche de phospholipides à laquelle plusieurs protéines spécifiques aux GL sont liées (Brown 2001; Thiele and Spandl 2008; Murphy, Martin et al. 2009). On appelle ces protéines les PAT, du au nom des trois principales protéines retrouvées : la périlipine (Plin1), la protéine reliée à la différenciation adipocitaire (ADRP/Plin2) et la protéine d'interaction terminale de 47 kDa (TIP-47/Plin3). Deux autres protéines ont été classifiées dans les PAT, soit la protéine S3-12 (Plin4), et la protéine myocardiale des GL (OXPAT/Plin5) (Kimmel, Brasaemle et al. 2010).

Il existe, encore aujourd'hui, beaucoup de lacunes dans notre compréhension du métabolisme des GL. Selon le modèle actuel, les GL prennent naissance dans la membrane du réticulum endoplasmique. Entre les deux couches de phospholipides de la membrane du RE se trouvent des enzymes impliqués dans la synthèse des TG (glycérol-3-phosphate acyltransférase, phosphatidic acide phosphohydrolase, diacylglycerol acyltransgérase, acyl-CoA synthétase et stéaroyl-CoA désaturase)

pouvant mener à la synthèse de lipides neutres qui seront incorporés dans la GL (Milger, Herrmann et al. 2006; Gonzalez-Baro, Lewin et al. 2007; Kuerschner, Moessinger et al. 2008; Hodges and Wu 2010). La synthèse de lipides est suivie d'un bourgeonnement de la GL à la surface du RE, grâce à des protéines de transport vésiculaire, de fusion membranaire et de motilité du cytosquelette (membres de la famille Rab et ARF, GTPase, cavéolines et phospholipase D1) (Martin and Parton 2006). Certaines protéines ancrées dans la membrane du RE se retrouveront sur la GL lors du bourgeonnement, alors que d'autres se lieront une fois la GL située dans le cytoplasme (Brown 2001). Ces protéines servent à contrôler la maturation de la GL. Par exemple, lorsqu'elle n'est pas phosphorylée, Plin1 est impliquée dans la stabilisation des lipides neutres stockés dans la GL (Brasaemle, Rubin et al. 2000). Plin2 semble également avoir une fonction similaire, puisqu'elle lie les AG et le cholestérol, stimule l'assimilation des AG dans la GL et stabilise les TG en bloquant la lipolyse (Gao and Serrero 1999; Serrero, Frolov et al. 2000; Atshaves, Storey et al. 2001; Imamura, Inoguchi et al. 2002; Listenberger, Ostermeyer-Fay et al. 2007). Plin3, Plin4 et Plin5 sont, quant à elles, principalement retrouvées dans le cytosol. Lors de la formation de GL, elles se déplacent jusqu'à la membrane du RE et se lient aux GL naissantes. Elles seraient impliquées dans la liaison des lipides qui seront stockés dans la GL (Wolins, Rubin et al. 2001; Wolins, Quaynor et al. 2005; Wolins, Brasaemle et al. 2006). Lorsque la GL est mature, elle migre vers le cytoplasme.

Plusieurs autres protéines, encore non classifiées, sont associées aux GL matures. C'est le cas des différentes protéines Cide a, Cide b et Cide c qui seraient impliqués dans la fusion de GL (Londos, Brasaemle et al. 1999; Puri, Ranjit et al. 2008; Gong, Sun et al. 2009).

Finalement, plusieurs lipases, impliquées dans la dégradation des GL (lipolyse), se retrouvent également à la surface des GL. Les trois principales lipases sont la lipase adipoitaire de TG (ATGL), la lipase hormones-sensible (HSL) et la lipase de monoglycérides (MGL) (Bickel, Tansey et al. 2009).

1.2.2.2 LIPOLYSE

Lors d'un manque d'énergie ou lors de la synthèse de nouvelles membranes, la cellule hydrolyse les TG contenus dans les gouttelettes lipidiques via la lipolyse. Bien qu'elle se produise principalement dans le tissu adipeux blanc, la lipolyse a lieu dans tous les types cellulaires qui contiennent des GL. Lors de ce processus, les TG sont catabolisés en DG, en MG, en glycérols et en AG libres (Ducharme and Bickel 2008; Bickel, Tansey et al. 2009).

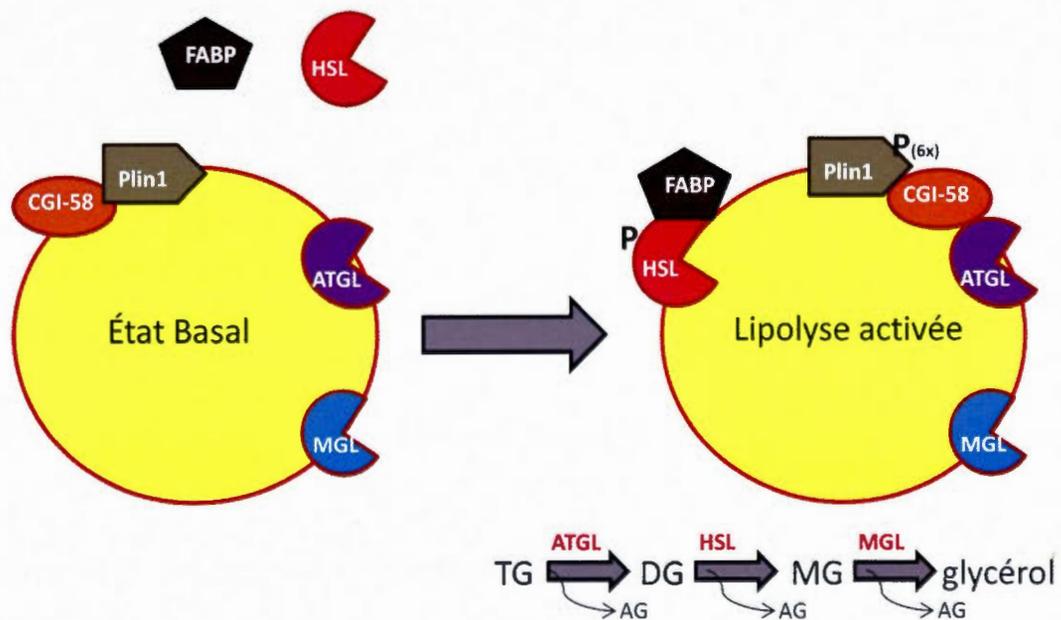


Figure 6 : Protéines liées aux GL et impliquées dans la lipolyse.

Plusieurs molécules entrent en jeu lors de la lipolyse (fig.6). À l'état basal, la périlipine est associée à CGI-58 à la surface de la GL. CGI-58 est le coactivateur d'ATGL. Ceci a un effet d'inhibition sur la lipolyse puisque ATGL, également située à la surface de la GL, ne peut être activée (Subramanian, Rothenberg et al. 2004; Yamaguchi, Omatsu et al. 2007). Lorsque la PKA phosphoryle la périlipine (sur 6 différents sites) CGI-58 est libéré, permettant l'activation d'ATGL. La PKA active également la HSL en la phosphorylant sur les résidus sérines 650 et 660. C'est ainsi

que HSL, située dans le cytoplasme, se lie à une protéine de liaison des AG (FABP) et se relocalise à la surface de la GL afin que la lipolyse commence (Egan, Greenberg et al. 1990). L'ATGL catalyse la première étape de la lipolyse, en transformant les triglycérides en diglycérides. C'est la HSL qui transforme ensuite ce nouveau composé en monoglycérides. Finalement, la MGL soluble catalyse la séparation entre l'AG restant et le squelette de glycérol (Bickel, Tansey et al. 2009).

La localisation appropriée des lipases est très importante pour que la lipolyse soit activée. Certaines protéines reliées aux GL délocalisent les lipases afin de favoriser le stockage des lipides. Par exemple, Listenberger *et al.* (2007) ont démontré, en surexprimant Plin2 dans plusieurs lignées cellulaires, une accumulation importante de TG reliée à la délocalisation d'ATGL. Plin2 est une protéine cytosolique qui est rapidement dégradée lorsqu'elle n'est pas associée à des lipides. Lorsque la quantité de lipides stockés augmente, Plin2 est stabilisée en se fixant sur les GL et peut ainsi stabiliser à son tour les lipides (Listenberger, Ostermeyer-Fay et al. 2007).

Un autre facteur important est la taille des GL. En effet, la présence de plusieurs petites gouttelettes permettra une plus grande surface de contact avec les lipases comparativement à de grosses gouttelettes. Par exemple, Cide a, Cide b et Cide c ont un rôle à jouer dans le rassemblement des petites GL en de grosses gouttelettes uniloculaires, diminuant le niveau de lipolyse et menant à l'accumulation de TG (Viswakarma, Yu et al. 2007; Matsusue, Kusakabe et al. 2008).

1.2.2.3 CIDE A, CIDE B ET CIDE C

Avant qu'on ne les découvre sur les GL, les protéines Cide ont été étudiées pour leur rôle dans l'apoptose. En effet, ces trois protéines partagent une séquence homologue au facteur de fragmentation de l'ADN de 45 kDa (DFF45) impliqué dans l'apoptose (Wu, Zhang et al. 2008). D'ailleurs, une surexpression de Cide a, Cide b ou de Cide c dans plusieurs lignées cellulaires humaines induit l'apoptose (Inohara, Koseki et al. 1998; Keller, Petrie et al. 2008).

Tableau 1 : Distribution et régulation de Cide a, Cide b et Cide c

Gène	Distribution		Régulation transcriptionnelle	
	Souris	Humain	Inducteur	Inhibiteur
Cide a	Tissu adipeux brun	Tissu adipeux blanc	SP1, SP3, PPAR α et γ , PGC1 α et β	RIP140
Cide b	Foie et reins	Foie et petit intestin	SP1, SP3 et HNF4 α	N/A
Cide c	Tissu adipeux brun	Tissu adipeux blanc	PPAR γ	N/A

N/A : non répertorié

Les trois Cide ont une distribution et une régulation différentes (Tableau 1). Chez les rongeurs, Cide a est principalement exprimée dans le tissu adipeux brun, alors que chez l'humain elle se retrouve dans le tissu adipeux blanc (Su, Cooke et al. 2002; Zhou, Yon Toh et al. 2003; Nordstrom, Ryden et al. 2005). L'expression basale du gène Cide a est régulée par méthylation de l'ADN via des sites SP1 et SP3. PPAR α , PGC1- α , PGC1- β et PPAR γ sont des inducteurs de CIDE a, alors que RIP140 inhibe l'induction de Cide a par PGC1- α (Viswakarma, Yu et al. 2007; Hallberg, Morganstein et al. 2008; Li, Da et al. 2008). Cide b, chez la souris, se retrouve majoritairement dans le foie et les reins, alors que chez l'humain on la retrouve dans le foie et dans le petit intestin (Chapman, Knight et al. 1984; Liang, Zhao et al. 2003). Tout comme pour Cide a, l'expression basale de Cide b est contrôlée par des sites SP1 et SP3. Cependant, le promoteur de Cide b contient un élément de réponse à HNF4 α (Da, Li et al. 2006). Cide c, chez la souris, est fortement exprimée dans les tissus adipeux brun et blanc alors que chez l'humain elle est surtout retrouvée dans le tissu adipeux blanc. Son expression est principalement régulée par PPAR γ (Gummeson, Jernas et al. 2007; Magnusson, Gummeson et al. 2008; Nishino, Tamori et al. 2008; Toh, Gong et al. 2008).

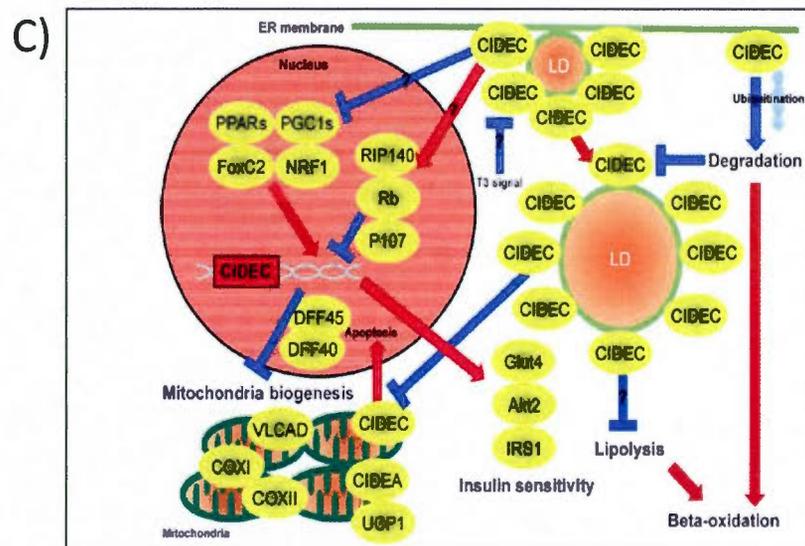


Figure 7 : Fonctions des protéines Cide a, b et c dans le métabolisme des lipides (Yonezawa, Kurata et al. 2011).

Cide a-c ont des rôles légèrement différents lorsqu'il s'agit du métabolisme des lipides. La figure 7 résume les principales fonctions des trois protéines. En résumé, Cide a, Cide b et Cide c ont toutes les trois la possibilité de mener à la formation de grosses gouttelettes lipidiques uniloculaires. Selon Yonezawa *et al.* (2011), les protéines Cide permettent la fusion des petites GL, diminuant la surface de contact entre les lipides et les lipases et diminuant ainsi le niveau de lipolyse. Cide a induit l'ubiquitination de la sous-unité AMPK β , menant à la dégradation protéasomale de tout le complexe AMPK. La dégradation de l'AMPK cause une activation de la lipogénèse (notamment via l'activation d'ACC) et une diminution de la β -oxydation, permettant une plus grande accumulation de lipides intracellulaires (Qi, Gong et al. 2008). Cide b, quant à elle, facilite la formation et la maturation des VLDL en liant l'apoB (Ye, Li et al. 2009). Elle semble également induire la lipogénèse, puisque des souris déficientes en Cide b ont un taux de lipogénèse inférieur aux souris WT (Li, Ye et al. 2007). Finalement, Cide c, en plus de son rôle dans la fusion des GL, pourrait avoir un rôle à jouer dans la biogénèse des mitochondries et dans la β -

oxydation. En effet, les souris déficientes en Cide c ont plus de mitochondries et subséquemment un plus haut taux de β -oxydation (Nishino, Tamori et al. 2008; Toh, Gong et al. 2008).

1.2.2.4 RÉGULATION DU MÉTABOLISME DES GOUTTELETTES LIPIDIQUES

La formation des GL est stimulée lorsque l'apport en AG augmente (lipogénèse et/ou AG alimentaires). L'accumulation de lipides stabilise les protéines associées aux GL qui à leur tour stabilisent les GL (Turro, Ingelmo-Torres et al. 2006; Kuerschner, Moessinger et al. 2008). À l'opposé, l'hydrolyse des GL est stimulée lorsque la demande en AG augmente (jeûne, effort physique). Ceci mène à la dégradation de plusieurs protéines associées aux GL, favorisant l'activation des lipases (Xu, Sztalryd et al. 2005; Masuda, Itabe et al. 2006; Turro, Ingelmo-Torres et al. 2006; Xu, Sztalryd et al. 2006; Kuerschner, Moessinger et al. 2008).

Au niveau moléculaire, PPAR γ est un récepteur nucléaire indispensable pour l'induction de l'adipogénèse dans le tissu adipeux. Lorsqu'il est activé, l'hétérodimère PPAR γ /RXR change de conformation, lui permettant de lier des coactivateurs et de se fixer sur l'élément de réponse à PPAR (PPRE) présent sur le promoteur de ses gènes cibles (Zoete, Grosdidier et al. 2007). Il augmente ainsi le stockage des lipides en induisant plusieurs gènes reliés à l'assimilation des AG (CD36), la formation et la maturation des GL et l'inhibition de la lipolyse (Plin2, Cide a et Cide c) (Tontonoz, Hu et al. 1994; Chawla, Boisvert et al. 2001; Rogue, Spire et al. 2010; Rogue, Lambert et al. 2011).

1.2.2.5 PPAR γ

PPAR γ est impliqué dans plusieurs mécanismes cellulaires. Par exemple, il induit l'adipogénèse, stimule l'ostéoclastogénèse et diminue l'inflammation en inhibant l'expression de plusieurs cytokines inflammatoires (Martin and Parton 2006; Wan, Chong et al. 2007; Tontonoz and Spiegelman 2008).

Il existe deux isoformes de PPAR γ , résultant de l'usage d'un promoteur alternatif : PPAR γ 1 est ubiquitaire, alors que PPAR γ 2 se retrouve principalement dans le tissu adipeux et à faible niveau dans d'autres tissus tels que le muscle et le placenta (Tontonoz, Hu et al. 1994; Tontonoz, Hu et al. 1994; Yu, Matsusue et al. 2003).

Tableau 2 : Régulation de l'expression et de l'activité de PPAR γ .

Facteurs qui influencent l'activité de PPARγ	
Facteurs de transcription inducteurs de PPAR γ	PPAR γ , SREBP-1c, C/EBP α , β et δ , KLF5, KLF15, ZFP3 et EBF1
Facteurs de transcription inhibiteurs de PPAR γ	KLF2 et GATA2 et 3
Coactivateurs	PGC-1 α , CBP/p300, famille des SRC et TRAP220
Corépresseurs	SMART, NCoR et RIP140
Ligands biologiques	PUFA,
Ligands synthétiques	Thiazolidinediones (rosiglitazone, pioglitazone, etc.)

Le niveau d'expression du gène de PPAR γ est régulé par de nombreux facteurs de transcription (Tableau 2). En effet, son expression est activée par SREBP-1c, C/EBP α , β et δ , KLF5, KLF15, ZFP3 et EBF1, alors qu'elle est réprimée par KLF2 et les protéines de liaison de GATA 2 et 3 (Fajas, Auboeuf et al. 1997; Darlington, Ross et al. 1998; Banerjee, Feinberg et al. 2003; Mori, Sakaue et al. 2005; Oishi, Manabe et al. 2005; Tong, Tsai et al. 2005; Rosen and MacDougald 2006; Gupta, Arany et al. 2010). Lorsqu'il est activé, PPAR γ lie son propre promoteur, induisant ainsi la transcription de son propre gène (Li, Xiao et al. 2010).

Pour jouer son rôle de facteur de transcription et se fixer sur les éléments de réponse à PPAR (PPRE) présents sur le promoteur de ses gènes cibles, PPAR γ doit former un hétérodimère avec RXR α et lier un de ses ligands (Zoete, Grosdidier et al. 2007; Tontonoz and Spiegelman 2008). Selon le ligand et le gène cible, différents corépresseurs (SMART, NCoR ou RIP140) ou coactivateurs (PGC-1 α , CBP/p300, famille des SRC et TRAP220) peuvent se lier au complexe RXR/PPAR γ (Debevec,

Christian et al. 2007). Parmi les ligands naturels de PPAR γ se trouvent l'AA et ses dérivés, dont les prostaglandines qui sont les plus forts activateurs naturels de PPAR γ (Forman, Tontonoz et al. 1995; Kliewer, Lenhard et al. 1995). Les AG polyinsaturés (PUFA) et les AG oxydés (provenant des LDL oxydés) l'activent également (Kliewer, Sundseth et al. 1997; Krey, Braissant et al. 1997; Nagy, Tontonoz et al. 1998). Il existe des activateurs synthétiques : les Thiazolidinediones (TZD). Ceux-ci sont fréquemment utilisés chez des gens diabétiques de type II ou résistants à l'insuline (Miles, Barak et al. 2003).

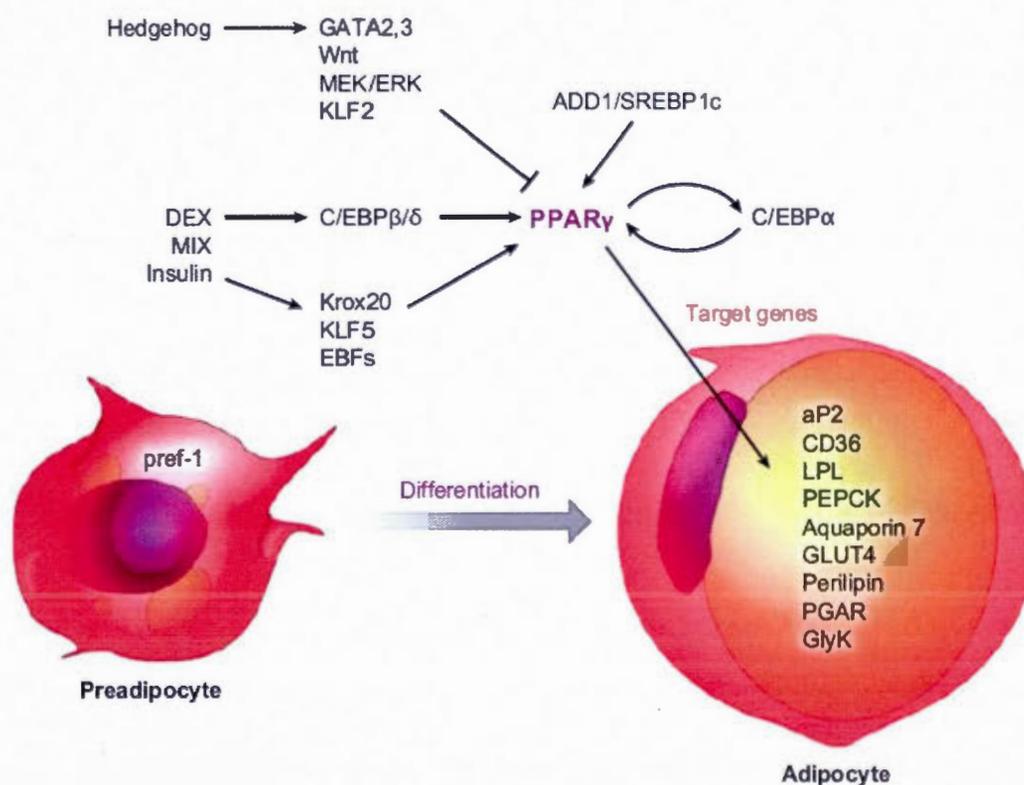


Figure 8 : Rôle de PPAR γ dans l'adipogenèse (Tontonoz and Spiegelman 2008).

Un des plus importants rôles de PPAR γ dans le métabolisme des lipides est son implication dans la différenciation adipocitaire. La figure 8 illustre les changements moléculaires induits par PPAR γ lors de la différenciation de pré-adipocytes en

adipocytes. Tout d'abord, une stimulation (généralement hormonale) de C/EBP mène à l'induction du gène PPAR γ qui à son tour sera activé par un de ses ligands. Il induira ainsi C/EBP α et plusieurs autres gènes cibles. L'induction de C/EBP α permet de maintenir l'expression de PPAR γ et d'amplifier l'activation du gène. Parmi les gènes cibles de PPAR γ se trouvent la LPL et CD36, permettant d'augmenter localement l'hydrolyse des lipoprotéines circulantes et l'entrée des AG dans l'adipocytes. Afin d'alimenter la lipogénèse, il y aura également une stimulation de la néoglucogénèse (notamment via l'enzyme PEPCK) et de l'entrée du glucose (notamment via le transporteur GLUT4). Le métabolisme des GL sera également amplifié puisque les gènes de la périlipin, Plin2, Cide a et Cide c seront induits. Ceci aura pour effet d'augmenter l'effort de stockage des lipides sous forme de GL et d'inhiber la lipolyse (Chawla, Boisvert et al. 2001; Rogue, Spire et al. 2010; Rogue, Lambert et al. 2011).

1.2.2.6 LES GOUTTELETTES LIPIDIQUES ET LA STÉATOSE HÉPATIQUE

Tout ce qui a la possibilité de diminuer l'activation des lipases ou d'empêcher leur co-localisation avec les GL est susceptible d'induire une stéatose hépatique. Il s'agit du rôle principal de plusieurs protéines associées aux GL. Plin2, par exemple, est un excellent candidat pour l'induction de la stéatose hépatique puisqu'il délocalise la lipase ATGL, inhibant la lipolyse. Il a été démontré que la surexpression de plin2 dans des cellules embryonnaires de reins (HEK293) cause une accumulation de TG sous forme de GL (Listenberger, Ostermeyer-Fay et al. 2007). À l'inverse, Imai *et al.* (2007) ont inhibé l'expression de plin2 dans le foie de souris ob/ob et dans le foie de souris souffrant de stéatose hépatique induite par une HFD. Cette inhibition a permis de faire régresser la stéatose.

Les protéines Cide a-c peuvent également contribuer à la stéatose hépatique. Cide c est la protéine qui a été la plus étudiée en lien avec une accumulation de TG. Tout d'abord, Keller *et al.* (2008) ont surexprimé Cide c dans des cellules 293T et des cellules 3T3-L1 différenciées en adipocytes. Chez les deux lignées, une accumulation

spontanée de TG a été observée, associée à une diminution de l'oxydation des AG. Au niveau hépatique, Matsusue *et al.* (2008) ont observé un haut niveau d'expression de Cide c chez des souris ob/ob souffrant de stéatose hépatique. En utilisant un adénovirus contenant un shRNA de Cide c, ils ont réussi à diminuer significativement la quantité de TG. À l'opposé, des souris KO pour Cide a, Cide b et Cide c ont été générées dans différents laboratoires. Les trois lignées de souris ont un phénotype similaire : les souris sont minces et résistantes à l'obésité induite par une diète riche en gras. Ces caractéristiques sont associées à la fragmentation des GL, à une augmentation de l'activité métabolique et à une augmentation de la sensibilité à l'insuline (Zhou, Yon Toh *et al.* 2003; Li, Ye *et al.* 2007; Nishino, Tamori *et al.* 2008; Toh, Gong *et al.* 2008). Ces phénotypes rappellent une fois de plus que les protéines Cide favorisent le stockage des lipides et qu'une mauvaise régulation de leur expression peut causer des troubles métaboliques tels que la stéatose hépatique.

Au niveau des régulateurs du stockage des lipides, PPAR γ représente une menace pour l'homéostasie hépatique. Lorsqu'il est activé dans le tissu adipeux, PPAR γ a un effet bénéfique pour tout l'organisme. En effet, il favorise la sensibilisation à l'insuline en détoxifiant l'organisme des AG en circulation et en induisant le gène de l'adiponectine (Song, Gao *et al.* 2010). Le foie n'est pas conçu pour accumuler une grande quantité de lipides, donc une sur-activation de PPAR γ au niveau hépatique peut causer une stéatose (Gavrilova, Haluzik *et al.* 2003).

Yu *et al.* (2003) ont surexprimé PPAR γ 1 dans le foie de souris PPAR α KO via un adénovirus. Ils ont observé l'apparition d'une stéatose hépatique reliée à une augmentation de la quantité de GL et à une stimulation de la lipogenèse. À l'inverse, une ablation de PPAR γ chez les souris ob/ob et des souris lipoatrophiques (souris AZIP) permet de faire régresser la stéatose hépatique (Gavrilova, Haluzik *et al.* 2003; Matsusue, Haluzik *et al.* 2003).

Bien que seul l'isoforme 1 soit exprimé dans le foie des souris de type sauvage, il arrive parfois que la stéatose hépatique induise PPAR γ 2. Par exemple, chez les souris ob/ob et apoB/BATless (qui expriment l'apoB humaine et n'ont pas de

tissu adipeux brun), il y a présence de PPAR γ 2. La stéatose hépatique qui apparaît normalement chez ces souris est associée à une augmentation de la lipogenèse hépatique et à l'accumulation de GL. Une ablation de PPAR γ 2 dans le foie de ces souris diminue la quantité de TG stocké et inhibe la lipogenèse (Rahimian, Masih-Khan et al. 2001; Matsusue, Haluzik et al. 2003; Zhang, Hernandez-Ono et al. 2006). Il est intéressant de noter que dans tous ces modèles, un lien étroit existe entre la lipogenèse et le métabolisme des GL.

1.2.3 SYNTHÈSE DE NOVO DES ACIDES GRAS

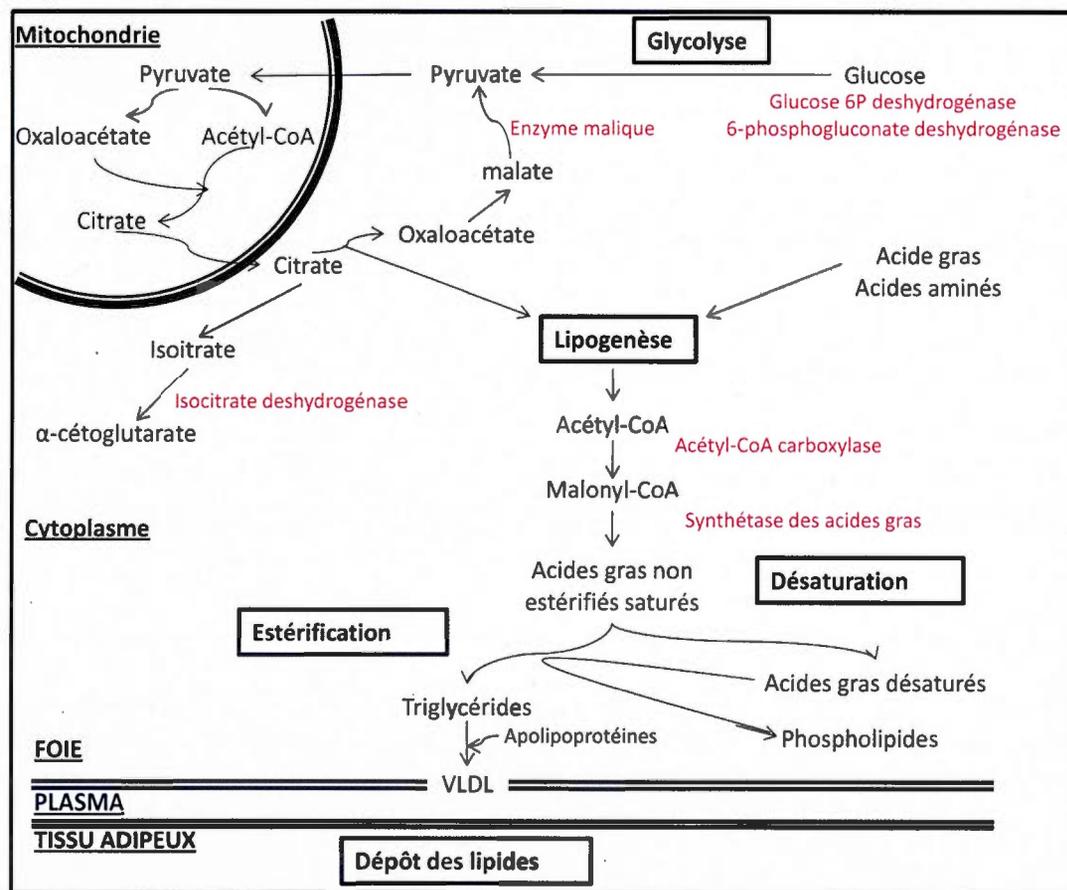


Figure 9 : Enzymes impliqués dans la lipogenèse.

Le tissu adipeux et le foie synthétisent des AG *de novo*, ce qu'on appelle la lipogénèse (fig. 9). Une augmentation importante de la synthèse *de novo* peut mener à une accumulation intracellulaire de lipides, pouvant causer une stéatose hépatique.

1.2.3.1 LES ENZYMES LIPOGÉNIQUES

Le substrat principal de la lipogénèse est l'acétyl-CoA provenant de la glycolyse. Dans la première étape de la lipogénèse, l'acétyl-CoA est carboxylé en malonyl-CoA par l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) (Tong and Harwood 2006). Il existe deux isoformes d'ACC : ACC1 qui est retrouvée principalement dans les tissus lipogéniques (foie et tissu adipeux) et ACC2 qui est surtout exprimée dans les tissus oxydatifs (cœur, muscle et faiblement dans le foie) (Abu-Elheiga, Almarza-Ortega et al. 1997). La raison de cette distribution est que le malonyl-CoA produit par ACC1, au niveau du cytosol, sert à alimenter la lipogénèse, alors que celui produit par ACC2, au niveau des mitochondries, sert à inhiber CPT1, l'enzyme limitant de la β -oxydation (Ha, Lee et al. 1996; McGarry and Brown 1997).

Pour la deuxième étape de la lipogénèse, la FAS utilise le malonyl-CoA (donneur de carbone) produit par ACC1, une molécule de NADPH (agent réducteur) et une molécule d'acétyl-CoA pour former de l'acide palmitique, un AG à 16 carbones (C16 :0). L'acide palmitique peut également être converti en acide stéarique (C18 :0) par les élongases (Chirala and Wakil 2004). C'est ensuite la stéaroyl-CoA désaturase (SCD) qui prend en charge la réaction pour former de l'acide pamtoleique (C16 :1n-7) à partir de l'acide palmitique ou encore former de l'acide oléique (C18 :1n-9) à partir d'acide stéarique (Heinemann and Ozols 2003). La lipogénèse terminée, les différents AG formés pourront être transformés par les différentes élongases et désaturases en PUFA (Jakobsson, Westerberg et al. 2006).

Afin d'éviter l'effet lipotoxique des AG, ces derniers sont transformés en TG par une glycérol-P-acyltransférase. Ils peuvent ensuite être utilisés par la MTP pour former des VLDL ou encore ils peuvent être stockés dans des gouttelettes lipidiques (Schlossman and Bell 1976).

1.2.3.2 LA RÉGULATION DE LA LIPOGÉNÈSE

La régulation de la lipogénèse se fait à la fois au niveau de la transcription des gènes lipogéniques et au niveau de l'activation de différentes enzymes. L'activation d'ACC est primordiale pour permettre la lipogénèse, puisque c'est l'enzyme qui débute la réaction enzymatique, mais la FAS est l'enzyme limitant, car elle ne possède qu'une isoforme. ACC est principalement régulée par phosphorylation. En fait, elle est activée lorsqu'elle n'est pas phosphorylée. La protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) est reconnue comme étant un puissant inhibiteur de l'ACC, via la phosphorylation d'ACC1 sur la Ser79 ou d'ACC2 sur la Ser222 (Ha, Daniel et al. 1994).

FAS, quant à elle, est régulée au niveau transcriptionnel. Le niveau d'expression de FAS augmente en présence d'insuline, de triiodothyronine et de glucose, alors qu'il diminue en présence de glucagon, d'AG à moyenne chaîne et de PUFA (Paulauskis and Sul 1989; Blake and Clarke 1990; Stapleton, Mitchell et al. 1990; Joseph, Laffitte et al. 2002; Dentin, Benhamed et al. 2005; Teran-Garcia, Adamson et al. 2007; Akpa, Point et al. 2010).

Plusieurs facteurs de transcription induisent l'expression des gènes lipogéniques (ACC, SCD1, FAS et Dgat). SREBP-1, ChREBP et LXR α sont les trois plus importants.

Il existe trois isoformes de SREBP : SREBP-1c qui est principalement exprimé dans le foie et SREBP-1a et SREBP-2 qui sont exprimés de façon constitutive. Alors que les isoformes 1a et 2 sont impliqués dans le métabolisme du cholestérol, SREBP-1c induit l'expression de plusieurs gènes lipogéniques, tels qu'ACC, FAS, SCD1, ELOV6, Δ 6-désaturase et Δ 5-désaturase (Shimano, Horton et al. 1997; Matsuzaka, Shimano et al. 2002; Nara, He et al. 2002; Mauvoisin, Rocque et al. 2007; Kumadaki, Matsuzaka et al. 2008; Raghov, Yellaturu et al. 2008).

Le récepteur nucléaire LXR a lui aussi un rôle à jouer dans la lipogénèse et dans le métabolisme du cholestérol. Il en existe deux isoformes: LXR α qui est

principalement exprimé dans le foie et LXR β qui est exprimé de façon ubiquitaire (Repa and Mangelsdorf 2000). Lorsqu'un agoniste se lie au complexe LXR/RXR (généralement un oxystérol : 24 (S), 25-epoxycholesterol, 22(R)-, 24(S)- et 27-hydroxycholesterol), un changement de conformation permet le recrutement de coactivateurs tels que SRC-1, Grip1 et PGC-1 α . Il augmente ainsi la lipogenèse en induisant la transcription des gènes lipogéniques SREBP1, ChREBP, FAS, ACC et SCD1 et il augmente le transport inverse du cholestérol en induisant la transcription d'ACBA1, de CYP7A1, d'ABCG1 et de l'apoE (Glass and Rosenfeld 2000; Joseph, Laffitte et al. 2002; Liang, Yang et al. 2002; Chu, Miyazaki et al. 2006; Peng, Hiipakka et al. 2008).

Finalement, ChREBP induit lui aussi la lipogenèse, mais également la glycolyse. Activé par le glucose, ChREBP est transloqué du cytoplasme au noyau et se lie aux éléments de réponse aux hydrates de carbone présents sur le promoteur de ses gènes cibles. ACC, FAS, SCD1 et ELOVL6 font partie des gènes lipogéniques induits par ChREBP (Iizuka, Bruick et al. 2004; Ma, Robinson et al. 2006).

1.2.3.3 LA LIPOGÈNE ET LA STÉATOSE HÉPATIQUE

La stéatose hépatique est fréquemment associée à une augmentation de la synthèse *de novo* des AG. En effet, ceci mène à une accumulation de TG sous forme de gouttelettes lipidiques. Si le foie ne compense pas en augmentant le taux d'exportation des VLDL ou le niveau d'oxydation des AG, il s'engorge de lipides (Sozio, Liangpunsakul et al. 2010).

Pour étudier la stéatose hépatique, plusieurs groupes de recherche ont eu recours à des modèles de souris KO pour certains gènes de la lipogenèse. Le rôle de ces enzymes peut être vérifié en soumettant ces souris à une diète riche en gras (HFD) ou en sucre (HCD). Alors que des modèles de souris KO pour les gènes ACC (spécifiquement au niveau du foie) et SCD1 protègent les souris contre la stéatose hépatique, les souris dont le gène hépatique de la FAS a été inhibé développent plus rapidement la stéatose hépatique que les souris WT lors d'une HFD. Ce résultat

provient du fait que l'absence de FAS cause une accumulation de malonyl-CoA (produit par ACC), inhibant la β -oxydation (Chakravarthy, Pan et al. 2005).

Une délétion totale d'ACC1 est létale et donc ne peut être étudiée chez des animaux. Cependant, une délétion spécifique d'ACC1 au niveau du foie a été réalisée. Ceci cause une diminution de 50 % de la lipogénèse résultant en 40 % moins de TG hépatiques comparativement aux souris WT. Ces souris ne sont pas résistantes à la stéatose hépatique, car il semblerait qu'ACC2 compense l'absence d'ACC1. Cependant, l'utilisation d'oligonucléotides antisens inhibiteurs d'ACC1 et d'ACC2 ont permis aux souris de développer une résistance à l'induction de la stéatose hépatique par une HFD (Mao, DeMayo et al. 2006; Savage, Choi et al. 2006).

Pour ce qui est de SCD1, l'effet protecteur contre la stéatose hépatique proviendrait d'une diminution de la lipogénèse et d'une augmentation de la β -oxydation, associées à une diminution du niveau d'expression des facteurs de transcription SREBP-1c et ChREBP (Miyazaki, Flowers et al. 2007).

L'effet de l'inhibition de SREBP-1c, LXR et ChREBP sur la stéatose hépatique a également été étudié chez des modèles murins. Le croisement de souris déficientes en leptine (ob/ob) avec des souris KO SREBP-1c a permis de diminuer le niveau d'expression des enzymes lipogéniques et donc de ralentir la progression de la stéatose hépatique. Ce ralentissement est associé à une diminution de la quantité de TG via une diminution de l'expression des gènes FAS et SCD1 (Yahagi, Shimano et al. 2002).

La même méthode a été utilisée dans le but d'étudier ChREBP. Des ARN interférents contre ChREBP ont été utilisés via un adénovirus chez des souris ob/ob. La diminution de l'expression de ChREBP a permis de diminuer la lipogénèse hépatique, résultant en 50 % moins de TG hépatiques et circulants. La β -oxydation est également augmentée et la voie de signalisation de l'insuline est partiellement rétablie au niveau hépatique (Dentin, Benhamed et al. 2006).

Finalement, les souris double mutantes LXR α /LXR β KO sont résistantes à l'obésité induite par une HFD et n'accumulent pas de TG au niveau hépatique. Cette

protection contre l'accumulation de TG est associée à une diminution de l'expression de SREBP-1c, FAS et SCD1. Cependant, ces souris développent une accumulation systémique de cholestérol puisque le transport inverse du cholestérol est diminué en absence de LXR (Kalaany, Gauthier et al. 2005).

Tous ces modèles de souris ont permis de démontrer l'importance de la régulation de l'expression des gènes lipogéniques hépatique, mais aussi des facteurs de transcription capables d'induire la lipogenèse.

1.2.4 LE MÉTABOLISME DU GLUCOSE

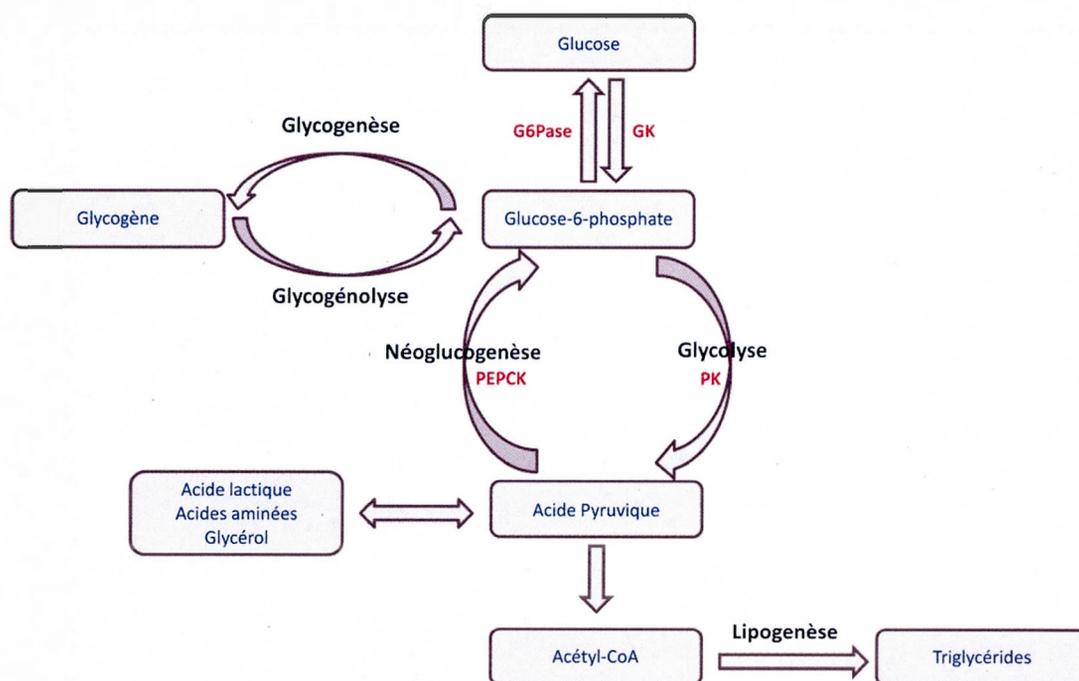


Figure 10 : Métabolisme du glucose hépatique

Le foie a une influence sur tout l'organisme en ce qui concerne le métabolisme du glucose (fig. 10). En effet, pour maintenir un taux de sucre sanguin adéquat, il a non seulement la possibilité de stocker le glucose sous forme de glycogène (glycogénèse), mais il a également la possibilité d'en produire en

dégradant du glycogène (glycogénolyse) ou en produisant *de novo* du glucose (néoglucogenèse) (Pilkis and Granner 1992; Nordlie, Foster et al. 1999). Le glucose est ensuite exporté ou encore il est utilisé dans la glycolyse pour former de l'énergie. Puisque l'acétyl-CoA provenant de la glycolyse peut alimenter la lipogenèse, une mauvaise régulation du métabolisme du glucose hépatique peut mener à l'accumulation de TG (Iritani, Nishimoto et al. 1992).

Lorsque le taux de sucre sanguin augmente, de l'insuline est produite par le pancréas. Afin de rétablir l'équilibre, le glucose et l'insuline induisent plusieurs changements dans les hépatocytes. En effet, le transporteur de glucose hépatique GLUT2 est activé par le glucose, permettant une augmentation de l'assimilation du glucose par les hépatocytes. De plus, l'insuline augmente la glycogénèse et la glycolyse via l'activation des enzymes glycolytiques 6-phosphofructo-2-kinase (6-PF-2-K) et pyruvate kinase (PK) (Assimacopoulos-Jeannet and Jeanrenaud 1990; Waeber, Thompson et al. 1996). L'insuline réduit également la néoglucogenèse via l'inhibition des gènes PEPCCK et G6Pase (O'Brien and Granner 1996). Si, au contraire, le taux de sucre est sous la normale, du glucagon est sécrété par le pancréas, résultant en une activation de la glycogénolyse et de la néoglucogenèse, associée à l'activation des gènes PEPCCK et G6Pase (Pilkis and Granner 1992).

1.2.4.1 LE MÉTABOLISME DU GLUCOSE ET LA STÉATOSE HÉPATIQUE

Une alimentation riche en sucre a plusieurs répercussions sur l'organisme. En plus de conduire à la résistance à l'insuline et à l'obésité, elle peut mener à la stéatose hépatique. L'excès de glucose sera capté par le foie via le récepteur GLUT2 et sera stocké sous forme de glycogène ou hydrolysé via la glycolyse. L'acétyl-CoA produit par la glycolyse pourra être utilisé pour alimenter la lipogenèse. Ainsi, des TG seront emmagasinés dans le foie (Iritani, Nishimoto et al. 1992).

La résistance à l'insuline (systémique) précède souvent la stéatose hépatique, accélérant l'accumulation de lipides intra-hépatiques. En effet, puisque le foie ne répond plus adéquatement à l'insuline, la glycogénolyse et la néoglucogenèse ne sont

pas efficacement inhibées, alors que la lipogenèse est stimulée. Ainsi, une grande quantité de glucose est produite par le foie, alimentant la lipogenèse en acétyl-CoA (Michael, Kulkarni et al. 2000; Klover and Mooney 2004). De plus, la lipolyse au niveau du tissu adipeux n'est pas adéquatement contrôlée (inhibée), donc la quantité d'AG circulants augmente et le foie capte une partie de ces AG (Cusi 2009).

Michael *et al.* (2000) ont produit des souris KO pour le récepteur à l'insuline spécifiquement au niveau du foie. Ces souris souffrent d'hyperglycémie, d'intolérance au glucose et de résistance à l'insuline. La néoglucogenèse hépatique est également stimulée, associée à une augmentation de l'expression de PEPCCK et de G6Pase. La glycolyse, quant à elle, est inhibée via une diminution de l'expression du gène L-PK. Vers l'âge de 6 mois, ces souris démontrent une accumulation significative de lipides au niveau hépatique (Michael, Kulkarni et al. 2000).

1.2.5 OXYDATION DES ACIDES GRAS

Le rôle primaire des AG est de fournir de l'énergie aux cellules. Pour ce faire, les AG sont catabolisés via la β -oxydation mitochondriale. Le muscle, le foie et le tissu adipeux sont les trois tissus dans lesquels la β -oxydation est très active.

1.2.5.1 LA β -OXYDATION

L'étape limitant de la β -oxydation mitochondriale est l'importation des AG à l'intérieur de la mitochondrie. Pour permettre aux AG d'entrer dans la mitochondrie, quatre étapes sont nécessaires (fig. 11). Premièrement, l'AG est estérifié avec la coenzyme A par la synthétase d'acyl-CoA à longue chaîne (LCAS) qui est située sur la membrane externe de la mitochondrie. Ensuite, la carnitine palmitoyl-transférase I (CPT-I) transforme ce nouveau produit en acyl-carnitine via une trans-estérification. La troisième étape consiste en le co-transport de l'acyl-carnitine et d'une molécule de carnitine jusqu'à la matrice mitochondriale par la translocase de carnitine/acyl-carnitine (CACT). Finalement, la carnitine palmitoyltransférase II (CPT-II) inverse

la réaction faite par CPT-I en transformant l'acyl-carnitine en acyl-CoA (Kerner and Hoppel 2000).

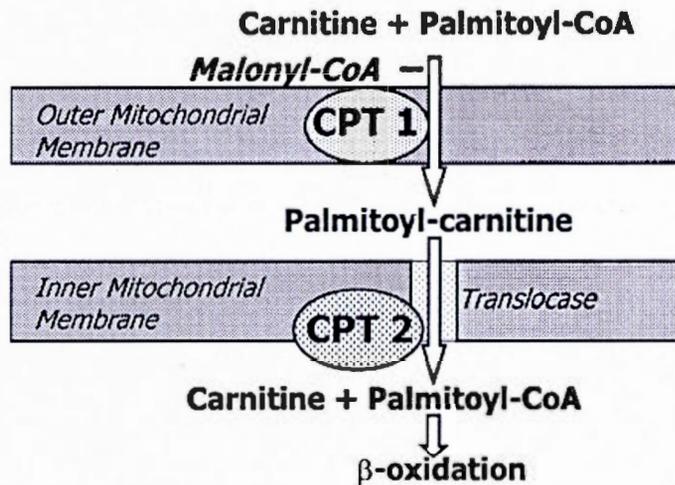


Figure 11 : Entrée des acides gras dans la mitochondrie (Winder 2001).

Une fois dans la mitochondrie, l'acyl-CoA peut subir la β -oxydation qui comporte quatre réactions séquentielles : la production d'enoyle-CoAs, la transformation des enoyle-CoA en L-3-hydroxyacyl-CoAs, puis en 3-cetoacyl-CoAs et finalement en acetyl-CoA condensés (fig. 12) (Uchida, Izai et al. 1992; Yang, He et al. 2005; Guillou, Martin et al. 2008).

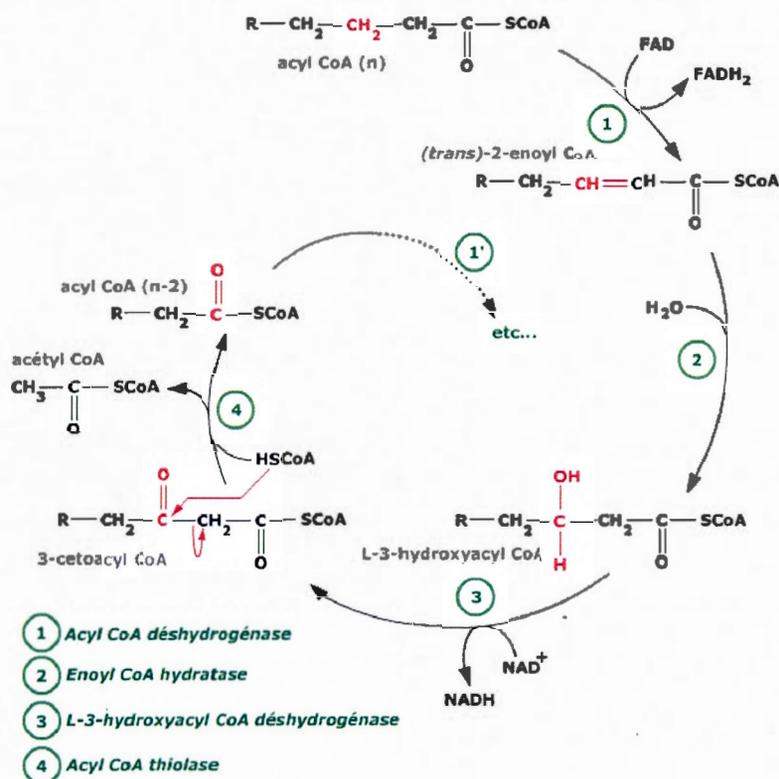


Figure 12 : Schématisation de la β -oxydation.

(http://wwwarpe.snv.jussieu.fr/coursvt/images_8/figure_4.html)

1.2.5.2 RÉGULATION DE L'OXYDATION DES AG

Pour ce qui est de la régulation de l'oxydation des AG, PPAR α est sans doute le facteur de transcription le plus influent. Il s'agit d'un récepteur nucléaire qui est principalement exprimé dans les tissus ayant un fort niveau de catabolisme des AG, tels que le foie, le cœur, les muscles squelettiques, les reins et le tissu adipeux brun (Desvergne and Wahli 1999). Lorsqu'il est activé par des AGLC saturés ou par des PUFA, il forme un hétérodimère avec RXR et se lie au promoteur de ses gènes cibles. Il induit ainsi la transcription de gènes impliqués dans l'oxydation des AG, tels que CPT-I, CPT-II et LCAS (Mandard, Muller et al. 2004).

L'AMPK a également un rôle important à jouer dans la régulation de la β -oxydation. Comme il a été énoncé précédemment, un puissant inhibiteur de la β -

oxydation est le malonyl-CoA. Ce produit de l'enzyme ACC2 inhibe CPT-I, empêchant l'entrée des AG dans la mitochondrie (McGarry and Brown 1997). Ainsi, lorsque la lipogenèse est activée, ACC2 n'est généralement pas phosphorylée, ce qui lui permet de produire du malonyl-CoA et ainsi de réduire le niveau de β -oxydation mitochondriale et de renforcer le stockage des lipides. Pour contrôler le niveau d'activité d'ACC2, l'AMPK peut la phosphoryler sur la Ser222, causant son inhibition et augmente donc la β -oxydation et diminue la lipogenèse.

1.2.5.3 LA β -OXYDATION ET LA STÉATOSE HÉPATIQUE

La β -oxydation est un mécanisme indispensable pour les hépatocytes. En plus de son rôle primaire qui est de fournir de l'énergie aux cellules, elle permet de diminuer la quantité de lipides stockés en surplus dans le foie, lorsque l'apport en AG est trop important.

Plusieurs facteurs peuvent mener à une diminution de l'oxydation des AG et causer une stéatose hépatique. La cause la plus fréquente provient d'une augmentation de la quantité de malonyl-CoA au niveau de la mitochondrie, ayant pour effet d'inhiber CPT1 et donc de causer un ralentissement de l'entrée des AG dans la mitochondrie (Ha, Lee et al. 1996; McGarry and Brown 1997). Une diminution du niveau d'expression ou de l'activité d'enzymes impliqués dans l'oxydation des AG peut également mener à la stéatose hépatique. C'est ce qui a été rapporté par Ibdah *et al.* (2005) lorsqu'ils ont étudié des souris hétérozygotes pour une perte de fonction de la protéine mitochondriale trifonctionnelle, qui est impliquée dans l'oxydation mitochondriale des AG. Certains facteurs de transcriptions peuvent aussi être impliqués dans le développement de la stéatose. En effet, les souris KO pour le gène de PPAR α développent une stéatose hépatique, due à une diminution de la β -oxydation (Ip, Farrell et al. 2004).

À l'opposé, plusieurs cas de stéatose hépatique ont été améliorés à l'aide d'activateurs synthétiques de PPAR α ou de l'AMPK. Par exemple, le fibrates, un agoniste connu de PPAR α , permet de diminuer le stockage hépatique des lipides

provenant de sources ectopiques en augmentant le niveau d'oxydation des AG (Yki-Jarvinen 2004). Le metformin, quant à lui, permet d'augmenter l'activité de la β -oxydation via l'activation de l'AMPK. Ceci permet d'inhiber la lipogenèse (ACC1, ACC2) et donc de restaurer l'activité de CPT1 (Winder 2001).

1.2.6 RÔLE DE L'AMPK DANS LA STÉATOSE HÉPATIQUE

L'AMPK a comme rôle de rétablir le ratio AMP-ATP lorsque celui-ci est perturbé. Pour ce faire, elle phosphoryle plusieurs protéines cibles, menant à la modulation de leur activité. Elle phosphoryle également des facteurs de transcription, influençant le niveau d'expression de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme énergétique (fig. 13) (Hardie 2004; Viollet, Athes et al. 2009).

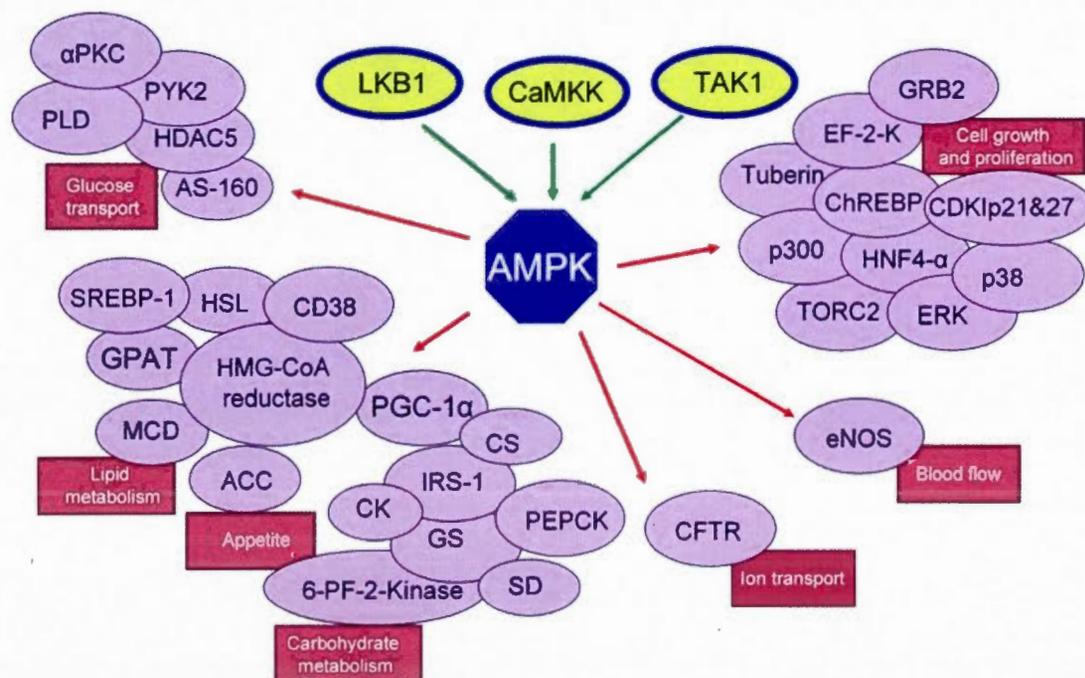


Figure 13 : Voies métaboliques régulées par l'AMPK (Gruzman, Babai et al. 2009).

L'AMPK est composée de trois sous-unités : α , qui est l'unité catalytique, β et γ , qui sont les sous-unités régulatrices. Chacune des sous-unités est représentée par

deux ou trois isoformes ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$) (Kahn, Alquier et al. 2005). Dans le foie, les deux isoformes catalytiques AMPK $\alpha 1$ et AMPK $\alpha 2$ sont présents. Il a été démontré que l'AMPK composée de la sous-unité $\alpha 1$ est prédominante dans le cytoplasme des hépatocytes, alors que celle qui contient la sous-unité $\alpha 2$ se retrouve également dans le noyau. Il se pourrait donc que chaque complexe ait des cibles différentes, selon les besoins énergétiques de la cellule (Cheung, Salt et al. 2000; Hallows, Kobinger et al. 2003; Evans, Mustard et al. 2005; Viollet, Foretz et al. 2006; Jager, Handschin et al. 2007).

L'AMPK peut être activée de trois façons : la liaison d'AMP sur la sous-unité γ permet un changement de conformation qui active faiblement la protéine (Hardie 2004). Ce changement de conformation permet une deuxième forme d'activation, beaucoup plus forte cette fois-ci, via la phosphorylation de la Thr172 de la sous-unité α par des kinases telles que la LKB1, la CAMKKII β et la TAK1 (Shaw, Kosmatka et al. 2004; Hawley, Pan et al. 2005; Kahn, Alquier et al. 2005; Momcilovic, Hong et al. 2006). La troisième source d'activation provient de ce même changement de conformation, qui protège l'AMPK contre la déphosphorylation par la protéine phosphatase 2Ca (Davies, Helps et al. 1995). Les AG à longue chaîne (AGLC) ont également un impact sur l'activation de l'AMPK. En effet, ces derniers causent une diminution du ratio ATP/AMP et activent LKB1 qui à son tour active l'AMPK. Une augmentation de la quantité d'AGLC au niveau du foie mène donc à une activation de la β -oxydation et à une diminution de la lipogenèse et de la néoglucogenèse via l'activation de l'AMPK et de PPAR α (Za'tara, Bar-Tana et al. 2008).

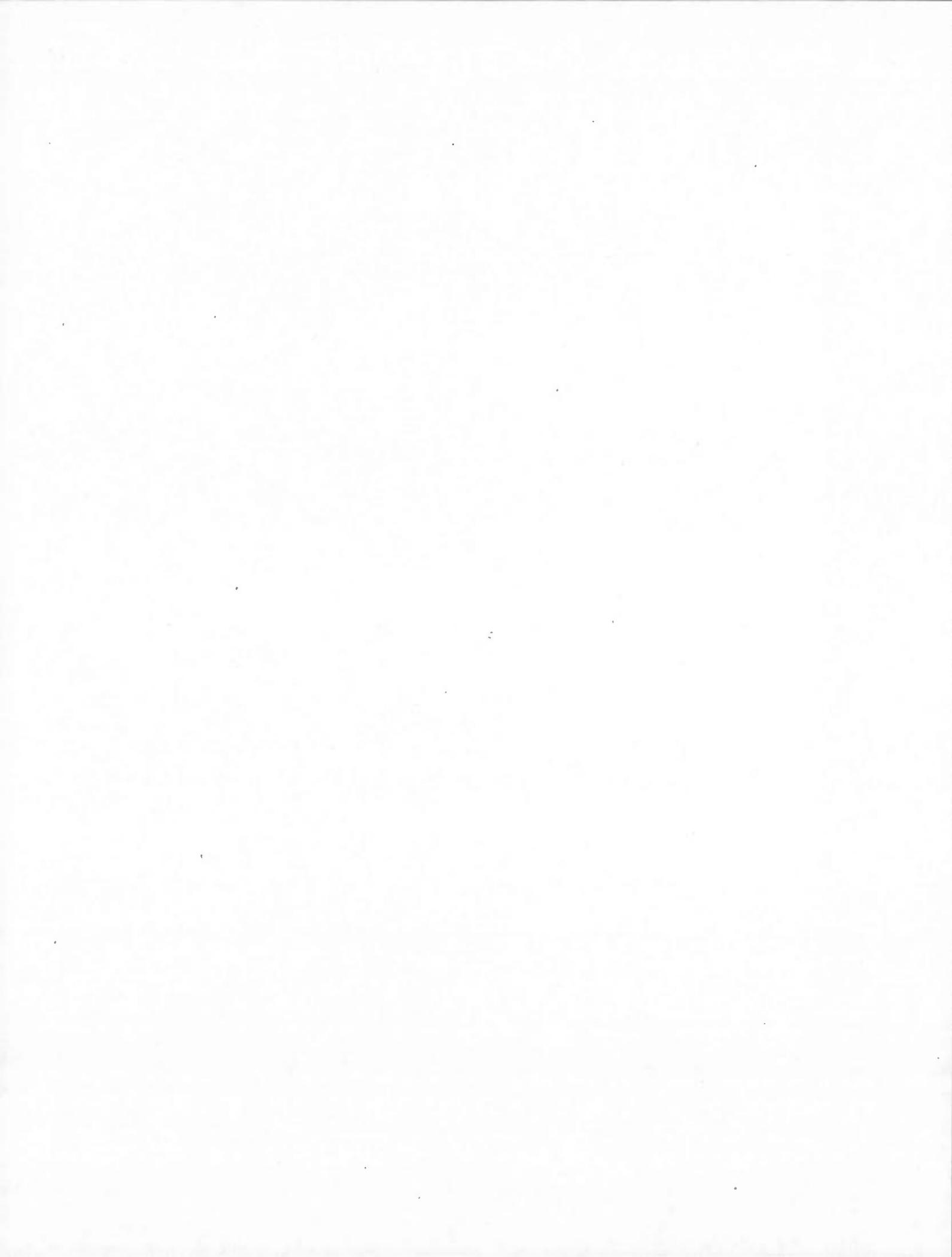
Dans le foie, l'activation de l'AMPK ($\alpha 1$ et/ou $\alpha 2$) provoque la stimulation de la β -oxydation par l'augmentation de la biosynthèse des mitochondries et par l'activation de CPT-I (Foretz, Ancellin et al. 2005; Baur, Pearson et al. 2006). Ceci induit aussi une diminution de la lipogenèse *de novo* par une inhibition de SREBP-1c et d'ACC1 et 2 (Dentin, Benhamed et al. 2005; Foretz, Ancellin et al. 2005; Viollet, Athea et al. 2009; Li, Xu et al. 2011). Finalement, le métabolisme du glucose est également affecté par une diminution de la néoglucogenèse associée à une diminution

du niveau d'expression des gènes PEPCK et G6Pase (Foretz, Ancellin et al. 2005). L'activation de l'AMPK est donc indispensable pour empêcher l'accumulation de lipides hépatiques.

L'AMPK α 2 joue un rôle important dans la balance entre la synthèse des AG et leur oxydation, puisque sa surexpression dans le foie cause une diminution de la quantité de TG hépatiques et circulants et une augmentation de la quantité de corps cétoniques, indiquant une augmentation de l'oxydation des AG (Foretz, Ancellin et al. 2005). En fait, Foretz *et al.* (2005) ont démontré qu'une surexpression de l'isoforme AMPK α 2 dans le foie de souris cause une diminution de l'expression des gènes lipogéniques ACC-1, ACC2, FAS, SCD1 et des facteurs de transcription SREBP-1 et ChREBP, les protégeant contre la stéatose hépatique. Le métabolisme du cholestérol est également inhibé, avec une diminution de l'expression des gènes qui codent pour le LDLr et l'HMG-CoA synthase. On observe également une diminution significative de l'expression des gènes PEPCK et G6Pase et du transporteur de glucose GLUT2, diminuant l'entrée du glucose dans les hépatocytes et inhibant la néoglucogenèse. Tous ces changements ont donc un effet protecteur contre la stéatose hépatique.

1.3 OBJECTIF

L'objectif de ce projet de maîtrise est de caractériser les mécanismes moléculaires associés à l'accumulation de triglycérides dans le foie de souris transgéniques qui surexpriment l'apoD humaine.



CHAPITRE II

ARTICLE SCIENTIFIQUE

Transgenic mice overexpressing apolipoprotein D Develop Hepatic Steatosis through activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma

*Marilyne Labrie, Marc-André Desnoyers, Ouafa Najib, Catherine Mounier and Eric Rassart**

Centre de recherche BioMed, Département des Sciences Biologiques, Université du Québec, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8

* Corresponding author: Département des Sciences Biologiques and Centre de recherche BioMed, Université du Québec à Montréal, Case Postale 8888 Succursale Centre-ville, Montréal, QC, H3C-3P8, Canada. Phone: 1 514 987 3000 ext 3953. Fax: 514 9874647. E-mail: rassart.eric@uqam.ca

2.1 Abstract

Transgenic mice (Tg) overexpressing human apolipoprotein D (apoD) in the brain are resistant to neurodegenerescence, but suffer from hepatic and muscular steatosis, glucose intolerance and insulin resistance. The goal of this study was to characterize the molecular mechanisms associated with the apparition of hepatic steatosis in these apoD Tg mice. Our study revealed a 2-fold increased of PPAR γ in the liver of the Tg mice compared to wild type. Consequently, PPAR γ target genes CD36, Plin2 and Cide a and c are overexpressed, leading to increased lipid droplets formation and stabilization and suggesting that that fatty acid uptake is also increased. As a compensatory mechanism, AMPK is activated, increasing the phosphorylation of acetyl CoA carboxylase and probably inhibiting lipogenesis. Gluconeogenic genes are downregulated while expression of carnitine palmityl transferase 1, the limited enzyme of beta-oxydation, is upregulated. In HepG2 cells overexpressing apoD, arachidonic acid (AA), the main ligand of ApoD, increased the transcriptional activity of PPAR γ . This strongly suggests that the hepatic steatosis observed in apoD Tg mice is a consequence of an increase of AA stabilization by apoD in cells leading to increase PPAR γ expression and activation.

Key words: Apolipoprotein D, PPAR γ , arachidonic acid, lipid droplets,

2.2 Introduction

Apolipoprotein D (apoD) is a 29 kDa protein that is member of the lipocalin super family (Drayna, McLean et al. 1987). It transports several small hydrophobic compounds such as arachidonic acid (AA), progesterone, pregnenolone, bilirubin, cholesterol and E-3-methyl-2-hexenoic acid (Dilley, Haagensen et al. 1990; Peitsch and Boguski 1990; Morais Cabral, Atkins et al. 1995; Zeng, Spielman et al. 1996; Patel, Lange et al. 1997; Terrisse, Marcoux et al. 2001). In human, apoD is found in the plasma fraction, associated with HDL. It is highly expressed in the brain, adrenal glands, kidneys, pancreas and placenta but poorly expressed in the intestine and the liver (McConathy and Alaupovic 1973; McConathy and Alaupovic 1976; Drayna, Fielding et al. 1986; Drayna, McLean et al. 1987). In mice, apoD gene is almost exclusively expressed in the central nervous system (Seguin, Desforges et al. 1995; Cofer and Ross 1996).

Our laboratory has previously shown that transgenic mice (Tg) overexpressing human apoD (H-apoD) in the brain are resistant to oxidative stress induced by Paraquat, a neurotoxic chemical agent (Ganformina, Do Carmo et al. 2008). These Tg mice also survive better than wild-types (WT) to acute encephalitis induced by the human coronavirus OC43 (HCoV-OC43) (Do Carmo, Jacomy et al. 2008). These data suggest that apoD could be a good therapeutic target for neurodegenerative diseases. Unfortunately, these mice develop, with age, insulin resistance, glucose intolerance and hepatic and muscular steatosis (Do Carmo, Fournier et al. 2009). In H-apoD Tg mice liver, steatosis is associated with overexpression of the peroxisome proliferator-activated gamma (PPAR γ) (Do Carmo, Fournier et al. 2009).

PPAR γ is a nuclear receptor implicated in adipocyte differentiation. Two isoforms exist: PPAR γ 1 is ubiquitously expressed while PPAR γ 2 is almost exclusive to adipose tissue (Tontonoz, Hu et al. 1994; Tontonoz, Hu et al. 1994). When activated by one of its ligands, PPAR γ forms a heterodimer with retinoid x receptor (RXR) α and binds to the peroxisome proliferator response elements (PPRE) on the promoter of target genes (Zoete, Grosdidier et al. 2007; Tontonoz and Spiegelman

2008). When activated, PPAR γ is highly expressed. In fact, PPAR γ regulates positively its own transcription and it also induces transcription of the CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) α which also positively regulates PPAR γ (Darlington, Ross et al. 1998; Li, Xiao et al. 2010). Many natural PPAR γ ligands have been discovered including arachidonic acid (AA), prostaglandins, oxidized fatty acid (FA) and some polyunsaturated fatty acid (PUFA) (Forman, Tontonoz et al. 1995; Kliewer, Lenhard et al. 1995; Kliewer, Sundseth et al. 1997; Krey, Braissant et al. 1997; Nagy, Tontonoz et al. 1998). Activation of hepatic PPAR γ may lead to an upregulation of free FA (FFA) uptake by increasing the expression of fatty acid transporter CD36 (also known as FAT). PPAR γ may also induce lipid droplets (LD) formation by increasing the expression of LD associated proteins such as perilipin 2 (Plin2), responsible for LDs stabilization, and cell death-inducing DFFA-like effectors (Cide) a and c, responsible for LDs fusion (Chawla, Boisvert et al. 2001; Rogue, Spire et al. 2010; Rogue, Lambert et al. 2011). Those proteins downregulate LDs lipolysis by reducing association of the three main LD lipases (adipose TG lipase (ATGL), hormone-sensitive lipase (HSL) and monoglycérine lipase (MGL)) to the surface of LDs (Listenberger, Ostermeyer-Fay et al. 2007; Keller, Petrie et al. 2008; Jinno, Nakakuki et al. 2010).

Many studies demonstrated a link between elevated PPAR γ expression and steatosis in the liver. Adenoviral overexpression of PPAR γ 1 in PPAR α knockout (KO) mice liver induces ectopic fat accumulation and activates lipogenesis, leading to hepatic steatosis (Gavrilova, Haluzik et al. 2003). Expression of PPAR γ 2 is observed in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) animal models, such as *Ob/Ob* and lipoatrophic mice. Inhibition of PPAR γ expression in these mice reduces hepatic steatosis by downregulation of lipogenesis and inhibition of LD formation (Rahimian, Masih-Khan et al. 2001; Matsusue, Haluzik et al. 2003; Zhang, Hernandez-Ono et al. 2006). Lipogenesis is regulated at many levels. The sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1c) and the liver-x-receptor (LXR) α are the main transcription factors responsible for the induction of acetyl-CoA carboxylase (ACC) and fatty acid

synthase (FAS). ACC and FAS are the two rate-limiting enzymes of lipogenesis. ACC transforms acetyl-coA to malonyl-coA and FAS uses both acetyl-CoA and malonyl-CoA to produce non-esterified FA (NEFA). NEFA are then esterified in triglycerides (TG) or desaturated by stearoyl-CoA desaturase (SCD). Alternatively, lipogenesis can be inhibited by AMP-activated protein kinase (AMPK) which phosphorylates and inhibits both ACC and SREBP-1c, therefore reducing production of malonyl-CoA and transcription of lipogenic enzymes.

In this study, we demonstrated that H-apoD Tg mice develop hepatic steatosis through overexpression and activation of PPAR γ . This is associated with increased FFA uptake and induction of LD formation. Our data also suggest that in cells, the presence of ApoD amplifies the activation of hepatic PPAR γ by AA. This work reveals a novel mechanism of action of apoD in metabolism.

2.3 Results

PPAR γ and C/EBP expression in liver of H-apoD Tg mice

We previously demonstrated that PPAR γ mRNA is increased in H-apoD Tg mice liver without any distinction between the two isoforms PPAR γ 1 and 2 (Do Carmo, Fournier et al. 2009). In this study, we show that mRNA expression of both isoforms is significantly increased in the liver of Tg mice compared to WT mice. PPAR γ 1 and γ 2 mRNA expression are increased by 1.37-fold and 1.16-fold respectively (Fig.1A). Interestingly, protein analysis by Western blot reveals that PPAR γ 1 only is increased in Tg mice (2.24-fold) (Fig.1B). The mRNA expression of C/EBP α , but not C/EBP β , is also significantly increased (1.14-fold) (Fig.1C,D).

FFA uptake analysis in the liver of H-apoD Tg mice

In our earlier work, we also demonstrated that circulating FFA, cholesterol and TG remained unchanged in H-apoD Tg mice compared to WT (Do Carmo, Fournier et al. 2009). In the present study, we show that mRNA expression of

lipoprotein lipase (LPL) and hepatic lipase (HL), implicated in lipoprotein metabolism, remained unaffected in Tg mice (Fig.2A,B). In contrast, the expression of CD36, the main transporter of FFA in cells, is significantly increased (1.2-fold) compared to WT mice (Fig.2C) suggesting an increased in FFA uptake in the liver of Tg mice.

Lipid droplets metabolism in liver of H-apoD Tg mice

In order to analyze LD metabolism, we measured the expression level of key proteins known to be involved in LD formation. We show that the mRNA of PPAR γ target genes Cide a and Cide c, implicated in LD fusion, are overexpressed by 1.47 and 1.45-fold respectively while Cide b remains unchanged (Fig.3B-D). Also, Plin2, a protein implicated in LD stabilization, is increased by 1.98-fold compared to WT (Fig.3A).

Since the mRNA levels of lipases HSL, MGL, ATGL and ATGL coactivator CGI-58 remain unchanged (Fig.4), hepatic LD were stained with bodipy493/503 and analyzed by confocal imagery (Fig.3E). Compared to WT mice, the number of LD is similar in the liver of H-apoD Tg mice and in WT mice (data not shown). However, as showed in Fig. 3E, the size of LD in H-apoD Tg mice is drastically increased (5.45-fold).

Lipogenesis analysis in H-apoD Tg mice liver

We previously demonstrated that the mRNA expression of SREBP-1 and FAS is increased in H-apoD Tg mice liver compared to WT mice (Do Carmo, Fournier et al. 2009). In order to evaluate the lipogenesis status in Tg mice, we measured the mRNA expression of several lipogenic enzymes and associated transcription factors and we also measured the protein level of FAS, the rate limiting enzyme of lipogenesis. The mRNA expression of ACC, SCD1, diacylglycerol acyltransferase (Dgat) and LXR α mRNA remain unaffected in H-apoD Tg mice liver compared to WT mice (Fig 5A). However, the FAS protein is significantly increased (1.97-fold) (Fig. 5B).

Surprisingly, the level of phosphorylation on Ser79 of ACC1 is significantly increased in H-apoD Tg mice (2.42) suggesting a reduced activity of ACC1 (Fig.5C). This increase of ACC1 phosphorylation is associated with an increase in the level of AMPK expression (1.82-fold) as well as with an increase of phosphorylation on Thr172 (2.63) (Fig. 5D).

Expression of gluconeogenic enzymes in the liver of H-apoD Tg mice

The mRNA levels of two key enzymes of gluconeogenesis, Glucose-6-phosphatase (G6Pase) and phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), are both modestly but significantly decreased (Fig.6A,B).

Analysis of genes involved in β -oxidation in the liver of H-apoD Tg mice

We previously demonstrated that PPAR α mRNA is increased in H-apoD Tg mice liver (Do Carmo, Fournier et al. 2009). As this transcription factor is known to be involved in the regulation of β -oxidation, we examined the expression levels of key proteins involved in this process. The mRNA levels of PGC-1 α , a co-activator of PPAR α is unchanged (Fig.7B). At the opposite, the protein level of PPAR α and the mRNA expression CPT-1, the rate limiting enzyme of β -oxidation, are respectively increased by 2.73-fold and 1.26-fold in the liver of H-apoD Tg (Fig.7A,C). This suggests that β -oxidation is increased in the liver of H-apoD Tg mice compared to WT mice.

Effect of apoD overexpression on PPAR γ activation by AA

To understand the link between apoD and PPAR γ , we evaluated the activation of PPAR γ by AA (7 μ M) in presence or absence of apoD. At this concentration, AA does not induce toxicity for the cells (Notarnicola, Messa et al. 2011). As showed in Fig.8, AA induced PPAR γ transcriptional activity by 1.4-fold. Increased ApoD expression in HepG2 cells appears also to increase PPAR γ transcriptional activity

albeit this difference is not statistically significant. Most interestingly, a higher apoD expression potentiates the effect of AA on the induction of PPAR γ transcriptional activity (2.4-fold).

2.4 Discussion

The goal of this study was to characterize molecular mechanisms leading to TG accumulation in the liver of H-apoD Tg mice. Here, we show that overexpression of apoD induces expression and activation of nuclear receptor PPAR γ , leading to ectopic fat accumulation.

Previous studies demonstrated that activation of PPAR γ in the liver increases expression of LPL and long chain fatty acid (LCFA) transporter CD36 (Rogue, Spire et al. 2010; Rogue, Lambert et al. 2011). Those proteins work together to upregulate FFA uptake. They hydrolyze TG-rich circulating lipoproteins and transport LCFA inside the hepatocytes (Goldberg 1996; Hirano, Kuwasako et al. 2003; Love-Gregory, Sherva et al. 2008). We did not observe any increase of either LPL or HL mRNA expression suggesting that the activity of these lipases is unaffected (Fig.2). In addition, circulating FFA, TG and cholesterol levels are unchanged in H-apoD Tg mice (Do Carmo, Fournier et al. 2009). On the other hand, CD36 mRNA expression was slightly increased, suggesting that LCFA uptake could be upregulated in H-apoD Tg mice liver compared to WT mice (Menard, Croteau et al. 2010). The increase in FFA uptake remains however to be demonstrated. This mild increase of CD36 expression may also explain why hepatic steatosis progresses slowly in Tg mice. Indeed, it takes up to one year to observe hepatic steatosis in those mice (Do Carmo, Fournier et al. 2009).

Recently, Perdomo *et al.* (2010) observed, in mice injected with an adenovirus expressing apoD, the activation of LPL leading to less circulating TG-rich lipoproteins. In addition, the authors did not observe any accumulation of ectopic fat in the liver. The difference between this study and our results could be due to the fact

that they used younger mice (six weeks old instead of one year old), but most importantly due to the type of promoter, the type of vector and thus the site of transient expression.

Another mechanism by which PPAR γ may be implicated in hepatic lipid accumulation could be by the induction of LD formation and maturation (Chawla, Boisvert et al. 2001; Rogue, Spire et al. 2010; Rogue, Lambert et al. 2011). In the present study, we discovered that Plin2 protein expression as well as Cide a and Cide c mRNA levels were increased in H-apoD Tg mice compared to WT mice (Fig.3). Listenburger *et al* (2007) demonstrated that Plin2 lowers the rate of TG turnover in LD by reducing the association of ATGL with LDs. The ATGL is known to initiate the hydrolysis of TG stocked in LDs (Bickel, Tansey et al. 2009). In H-apoD Tg mice liver, this probable delocalization of ATGL may stabilize lipids, allowing maturation of pre-existing LDs and accumulation of TG. The precise localization of ATGL in the liver of H-apoD Tg mice remains to be evaluated. Our analysis also reveals an increased expression of the mRNA levels of Cide a and c (Fig. 3). Both proteins are implicated in LDs fusion (Nishino, Tamori et al. 2008; Puri, Ranjit et al. 2008; Gong, Sun et al. 2009; Yonezawa, Kurata et al. 2011). Fusion of LDs reduces lipolysis because the surface of contact between LDs and lipases is decreased. In the present study, a 5-fold increase in LDs size is observed (Fig.3). In addition, the mRNA levels of the different lipases remain unaltered (Fig.4). This strongly suggests that lipolysis is downregulated in the liver of H-apoD Tg-mice liver compared to WT mice. The induction of the formation and maturation of LDs leading to TG accumulation is probably mediated by PPAR γ as mRNA expression of Cide b, which is not a target gene of PPAR γ , was unaltered (Fig.3).

Several studies have shown that activation of PPAR γ induces lipogenesis (Rahimian, Masih-Khan et al. 2001; Matsusue, Haluzik et al. 2003; Zhang, Hernandez-Ono et al. 2006). Because we previously showed that SREBP-1 and FAS mRNA expression was increased in H-apoD Tg mice liver (Do Carmo, Fournier et al. 2009), we measured the mRNA levels of other lipogenic enzymes including that of

LXR α . LXR α is a transcription factor that induces gene transcription of SREBP-1, FAS, SCD1, Dgat and ACC (Glass and Rosenfeld 2000; Joseph, Laffitte et al. 2002; Liang, Yang et al. 2002; Chu, Miyazaki et al. 2006; Peng, Hiipakka et al. 2008). We did not observe changes in the mRNA levels of ACC, SCD1, Dgat and LXR α (Fig.5). However, we confirmed that the FAS protein level is increased in the liver of H-apoD Tg compared to that of WT mice. Surprisingly, the level of phosphorylation of ACC1 is increased in H-apoD Tg mice liver. The increased phosphorylation of ACC leads to decrease enzymatic activity (Ha, Lee et al. 1996). This suggests that despite an elevation of FAS expression, lipogenesis may be inhibited in H-apoD Tg mice as the production of malonyl-CoA by ACC is the first step of lipogenesis (Mao, DeMayo et al. 2006; Savage, Choi et al. 2006; Viollet, Athesa et al. 2009). The increased phosphorylation of ACC could explain the overexpression of FAS. Indeed, Mao *et al* (2006) showed that inhibition of ACC1 expression in mice liver induces expression of FAS and ACC2 proteins reducing TG accumulation. This inhibition of lipogenesis in the liver of H-apoD Tg mice, probably reflecting a compensatory mechanism, remains however to be demonstrated *in vivo*.

ACC phosphorylation and therefore activity is mainly regulated by AMPK. AMPK is a strong inhibitor of both ACC and SREBP-1c (Za'tara, Bar-Tana et al. 2008; Viollet, Athesa et al. 2009; Li, Xu et al. 2011). The increase of total and phosphorylated AMPK catalytic α subunit suggests a strong activation of AMPK in the H-apoD Tg mice liver (Fig.5). Since AMPK is activated by LCFA, it is likely that its activation is due to the increased expression of CD36 and subsequently the increase in FFA uptake (Za'tara, Bar-Tana et al. 2008). In H-apoD Tg mice liver, the phosphorylation of SREBP-1c by AMPK may be increased. This could lead to inhibition of its translocation to the nucleus. However, this inhibition may not be sufficient to reduce its transcriptional activity as the mRNA levels of its target genes remain unchanged. Lipogenesis needs acetyl-CoA as a substrate. Since glycolysis is the most important pathway producing acetyl-CoA, the downregulation of glucose formation might also be a compensatory mechanism. AMPK inhibits the transcription

of the rate-limiting gluconeogenic enzymes G6Pase and PEPCK (Foretz, Ancellin et al. 2005). Here we show that both G6Pase and PEPCK mRNA expression levels are significantly decreased in the liver of H-apoD Tg mice compared to WT mice (Fig.6). This downregulation may consequently lead to a decrease of *de novo* glucose synthesis. This inhibition of gluconeogenesis might protect the Tg mice against hyperglycemia reducing hyperinsulinemia that appears in association with hepatic steatosis.

AMPK is not the only protein that might be activated by LCFA. PPAR α is also known to be activated by LCFA (Desvergne and Wahli 1999; Mandard, Muller et al. 2004). In a previous study, we demonstrated that hepatic PPAR α mRNA is increased in H-apoD Tg mice liver (Do Carmo, Fournier et al. 2009). PPAR α is a nuclear receptor that induces transcription of many genes implicated in the mitochondrial β -oxidation of lipids (Mandard, Muller et al. 2004). Here, we demonstrate that PPAR α is also overexpressed at the protein level, probably by the elevated intracellular concentration of LCFA. Its activity is also probably increased. The mRNA expression of its coactivator PGC-1 α does not change, but the mRNA expression of CPT1, the rate limiting-enzyme of the mitochondrial β -oxidation is increased (Kerner and Hoppel 2000) (Fig.7C). CPT-1 is normally inhibited by malonyl-CoA produced by ACC (McGarry and Brown 1997). So, in H-apoD Tg mice, the inhibition of ACC by AMPK and the increased expression of CPT-1 by PPAR α might suggest that β -oxidation is activated helping to reduce the rapid progression of hepatic steatosis in the H-apoD Tg mice which appears only after one year of age.

To understand the link between apoD and PPAR γ , we evaluated the activation of PPAR γ by AA in presence or absence of apoD. AA is the preferential ligand of apoD and is a precursor for prostaglandins, which are the strongest natural PPAR γ activators (Forman, Tontonoz et al. 1995; Kliewer, Lenhard et al. 1995; Morais Cabral, Atkins et al. 1995). Our results indicate that the activation of PPAR γ by AA is significantly potentiated by increased apoD concentration in cells. Thomas *et al.*

(2003) studied the impact of apoD overexpression on AA metabolism in cultured embryonic kidney (HEK) 293T cells. They revealed that overexpression of apoD in those cells stabilizes AA in the plasma membrane and inhibits the release of AA in the extracellular media. Taken together, these experiments suggest that apoD modulates the AA pathway, leading to the activation of PPAR γ . It is not clear if PPAR γ activation is directly mediated by AA or prostaglandins, which are stronger PPAR γ activators than AA (Forman, Tontonoz et al. 1995; Kliewer, Lenhard et al. 1995). The use of siRNA specific to Cox-1 and Cox-2 would allow us, in a future study, to inhibit the transformation of AA in prostaglandins and thus verify if PPAR γ activation is still enhanced by apoD overexpression.

Finally, our results inspired us a model of the potential effects of apoD overexpression on hepatic lipid metabolism (Fig.9). Increasing apoD expression may lead to stabilization of AA to the membrane and, subsequent activation of the nuclear receptor PPAR γ . In addition, PPAR γ is positively regulated by its target gene C/EBP α , maintaining the expression level of PPAR γ (Darlington, Ross et al. 1998; Li, Xiao et al. 2010). As a result, other PPAR γ target genes (CD36, Plin2, Cide a and Cide c) are overexpressed. CD36 probably induces LCFA uptake by the hepatocytes while Plin2 protects LDs against lipolysis by blocking access to lipases. Then, Cide a and Cide c provoke the fusion of stabilized LDs to form large unilocular LDs. This morphologic modification strongly reduces contact surface between LDs and lipases and consequently reduces lipolysis. As a result, lipids accumulate in H-apoD Tg mice liver leading to hepatic steatosis. As a compensatory mechanism, LCFA transported by CD36 into the hepatocytes activates AMPK and PPAR α . AMPK inhibits lipogenesis and activates mitochondrial β -oxidation by the phosphorylation of ACC. It also reduces hyperglycemia by inhibiting the transcription of the gluconeogenic genes G6Pase and PEPCK. On the other hand, PPAR α induces enzymes of the β -oxidation pathway, upregulating FA oxidation. However, the activation of these compensatory pathways is insufficient to inhibit the accumulation of ectopic fat in the

liver, but it certainly helps to reduce the progression of hepatic steatosis. This may explain why H-apoD Tg mice develop hepatic steatosis and insulin resistance after one year of age only. Overall this study highlights the role of apoD and its ligand AA in TG metabolism.

2.5 Materials and methods

2.5.1 Materials

Cell culture medium was purchased from Wisent (Wisent, St-Bruno, Qc, Canada). Bodipy 493/503, Prolong Gold antifade reagent, Galacto-light™ beta-galactosidase reporter gene assay system, Trizol Reagent, mouse anti-myc monoclonal antibody, FBS and penicillin-streptomycin were purchased from Invitrogen (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Cryostat model CM1950 was purchased from Leica Biosystems (ON, Canada). AA, anti-mouse secondary antibody, luciferin and propidium iodure were obtained from Sigma (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada). BM chemiluminescence blotting substrate, transcriptor first strand cDNA synthesis kit and complete protease inhibitor were purchased from Roche (Roche, Mississauga, ON, Canada). Taq DNA polymerase was from Feldan (Feldan, Industrial Park, Qc, Canada). Anti-PPAR γ (C26H12), anti-AMPK α and anti-phospho-AMPK α (Thr172) (40H9) antibodies were from Cell signaling (cell signaling technology, Danvers, MA, USA). Anti-acetyl-CoA carboxylase and anti-phospho-Acetyl CoA carboxylase (Ser79) antibodies were from Millipore (Millipore, Billerica, MA, USA). Anti-Plin2 antibody was from Novus Biological (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) and goat anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody and Bradford reagent were from Bio-rad (Life Science Bio-rad, Mississauga, Ontario, Canada). Gal4-PPAR γ and UAS-Luciferase plasmid were generously provided by Dr. Maurizio Crestani.

2.5.2 Animals

All the experimental procedures were approved by the Animal Care and Use Committee of Université du Québec à Montréal. Animals were housed at $24 \pm 1^\circ\text{C}$ in a 12-h light-dark cycle and fed a standard rodent chow *ad libitum* with free access to water. The H-apoD Tg mice overexpress the human ApoD gene under the control of the neuron-specific Thy-1 promoter. Their characterization and genotyping procedures have been already reported (Ganforina, Do Carmo et al. 2008; Do Carmo, Fournier et al. 2009). Experiments were carried out with 12 months old male animals. Tissues were collected, frozen in dry ice and kept at -80°C until further use.

2.5.3 Cell culture

The human hepatocarcinoma cells (HepG2) were cultured in EMEM supplemented with 10% FBS. The day before transfection, cells were plated at 80% confluence (2×10^5 cells per well). The cells were then incubated for 48h, with a ratio of 4 μl of Fugene HD for 2 μg of a mix of the different DNA constructs tested: 0.125 μg of pRSV- β -galactosidase and 0.8 μg of UAS-Luciferase (a luciferase reporter plasmid with five upstream activating sequences elements) with 0.25 μg of either PCDNA3.1A or apoD cDNA construct, in presence or not of 0.4 μg of Gal4-PPAR γ (containing the PPAR γ cDNA and the DNA binding domain of GAL4). The medium was then replaced with one containing 7 μM of AA. After 4h, the cells were harvested and the cellular extracts were prepared for luciferase (de Wet, Wood et al. 1987) and β -galactosidase assays (according to the manufacturer instructions).

2.5.4 RNA extraction and semiquantitative RT-PCR

Extraction of total RNA was performed with the TRIZOL reagent according to the manufacturer instructions. Total RNA was then reverse transcribed using Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit and amplified with Taq DNA polymerase and specific primers (supplementary data, Table I). Amplifications were

carried out for 25-32 cycles for all genes. HPRT gene was used as housekeeping gene control.

2.5.5 Immunoblotting

Tissues (liver and skeletal muscle) were homogenized in cold lysis buffer (50 mM Tris·HCl pH 7.3, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.2% Triton X-100, 2 mM sodium orthovanadate and 10% Complete protease inhibitor). Lysates were then incubated 30 min at 4°C, cleared by centrifugation and stored at -80°C until further use. Based on Bradford assay (Bradford 1976), 60 µg of protein of each sample were separated on SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes. After blocking with 5 % milk 1h at room temperature, the membrane was incubated with the primary antibodies overnight at 4°C. Dilutions of the primary antibodies were: 1:1000 for PPAR γ (C26H12), 1:1000 for total AMPK α antibody; 1:1000 for phospho-AMPK α (Thr172) (40H9) antibody; 1:1000 for acetyl-CoA carboxylase antibody; 1:300 for anti-phospho-Acetyl CoA carboxylase (Ser79) antibody and 1:5000 for Plin2 antibody. These primary antibodies were then detected with a goat anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:10000) and visualized by BM chemiluminescence camera.

2.5.6 Lipid staining

Tissue samples were incubated overnight at 4°C in 4% paraformaldehyde, frozen in dry ice and kept at -80°C until further use. Four micro thick longitudinal sections were cut with a cryostat, and stained with Bodipy 493/503. Sections were incubated 5 minutes in a solution of PBS containing 0.04 mg/ml propidium iodure and 0.1 µg/ml of Bodipy and washed 3 times for 5 minutes in PBS. Coverslips were mounted onto slides using Prolong Gold antifade reagent and observed within 24h with a laser scanning confocal microscope (Nikon TE300) (original magnification X60).

2.5.7 Statistical analysis.

Results are expressed as means \pm SD. Statistical analysis was performed with GraphPad 5 software. The statistical significance from control values was determined by Student's t-test. Values were considered to be significant at $P < 0.05$.

2.6 Acknowledgments

We wish to thank Dr. Maurizio Crestani for kindly providing us the GAL4-PPAR γ and the UAS-Luciferase plasmids. We also thank Denis Flipo for his precious help with the confocal microscopy and Ouafa Najib for her help with the mice. Authors declare that no conflict of interest exists in relation to the content of this manuscript.

2.7 References

- Bickel, P. E., J. T. Tansey, et al. (2009). "PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores." Biochim Biophys Acta **1791**(6): 419-440.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Chawla, A., W. A. Boisvert, et al. (2001). "A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis." Mol Cell **7**(1): 161-171.
- Chu, K., M. Miyazaki, et al. (2006). "Stearoyl-coenzyme A desaturase 1 deficiency protects against hypertriglyceridemia and increases plasma high-density lipoprotein cholesterol induced by liver X receptor activation." Mol Cell Biol **26**(18): 6786-6798.
- Cofer, S. and S. R. Ross (1996). "The murine gene encoding apolipoprotein D exhibits a unique expression pattern as compared to other species." Gene **171**(2): 261-263.
- Darlington, G. J., S. E. Ross, et al. (1998). "The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation." J Biol Chem **273**(46): 30057-30060.
- de Wet, J. R., K. V. Wood, et al. (1987). "Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells." Mol Cell Biol **7**(2): 725-737.
- Desvergne, B. and W. Wahli (1999). "Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism." Endocr Rev **20**(5): 649-688.
- Dilley, W. G., D. E. Haagensen, et al. (1990). "Immunologic and steroid binding properties of the GCDFP-24 protein isolated from human breast gross cystic disease fluid." Breast Cancer Res Treat **16**(3): 253-260.

- Do Carmo, S., D. Fournier, et al. (2009). "Human apolipoprotein D overexpression in transgenic mice induces insulin resistance and alters lipid metabolism." Am J Physiol Endocrinol Metab **296**(4): E802-811.
- Do Carmo, S., H. Jacomy, et al. (2008). "Neuroprotective effect of apolipoprotein D against human coronavirus OC43-induced encephalitis in mice." J Neurosci **28**(41): 10330-10338.
- Drayna, D., C. Fielding, et al. (1986). "Cloning and expression of human apolipoprotein D cDNA." J Biol Chem **261**(35): 16535-16539.
- Drayna, D. T., J. W. McLean, et al. (1987). "Human apolipoprotein D gene: gene sequence, chromosome localization, and homology to the alpha 2u-globulin superfamily." DNA **6**(3): 199-204.
- Foretz, M., N. Ancellin, et al. (2005). "Short-term overexpression of a constitutively active form of AMP-activated protein kinase in the liver leads to mild hypoglycemia and fatty liver." Diabetes **54**(5): 1331-1339.
- Forman, B. M., P. Tontonoz, et al. (1995). "15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma." Cell **83**(5): 803-812.
- Ganfornina, M. D., S. Do Carmo, et al. (2008). "Apolipoprotein D is involved in the mechanisms regulating protection from oxidative stress." Aging Cell **7**(4): 506-515.
- Gavrilova, O., M. Haluzik, et al. (2003). "Liver peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass." J Biol Chem **278**(36): 34268-34276.
- Glass, C. K. and M. G. Rosenfeld (2000). "The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors." Genes Dev **14**(2): 121-141.
- Goldberg, I. J. (1996). "Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis." J Lipid Res **37**(4): 693-707.
- Gong, J., Z. Sun, et al. (2009). "CIDE proteins and metabolic disorders." Curr Opin Lipidol **20**(2): 121-126.
- Ha, J., J. K. Lee, et al. (1996). "Cloning of human acetyl-CoA carboxylase-beta and its unique features." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(21): 11466-11470.
- Hirano, K., T. Kuwasako, et al. (2003). "Pathophysiology of human genetic CD36 deficiency." Trends Cardiovasc Med **13**(4): 136-141.
- Jinno, Y., M. Nakakuki, et al. (2010). "Cide-a and Cide-c are induced in the progression of hepatic steatosis and inhibited by eicosapentaenoic acid." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **83**(2): 75-81.
- Joseph, S. B., B. A. Laffitte, et al. (2002). "Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors." J Biol Chem **277**(13): 11019-11025.
- Keller, P., J. T. Petrie, et al. (2008). "Fat-specific protein 27 regulates storage of triacylglycerol." J Biol Chem **283**(21): 14355-14365.
- Kerner, J. and C. Hoppel (2000). "Fatty acid import into mitochondria." Biochim Biophys Acta **1486**(1): 1-17.

- Kliwer, S. A., J. M. Lenhard, et al. (1995). "A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation." Cell **83**(5): 813-819.
- Kliwer, S. A., S. S. Sundseth, et al. (1997). "Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(9): 4318-4323.
- Krey, G., O. Braissant, et al. (1997). "Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay." Mol Endocrinol **11**(6): 779-791.
- Li, H. X., L. Xiao, et al. (2010). "Review: Epigenetic regulation of adipocyte differentiation and adipogenesis." J Zhejiang Univ Sci B **11**(10): 784-791.
- Li, Y., S. Xu, et al. (2011). "AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice." Cell Metab **13**(4): 376-388.
- Liang, G., J. Yang, et al. (2002). "Diminished hepatic response to fasting/refeeding and liver X receptor agonists in mice with selective deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c." J Biol Chem **277**(11): 9520-9528.
- Listenberger, L. L., A. G. Ostermeyer-Fay, et al. (2007). "Adipocyte differentiation-related protein reduces the lipid droplet association of adipose triglyceride lipase and slows triacylglycerol turnover." J Lipid Res **48**(12): 2751-2761.
- Love-Gregory, L., R. Sherva, et al. (2008). "Variants in the CD36 gene associate with the metabolic syndrome and high-density lipoprotein cholesterol." Hum Mol Genet **17**(11): 1695-1704.
- Mandard, S., M. Muller, et al. (2004). "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes." Cell Mol Life Sci **61**(4): 393-416.
- Mao, J., F. J. DeMayo, et al. (2006). "Liver-specific deletion of acetyl-CoA carboxylase 1 reduces hepatic triglyceride accumulation without affecting glucose homeostasis." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(22): 8552-8557.
- Matsusue, K., M. Haluzik, et al. (2003). "Liver-specific disruption of PPARgamma in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes." J Clin Invest **111**(5): 737-747.
- McConathy, W. J. and P. Alaupovic (1973). "Isolation and partial characterization of apolipoprotein D: a new protein moiety of the human plasma lipoprotein system." FEBS Lett **37**(2): 178-182.
- McConathy, W. J. and P. Alaupovic (1976). "Studies on the isolation and partial characterization of apolipoprotein D and lipoprotein D of human plasma." Biochemistry **15**(3): 515-520.
- McGarry, J. D. and N. F. Brown (1997). "The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis." Eur J Biochem **244**(1): 1-14.

- Menard, S. L., E. Croteau, et al. (2010). "Abnormal in vivo myocardial energy substrate uptake in diet-induced type 2 diabetic cardiomyopathy in rats." Am J Physiol Endocrinol Metab **298**(5): E1049-1057.
- Morais Cabral, J. H., G. L. Atkins, et al. (1995). "Arachidonic acid binds to apolipoprotein D: implications for the protein's function." FEBS Lett **366**(1): 53-56.
- Nagy, L., P. Tontonoz, et al. (1998). "Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma." Cell **93**(2): 229-240.
- Nishino, N., Y. Tamori, et al. (2008). "FSP27 contributes to efficient energy storage in murine white adipocytes by promoting the formation of unilocular lipid droplets." J Clin Invest **118**(8): 2808-2821.
- Notarnicola, M., C. Messa, et al. (2011). "Polyunsaturated fatty acids reduce fatty acid synthase and hydroxy-methyl-glutaryl CoA-reductase gene expression and promote apoptosis in HepG2 cell line." Lipids Health Dis **10**: 10.
- Patel, R. C., D. Lange, et al. (1997). "Probing the structure of the ligand binding cavity of lipocalins by fluorescence spectroscopy." Protein Eng **10**(6): 621-625.
- Peitsch, M. C. and M. S. Boguski (1990). "Is apolipoprotein D a mammalian bilin-binding protein?" New Biol **2**(2): 197-206.
- Peng, D., R. A. Hiipakka, et al. (2008). "Antiatherosclerotic effects of a novel synthetic tissue-selective steroidal liver X receptor agonist in low-density lipoprotein receptor-deficient mice." J Pharmacol Exp Ther **327**(2): 332-342.
- Perdomo, G., D. H. Kim, et al. (2010). "A role of apolipoprotein D in triglyceride metabolism." J Lipid Res **51**(6): 1298-1311.
- Puri, V., S. Ranjit, et al. (2008). "Cidea is associated with lipid droplets and insulin sensitivity in humans." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(22): 7833-7838.
- Rahimian, R., E. Masih-Khan, et al. (2001). "Hepatic over-expression of peroxisome proliferator activated receptor gamma2 in the ob/ob mouse model of non-insulin dependent diabetes mellitus." Mol Cell Biochem **224**(1-2): 29-37.
- Rogue, A., C. Lambert, et al. (2011). "Comparative Gene Expression Profiles Induced by PPARgamma and PPARalpha/gamma Agonists in Human Hepatocytes." PLoS One **6**(4): e18816.
- Rogue, A., C. Spire, et al. (2010). "Gene Expression Changes Induced by PPAR Gamma Agonists in Animal and Human Liver." PPAR Res **2010**: 325183.
- Savage, D. B., C. S. Choi, et al. (2006). "Reversal of diet-induced hepatic steatosis and hepatic insulin resistance by antisense oligonucleotide inhibitors of acetyl-CoA carboxylases 1 and 2." J Clin Invest **116**(3): 817-824.
- Seguin, D., M. Desforges, et al. (1995). "Molecular characterization and differential mRNA tissue distribution of mouse apolipoprotein D." Brain Res Mol Brain Res **30**(2): 242-250.
- Terrisse, L., K. Marcoux, et al. (2001). "Structure-function relationships of human apolipoprotein D an immunochemical analysis." Life Sci **70**(6): 629-638.

- Thomas, E. A., R. C. George, et al. (2003). "Apolipoprotein D modulates arachidonic acid signaling in cultured cells: implications for psychiatric disorders." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **69**(6): 421-427.
- Tontonoz, P., E. Hu, et al. (1994). "mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer." Genes Dev **8**(10): 1224-1234.
- Tontonoz, P., E. Hu, et al. (1994). "Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor." Cell **79**(7): 1147-1156.
- Tontonoz, P. and B. M. Spiegelman (2008). "Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma." Annu Rev Biochem **77**: 289-312.
- Viollet, B., Y. Athes, et al. (2009). "AMPK: Lessons from transgenic and knockout animals." Front Biosci **14**: 19-44.
- Yonezawa, T., R. Kurata, et al. (2011). "Which CIDE are you on? Apoptosis and energy metabolism." Mol Biosyst **7**(1): 91-100.
- Za'tara, G., J. Bar-Tana, et al. (2008). "AMPK activation by long chain fatty acyl analogs." Biochem Pharmacol **76**(10): 1263-1275.
- Zeng, C., A. I. Spielman, et al. (1996). "A human axillary odorant is carried by apolipoprotein D." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(13): 6626-6630.
- Zhang, Y. L., A. Hernandez-Ono, et al. (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.
- Zoete, V., A. Grosdidier, et al. (2007). "Peroxisome proliferator-activated receptor structures: ligand specificity, molecular switch and interactions with regulators." Biochim Biophys Acta **1771**(8): 915-925.

2.8 Figure legends

Figure 2.1: PPAR γ expression in the liver of H-apoD Tg mice. Semi quantitative RT-PCR (A) and Western blot (B) analysis of PPAR γ expression in liver and skeletal muscle of H-apoD Tg and WT mice and semi quantitative RT-PCR of C/EBP α (C) and C/EBP β (D) in liver of H-apoD Tg and WT mice. **A, C, D** - Graphs represent the mRNA expression level normalized by HPRT. A representative gel is presented below. **B**- The graph represents the level of PPAR γ protein expression standardized by amidoblack staining. Muscle tissue was used for PPAR γ 1/PPAR γ 2 positive control. Values are expressed relatively to the WT mice and are the means \pm SD of 4 mice per group (A-D). WT *P<0.05 and **P<0.01 vs WT mice. All experiments were performed in triplicate.

Figure 2.2: Analysis of genes involved in FFA uptake and hydrolysis in the liver of H-apoD Tg mice. Semiquantitative RT-PCR analysis of HL (A), LPL (B) and FAT/CD36 (C) expression in liver tissues of H-apoD Tg and WT mice. Graphs represent the mRNA expression levels normalized by HPRT. Representative gels are presented below. Values are expressed relatively to the WT mice and are the means \pm SD of 4 mice per group. **P<0.01 vs WT mice.

Figure 2.3: Lipid droplets metabolism in H-apoD Tg mice liver. A- Western blot analysis of Plin2 expression. The graph represents the level of PPAR γ protein expression standardized by amidoblack staining. A representative gel is presented below. Semiquantitative RT-PCR analysis of Cide A (B), Cide B (C) and Cide C (D) mRNA expression. The graph represents the level of mRNA expressions normalized by HPRT. Values are expressed relatively to the WT mice and are the means \pm SD of 4 mice per group. Confocal analysis of lipid droplets (E) in liver tissues of H-apoD Tg and WT mice. Lipid droplets are stained in green and nucleus are in red. Graph represents the quantification of 18 images. *P<0.05, **P<0.01, P<0.001 vs WT mice.

Figure 2.4: Analysis of lipases gene expression associated with LD in liver of H-apoD Tg mice. Semiquantitative RT-PCR analysis of ATGL (A), CGI-58 (B), HSL (C) and MGL (D) expression in liver tissues of H-apoD Tg and WT mice. The graph represents the level of mRNA expressions normalized by HPRT. A representative gel is presented below. Values are expressed relatively to the WT mice and are the means \pm SD of 4 mice per group.

Figure 2.5: Analysis of proteins involved in lipogenesis in the liver H-apoD Tg mice. A- Semiquantitative RT-PCR analysis of ACC, SCD1, Dgat and LXR α . The graph represents the level of mRNA expressions normalized by HPRT. A representative gel is presented below. Values are expressed relatively to the WT mice and are the means \pm SD of 4 mice per group. Western blot analysis of FAS (B), total (C) and phospho-ACC (D) and total (E) and phospho-AMPK α (F) protein expression in liver tissues of H-apoD Tg and WT mice. The graph represents the level of PPAR γ protein expression standardized by amidoblack staining. Values are expressed relatively to the WT mice and are the means \pm SD of 4 mice per group. *P<0.05, **P<0.01 vs WT mice.

Figure 2.6: Analysis of genes involved in gluconeogenesis in the liver of H-apoD Tg mice. Semiquantitative RT-PCR analysis of G6Pase (A) and PEPCK (B) expression in liver tissues of H-apoD Tg and WT mice. The graph represents the level of mRNA expressions normalized by HPRT. A representative gel is presented below. Values are expressed relatively to the WT mice and are the means \pm SD of 4 mice per group. *P<0.05 vs WT mice.

Figure 2.7: Analysis of genes involved in β -oxidation in the liver of H-apoD Tg mice. A- Western blot analysis of PPAR α protein expression. The graph represents the level of PPAR α protein expression standardized by amidoblack staining. A representative gel is presented below. Semiquantitative RT-PCR analysis of PGC-1 α

(B) and CPT1 (C) expression in liver tissues of H-apoD Tg and WT mice. PPAR α expression was normalized by amidoblack staining (A) and PGC1 α and CPT1 gene expression was normalized by HPRT levels (B-C). For each graph, the H-apoD Tg values were normalized by the WT values, which was given an arbitrary value of 1. A-C: values are means \pm SD of 4 mice per group. *P<0.05, **P<0.01 vs WT mice.

Figure 2.8: PPAR γ transcriptional activity by arachidonic acid in presence or absence of apoD. HepG2 were transfected with 0.8 μ g UAS-Luc, 0.4 μ g GAL4-PPAR γ , 0.125 μ g β -galactosidase and 0.25 μ g of PCDNA or apoD vectors. After transfection, cells were treated with 7 μ M AA for 4 h. Luciferase activity represents data that have been normalized with β -galactosidase activity. The data represent the mean \pm SD (n=3). ^aP<0.01 vs the un-stimulated control without apoD, ^bP<0.05 vs the stimulated control without apoD.

Figure 2.9: Schematic model of the role of apoD overexpression on hepatic lipid metabolism. An apoD ligand such as AA activates nuclear receptor PPAR γ . As a result, PPAR γ target genes (CD36, Plin2, Cide A and Cide C) are overexpressed. CD36 induces FFA uptake by hepatocytes while Plin2 protects LDs against lipolysis by blocking access to lipases. Then, Cide a and Cide c bring stabilized LDs together to form large unilocular LDs. This morphologic modification reduces contact surface between LDs and lipases and thus reduces lipolysis. As a result, lipids accumulate in H-apoD transgenic mice liver and lead to hepatic steatosis.

Figure 2.1

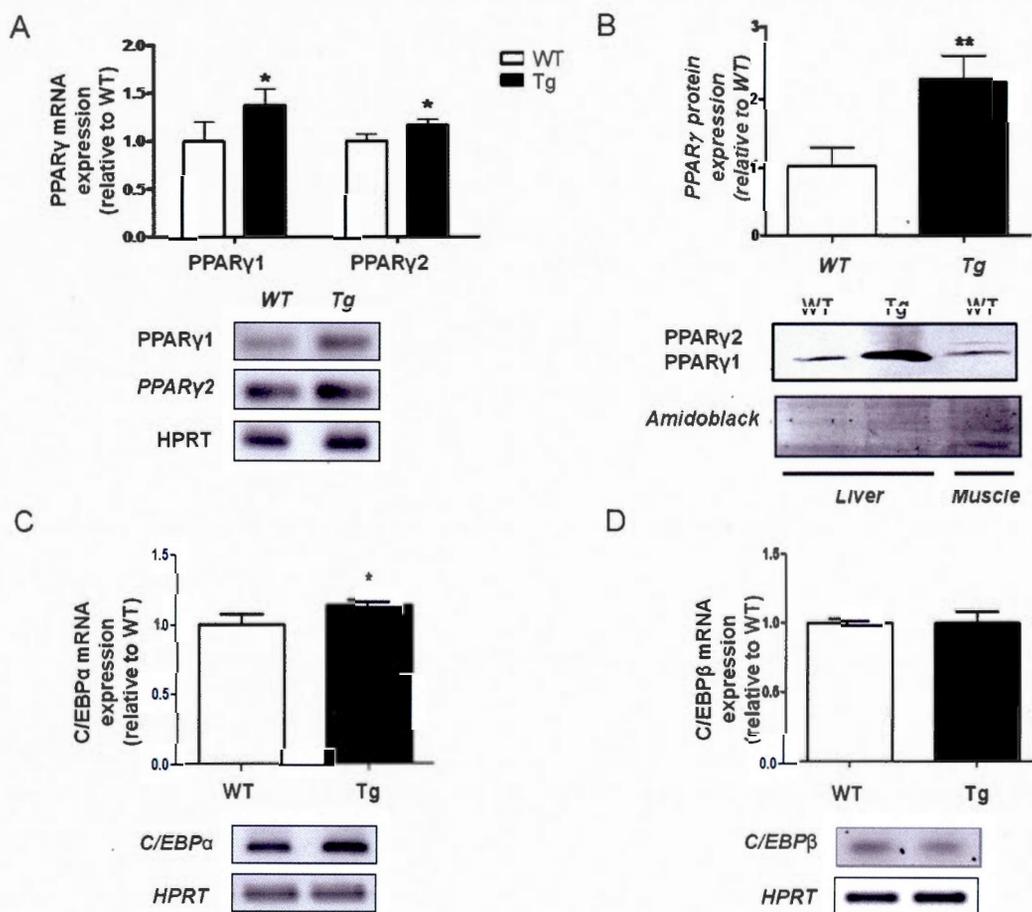


Figure 2.2

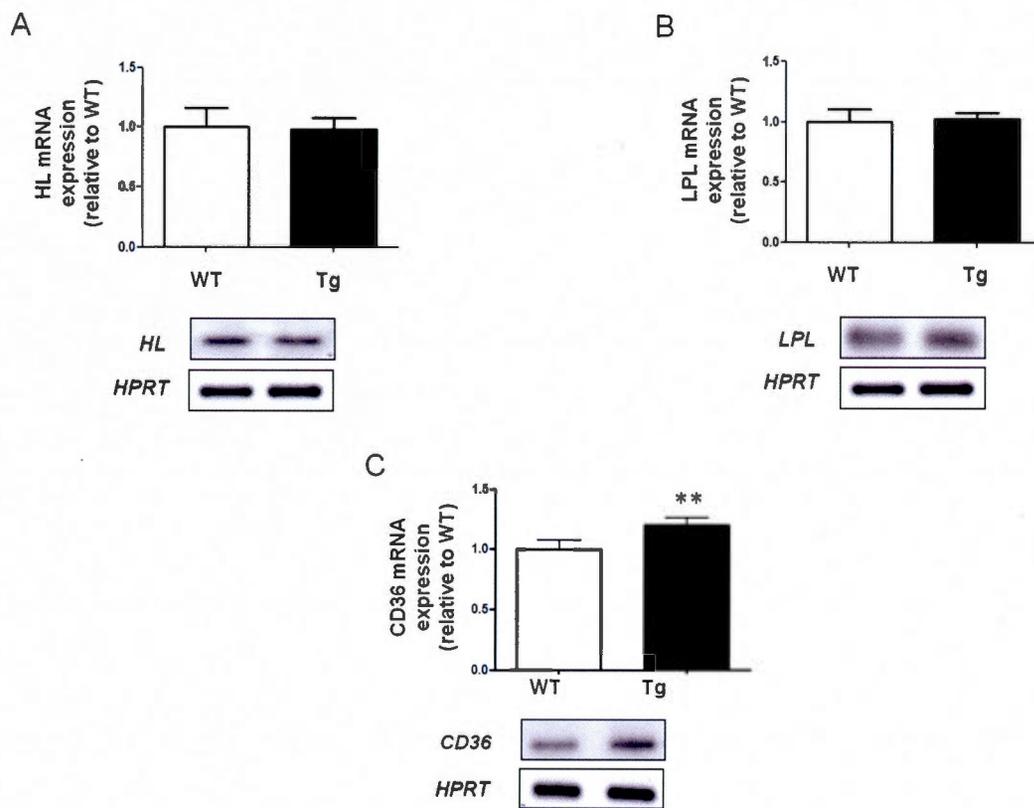


Figure 2.3

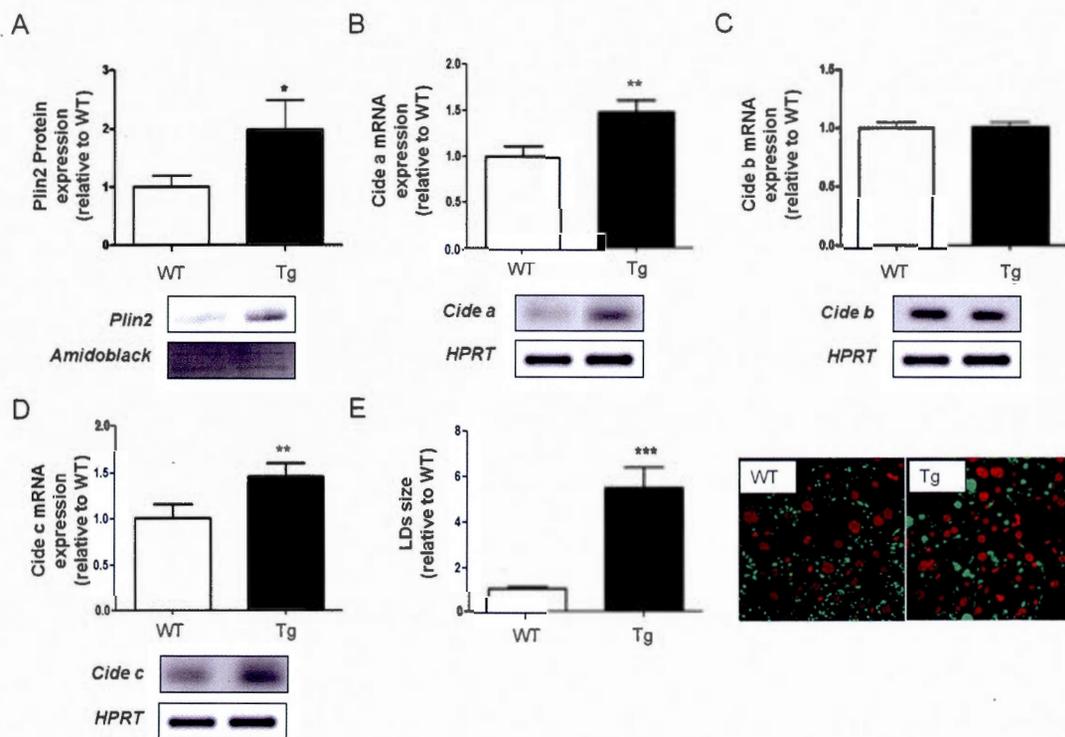


Figure 2.4

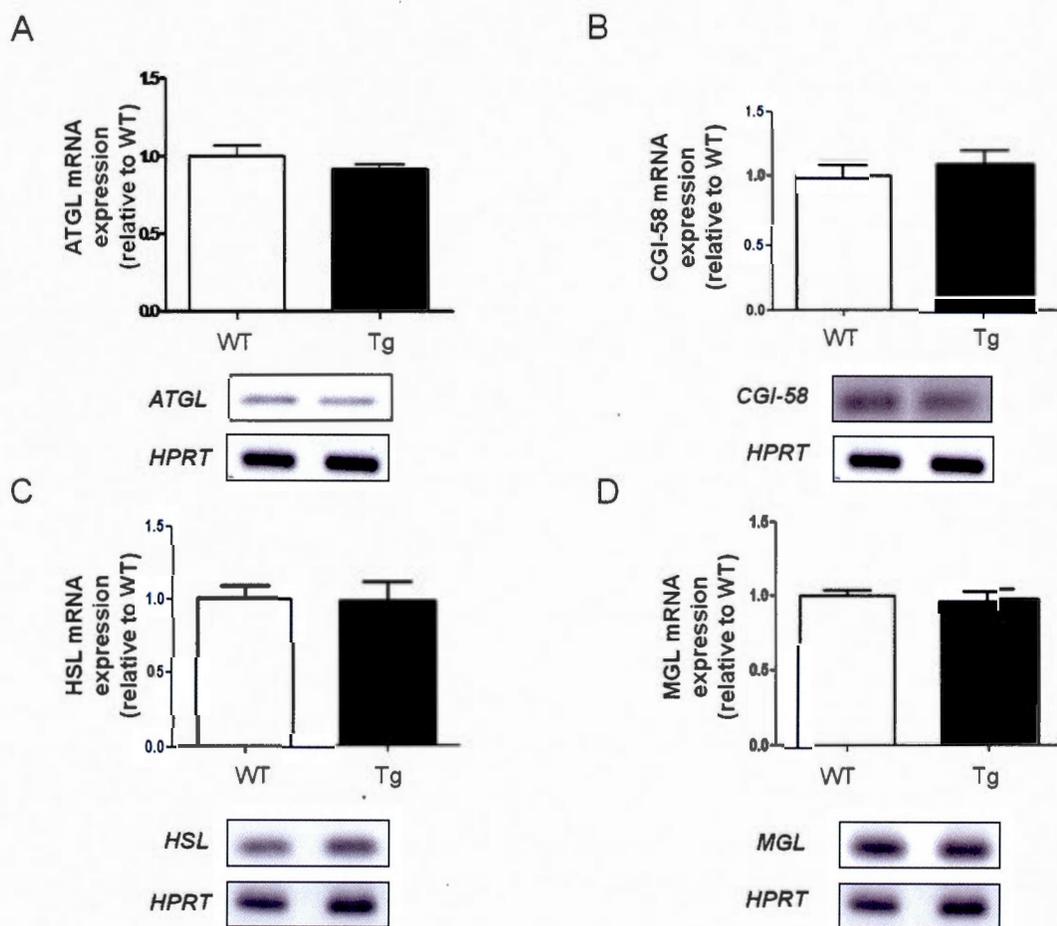


Figure 2.5

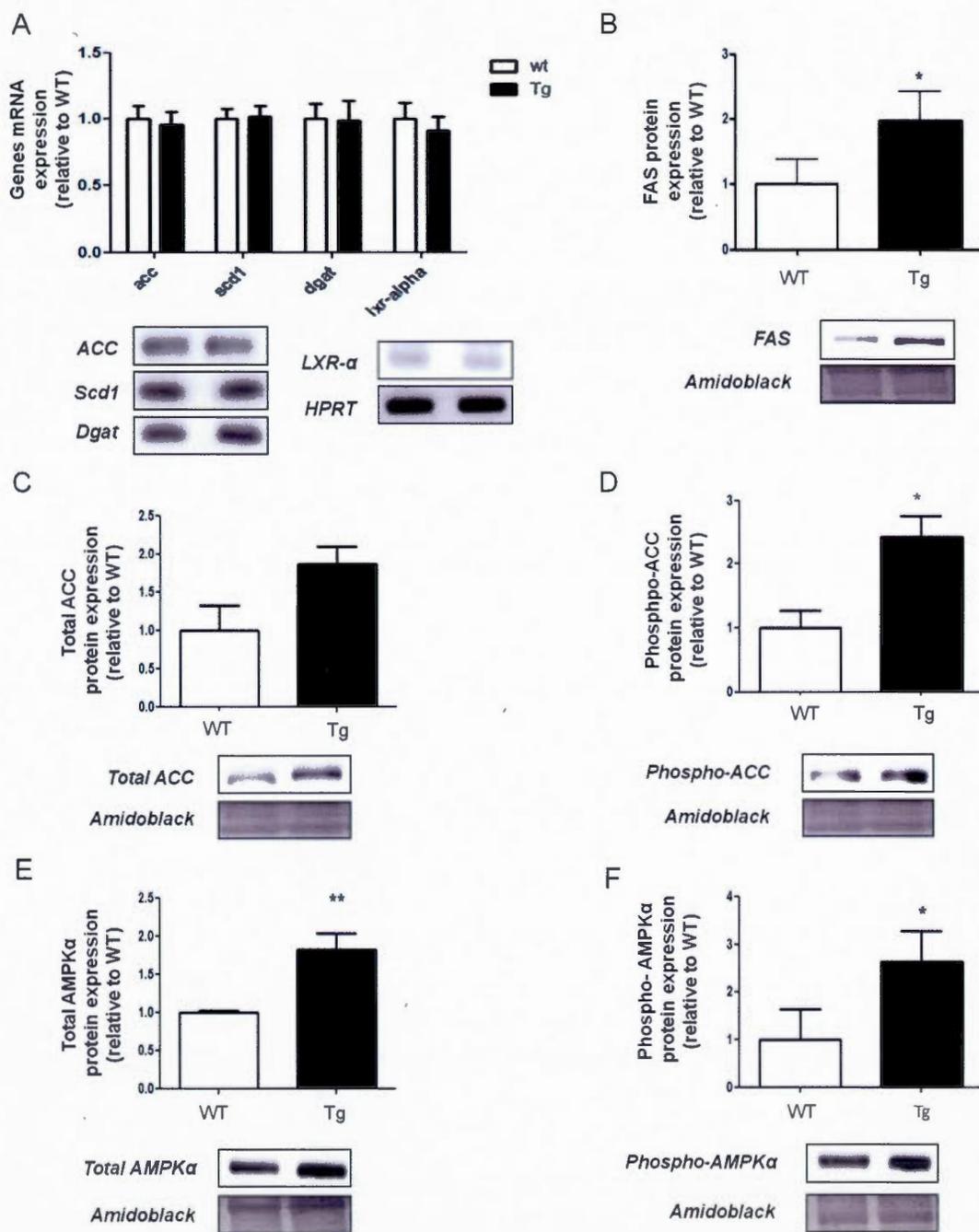


Figure 2.6

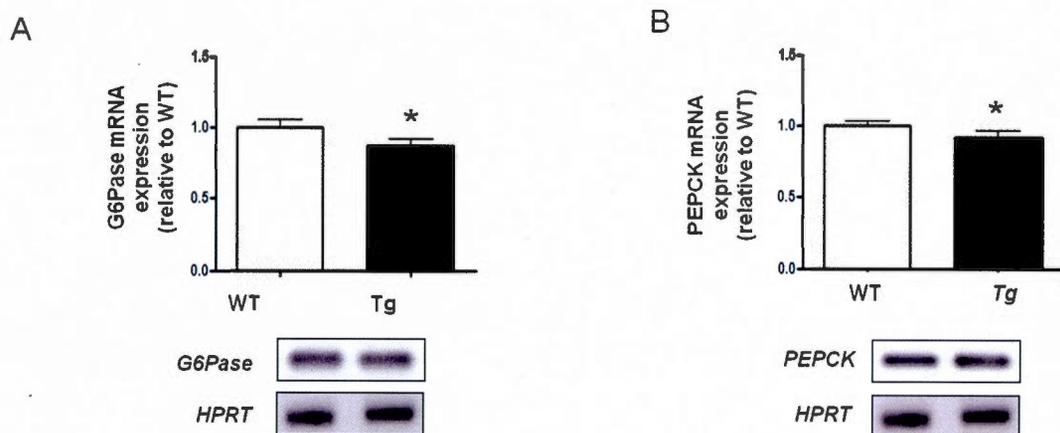


Figure 2.7

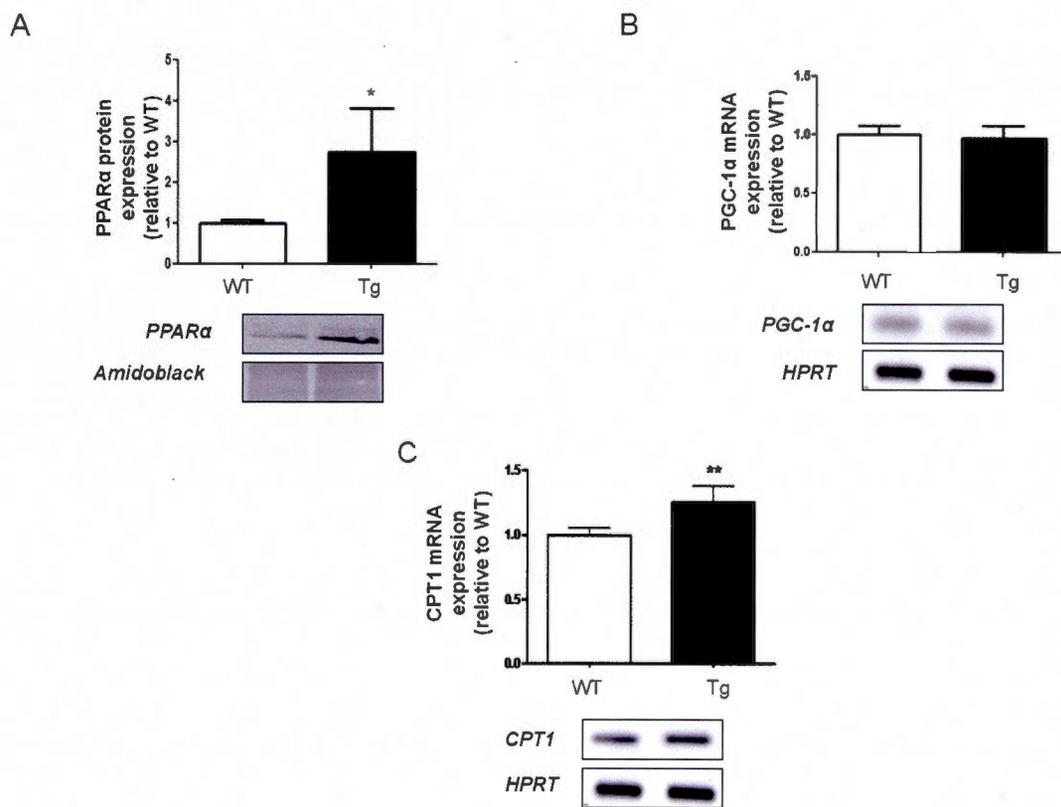


Figure 2.8

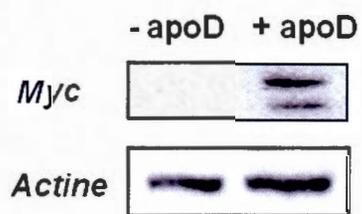
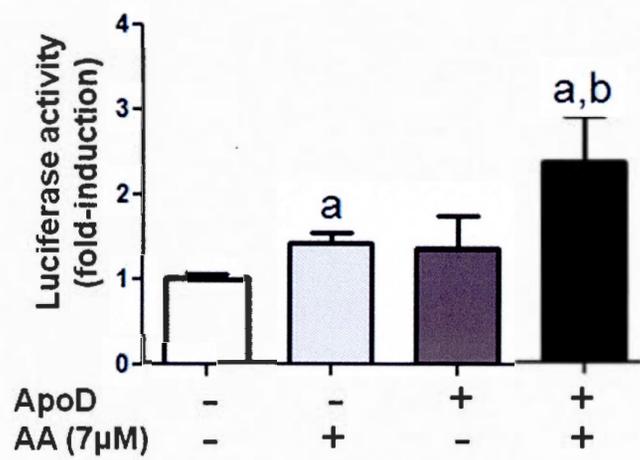
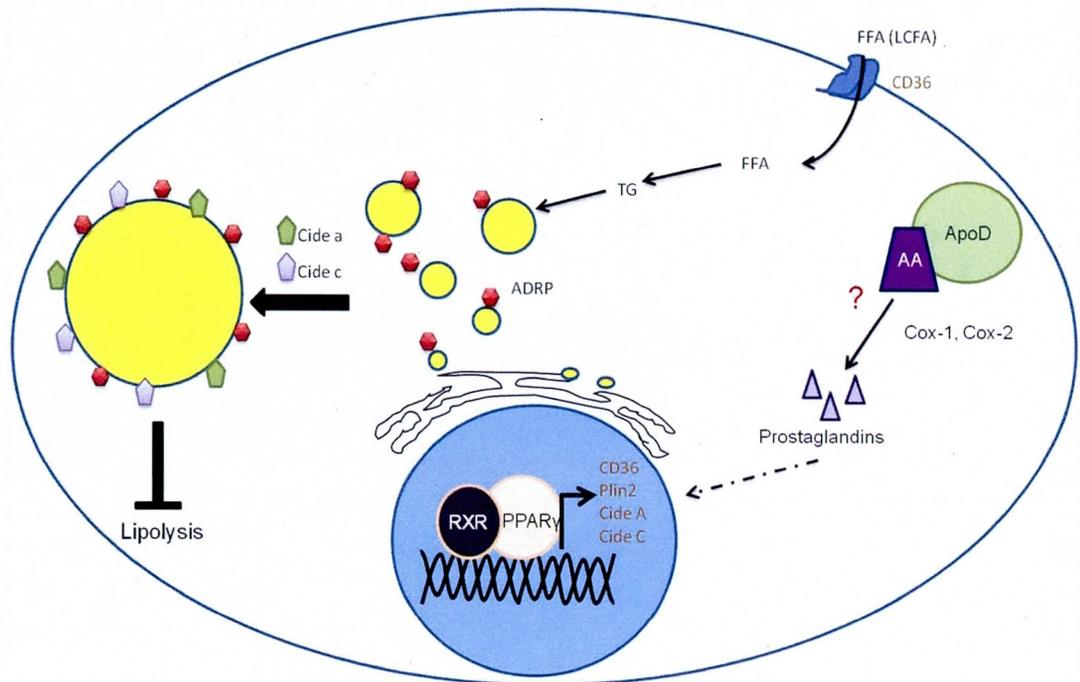


Figure 2.9



2.9 Tables

Table I: Primers used in semiquantitative RT-PCR

Gene	Foward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
PPAR γ 1	acg cgg gct gag aag tca cg	agt tgg tgg gcc aga atg gca
PPAR γ 2	ccc aga gca tgg tgc ctt cgc	tgc gag tgg tct tcc atc ac gg
CD36	gaa tta gaa ccg ggc cac gta gaa a	aca gct cca gca atg agc cca c
HL	cgc agg cag ctc cat gga cgg	aag gcg ctc gtt ggg gga cgt
LPL	tcc ctt cac cct gcc cga gg	tgg ggc tgc tcc acc agt ca
Cide a	ggc cct cgg tac cgt ttg cg	tcc cat gaa tgt cag ggg cct ga
Cide b	tgg cct gct aag gtc agt atc cac t	agg acc tta tct agc agt tct tgg agg
Cide c	tgg cca cgc ggt att gcc ag	tgc cac atg cct gga cag cg
ATGL	tgg gtg aag cag gtg cca aca tta	ctg cag aca ttg gcc tgg atg agc t
CGI-58	gcc aaa cgg cca atg ctt cag	gcc ccg agg atg gca att gtc t
HSL	ctc ctc atg gct caa ctc ctt tcc	agg ggt tct tga cta tgg gtg acg
MGL	caa ggc cct cat ctt tgt gtc cca	ctt gga agt ccg aca cca cca tcc
CPT1	aag tgc cgg acg agt cc cga	tgc tct gcc gtt gtt gtg ggg
G6Pase	gcc cgt att ggt ggg tcc tgg	cag agg gac ttc ctg gtc cgg tc
PEPCK	cgt ggc cga gac tag cga tgg	atg ggc aca tgg ttc cgc gtc
LXR α	gga tag ggt tgg agt cag ca	gga gcg cct gtt aca ctg tt
Dgat	ggc tca ggt ccc act ggc ct	gga ggg ctg gcc ttt ggc ag
SCD1	ccg gag acc cct tag atc ga	tag cct gta aaa gat ttc tgc aaa cc
ACC	tcc ctg gag tgg cag tgg tct	ccc ttt ccc tcc tcc tcc etc t
C/EBP α	ctcgccatgccgggagaactc	aactcgtcgttgaaggcggcc
C/EBP β	cgagcgaacaacatcgcg	cgctcgttctccgcgtcag

CHAPITRE III

DISCUSSION

En Amérique du Nord, le taux croissant de personnes en surpoids est un problème de santé important. L'obésité prédispose à plusieurs troubles métaboliques, dont la stéatose hépatique. Aux États-Unis seulement, plus de 20 millions de personnes sont atteintes de stéatose hépatique et plusieurs d'entre elles développeront éventuellement une fibrose, voire même une cirrhose du foie (Ahmed and Byrne 2007).

Au niveau moléculaire, plusieurs anomalies peuvent mener à la stéatose hépatique : une alimentation riche en gras ou en sucre, l'hyperlipidémie, une augmentation de la synthèse *de novo* des AG, une défaillance dans la production de VLDL ou une diminution de l'oxydation des AG (Chirieac, Chirieac et al. 2000; Schuler and Wood 2002; Diehl 2005; Rinella, Elias et al. 2008). Le but de ce projet

était de caractériser les mécanismes moléculaires qui mènent à l'accumulation de TG dans le foie des souris Tg H-apoD.

Le lien entre l'apoD et le métabolisme des TG a été établi pour la première fois en 2009, lorsque Do Carmo *et al.* (2009) ont rapporté que des souris Tg H-apoD développent une stéatose hépatique. Dans la présente étude, les résultats indiquent clairement que la stéatose hépatique dont souffrent ces souris provient de l'activation de PPAR γ par un des ligands de l'apoD. En effet, nous avons démontré que PPAR γ est activé, causant la transcription de plusieurs de ses gènes cibles impliqués dans l'accumulation des lipides. Parmi ceux-ci, CD36 augmente probablement l'assimilation des AG par le foie, alors que Plin2, Cide a et Cide c favorisent l'accumulation de TG sous forme de GL. Un autre gène cible de PPAR γ , C/EBP α , permet à PPAR γ d'augmenter son niveau d'expression grâce à une boucle d'activation qui se fait entre ces deux facteurs de transcription (Darlington, Ross et al. 1998).

L'hypothèse la plus réaliste est que l'activation de PPAR γ est causée par l'AA et/ou ses dérivés (principalement les prostaglandines). En effet, l'AA est le ligand préférentiel de l'apoD et il a été démontré que celle-ci stabilise l'AA intracellulaire, causant son accumulation dans la membrane cellulaire (Forman, Tontonoz et al. 1995; Kliewer, Lenhard et al. 1995; Morais Cabral, Atkins et al. 1995; Thomas, George et al. 2003). Nous avons démontré *in vitro* que la surexpression de l'apoD potentialise l'activation de PPAR γ par l'AA. Maintenant, il serait intéressant de mesurer, dans le foie des souris Tg-H-apoD, les niveaux de prostaglandines et d'AA. De plus, sachant que l'apoD est sécrétée et qu'elle a la possibilité d'entrer de nouveau dans les cellules, il serait intéressant de vérifier si l'apoD circulante peut entrer dans les hépatocytes lorsqu'elle est liée à l'AA. Pour ce faire, de l'apoD purifiée à partir de fluide cystique humain et pré-incubée avec de l'AA pourrait être utilisée pour stimuler des cellules HEPG2 qui surexpriment les vecteurs utilisés dans notre étude : GAL4- PPAR γ et UAS-Luciférase. Il serait également possible d'incuber de l'apoD

purifiée avec de l'AA radioactive afin de vérifier si cette dernière pénètre dans les cellules.

Évidemment, chez ces souris, tous les effets de la surexpression de l'apoD (résistance à l'insuline, stéatose multiple, neuroprotection, etc.) ne résultent probablement pas de l'activation de PPAR γ . Puisque l'apoD a différents niveaux de glycosylation, qu'elle est exprimée dans différents tissus et qu'elle a plusieurs ligands, il serait logique que ses fonctions diffèrent selon les conditions dans lesquelles elle se trouve. Par exemple, Perdormo *et al.* (2010) ont eux aussi tenté de démystifier le rôle de l'apoD dans le métabolisme des lipides. Ils ont utilisé un adénovirus contenant le gène de l'apoD murin qu'ils ont injecté à des souris. En plus de ne pas avoir détecté d'accumulation de TG dans le foie des souris, ils ont noté que la surexpression de l'apoD cause une activation des LPL, menant à une diminution du niveau de TG circulants. Le modèle utilisé par ce groupe de recherche est différent, à plusieurs niveaux, des souris Tg H-apoD. Premièrement, le promoteur utilisé (SV40) est plus fort que le promoteur Thy-1. Ensuite, il s'agit d'une surexpression transitoire de l'apoD (2 semaines seulement), donc un effet cumulatif ne peut être observé. Enfin, les tissus ciblés ne sont pas les mêmes, puisque Thy-1 cible principalement le SNC (Do Carmo, Fournier *et al.* 2009), alors que les adénovirus ciblent principalement le foie (Perdomo, Kim *et al.* 2010). Toutes ces raisons nous poussent donc à explorer d'autres pistes, soit l'effet de l'apoD au niveau systémique.

Tout d'abord, puisque l'H-apoD est produite principalement dans le cerveau des souris Tg, elle pourrait influencer la gestion de l'énergie par l'hypothalamus. L'hypothalamus est le centre de contrôle de l'énergie, principalement par les voies de signalisation de la leptine et de l'AMPK. Alors que la leptine a un effet « coupe-faim », l'activation de l'AMPK a l'effet inverse, c'est-à-dire qu'elle mène à l'hyperphagie et à une diminution de la dépense énergétique (Montague, Farooqi *et al.* 1997; Xue and Kahn 2006; Sejima, Yamauchi *et al.* 2011). Il est reconnu que

l'apoD peut lier le récepteur de la leptine (Liu, Chang et al. 2001) et nos résultats démontrent qu'une surexpression de l'apoD peut activer l'AMPK. Il serait donc possible que l'apoD perturbe la voie de signalisation de la leptine ou encore qu'elle active l'AMPK au niveau de l'hypothalamus.

Il serait possible de comparer la prise alimentaire entre des souris WT et des souris Tg H-apoD en utilisant des cages métaboliques. Celles-ci fourniraient des mesures directes de la quantité de nourriture et d'eau consommée ainsi que la quantité de fèces et d'urine produites. La mesure de la température des souris ainsi que leur production de CO₂ serait également représentative de la dépense énergétique. Au niveau de l'hypothalamus, il serait possible de vérifier si l'apoD a un impact sur l'activation de l'AMPK en mesurant son niveau d'expression et de phosphorylation. Il serait aussi possible de vérifier si la voie de signalisation de la leptine est modulée en vérifiant le niveau de phosphorylation des protéines clés de cette voie, par exemple STAT3 et JAK2.

Néanmoins, le dysfonctionnement de la voie de signalisation de la leptine ou l'activation hypothalamique de l'AMPK chez les souris Tg H-apoD est peu probable. En effet, le phénotype de ces souris ne concorde pas avec celui de souris déficientes en récepteur de la leptine (db/db) ou celui de souris qui surexpriment une forme constitutivement active de l'AMPK (AMPK') au niveau de l'hypothalamus. En effet, des souris db/db et des souris AMPK' sont hyperphagiques et obèses, alors que les souris Tg H-apoD ne le sont pas (Koranyi, James et al. 1990; Minokoshi, Alquier et al. 2004; Do Carmo, Fournier et al. 2009).

Il est possible que l'apoD produite dans le cerveau ait un effet local, mais nous ne pouvons pas éliminer la possibilité que ce soit de l'apoD circulante qui perturbe certaines voies métaboliques. À ce jour, nous ne savons pas si l'apoD peut passer la barrière hémato-encéphalique. Donc, malgré le fait qu'elle soit sécrétée, nous ne savons pas si l'H-apoD produite dans le cerveau des souris Tg peut se rendre aux organes périphériques et ainsi perturber le métabolisme des lipides et la voie de signalisation de l'insuline. Ainsi, les troubles métaboliques observés chez ces souris

Tg pourraient provenir soit de l'H-apoD produite dans le cerveau, laquelle passerait ou non la barrière hémato-encéphalique, soit de l'apoD produite par les organes périphériques. En effet, Do Carmo *et al.* (2009) ont démontré qu'une petite quantité d'H-apoD est produite dans le cœur, le foie, les ovaires et les testicules des souris Tg H-apoD. Cette apoD se retrouve dans la circulation sanguine et peut donc être captée par les différents tissus.

Une façon d'éclaircir ce phénomène serait d'étudier le lien qui existe entre la résistance à l'insuline et la stéatose hépatique et musculaire dont les souris Tg H-apoD sont atteintes. En effet, la voie de signalisation de l'insuline et le métabolisme des lipides sont étroitement reliés, puisqu'un dérèglement de la voie de signalisation de l'insuline peut causer une accumulation de lipides dans les tissus périphériques, et qu'un dérèglement du métabolisme des lipides peut lui aussi perturber la voie de signalisation de l'insuline (Lonardo, Lombardini *et al.* 2005).

Chez les souris Tg H-apoD, la relation entre la résistance à l'insuline, la stéatose hépatique et la stéatose musculaire est encore incomprise. Do Carmo *et al.* (2009) ont suggéré que la stéatose hépatique est le premier trouble métabolique à survenir chez ces souris, puisqu'une augmentation du niveau d'ARNm de SREBP-1c est observée vers l'âge de trois mois, alors que la résistance à l'insuline n'est pas encore détectée. Selon nos résultats, PPAR γ est probablement activé dès la naissance des souris, et donc des lipides s'accumulent lentement au niveau du foie. Cette accumulation de lipides est susceptible de perturber la voie de signalisation de l'insuline, ce qui aura pour effet d'accélérer ce mécanisme qui mène à la stéatose hépatique. Pour ce qui est du muscle, il n'est pas possible, pour le moment, de déterminer si l'accumulation de lipides est également due à une activation de PPAR γ ou si elle résulte plutôt de la résistance à l'insuline. En effet, au niveau des muscles squelettiques des souris Tg, Do Carmo *et al.* (2009) n'ont pas détecté l'expression en ARNm de H-apoD. Évidemment, de l'apoD circulante pourrait entrer dans les muscles et activer PPAR γ , mais l'effet serait probablement moins marqué que si la

protéine était produite dans le muscle. Il faudrait donc refaire une étude moléculaire des gènes lipogéniques et des gènes impliqués dans la formation des GL au niveau des muscles squelettiques des souris Tg H-apoD.

Afin de déterminer quel dérèglement apparaît en premier chez ces souris, il serait possible de suivre le cheminement de la stéatose hépatique et musculaire et de la résistance à l'insuline à chaque mois postnatal. Pour se faire, un test de tolérance au glucose et à l'insuline ainsi que la quantification des lipides dans le foie et le muscle pourraient être utilisés. Il serait également intéressant de tester, chez ces souris, le niveau d'expression hépatique et musculaire de PPAR γ et de certains de ses gènes cibles ainsi que le niveau de phosphorylation d'AKT. Tous ces tests permettraient une meilleure compréhension du rôle de l'apoD dans le métabolisme énergétique.

Bien sûr, puisque l'apoD a souvent été étudiée pour son rôle dans le métabolisme du cholestérol, il serait aussi intéressant d'étudier cet aspect. Plusieurs polymorphismes sur le gène de l'apoD ont été répertoriés dans la population mondiale. Ces derniers entraînent généralement des anomalies métaboliques, telles qu'une hypertriglycémie et une diminution du taux de HDL circulants (Kamboh, Albers et al. 1989; Hitman, McCarthy et al. 1992; Baker, Hitman et al. 1994; Vijayaraghavan, Hitman et al. 1994; Desai, Bunker et al. 2002; Perdomo, Kim et al. 2010). Il serait donc attendu que le métabolisme du cholestérol soit modulé chez des souris Tg qui surexpriment l'apoD. Néanmoins, au niveau hépatique et circulant, aucune différence n'a été détectée dans les niveaux de cholestérol (Do Carmo, Fournier et al. 2009). Afin de supporter ces résultats, nous avons mesuré, chez les souris Tg H-apoD, le niveau d'expression de CYP7A1, enzyme limitant de la formation de la bile. Hors de toute attente, nous avons démontré que l'expression du gène CYP7A1 diminue significativement par rapport aux souris WT (Figure supplémentaire 1). Cette diminution pourrait être causée par PPAR α , puisque l'expression de celui-ci est augmentée dans le foie des souris Tg H-apoD et qu'il est reconnu comme étant un répresseur du gène CYP7A1 (Janowski, Willy et al. 1996;

Marrapodi and Chiang 2000; Do Carmo, Fournier et al. 2009). Il serait intéressant d'étudier le métabolisme du cholestérol chez ces souris Tg afin de comprendre pourquoi la diminution de CYP7A1 n'a pas d'impact sur la quantité hépatique et circulante de cholestérol. Puisqu'il semble exister un mécanisme compensatoire, il serait pertinent de mesurer le niveau d'expression hépatique musculaire et adipocitaire d'ABCA1, impliqué dans l'exportation du cholestérol vers les HDL (Bodzioch, Orso et al. 1999; Zannis, Chroni et al. 2006). Il serait également intéressant d'étudier le niveau d'expression des enzymes hépatiques CYP27A1 et CYP7B1, puisqu'ils font partie d'une voie alternative à CYP7A1 (Chiang 2009).

Évidemment, une multitude de pistes pourrait être étudiée. Cependant, plusieurs expériences complémentaires à notre étude devront être réalisées avant l'utilisation d'approches alternatives. Ces expériences complémentaires permettraient d'approfondir nos résultats et ainsi de mieux comprendre le lien entre l'apoD et PPAR γ .

Tout d'abord, l'augmentation en ARNm de CD36 chez les souris Tg H-apoD suggère qu'une plus grande quantité d'AG (principalement des AGLC) est captée par les hépatocytes. Il serait possible de vérifier *in vivo* la captation des AG par le foie, en injectant de l'acide palmitique-[^3H] à des souris WT et Tg. Le niveau de radioactivité retrouvé dans le foie des souris serait représentatif du niveau de captation des AG par cet organe. Il serait également intéressant de vérifier le niveau de captation des AG par les muscles squelettiques, puisque les souris Tg H-apoD souffrent également d'une stéatose musculaire. Ce résultat pourrait confirmer que les AG stockés dans le foie des souris Tg H-apoD proviennent de source ectopique.

Une augmentation de l'entrée des AG peut être cytotoxique. Les cellules n'ont donc pas d'autre choix que de s'en débarrasser (par l'intermédiaire des VLDL ou de la β -oxydation) ou de les isoler (par l'intermédiaire des GL) (Schlossman and Bell 1976). Afin de compenser une augmentation de l'expression de CD36, il est reconnu que les AGLC captés par celui-ci activent AMPK et PPAR α (Mandard, Muller et al.

2004; Za'tara, Bar-Tana et al. 2008). C'est ce qui semble s'être produit dans le foie des souris Tg H-apoD, puisque l'AMPK et PPAR α sont surexprimés et activés. Leur activation mène à une diminution de la lipogenèse, via la phosphorylation d'ACC, à une augmentation de la β -oxydation par l'induction du gène CPT1 et par l'activation de la protéine et à une diminution de la néoglucogenèse par une diminution de l'expression de PEPCCK et de G6Pase. Ces deux mécanismes compensatoires peuvent ralentir la progression de la stéatose hépatique chez les souris Tg H-apoD et peuvent peut-être même diminuer l'hyperglycémie causée par la résistance à l'insuline dont souffrent ces souris Tg.

Même si la lipogenèse semble inhibée, l'enzyme FAS est surexprimé chez les souris Tg. Il serait pertinent de mesurer le niveau de lipogenèse dans le foie des souris Tg et WT afin de confirmer le niveau d'activation de la lipogenèse. Pour se faire, il serait possible de mesurer l'incorporation de ^3H dans des AG, en injectant du $^3\text{H}_2\text{O}$ à des souris Tg et WT. Le foie serait ensuite prélevé et les lipides isolés afin de mesurer la quantité de radioactivité (Stansbie, Brownsey et al. 1976). Cette expérience permettrait de confirmer que l'enzyme FAS est augmenté en compensation à l'inactivation d'ACC.

Pour ce qui est de la β -oxydation, il a été démontré que des souris déficientes en Cide a ou Cide c ont plus de mitochondries que des souris WT. L'augmentation de la biogenèse mitochondriale favorise la β -oxydation. Puisque l'expression de Cide a et de Cide c est augmentée dans le foie des souris Tg H-apoD, il aurait été pertinent de vérifier par microscope à fluorescence la quantité de mitochondries. Celles-ci pourraient être marquées par un « MitoTracker » sur des coupes de foie de souris Tg et de souris WT.

Évidemment, les mécanismes compensatoires qui semblent être activés chez les souris Tg H-apoD ne suffisent pas puisque la stéatose hépatique apparaît éventuellement. Puisqu'un des rôles de PPAR γ est de mener à la formation et à la maturation des GL, la majorité des AG captés semble être dirigée vers les GL. En

effet, la surexpression de Plin2, de Cide a et de Cide c indique que les lipides contenus dans les GL sont stabilisés par la délocalisation des lipases et par la diminution de la surface de contact entre les lipases et les GL. Les changements apportés par l'activation de PPAR γ causent une augmentation de 5X de la taille des GL, appuyant le fait que les protéines Cide mènent à la fusion des GL.

Comme expérience complémentaire, il aurait été utile de visualiser par immunohistofluorescence la localisation des différentes lipases (ATGL, HSL et MGL) par rapport aux GL afin de confirmer leur délocalisation. De plus, le niveau de lipolyse pourrait être vérifié en mesurant la quantité de glycérol produit par des hépatocytes primaires provenant de souris Tg et WT. Lorsqu'un TG est hydrolysé, il y a la libération de trois AG et d'une chaîne de glycérol. Donc, la quantité de glycérol retrouvée dans le milieu de culture serait représentative du niveau de lipolyse des GL.

Toutes ces expériences permettraient de mieux comprendre les différentes étapes qui mènent à l'accumulation de TG dans le foie de souris Tg H-apoD. Elles permettraient également de confirmer l'implication de PPAR γ dans ce mécanisme.

CONCLUSION

Bien que l'apoD ait été découverte en 1963, ses rôles sont encore aujourd'hui incompris. Dans cette étude, nous avons démontré que la stéatose hépatique dont souffrent les souris Tg H-apoD résulte d'une activation du récepteur nucléaire PPAR γ . Ainsi, la transcription de plusieurs gènes cibles de PPAR γ est induite, menant à l'accumulation de TG sous forme de GL. Nous croyons que CD36 augmente l'entrée des AGLC, qui seront ensuite transformés en TG et stockés dans des GL. La protéine Plin2 stabilise ensuite les GL en délocalisant les lipases, alors que Cide a et Cide c provoquent la fusion des GL, diminuant ainsi la surface de contact entre les GL et les lipases. Cette augmentation de l'effort de stockage causerait, à long terme, la stéatose hépatique. Il existe cependant des mécanismes compensatoires dans le foie de ces souris. L'AMPK et PPAR α permettraient de diminuer la progression de la stéatose hépatique en diminuant la lipogenèse et la néoglucogenèse et en augmentant la β -oxydation. Enfin, notre étude *in vitro* nous a permis de démontrer que l'activation de PPAR γ par l'AA est augmentée lorsque les cellules HEPG2 surexpriment l'apoD.

Il serait nécessaire de mieux comprendre les mécanismes par lesquels la surexpression de l'apoD cause l'activation de PPAR γ . De plus, une meilleure compréhension du rôle des différents ligands de l'apoD pourrait peut-être même nous aider à comprendre l'impact de l'apoD dans l'organisme, par exemple son rôle dans la neuroprotection, et de développer des approches thérapeutiques pour plusieurs maladies neurodégénératives.

CHAPITRE IV

BIBLIOGRAPHIE

- Abu-Elheiga, L., et al. (1997). "Human acetyl-CoA carboxylase 2. Molecular cloning, characterization, chromosomal mapping, and evidence for two isoforms." J Biol Chem **272**(16): 10669-10677.
- Ahmed, M. H. and C. D. Byrne (2007). "Modulation of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) as potential treatments for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)." Drug Discov Today **12**(17-18): 740-747.
- Akpa, M. M.; et al. (2010). "Inhibition of insulin and T3-induced fatty acid synthase by hexanoate." Lipids **45**(11): 997-1009.
- Alaupovic, P., et al. (1981). "Plasma apolipoprotein concentrations in familial apolipoprotein A-I and A-II deficiency (Tangier disease)." Metabolism **30**(8): 805-809.
- Albers, J. J., et al. (1976). "Purification and characterization of human plasma lecithin:cholesterol acyltransferase." Biochemistry **15**(5): 1084-1087.
- Albers, J. J., et al. (1979). "Effect of human plasma apolipoproteins on the activity of purified lecithin: cholesterol acyltransferase." Artery **5**(1): 61-75.
- Aspinall, J. O., et al. (1995). "Differential expression of apolipoprotein-D and prostate specific antigen in benign and malignant prostate tissues." J Urol **154**(2 Pt 1): 622-628.

- Assimacopoulos-Jeannet, F. and B. Jeanrenaud (1990). "Insulin activates 6-phosphofructo-2-kinase and pyruvate kinase in the liver. Indirect evidence for an action via a phosphatase." *J Biol Chem* **265**(13): 7202-7206.
- Atshaves, B. P., et al. (2001). "Sterol carrier protein-2 expression modulates protein and lipid composition of lipid droplets." *J Biol Chem* **276**(27): 25324-25335.
- Baker, W. A., et al. (1994). "Apolipoprotein D gene polymorphism: a new genetic marker for type 2 diabetic subjects in Nauru and south India." *Diabet Med* **11**(10): 947-952.
- Balbin, M., et al. (1990). "Apolipoprotein D is the major protein component in cyst fluid from women with human breast gross cystic disease." *Biochem J* **271**(3): 803-807.
- Banerjee, S. S., et al. (2003). "The Kruppel-like factor KLF2 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression and adipogenesis." *J Biol Chem* **278**(4): 2581-2584.
- Baur, J. A., et al. (2006). "Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet." *Nature* **444**(7117): 337-342.
- Bickel, P. E., et al. (2009). "PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores." *Biochim Biophys Acta* **1791**(6): 419-440.
- Blake, W. L. and S. D. Clarke (1990). "Suppression of rat hepatic fatty acid synthase and S14 gene transcription by dietary polyunsaturated fat." *J Nutr* **120**(12): 1727-1729.
- Blanco-Vaca, F., et al. (1992). "Characterization of disulfide-linked heterodimers containing apolipoprotein D in human plasma lipoproteins." *J Lipid Res* **33**(12): 1785-1796.
- Bodzioch, M., et al. (1999). "The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease." *Nat Genet* **22**(4): 347-351.
- Boren, J., et al. (1992). "The assembly and secretion of ApoB 100-containing lipoproteins in Hep G2 cells. ApoB 100 is cotranslationally integrated into lipoproteins." *J Biol Chem* **267**(14): 9858-9867.
- Borgstroem, B. (1964). "Influence of Bile Salt, Ph, and Time on the Action of Pancreatic Lipase; Physiological Implications." *J Lipid Res* **5**: 522-531.
- Bowles, L. and P. Kopelman (2001). "Leptin: of mice and men?" *J Clin Pathol* **54**(1): 1-3.
- Boyles, J. K., et al. (1990). "Accumulation of apolipoproteins in the regenerating and remyelinating mammalian peripheral nerve. Identification of apolipoprotein D, apolipoprotein A-IV, apolipoprotein E, and apolipoprotein A-I." *J Biol Chem* **265**(29): 17805-17815.
- Boyles, J. K., et al. (1990). "Identification, characterization, and tissue distribution of apolipoprotein D in the rat." *J Lipid Res* **31**(12): 2243-2256.
- Bradbury, M. W. (2006). "Lipid metabolism and liver inflammation. I. Hepatic fatty acid uptake: possible role in steatosis." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **290**(2): G194-198.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Brasaemle, D. L., et al. (2000). "Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis." *J Biol Chem* **275**(49): 38486-38493.
- Brown, D. A. (2001). "Lipid droplets: proteins floating on a pool of fat." *Curr Biol* **11**(11): R446-449.

- Brunzell, J. D. and W. Y. Fujimoto (1995). "Body fat distribution and dyslipidemia." Am J Med **99**(5): 457-458.
- Chakravarthy, M. V., et al. (2005). "'New' hepatic fat activates PPARalpha to maintain glucose, lipid, and cholesterol homeostasis." Cell Metab **1**(5): 309-322.
- Chapman, A. B., et al. (1984). "Analysis of gene expression during differentiation of adipogenic cells in culture and hormonal control of the developmental program." J Biol Chem **259**(24): 15548-15555.
- Chawla, A., et al. (2001). "A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis." Mol Cell **7**(1): 161-171.
- Chen, C. H. and J. J. Albers (1982). "Distribution of lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) in human plasma lipoprotein fractions. Evidence for the association of active LCAT with low density lipoproteins." Biochem Biophys Res Commun **107**(3): 1091-1096.
- Cheung, P. C., et al. (2000). "Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding." Biochem J **346 Pt 3**: 659-669.
- Chiang, J. Y. (2009). "Bile acids: regulation of synthesis." J Lipid Res **50**(10): 1955-1966.
- Chirala, S. S. and S. J. Wakil (2004). "Structure and function of animal fatty acid synthase." Lipids **39**(11): 1045-1053.
- Chirieac, D. V., et al. (2000). "Glucose-stimulated insulin secretion suppresses hepatic triglyceride-rich lipoprotein and apoB production." American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism **279**(5): E1003-E1011.
- Chu, K., et al. (2006). "Stearoyl-coenzyme A desaturase 1 deficiency protects against hypertriglyceridemia and increases plasma high-density lipoprotein cholesterol induced by liver X receptor activation." Mol Cell Biol **26**(18): 6786-6798.
- Cofer, S. and S. R. Ross (1996). "The murine gene encoding apolipoprotein D exhibits a unique expression pattern as compared to other species." Gene **171**(2): 261-263.
- Crestani, M., et al. (1998). "Transcriptional activation of the cholesterol 7alpha-hydroxylase gene (CYP7A) by nuclear hormone receptors." J Lipid Res **39**(11): 2192-2200.
- Cusi, K. (2009). "Role of insulin resistance and lipotoxicity in non-alcoholic steatohepatitis." Clin Liver Dis **13**(4): 545-563.
- Da, L., et al. (2006). "Dual promoters control the cell-specific expression of the human cell death-inducing DFF45-like effector B gene." Biochem J **393**(Pt 3): 779-788.
- Darlington, G. J., et al. (1998). "The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation." J Biol Chem **273**(46): 30057-30060.
- Davies, S. P., et al. (1995). "5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C alpha and native bovine protein phosphatase-2AC." FEBS Lett **377**(3): 421-425.
- de Wet, J. R., et al. (1987). "Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells." Mol Cell Biol **7**(2): 725-737.
- Debevec, D., et al. (2007). "Receptor interacting protein 140 regulates expression of uncoupling protein 1 in adipocytes through specific peroxisome proliferator activated receptor isoforms and estrogen-related receptor alpha." Mol Endocrinol **21**(7): 1581-1592.

- DeNigris, S. J., et al. (1988). "Lingual and gastric lipases: species differences in the origin of prepancreatic digestive lipases and in the localization of gastric lipase." Biochim Biophys Acta **959**(1): 38-45.
- Dentin, R., et al. (2006). "Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice." Diabetes **55**(8): 2159-2170.
- Dentin, R., et al. (2005). "Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation." J Clin Invest **115**(10): 2843-2854.
- Desai, P. P., et al. (2002). "Genetic variation in the apolipoprotein D gene among African blacks and its significance in lipid metabolism." Atherosclerosis **163**(2): 329-338.
- Desvergne, B. and W. Wahli (1999). "Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism." Endocr Rev **20**(5): 649-688.
- Diehl, A. M. (2005). "Lessons from animal models of NASH." Hepatology Research **33**(2): 138-144.
- Diez-Iltza, I., et al. (1994). "Expression and prognostic significance of apolipoprotein D in breast cancer." Am J Pathol **144**(2): 310-320.
- Dilley, W. G., et al. (1990). "Immunologic and steroid binding properties of the GCDFP-24 protein isolated from human breast gross cystic disease fluid." Breast Cancer Res Treat **16**(3): 253-260.
- Do Carmo, S., et al. (2009). "Human apolipoprotein D overexpression in transgenic mice induces insulin resistance and alters lipid metabolism." Am J Physiol Endocrinol Metab **296**(4): E802-811.
- Do Carmo, S., et al. (2008). "Neuroprotective effect of apolipoprotein D against human coronavirus OC43-induced encephalitis in mice." J Neurosci **28**(41): 10330-10338.
- Drayna, D., et al. (1986). "Cloning and expression of human apolipoprotein D cDNA." J Biol Chem **261**(35): 16535-16539.
- Drayna, D. T., et al. (1987). "Human apolipoprotein D gene: gene sequence, chromosome localization, and homology to the alpha 2u-globulin superfamily." DNA **6**(3): 199-204.
- Ducharme, N. A. and P. E. Bickel (2008). "Lipid droplets in lipogenesis and lipolysis." Endocrinology **149**(3): 942-949.
- Egan, J. J., et al. (1990). "Control of endogenous phosphorylation of the major cAMP-dependent protein kinase substrate in adipocytes by insulin and beta-adrenergic stimulation." J Biol Chem **265**(31): 18769-18775.
- Eichinger, A., et al. (2007). "Structural insight into the dual ligand specificity and mode of high density lipoprotein association of apolipoprotein D." J Biol Chem **282**(42): 31068-31075.
- Evans, A. M., et al. (2005). "Does AMP-activated protein kinase couple inhibition of mitochondrial oxidative phosphorylation by hypoxia to calcium signaling in O₂-sensing cells?" J Biol Chem **280**(50): 41504-41511.
- Fajas, L., et al. (1997). "The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene." J Biol Chem **272**(30): 18779-18789.
- Fidge, N. H. (1999). "High density lipoprotein receptors, binding proteins, and ligands." J Lipid Res **40**(2): 187-201.

- Fievet, C. and B. Staels (2009). "Liver X receptor modulators: effects on lipid metabolism and potential use in the treatment of atherosclerosis." Biochem Pharmacol **77**(8): 1316-1327.
- Fisher, E. A. and H. N. Ginsberg (2002). "Complexity in the secretory pathway: the assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins." J Biol Chem **277**(20): 17377-17380.
- Foretz, M., et al. (2005). "Short-term overexpression of a constitutively active form of AMP-activated protein kinase in the liver leads to mild hypoglycemia and fatty liver." Diabetes **54**(5): 1331-1339.
- Forman, B. M., et al. (1995). "15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma." Cell **83**(5): 803-812.
- Francis, G. A., et al. (1995). "Defective removal of cellular cholesterol and phospholipids by apolipoprotein A-I in Tangier Disease." J Clin Invest **96**(1): 78-87.
- Franz, G., et al. (1999). "Increased expression of apolipoprotein D following experimental traumatic brain injury." J Neurochem **73**(4): 1615-1625.
- Ganfornina, M. D., et al. (2008). "Apolipoprotein D is involved in the mechanisms regulating protection from oxidative stress." Aging Cell **7**(4): 506-515.
- Ganfornina, M. D., et al. (2010). "ApoD, a glia-derived apolipoprotein, is required for peripheral nerve functional integrity and a timely response to injury." Glia **58**(11): 1320-1334.
- Gao, J. and G. Serrero (1999). "Adipose differentiation related protein (ADRP) expressed in transfected COS-7 cells selectively stimulates long chain fatty acid uptake." J Biol Chem **274**(24): 16825-16830.
- Gavrilova, O., et al. (2003). "Liver peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass." J Biol Chem **278**(36): 34268-34276.
- Gaw, A., et al. (1995). "Overproduction of small very low density lipoproteins (Sf 20-60) in moderate hypercholesterolemia: relationships between apolipoprotein B kinetics and plasma lipoproteins." J Lipid Res **36**(1): 158-171.
- Glass, C. K. and M. G. Rosenfeld (2000). "The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors." Genes Dev **14**(2): 121-141.
- Goldberg, I. J. (1996). "Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis." J Lipid Res **37**(4): 693-707.
- Gong, J., et al. (2009). "CIDE proteins and metabolic disorders." Curr Opin Lipidol **20**(2): 121-126.
- Gonzalez-Baro, M. R., et al. (2007). "Regulation of Triglyceride Metabolism. II. Function of mitochondrial GPAT1 in the regulation of triacylglycerol biosynthesis and insulin action." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **292**(5): G1195-1199.
- Gruzman, A., et al. (2009). "Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase (AMPK) as a New Target for Antidiabetic Drugs: A Review on Metabolic, Pharmacological and Chemical Considerations." Rev Diabet Stud **6**(1): 13-36.
- Guillou, H., et al. (2008). "Transcriptional regulation of hepatic fatty acid metabolism." Subcell Biochem **49**: 3-47.

- Gummesson, A., et al. (2007). "Relations of adipose tissue CIDEA gene expression to basal metabolic rate, energy restriction, and obesity: population-based and dietary intervention studies." J Clin Endocrinol Metab **92**(12): 4759-4765.
- Gupta, R. K., et al. (2010). "Transcriptional control of preadipocyte determination by Zfp423." Nature **464**(7288): 619-623.
- Ha, J., et al. (1994). "Critical phosphorylation sites for acetyl-CoA carboxylase activity." J Biol Chem **269**(35): 22162-22168.
- Ha, J., et al. (1996). "Cloning of human acetyl-CoA carboxylase-beta and its unique features." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(21): 11466-11470.
- Hajri, T. and N. A. Abumrad (2002). "Fatty acid transport across membranes: relevance to nutrition and metabolic pathology." Annu Rev Nutr **22**: 383-415.
- Hallberg, M., et al. (2008). "A functional interaction between RIP140 and PGC-1alpha regulates the expression of the lipid droplet protein CIDEA." Mol Cell Biol **28**(22): 6785-6795.
- Hallows, K. R., et al. (2003). "Physiological modulation of CFTR activity by AMP-activated protein kinase in polarized T84 cells." Am J Physiol Cell Physiol **284**(5): C1297-1308.
- Hardie, D. G. (2004). "The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream." J Cell Sci **117**(Pt 23): 5479-5487.
- Havel, R. J., et al. (1973). "Interchange of apolipoproteins between chylomicrons and high density lipoproteins during alimentary lipemia in man." J Clin Invest **52**(1): 32-38.
- Hawley, S. A., et al. (2005). "Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase." Cell Metab **2**(1): 9-19.
- Heinemann, F. S. and J. Ozols (2003). "Stearoyl-CoA desaturase, a short-lived protein of endoplasmic reticulum with multiple control mechanisms." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **68**(2): 123-133.
- Hirano, K., et al. (2003). "Pathophysiology of human genetic CD36 deficiency." Trends Cardiovasc Med **13**(4): 136-141.
- Hitman, G. A., et al. (1992). "The genetics of non-insulin-dependent diabetes mellitus in south India: an overview." Ann Med **24**(6): 491-497.
- Hodges, B. D. and C. C. Wu (2010). "Proteomic insights into an expanded cellular role for cytoplasmic lipid droplets." J Lipid Res **51**(2): 262-273.
- Holmquist, L. (1989). "Separation of free and apolipoprotein D-associated human plasma lecithin: cholesterol acyltransferase." J Biochem Biophys Methods **19**(1): 93-103.
- Huang-Doran, I., et al. (2010). "Lipodystrophy: metabolic insights from a rare disorder." J Endocrinol **207**(3): 245-255.
- Hunter, S. B., et al. (2005). "Apolipoprotein D expression in primary brain tumors: analysis by quantitative RT-PCR in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue." J Histochem Cytochem **53**(8): 963-969.
- Ibdah, J. A., et al. (2005). "Mice heterozygous for a defect in mitochondrial trifunctional protein develop hepatic steatosis and insulin resistance." Gastroenterology **128**(5): 1381-1390.

- lizuka, K., et al. (2004). "Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(19): 7281-7286.
- Imai, Y., et al. (2007). "Reduction of hepatosteatosis and lipid levels by an adipose differentiation-related protein antisense oligonucleotide." Gastroenterology **132**(5): 1947-1954.
- Imamura, M., et al. (2002). "ADRP stimulates lipid accumulation and lipid droplet formation in murine fibroblasts." Am J Physiol Endocrinol Metab **283**(4): E775-783.
- Inazu, A., et al. (2008). "Decreased post-prandial triglyceride response and diminished remnant lipoprotein formation in cholesteryl ester transfer protein (CETP) deficiency." Atherosclerosis **196**(2): 953-957.
- Inohara, N., et al. (1998). "CIDE, a novel family of cell death activators with homology to the 45 kDa subunit of the DNA fragmentation factor." EMBO J **17**(9): 2526-2533.
- Iritani, N., et al. (1992). "Regulation of hepatic lipogenic enzyme gene expression by diet quantity in rats fed a fat-free, high carbohydrate diet." J Nutr **122**(1): 28-36.
- Ishigami, M., et al. (1994). "Large and cholesteryl ester-rich high-density lipoproteins in cholesteryl ester transfer protein (CETP) deficiency can not protect macrophages from cholesterol accumulation induced by acetylated low-density lipoproteins." J Biochem **116**(2): 257-262.
- Jager, S., et al. (2007). "AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(29): 12017-12022.
- Jakobsson, A., et al. (2006). "Fatty acid elongases in mammals: their regulation and roles in metabolism." Prog Lipid Res **45**(3): 237-249.
- Janowski, B. A., et al. (1996). "An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha." Nature **383**(6602): 728-731.
- Jinno, Y., et al. (2010). "Cide-a and Cide-c are induced in the progression of hepatic steatosis and inhibited by eicosapentaenoic acid." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **83**(2): 75-81.
- Joseph, S. B., et al. (2002). "Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors." J Biol Chem **277**(13): 11019-11025.
- Kahn, B. B., et al. (2005). "AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism." Cell Metab **1**(1): 15-25.
- Kalaany, N. Y., et al. (2005). "LXRs regulate the balance between fat storage and oxidation." Cell Metab **1**(4): 231-244.
- Kamboh, M. I., et al. (1989). "Genetic studies of human apolipoproteins. IX. Apolipoprotein D polymorphism and its relation to serum lipoprotein lipid levels." Am J Hum Genet **45**(1): 147-154.
- Keller, P., et al. (2008). "Fat-specific protein 27 regulates storage of triacylglycerol." J Biol Chem **283**(21): 14355-14365.
- Kerner, J. and C. Hoppel (2000). "Fatty acid import into mitochondria." Biochim Biophys Acta **1486**(1): 1-17.

- Kimmel, A. R., et al. (2010). "Adoption of PERILIPIN as a unifying nomenclature for the mammalian PAT-family of intracellular lipid storage droplet proteins." J Lipid Res **51**(3): 468-471.
- Kliwer, S. A., et al. (1995). "A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation." Cell **83**(5): 813-819.
- Kliwer, S. A., et al. (1997). "Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(9): 4318-4323.
- Klover, P. J. and R. A. Mooney (2004). "Hepatocytes: critical for glucose homeostasis." Int J Biochem Cell Biol **36**(5): 753-758.
- Koranyi, L., et al. (1990). "Glucose transporter levels in spontaneously obese (db/db) insulin-resistant mice." J Clin Invest **85**(3): 962-967.
- Kostner, G. (1974). "Studies on the cofactor requirements for lecithin:cholesterol acyltransferase." Scand J Clin Lab Invest Suppl **137**: 19-21.
- Krey, G., et al. (1997). "Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay." Mol Endocrinol **11**(6): 779-791.
- Kuerschner, L., et al. (2008). "Imaging of lipid biosynthesis: how a neutral lipid enters lipid droplets." Traffic **9**(3): 338-352.
- Kumadaki, S., et al. (2008). "Mouse Elovl-6 promoter is an SREBP target." Biochem Biophys Res Commun **368**(2): 261-266.
- Lambert, J., et al. (1993). "Structure of the human apolipoprotein D gene promoter region." Biochim Biophys Acta **1172**(1-2): 190-192.
- Levros, L. C., Jr., et al. (2010). "Characterization of nuclear factors modulating the apolipoprotein D promoter during growth arrest: implication of PARP-1, APEX-1 and ERK1/2 catalytic activities." Biochim Biophys Acta **1803**(9): 1062-1071.
- Lewis, G. F. and D. J. Rader (2005). "New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport." Circ Res **96**(12): 1221-1232.
- Li, D., et al. (2008). "CpG methylation plays a vital role in determining tissue- and cell-specific expression of the human cell-death-inducing DFF45-like effector A gene through the regulation of Sp1/Sp3 binding." Nucleic Acids Res **36**(1): 330-341.
- Li, H. X., et al. (2010). "Review: Epigenetic regulation of adipocyte differentiation and adipogenesis." J Zhejiang Univ Sci B **11**(10): 784-791.
- Li, J. Z., et al. (2007). "Cideb regulates diet-induced obesity, liver steatosis, and insulin sensitivity by controlling lipogenesis and fatty acid oxidation." Diabetes **56**(10): 2523-2532.
- Li, T., et al. (2006). "Bile acids and cytokines inhibit the human cholesterol 7 alpha-hydroxylase gene via the JNK/c-jun pathway in human liver cells." Hepatology **43**(6): 1202-1210.
- Li, T., et al. (2006). "Insulin regulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase expression in human hepatocytes: roles of forkhead box O1 and sterol regulatory element-binding protein 1c." J Biol Chem **281**(39): 28745-28754.

- Li, Y., et al. (2011). "AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice." Cell Metab **13**(4): 376-388.
- Liang, G., et al. (2002). "Diminished hepatic response to fasting/refeeding and liver X receptor agonists in mice with selective deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c." J Biol Chem **277**(11): 9520-9528.
- Liang, L., et al. (2003). "Molecular cloning and characterization of CIDE-3, a novel member of the cell-death-inducing DNA-fragmentation-factor (DFF45)-like effector family." Biochem J **370**(Pt 1): 195-203.
- Listenberger, L. L., et al. (2007). "Adipocyte differentiation-related protein reduces the lipid droplet association of adipose triglyceride lipase and slows triacylglycerol turnover." J Lipid Res **48**(12): 2751-2761.
- Liu, Z., et al. (2001). "Apolipoprotein D interacts with the long-form leptin receptor: a hypothalamic function in the control of energy homeostasis." FASEB J **15**(7): 1329-1331.
- Lonardo, A., et al. (2005). "Review article: hepatic steatosis and insulin resistance." Aliment Pharmacol Ther **22 Suppl 2**: 64-70.
- Londos, C., et al. (1999). "Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells." Semin Cell Dev Biol **10**(1): 51-58.
- Love-Gregory, L., et al. (2008). "Variants in the CD36 gene associate with the metabolic syndrome and high-density lipoprotein cholesterol." Hum Mol Genet **17**(11): 1695-1704.
- Lusis, A. J. and P. Pajukanta (2008). "A treasure trove for lipoprotein biology." Nat Genet **40**(2): 129-130.
- Ma, L., et al. (2006). "ChREBP**Mlx* is the principal mediator of glucose-induced gene expression in the liver." J Biol Chem **281**(39): 28721-28730.
- Magnusson, B., et al. (2008). "Cell death-inducing DFF45-like effector C is reduced by caloric restriction and regulates adipocyte lipid metabolism." Metabolism **57**(9): 1307-1313.
- Mahley, R. W., et al. (1984). "Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function." J Lipid Res **25**(12): 1277-1294.
- Mandard, S., et al. (2004). "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes." Cell Mol Life Sci **61**(4): 393-416.
- Mao, J., et al. (2006). "Liver-specific deletion of acetyl-CoA carboxylase 1 reduces hepatic triglyceride accumulation without affecting glucose homeostasis." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(22): 8552-8557.
- Marchesini, G., et al. (2001). "Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome." Diabetes **50**(8): 1844-1850.
- Marrapodi, M. and J. Y. Chiang (2000). "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) and agonist inhibit cholesterol 7alpha-hydroxylase gene (CYP7A1) transcription." J Lipid Res **41**(4): 514-520.
- Martin, S. and R. G. Parton (2006). "Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(5): 373-378.

- Masuda, Y., et al. (2006). "ADRP/adipophilin is degraded through the proteasome-dependent pathway during regression of lipid-storing cells." *J Lipid Res* **47**(1): 87-98.
- Matsusue, K., et al. (2003). "Liver-specific disruption of PPARgamma in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes." *J Clin Invest* **111**(5): 737-747.
- Matsusue, K., et al. (2008). "Hepatic steatosis in leptin-deficient mice is promoted by the PPARgamma target gene Fsp27." *Cell Metab* **7**(4): 302-311.
- Matsuzaka, T., et al. (2002). "Dual regulation of mouse Delta(5)- and Delta(6)-desaturase gene expression by SREBP-1 and PPARalpha." *J Lipid Res* **43**(1): 107-114.
- Mauvoisin, D., et al. (2007). "Role of the PI3-kinase/mTor pathway in the regulation of the stearoyl CoA desaturase (SCD1) gene expression by insulin in liver." *J Cell Commun Signal* **1**(2): 113-125.
- McConathy, W. J. and P. Alaupovic (1973). "Isolation and partial characterization of apolipoprotein D: a new protein moiety of the human plasma lipoprotein system." *FEBS Lett* **37**(2): 178-182.
- McConathy, W. J. and P. Alaupovic (1976). "Studies on the isolation and partial characterization of apolipoprotein D and lipoprotein D of human plasma." *Biochemistry* **15**(3): 515-520.
- McGarry, J. D. and N. F. Brown (1997). "The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis." *Eur J Biochem* **244**(1): 1-14.
- Mead, J. R., et al. (2002). "Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease." *J Mol Med* **80**(12): 753-769.
- Menard, S. L., et al. (2010). "Abnormal in vivo myocardial energy substrate uptake in diet-induced type 2 diabetic cardiomyopathy in rats." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **298**(5): E1049-1057.
- Michael, M. D., et al. (2000). "Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction." *Mol Cell* **6**(1): 87-97.
- Miles, P. D., et al. (2003). "Effect of heterozygous PPARgamma deficiency and TZD treatment on insulin resistance associated with age and high-fat feeding." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284**(3): E618-626.
- Milger, K., et al. (2006). "Cellular uptake of fatty acids driven by the ER-localized acyl-CoA synthetase FATP4." *J Cell Sci* **119**(Pt 22): 4678-4688.
- Minokoshi, Y., et al. (2004). "AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus." *Nature* **428**(6982): 569-574.
- Miyazaki, M., et al. (2007). "Hepatic stearoyl-CoA desaturase-1 deficiency protects mice from carbohydrate-induced adiposity and hepatic steatosis." *Cell Metab* **6**(6): 484-496.
- Momcilovic, M., et al. (2006). "Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase in vitro." *J Biol Chem* **281**(35): 25336-25343.
- Montague, C. T., et al. (1997). "Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans." *Nature* **387**(6636): 903-908.
- Morais Cabral, J. H., et al. (1995). "Arachidonic acid binds to apolipoprotein D: implications for the protein's function." *FEBS Lett* **366**(1): 53-56.

- Mori, T., et al. (2005). "Role of Kruppel-like factor 15 (KLF15) in transcriptional regulation of adipogenesis." *J Biol Chem* **280**(13): 12867-12875.
- Murphy, S., et al. (2009). "Lipid droplet-organelle interactions; sharing the fats." *Biochim Biophys Acta* **1791**(6): 441-447.
- Nagy, L., et al. (1998). "Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma." *Cell* **93**(2): 229-240.
- Nara, T. Y., et al. (2002). "The E-box like sterol regulatory element mediates the suppression of human Delta-6 desaturase gene by highly unsaturated fatty acids." *Biochem Biophys Res Commun* **296**(1): 111-117.
- Nishino, N., et al. (2008). "FSP27 contributes to efficient energy storage in murine white adipocytes by promoting the formation of unilocular lipid droplets." *J Clin Invest* **118**(8): 2808-2821.
- Nordlie, R. C., et al. (1999). "Regulation of glucose production by the liver." *Annu Rev Nutr* **19**: 379-406.
- Nordstrom, E. A., et al. (2005). "A human-specific role of cell death-inducing DFFA (DNA fragmentation factor-alpha)-like effector A (CIDEA) in adipocyte lipolysis and obesity." *Diabetes* **54**(6): 1726-1734.
- Notarnicola, M., et al. (2011). "Polyunsaturated fatty acids reduce fatty acid synthase and hydroxy-methyl-glutaryl CoA-reductase gene expression and promote apoptosis in HepG2 cell line." *Lipids Health Dis* **10**: 10.
- O'Brien, R. M. and D. K. Granner (1996). "Regulation of gene expression by insulin." *Physiol Rev* **76**(4): 1109-1161.
- Oishi, Y., et al. (2005). "Kruppel-like transcription factor KLF5 is a key regulator of adipocyte differentiation." *Cell Metab* **1**(1): 27-39.
- Ordenez, C., et al. (2011). "Gender differences in apolipoprotein D expression during aging and in Alzheimer disease." *Neurobiol Aging*.
- Pardina, E., et al. (2009). "Lipoprotein lipase expression in livers of morbidly obese patients could be responsible for liver steatosis." *Obes Surg* **19**(5): 608-616.
- Patel, R. C., et al. (1997). "Probing the structure of the ligand binding cavity of lipocalins by fluorescence spectroscopy." *Protein Eng* **10**(6): 621-625.
- Paulauskis, J. D. and H. S. Sul (1989). "Hormonal regulation of mouse fatty acid synthase gene transcription in liver." *J Biol Chem* **264**(1): 574-577.
- Peitsch, M. C. and M. S. Boguski (1990). "Is apolipoprotein D a mammalian bilin-binding protein?" *New Biol* **2**(2): 197-206.
- Peng, D., et al. (2008). "Antiatherosclerotic effects of a novel synthetic tissue-selective steroidal liver X receptor agonist in low-density lipoprotein receptor-deficient mice." *J Pharmacol Exp Ther* **327**(2): 332-342.
- Perdomo, G., et al. (2010). "A role of apolipoprotein D in triglyceride metabolism." *J Lipid Res* **51**(6): 1298-1311.
- Pereira, I. V., et al. (2011). "Microsomal triglyceride transfer protein and nonalcoholic fatty liver disease." *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* **5**(2): 245-251.
- Peterson, J., et al. (1986). "Mouse preheparin plasma contains high levels of hepatic lipase with low affinity for heparin." *Biochim Biophys Acta* **878**(1): 65-70.

- Phair, R. D., et al. (1975). "Preliminary model for human lipoprotein metabolism in hyperlipoproteinemia." *Fed Proc* **34**(13): 2263-2270.
- Pilkis, S. J. and D. K. Granner (1992). "Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis." *Annu Rev Physiol* **54**: 885-909.
- Puri, V., et al. (2008). "Cidea is associated with lipid droplets and insulin sensitivity in humans." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(22): 7833-7838.
- Qi, J., et al. (2008). "Downregulation of AMP-activated protein kinase by Cidea-mediated ubiquitination and degradation in brown adipose tissue." *EMBO J* **27**(11): 1537-1548.
- Raghow, R., et al. (2008). "SREBPs: the crossroads of physiological and pathological lipid homeostasis." *Trends Endocrinol Metab* **19**(2): 65-73.
- Rahimian, R., et al. (2001). "Hepatic over-expression of peroxisome proliferator activated receptor gamma2 in the ob/ob mouse model of non-insulin dependent diabetes mellitus." *Mol Cell Biochem* **224**(1-2): 29-37.
- Ratziu, V., et al. (2002). "Survival, liver failure, and hepatocellular carcinoma in obesity-related cryptogenic cirrhosis." *Hepatology* **35**(6): 1485-1493.
- Repa, J. J. and D. J. Mangelsdorf (2000). "The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis." *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 459-481.
- Rinella, M. E., et al. (2008). "Mechanisms of hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methionine choline-deficient diet." *Journal of Lipid Research* **49**(5): 1068-1076.
- Rogue, A., et al. (2011). "Comparative Gene Expression Profiles Induced by PPARgamma and PPARalpha/gamma Agonists in Human Hepatocytes." *PLoS One* **6**(4): e18816.
- Rogue, A., et al. (2010). "Gene Expression Changes Induced by PPAR Gamma Agonists in Animal and Human Liver." *PPAR Res* **2010**: 325183.
- Rosen, E. D. and O. A. MacDougald (2006). "Adipocyte differentiation from the inside out." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(12): 885-896.
- Sanchez, D., et al. (2006). "Loss of glial lazaro, a homolog of apolipoprotein D, reduces lifespan and stress resistance in Drosophila." *Curr Biol* **16**(7): 680-686.
- Sanyal, A. J., et al. (2001). "Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities." *Gastroenterology* **120**(5): 1183-1192.
- Savage, D. B., et al. (2006). "Reversal of diet-induced hepatic steatosis and hepatic insulin resistance by antisense oligonucleotide inhibitors of acetyl-CoA carboxylases 1 and 2." *J Clin Invest* **116**(3): 817-824.
- Schaloske, R. H. and E. A. Dennis (2006). "The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system." *Biochim Biophys Acta* **1761**(11): 1246-1259.
- Schlossman, D. M. and R. M. Bell (1976). "Triacylglycerol synthesis in isolated fat cells. Evidence that the sn-glycerol-3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate acyltransferase activities are dual catalytic functions of a single microsomal enzyme." *J Biol Chem* **251**(18): 5738-5744.
- Schuler, A. M. and P. A. Wood (2002). "Mouse models for disorders of mitochondrial fatty acid beta-oxidation." *ILAR J* **43**(2): 57-65.
- Seguin, D., et al. (1995). "Molecular characterization and differential mRNA tissue distribution of mouse apolipoprotein D." *Brain Res Mol Brain Res* **30**(2): 242-250.

- Sejima, E., et al. (2011). "A Role for Hypothalamic AMP-Activated Protein Kinase in the Mediation of Hyperphagia and Weight Gain Induced by Chronic Treatment with Olanzapine in Female Rats." Cell Mol Neurobiol.
- Serrero, G., et al. (2000). "Adipose differentiation related protein: expression, purification of recombinant protein in Escherichia coli and characterization of its fatty acid binding properties." Biochim Biophys Acta **1488**(3): 245-254.
- Shaw, R. J., et al. (2004). "The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(10): 3329-3335.
- Shimano, H., et al. (1997). "Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells." J Clin Invest **99**(5): 846-854.
- Song, G. Y., et al. (2010). "Rosiglitazone reduces fatty acid translocase and increases AMPK in skeletal muscle in aged rats: a possible mechanism to prevent high-fat-induced insulin resistance." Chin Med J (Engl) **123**(17): 2384-2391.
- Song, K. H. and J. Y. Chiang (2006). "Glucagon and cAMP inhibit cholesterol 7alpha-hydroxylase (CYP7A1) gene expression in human hepatocytes: discordant regulation of bile acid synthesis and gluconeogenesis." Hepatology **43**(1): 117-125.
- Song, K. H., et al. (2007). "Hepatocyte growth factor signaling pathway inhibits cholesterol 7alpha-hydroxylase and bile acid synthesis in human hepatocytes." Hepatology **46**(6): 1993-2002.
- Song, K. H., et al. (2009). "Bile acids activate fibroblast growth factor 19 signaling in human hepatocytes to inhibit cholesterol 7alpha-hydroxylase gene expression." Hepatology **49**(1): 297-305.
- Sozio, M. S., et al. (2010). "The role of lipid metabolism in the pathogenesis of alcoholic and nonalcoholic hepatic steatosis." Semin Liver Dis **30**(4): 378-390.
- Stansbie, D., et al. (1976). "Acute effects in vivo of anti-insulin serum on rates of fatty acid synthesis and activities of acetyl-coenzyme A carboxylase and pyruvate dehydrogenase in liver and epididymal adipose tissue of fed rats." Biochem J **160**(2): 413-416.
- Stapleton, S. R., et al. (1990). "Triiodothyronine stimulates transcription of the fatty acid synthase gene in chick embryo hepatocytes in culture. Insulin and insulin-like growth factor amplify that effect." J Biol Chem **265**(30): 18442-18446.
- Steyrer, E. and G. M. Kostner (1988). "Activation of lecithin-cholesterol acyltransferase by apolipoprotein D: comparison of proteoliposomes containing apolipoprotein D, A-I or C-I." Biochim Biophys Acta **958**(3): 484-491.
- Strauss, J. G., et al. (2003). "Fatty acids liberated from high-density lipoprotein phospholipids by endothelial-derived lipase are incorporated into lipids in HepG2 cells." Biochem J **371**(Pt 3): 981-988.
- Su, A. I., et al. (2002). "Large-scale analysis of the human and mouse transcriptomes." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(7): 4465-4470.
- Subramanian, V., et al. (2004). "Perilipin A mediates the reversible binding of CGI-58 to lipid droplets in 3T3-L1 adipocytes." J Biol Chem **279**(40): 42062-42071.

- Surwit, R. S., et al. (1995). "Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice." *Metabolism* **44**(5): 645-651.
- Teran-Garcia, M., et al. (2007). "Polyunsaturated fatty acid suppression of fatty acid synthase (FASN): evidence for dietary modulation of NF-Y binding to the Fasn promoter by SREBP-1c." *Biochem J* **402**(3): 591-600.
- Terrisse, L., et al. (2001). "Structure-function relationships of human apolipoprotein D an immunochemical analysis." *Life Sci* **70**(6): 629-638.
- Terrisse, L., et al. (1998). "Increased levels of apolipoprotein D in cerebrospinal fluid and hippocampus of Alzheimer's patients." *J Neurochem* **71**(4): 1643-1650.
- Terrisse, L., et al. (1999). "Modulation of apolipoprotein D and apolipoprotein E expression in rat hippocampus after entorhinal cortex lesion." *Brain Res Mol Brain Res* **70**(1): 26-35.
- Thiele, C. and J. Spandl (2008). "Cell-biology of lipid droplets." *Curr Opin Cell Biol* **20**(4): 378-385.
- Thomas, E. A., et al. (2003). "Apolipoprotein D modulates arachidonic acid signaling in cultured cells: implications for psychiatric disorders." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **69**(6): 421-427.
- Tian, L. and M. Fu (2010). "The relationship between high density lipoprotein subclass profile and plasma lipids concentrations." *Lipids Health Dis* **9**: 118.
- Toh, S. Y., et al. (2008). "Up-regulation of mitochondrial activity and acquirement of brown adipose tissue-like property in the white adipose tissue of fsp27 deficient mice." *PLoS One* **3**(8): e2890.
- Tomiyasu, K., et al. (2001). "Differential metabolism of human VLDL according to content of ApoE and ApoC-III." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**(9): 1494-1500.
- Tong, L. and H. J. Harwood, Jr. (2006). "Acetyl-coenzyme A carboxylases: versatile targets for drug discovery." *J Cell Biochem* **99**(6): 1476-1488.
- Tong, Q., et al. (2005). "Interaction between GATA and the C/EBP family of transcription factors is critical in GATA-mediated suppression of adipocyte differentiation." *Mol Cell Biol* **25**(2): 706-715.
- Tontonoz, P., et al. (1994). "mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer." *Genes Dev* **8**(10): 1224-1234.
- Tontonoz, P., et al. (1994). "Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor." *Cell* **79**(7): 1147-1156.
- Tontonoz, P. and B. M. Spiegelman (2008). "Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma." *Annu Rev Biochem* **77**: 289-312.
- Tso, P. and J. A. Balint (1986). "Formation and transport of chylomicrons by enterocytes to the lymphatics." *Am J Physiol* **250**(6 Pt 1): G715-726.
- Turro, S., et al. (2006). "Identification and characterization of associated with lipid droplet protein 1: A novel membrane-associated protein that resides on hepatic lipid droplets." *Traffic* **7**(9): 1254-1269.
- Uchida, Y., et al. (1992). "Novel fatty acid beta-oxidation enzymes in rat liver mitochondria. II. Purification and properties of enoyl-coenzyme A (CoA) hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase trifunctional protein." *J Biol Chem* **267**(2): 1034-1041.

- Vijayaraghavan, S., et al. (1994). "Apolipoprotein-D polymorphism: a genetic marker for obesity and hyperinsulinemia." *J Clin Endocrinol Metab* **79**(2): 568-570.
- Viollet, B., et al. (2009). "AMPK: Lessons from transgenic and knockout animals." *Front Biosci* **14**: 19-44.
- Viollet, B., et al. (2006). "Activation of AMP-activated protein kinase in the liver: a new strategy for the management of metabolic hepatic disorders." *J Physiol* **574**(Pt 1): 41-53.
- Viswakarma, N., et al. (2007). "Transcriptional regulation of Cidea, mitochondrial cell death-inducing DNA fragmentation factor alpha-like effector A, in mouse liver by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma." *J Biol Chem* **282**(25): 18613-18624.
- Waeber, G., et al. (1996). "Transcriptional activation of the GLUT2 gene by the IPF-1/STF-1/IDX-1 homeobox factor." *Mol Endocrinol* **10**(11): 1327-1334.
- Walker, D. W., et al. (2006). "Overexpression of a Drosophila homolog of apolipoprotein D leads to increased stress resistance and extended lifespan." *Curr Biol* **16**(7): 674-679.
- Wan, Y., et al. (2007). "PPAR-gamma regulates osteoclastogenesis in mice." *Nat Med* **13**(12): 1496-1503.
- Warden, C. H., et al. (1992). "Localization of the gene for apolipoprotein D on mouse chromosome 16." *Genomics* **12**(4): 851-852.
- Weech, P. K., et al. (1986). "Apolipoprotein D and cross-reacting human plasma apolipoproteins identified using monoclonal antibodies." *J Biol Chem* **261**(17): 7941-7951.
- Weech, P. K., et al. (1991). "Apolipoprotein D--an atypical apolipoprotein." *Prog Lipid Res* **30**(2-3): 259-266.
- Winder, W. W. (2001). "Energy-sensing and signaling by AMP-activated protein kinase in skeletal muscle." *J Appl Physiol* **91**(3): 1017-1028.
- Wolins, N. E., et al. (2006). "A proposed model of fat packaging by exchangeable lipid droplet proteins." *FEBS Lett* **580**(23): 5484-5491.
- Wolins, N. E., et al. (2005). "S3-12, Adipophilin, and TIP47 package lipid in adipocytes." *J Biol Chem* **280**(19): 19146-19155.
- Wolins, N. E., et al. (2001). "TIP47 associates with lipid droplets." *J Biol Chem* **276**(7): 5101-5108.
- Wu, C., et al. (2008). "Molecular evolution of Cide family proteins: novel domain formation in early vertebrates and the subsequent divergence." *BMC Evol Biol* **8**: 159.
- Xu, G., et al. (2006). "Degradation of perilipin is mediated through ubiquitination-proteasome pathway." *Biochim Biophys Acta* **1761**(1): 83-90.
- Xu, G., et al. (2005). "Post-translational regulation of adipose differentiation-related protein by the ubiquitin/proteasome pathway." *J Biol Chem* **280**(52): 42841-42847.
- Xue, B. and B. B. Kahn (2006). "AMPK integrates nutrient and hormonal signals to regulate food intake and energy balance through effects in the hypothalamus and peripheral tissues." *J Physiol* **574**(Pt 1): 73-83.

- Yahagi, N., et al. (2002). "Absence of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) ameliorates fatty livers but not obesity or insulin resistance in Lep(ob)/Lep(ob) mice." J Biol Chem **277**(22): 19353-19357.
- Yamaguchi, T., et al. (2007). "CGI-58 facilitates lipolysis on lipid droplets but is not involved in the vesiculation of lipid droplets caused by hormonal stimulation." J Lipid Res **48**(5): 1078-1089.
- Yang, C. Y., et al. (1994). "Structure of human apolipoprotein D: locations of the intermolecular and intramolecular disulfide links." Biochemistry **33**(41): 12451-12455.
- Yang, S. Y., et al. (2005). "3-Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase and short chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase in human health and disease." FEBS J **272**(19): 4874-4883.
- Yasuda, T., et al. (2010). "Update on the role of endothelial lipase in high-density lipoprotein metabolism, reverse cholesterol transport, and atherosclerosis." Circ J **74**(11): 2263-2270.
- Ye, J., et al. (2009). "Cideb, an ER- and lipid droplet-associated protein, mediates VLDL lipidation and maturation by interacting with apolipoprotein B." Cell Metab **9**(2): 177-190.
- Yki-Jarvinen, H. (2004). "Thiazolidinediones." N Engl J Med **351**(11): 1106-1118.
- Yonezawa, T., et al. (2011). "Which CIDE are you on? Apoptosis and energy metabolism." Mol Biosyst **7**(1): 91-100.
- Yoshida, K., et al. (1996). "Molecular cloning of the mouse apolipoprotein D gene and its upregulated expression in Niemann-Pick disease type C mouse model." DNA Cell Biol **15**(10): 873-882.
- Yu, S., et al. (2003). "Adipocyte-specific gene expression and adipogenic steatosis in the mouse liver due to peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 (PPARGgamma1) overexpression." J Biol Chem **278**(1): 498-505.
- Za'tara, G., et al. (2008). "AMPK activation by long chain fatty acyl analogs." Biochem Pharmacol **76**(10): 1263-1275.
- Zannis, V. I., et al. (2006). "Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL." J Mol Med **84**(4): 276-294.
- Zeng, C., et al. (1996). "A human axillary odorant is carried by apolipoprotein D." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(13): 6626-6630.
- Zhang, Y. L., et al. (2006). "Aberrant hepatic expression of PPARGgamma2 stimulates hepatic lipogenesis in a mouse model of obesity, insulin resistance, dyslipidemia, and hepatic steatosis." J Biol Chem **281**(49): 37603-37615.
- Zhou, Z., et al. (2003). "Cidea-deficient mice have lean phenotype and are resistant to obesity." Nat Genet **35**(1): 49-56.
- Zoete, V., et al. (2007). "Peroxisome proliferator-activated receptor structures: ligand specificity, molecular switch and interactions with regulators." Biochim Biophys Acta **1771**(8): 915-925.

APPENDICE A

FIGURE COMPLÉMENTAIRE

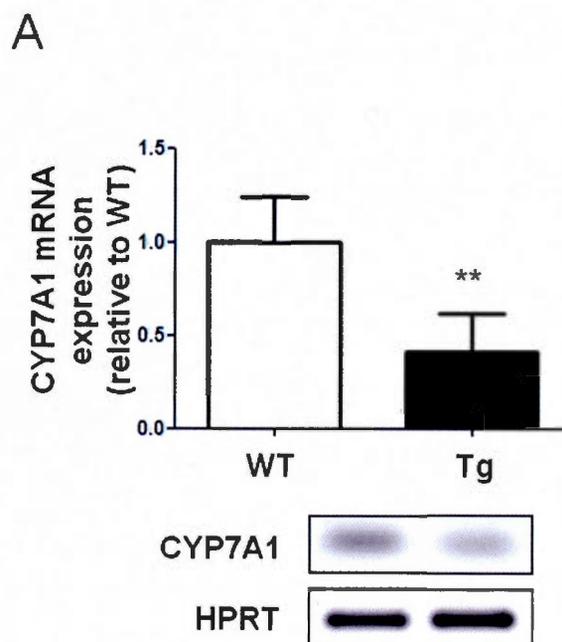


Figure complémentaire 1 : Niveau d'expression du gène CYP7A1 dans le foie de souris Tg H-apoD. Analyse du niveau d'expression du gène CYP7A1 par RT-PCR semiquantitative dans le foie de souris Tg H-apoD et WT. Le graphique représente le niveau d'expression en ARNm normalisé par HPRT. Un gel représentatif du résultat est présenté sous le graphique. La valeur WT a été rapportée à 1 et il s'agit d'une moyenne \pm écart-type de 4 souris par groupe. ** $P < 0.01$ vs souris WT