

Université de Montréal

**Le rôle de la dysrégulation du métabolisme du
cholestérol par le retrait des estrogènes sur la stéatose
hépatique**

par

Isabelle Côté

Département de kinésiologie

Faculté de kinésiologie

Thèse présentée à la Faculté de kinésiologie
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en sciences de l'activité physique
option Physiologie de l'exercice

Décembre 2013

© Isabelle Côté, 2013

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

**Le rôle de la dysrégulation du métabolisme du cholestérol par le retrait des
estrogènes sur la stéatose hépatique**

Présentée par :

Isabelle Côté

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Daniel Curnier, président-rapporteur

Jean-Marc Lavoie, directeur de recherche

François Péronnet, membre du jury

Micheline Piquette-Miller, examinateur externe

Guy Rousseau, représentant du doyen de la FES

Résumé

Les estrogènes confèrent aux femmes une protection cardiovasculaire jusqu'à la ménopause. En effet, la perte des fonctions ovariennes engendre plusieurs désordres du profil lipidique qui s'accompagnent d'une accumulation de triglycérides au foie appelée *stéatose hépatique*. Le retrait des estrogènes perturbe de nombreuses voies de contrôle de la cholestérolémie, provoquant simultanément une hypercholestérolémie et une stéatose hépatiques. Toutefois, à ce jour, les mécanismes d'action du retrait des estrogènes sur le métabolisme du cholestérol favorisant le stockage de triglycérides au foie demeurent imprécis.

À cet égard, les travaux de cette thèse visaient à clarifier l'ensemble des effets du retrait des estrogènes sur le métabolisme du cholestérol pouvant mener à la pathogenèse de la stéatose hépatique. Lors de la première étude, l'ovariectomie (Ovx) chez la rate, un modèle bien établi de la stéatose, avait permis d'identifier la voie d'assemblage des lipoprotéines à très faible densité (VLDL) comme élément contributif à la stéatose. La voie des VLDL reliant étant également une voie de transport du cholestérol, l'étude suivante a été réalisée afin de comprendre le rôle du cholestérol alimentaire sur les lipides hépatiques. Dans cette deuxième étude, le modèle de la diète riche en lipides et en cholestérol (HFHC), aussi reconnu pour induire une stéatose hépatique, a permis d'établir des liens étroits entre le métabolisme du cholestérol et celui des lipides hépatiques. Étonnamment, de manière similaire à l'Ovx, la diète HFHC perturbait la voie d'assemblage des VLDL. En outre, les données recueillies au cours de ces travaux indiquaient qu'une dysrégulation du métabolisme des acides biliaires avait contribué à la sévérité de la stéatose hépatique induite par cette diète HFHC. Dans la continuité de ces deux premiers projets, nous nous sommes intéressés aux effets concomitants du retrait des estrogènes et d'une diète HFHC sur la stéatose hépatique. De manière intéressante, lorsque combinés, l'Ovx et la diète HFHC potentialisaient non seulement l'accumulation de lipides hépatiques, mais également les perturbations moléculaires des voies sous-jacentes à la stéatose, dont l'assemblage des VLDL et de la sécrétion d'acides biliaires.

Dans l'ensemble, les données présentées dans la revue de littérature et dans les trois études liées à cette thèse indiquent qu'une dysrégulation du métabolisme du

cholestérol en réponse au retrait des estrogènes entraîne des complications favorisant l'accumulation de lipides dans le foie.

Mots-clés : estrogènes, cholestérol alimentaire, lipoprotéines à très faible densité (VLDL), stéatose hépatique, cholestérol hépatique, acides biliaires, farneoid X receptor, ovariectomie (Ovx), rat.

Abstract

Estrogens confer to women a cardiovascular protection until menopause. Indeed, the loss of ovarian functions leads to several lipid disorders along with hepatic triglycerides accumulation called *hepatic steatosis*. Estrogen withdrawal disrupts several cholesterol metabolism pathways that results in both hypercholesterolemia and hepatic steatosis. However, to date, the precise mechanisms by which estrogen withdrawal affect cholesterol metabolism pathways that favour lipid storage in the liver are unclear.

In this regard, works in the present thesis aimed at elucidate the effects of estrogen withdrawal on cholesterol metabolism involved in hepatic steatosis pathogenesis. In the first study, estrogen withdrawal by ovariectomy (Ovx), a well established model for hepatic steatosis and hypercholesterolemia, had enabled the identification of very low density lipoprotein (VLDL) pathway as a contributory element for hepatic steatosis. Since the VLDL pathway relates lipids and cholesterol metabolism, we conducted the second study to explore the role of dietary cholesterol on hepatic lipids. In the second study, the high fat/high cholesterol (HFHC) diet, also recognized as a model for hepatic steatosis development, was used to explore links between cholesterol metabolism and hepatic fat accumulation. Surprisingly, HFHC diet also disrupted the VLDL pathway. Additionally, data provided in this study indicated that a dysregulation of bile acids metabolism might have contributed to the severity of hepatic steatosis induced by the HFHC diet. As a continuation of these projects, we were interested in the concomitant effects of estrogen withdrawal and HFHC diet on hepatic lipid accretion. Interestingly, when combined, Ovx and HFHC diet not only potentiated hepatic lipid accumulation but also molecular disruptions involved in underlying pathways for hepatic steatosis including the VLDL pathway and bile acid secretion.

Overall, data presented in the review of literature and provided by the three studies related to the present thesis indicate that cholesterol metabolism dysregulation following estrogen withdrawal result in complications that favour hepatic lipid accumulation.

Keywords : estrogens, dietary cholesterol, very low density lipoprotein (VLDL), hepatic steatosis, hepatic cholesterol, bile acids, farnesoid X receptor, ovariectomy (Ovx), rat.

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iv
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des abréviations.....	xii
Remerciements.....	xvi
Introduction.....	1
Partie 1 : Description des voies métaboliques du cholestérol.....	3
1. Voies d'entrée du cholestérol dans l'organisme.....	3
1.1 L'absorption intestinale du cholestérol.....	3
1.1.1 La traversée de la membrane apicale.....	3
1.1.2 La traversée de la membrane basolatérale.....	4
1.2 La captation des résidus de chylomicrons (RC) par le foie.....	5
1.2.1 La captation des RC par le LDLr.....	7
1.2.2 La captation des RC par le HSPG.....	8
1.2.3 La captation des RC par le complexe LRP1-HSPG.....	8
1.3 La biosynthèse de cholestérol.....	9
1.4 La production hépatique de VLDL.....	10
1.5 La production intestinale de VLDL.....	14
1.6 Le devenir des VLDL.....	15
2. Voies d'élimination du cholestérol de l'organisme.....	15
2.1 Le métabolisme des HDL-C.....	15
2.2 L'efflux de cholestérol périphérique.....	18
2.3 Le catabolisme des lipoprotéines.....	18
2.4 La sécrétion de cholestérol par la voie hépatobiliaire.....	21
2.5 La synthèse d'acides biliaires.....	23
2.6 Le recyclage des acides biliaires.....	27
2.7 L'efflux de cholestérol transintestinal.....	30

Partie 2 : Mécanismes hépatiques de régulation des voies métaboliques du cholestérol	
3.1 Le sterol regulatory element binding protein-2 (SREBP-2)	32
3.1.1 Le SREBP-2 hépatique	33
3.1.2 Le SREBP-2 intestinal	35
3.2 Le liver X receptor (LXR)	36
3.2.1 L'expression du LXR	38
3.2.2 Les rôles du LXR sur la voie RCT	38
3.3 Le farnesoid X receptor (FXR)	41
3.3.1 L'expression du FXR	41
3.3.2 Le rôle du FXR sur l'homéostasie du cholestérol et des acides biliaires	41
3.3.3 Le rôle du FXR sur l'homéostasie des lipides	44
3.3.4 Le FXR et les niveaux de lipides hépatiques	46
Partie 3 : Les estrogènes et les voies métaboliques du cholestérol	48
4.1 Les estrogènes et l'absorption intestinale de cholestérol	48
4.2 Les estrogènes et la clairance des lipoprotéines	49
4.3 Les estrogènes et la biosynthèse de cholestérol	50
4.4 Les estrogènes et la production de VLDL	51
4.5 Le rôle des estrogènes sur la voie RCT	51
4.6 Les estrogènes et le métabolisme des acides biliaires au foie	53
4.7 Les estrogènes et le cycle entérohépatique des acides biliaires	54
Partie 4 : Les effets de l'exercice sur le transport à rebours du cholestérol	57
5.1 L'exercice et les lipides hépatiques	57
5.2 L'exercice et le profil lipidique	58
5.2.1 L'exercice et l'absorption intestinale de cholestérol	58
5.2.2 L'exercice et le métabolisme des CM	60
5.2.3 L'exercice et la biosynthèse de cholestérol	60
5.2.4 L'exercice et la production de VLDL	61
5.3 L'exercice et la voie RCT	62
5.3.1 L'exercice et le métabolisme des HDL-C	62
5.4 L'augmentation de l'efflux de cholestérol périphérique par l'exercice	65

5.5 L'amélioration de la capacité de clairance du cholestérol plasmatique par le foie par l'exercice.....	65
5.6 Les effets de l'exercice sur la sécrétion de cholestérol par voie hépatobiliaire..	66
5.7 L'excrétion fécale de cholestérol après la pratique d'activité physique	66
Chapitre 2 : Article original 1	69
Abstract.....	71
Introduction.....	73
Results.....	80
Discussion.....	87
References.....	93
Chapitre 3 : Article original 2	97
Abstract.....	99
Introduction.....	100
Results.....	108
Discussion.....	118
References.....	124
Chapitre 4 : Article original 3	131
Abstract.....	133
Introduction.....	134
Results.....	139
Discussion.....	142
References.....	147
Chapitre 5 : Discussion générale et conclusion	162
Limites des études.....	170
Les modèles du retrait des estrogènes.....	170
Les modèles HFHC.....	172
Les espèces utilisées dans l'étude du métabolisme du cholestérol.....	173
La variabilité dans la composition des diètes HFHC.....	174
Conclusions et perspectives	176
Bibliographie.....	177

Liste des tableaux

Tableau 1 : Résumé des effets des estrogènes ou du retrait des estrogènes sur les voies métaboliques et de transport du cholestérol et des acides biliaires.....	56
Tableau 2 : Résumé des effets de l'exercice sur les voies métaboliques et de transport du cholestérol et des acides biliaires.....	68

Liste des figures

Figure 1 : Mécanismes moléculaires du transport du cholestérol.....	4
Figure 2 : Métabolisme des chylomicrons.....	6
Figure 3 : Mécanismes de captation des RC au foie.....	7
Figure 4 : Vue d'ensemble de la voie de biosynthèse hépatique du cholestérol	10
Figure 5 : Première phase de l'assemblage du VLDL : la lipidation initiale.....	11
Figure 6 : Vue d'ensemble de l'assemblage et de la sécrétion des VLDL dans les divers compartiments cellulaires	12
Figure 7 : Colocalisation du Cideb sur le réticulum endoplasmique et les gouttelettes lipidiques.....	14
Figure 8 : Lipidation initiale : étape déterminante de la biogenèse des pré-HDL-C	16
Figure 9 : Remodelage des HDL-C sous l'action de la LCAT et de la CETP.....	17
Figure 10 : Catabolisme des HDL-C	19
Figure 11 : Captation sélective de cholestérol des HDL-C par le SR-BI	20
Figure 12 : Schéma de la voie de liaison, d'internalisation et de recyclage du LDLr	21
Figure 13 : Principaux transporteurs hépatiques du cholestérol, des acides biliaires et des phospholipides dans les conduits biliaires	23
Figure 14 : Initiation de la synthèse d'acides biliaires.....	24
Figure 15 : Modifications structurelles des anneaux de stérol.....	25
Figure 16 : Oxydation et rétrécissement de la chaîne latérale de stérol	26
Figure 17 : Conjugaison des acides biliaires	27
Figure 18 : Mécanismes de transport des acides biliaires au foie et à l'intestin.....	29
Figure 19 : Mécanismes de régulation du cholestérol intracellulaire par le SREBP-2.....	33
Figure 20 : Régulation de l'expression de l'ABCA1 hépatique	35
Figure 21 : Structure de base des récepteurs nucléaires et formation d'hétérodimères des récepteurs nucléaires avec le RXR	37
Figure 22 : Rôles du LXR dans la voie RCT.....	39
Figure 23 : Régulation de la synthèse des acides biliaires.....	42
Figure 24 : Activation du FXR intestinal.....	44
Figure 25 : Mécanismes de diminution des TAG plasmatiques par le FXR	45

Figure 26 : Effets d'une inhibition de l'activité de la CETP sur le profil lipidique 63
Figure 27 : Mécanismes d'action de l'exercice sur le métabolisme des HDL-C 64

Liste des abréviations

AB : acides biliaires

ABCA1 : ATP-binding cassette transporter A1

ABCB4 : ATP-binding cassette transporter B4

ABCG1 : ATP-binding cassette transporter G1

ABCG5 : ATP-binding cassette transporter G5

ABCG8 : ATP-binding cassette transporter G8

ACAT-1 : Acyl-CoenzymeA cholesterol transferase 1

ACAT-2 : Acyl-CoenzymeA cholesterol transferase 2

ACC : Acetyl CoA carboxylase

apoA-I : apolipoprotéine A-I

apoA-II : apolipoprotéine A-II

apoB-48 : apolipoprotéine B-48

apoB-100 : apolipoprotéine B-100

apoC-I, II, et III : apolipoprotéine C-I, II et III

apoE : apolipoprotéine E

ASBT : Apical sodium bile acid transporter

BAAT : bile acid coenzyme A:amino acid N-acyltransferase

BSEP : Bile salt export protein

CAR : constitutive androstane receptor

CeH : cholesterol ester hydrolase

CETP : cholesterol ester transfer protein

Cideb : cell death-inducing like factor type B

COPII : coat protein complex

CM : chylomicron

CT : Cholesterol total

CYP27A1 : cholesterol 27 α -hydroxylase

CYP7A1 : cholesterol 7 α -hydroxylase

CYP8B1 : 12 α -hydroxylase

DGAT-1/2 : diacylglycerol acyl transferase 1/2
EE : ethinylestradiol
ER : Estrogen receptor
FAS : Fatty acid synthase
FGF15/19 : fibroblast growth factor 15/19
FGFR4 : FGF receptor 4
FXR : Farnesoid X receptor
FXRE : FXR response element
HMG-CoA r : 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase
HDL-C : High density lipoprotein cholesterol
HFHC : High fat/High cholesterol
HL : lipase hépatique
HNF-4 α : hepatocyte nuclear factor 4 α
HSPG : héparan sulfate protéoglycan
IBABP : Ileal bile acid binding protein
LCAT : lecithin : cholestérol acyltransferase
LDL-C : Low density lipoprotein cholesterol
LDLr : Low density lipoprotein receptor
LRH1 : liver receptor homologue 1
LPL : lipoprotéine lipase
LRP1 : Low density lipoprotein receptor related protein 1
LXR : Liver X receptor
LXRE : Liver X receptor responsive element
MTP : Microsomal triglyceride transfert protein
NPC1L1 : Niemann-Pick C1 Like 1
NTCP : Sodium dependant sodium taurocholate co-transporting polypeptide
OATP : Sodium independant multispecific organic anion transporter
OATP3 : Organic anion transport 3
OST α/β : Organite solute transporters α/β
Ovx : Ovariectomy
PCSK9 : Proprotein convertase subtilisin kexin type 9

PPAR α : Peroxisome proliferator-activated receptor α
PXR : pregnane X receptor
RAP : receptor associated protein
RC : résidu de chylomicron
RCT : transport à rebours du cholestérol
RXR : Retinoic acid X receptor
Sar1a/b : Small GTPase de type Sar1 a et b
SCAP : SREBP-cleavage-activating protein
SCD1 : Steroyl CoA desaturase 1
SERM : modulateur sélectif aux récepteurs aux estrogènes
SHP : Small heterodimer partner
SR-BI : Scavenger receptor B1
SREBP-1a, 1c et 2 : Sterol regulatory element binding protein 1a, 1c et 2
TAG : triacylglycérol
VDR : récepteur à la vitamine D
VLDL : Very low density lipoprotein

À toi maman

Remerciements

J'aimerais remercier tous les membres de ma famille et mes amis qui m'ont supportée au long de ce périlleux parcours. Particulièrement, je remercie ma mère de m'avoir épaulée durant les moments plus difficiles de mon cheminement et de m'avoir redonné courage et force. Ma persévérance et ma volonté de m'améliorer sont des qualités que tu m'as transmises qui m'ont véritablement permis la réalisation de cette thèse. J'aimerais souligner l'important support de ma petite sœur Marie qui a toujours été là pour moi et de mon conjoint Danick qui a su trouver le mot juste pour me propulser davantage vers cette grande réalisation. J'ajoute une petite note spéciale pour mes beaux-parents Monique et André ainsi qu'à ma belle-sœur Joanie pour avoir pris soin de mon petit loup à plusieurs reprises. Sans votre aide, je n'aurais pu réaliser mes travaux à temps.

J'aimerais exprimer toute ma gratitude à mon directeur Jean-Marc Lavoie, la personne qui a su allumer ma passion pour la recherche. Son entregent, ses qualités de leadership et de communication font de lui le directeur idéal avec qui il fut agréable de travailler au cours des quatre dernières années. Je te remercie Jean-Marc d'avoir contribué à l'avancement de mon cheminement tant sur le plan professionnel que personnel. Ce doctorat fut incontestablement ma plus grande réalisation qui m'a donné une importante leçon de vie, celle de persévérer et aller de l'avant. Je remercie tous mes collaborateurs: ma collègue Émilienne, Siham Yasari, Azin, Naser, Rémi Rabasa-Lhoret, Denis Prud'homme et Natalie Chapados.

Enfin, j'apporte à cette thèse trois mentions d'honneur. Tout d'abord, Céline, tu es un modèle de force et de courage pour avoir combattu un second cancer. Tout comme il y a presque 10 ans, tu t'es relevée la tête haute et tu as poursuivi ton chemin. Ensuite, grand-maman, même si tu perds tranquillement ta mémoire, tu resteras toujours dans la mienne. Je garderai toujours de merveilleux souvenirs des journées où tu as pris soin de Marie, François et moi. Pour terminer, je lève mon chapeau à mon grand ami François Fortin pour l'attitude avec laquelle il combat son cancer. Cette dure épreuve ne sera bientôt qu'une histoire du passé.

Introduction

Les hormones femelles, particulièrement les estrogènes, protègent les femmes des maladies cardiovasculaires jusqu'à la période du déclin des fonctions ovariennes, la ménopause. En effet, cette période de changements hormonaux modifie profondément le profil lipidique qui provoque certaines complications dont une accumulation de triglycérides dans le foie appelée *stéatose hépatique*. Une dysrégulation du métabolisme du cholestérol est un nouveau mécanisme qui pourrait expliquer le développement d'une hypercholestérolémie et d'une stéatose hépatique en réponse au retrait des estrogènes [1, 2]. Néanmoins, les actions précises du retrait de ces hormones sexuelles sur les voies régulant le métabolisme et le transport du cholestérol doivent être mieux précisées afin de comprendre leur impact sur les lipides hépatiques.

À cet égard, les travaux de cette thèse visaient à clarifier et à intégrer les effets spécifiques du retrait des estrogènes sur le métabolisme du cholestérol et à en faire le lien avec l'accumulation de lipides au foie. Lors de la première étude, l'ovariectomie (Ovx) chez la rate, un modèle bien établi de la stéatose hépatique [3-8] et de l'hypercholestérolémie [9-13], a permis d'identifier la voie d'assemblage des lipoprotéines à très faible densité (VLDL) comme élément contributif à la stéatose. Puisque la voie des VLDL forme un lien étroit entre le métabolisme des lipides et celui du cholestérol, nous avons mené l'étude suivante en vue de mieux comprendre le rôle du cholestérol alimentaire sur l'accumulation de lipides dans les hépatocytes. Pour cela, le modèle de la diète riche en lipides et en cholestérol (HFHC), un modèle récemment établi pour l'induction d'une stéatose hépatique sévère [14], a été utilisé. La diète HFHC avait réduit de manière importante l'expression génique de la microsomal triglyceride transfer protein (MTP), enzyme déterminante de l'assemblage des VLDL. Cette diminution de l'expression du gène de la MTP suggère qu'une consommation chronique de la diète HFHC avait, semblablement à l'Ovx, perturbé la production de VLDL et contribué au développement de la stéatose. De manière encore plus importante, l'ingestion de la diète HFHC affaiblissait de 70 % l'expression génique du farnesoid X receptor (FXR) hépatique, le régulateur clé du métabolisme des acides biliaires au foie. Ces données indiquent qu'une baisse des facteurs de régulation des niveaux d'acides biliaires dans le

foie avait contribué à la sévérité de la stéatose hépatique induite par cette diète HFHC. Dans la continuité de ces travaux, l'étude suivante était consacrée aux effets concomitants du retrait des estrogènes et d'une diète HFHC sur la stéatose hépatique. Étonnamment, lorsque combinées, l'Ovx et la diète HFHC potentialisaient simultanément le niveau de stéatose ainsi que la suppression génique d'enzymes relatives aux voies sous-jacentes à la stéatose, dont l'assemblage des VLDL et de la sécrétion d'acides biliaires.

Cette thèse comporte cinq chapitres. Le premier présente une revue de littérature qui comprend quatre parties soit : la description: 1) des voies métaboliques et de transport du cholestérol dans l'organisme, 2) des mécanismes de régulation du métabolisme du cholestérol, 3) de la contribution des estrogènes sur le métabolisme du cholestérol pouvant intervenir sur le profil lipidique et le niveau des lipides hépatiques et 4) des effets de l'exercice sur les voies métaboliques et de transport du cholestérol. Cette dernière partie a été incluse à la revue de littérature afin de mieux comprendre en quoi la pratique de l'activité physique régulière s'avère une avenue thérapeutique intéressante pour contrecarrer les effets du retrait des estrogènes. Les trois chapitres suivants présentent les données recueillies au cours des trois études et finalement, le cinquième chapitre comporte la discussion générale et la conclusion de cette thèse.

Chapitre 1 : Revue de littérature

Partie 1 : Description des voies métaboliques du cholestérol

1. Voies d'entrée du cholestérol dans l'organisme

1.1 L'absorption intestinale du cholestérol

Absorbant quotidiennement de 1000 à 2000 mg de cholestérol, l'intestin humain joue un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie du cholestérol. En conditions normales, l'alimentation contribue à environ 30 % du cholestérol absorbé par l'intestin. La portion d'absorption complémentaire provient du recyclage du cholestérol biliaire et des acides biliaires qui sont dérivés du cholestérol. Chez l'humain, l'intestin recueille chaque jour de 500 à 1000 ml de bile, dont 95 % est recyclée [15]. Pour intégrer l'organisme, le cholestérol traverse l'épithélium intestinal par des cellules absorbantes appelées *entérocytes*. La disposition et la forme de ces cellules font que le passage de deux membranes (apicale et basolatérale) est essentiel à l'absorption complète du cholestérol (Figure 1). Il est à préciser que l'absorption du cholestérol a lieu principalement dans les segments proximaux du tractus digestif, plus précisément dans le duodénum et le jéjunum.

1.1.1 La traversée de la membrane apicale

Le cholestérol traverse la membrane apicale par des protéines de transport membranaire. Cible de l'hypocholestérolémiant *ezetimibe*, le *Niemann-Pick C1 Like 1* (NPC1L1) est le transporteur apical déterminant du cholestérol [16] (Figure 1). Cette protéine est exprimée abondamment dans la portion médiale du petit intestin, le jéjunum. Même si le NPC1L1 n'est pas indispensable à l'absorption du cholestérol [17], il joue un rôle de premier plan puisque l'absence du gène encodant cette protéine diminue fortement l'efficacité d'absorption [18, 19]. Des expériences sur la souris invalidée du gène NPC1L1 indiquent une contribution de l'ordre d'environ 80 % de l'absorption totale de cholestérol [18].

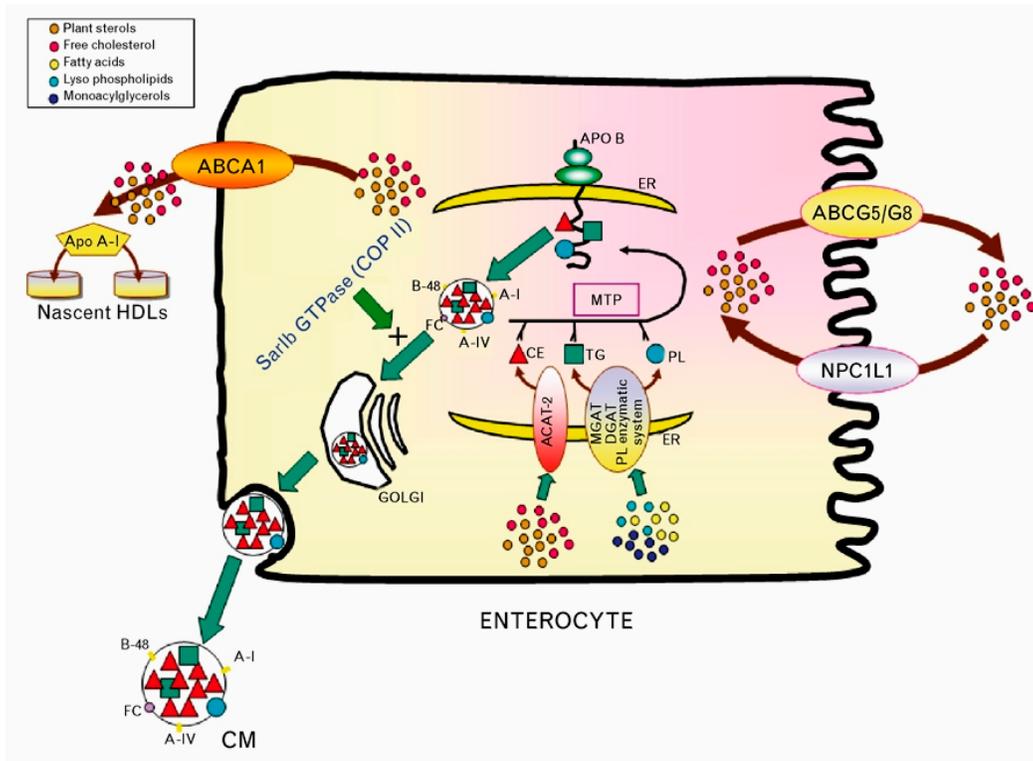


Figure 1 : Mécanismes moléculaires du transport du cholestérol

Le cholestérol libre est transporté depuis la lumière intestinale à l'aide de protéines situées sur le pôle apical des entérocytes. Alors que le NPC1L1 est le transporteur déterminant de l'entrée de cholestérol dans la cellule intestinale, une importante proportion de cholestérol est renvoyée dans la lumière intestinale par les transporteurs ABCG5/G8. Également, l'ABCA1 contribue à l'homéostasie du cholestérol en favorisant l'efflux de cholestérol de la cellule vers l'apoA-1 des pré-HDL-C (nascent HDLs). Le cholestérol, demeurant dans la cellule intestinale, est transféré dans le réticulum endoplasmique (ER) et l'acyl-CoA cholestérol acyltransférase 2 (ACAT-2) catalyse l'estérification du cholestérol alors que la monoacylglycerol acyltransférase (MGAT) et la diacylglycerol acyltransférase (DGAT) recyclent les acides gras et les monoacylglycérols en triglycérides (TG). Sous l'action de la microsomal triglyceride transfert protein (MTP), les lipides sont assemblés avec l'apolipoprotéine B-48 nouvellement synthétisée pour générer des chylomicrons (CM). Ces lipoprotéines sont ensuite acheminées dans des vésicules spécialisées du ER vers le Golgi avec une participation cruciale du Sar1b GTPase. Image tirée de Lévy et collab. [20].

1.1.2 La traversée de la membrane basolatérale

Une fois dans le cytosol de l'entérocyte, le cholestérol traverse la membrane basolatérale afin d'intégrer l'organisme (Figure 1). Pour être mis en circulation, le cholestérol emprunte la voie des lipoprotéines. L'estérification du cholestérol par l'*Acyl-Coenzyme A cholesterol acyltransferase 2* (ACAT-2) prévient son reflux dans la lumière

intestinale par les *ATP-binding cassette transporters G5/G8* (ABCG5/G8) (Figure 1). Pour évaluer la contribution de cette enzyme dans l'absorption du cholestérol, Repa et ses collègues ont effectué des mesures d'absorption de cholestérol chez la souris invalidée du gène ACAT-2 qu'ils ont comparées à la souris sauvage nourrie avec cinq différents niveaux de cholestérol alimentaire (de 0 à 0,5 %) [21]. De manière intéressante, aucune différence d'absorption entre les animaux de type sauvage et ceux invalidés du gène ACAT-2 n'était observée avec la diète à 0 %, mais une diminution atteignant 70 % avec la diète enrichie de 0,5 % de cholestérol chez les animaux ACAT-2 (-/-) [21]. Ces résultats montrent que l'ACAT-2 intervient activement sur le transport du cholestérol seulement lors d'une ingestion élevée. Plusieurs autres protéines participent à la production des CM telles que la *monoacylglycerol acyltransferase* (MGAT) et la *diacylglycerol acyltransferase* (DGAT) qui, ensemble, unissent les acides gras et les monoacylglycérols pour former des triglycérides. Sous l'action de la *microsomal triglyceride transfert protein* (MTP), les lipides sont incorporés à l'*apolipoprotéine B-48* (apoB-48) pour générer des CM. Par des vésicules spécialisées, ces lipoprotéines sont ensuite acheminées du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi avec une participation cruciale du *Small GTPase de type Sar1b* (Sar1b) (Figure 1). Les CM sont sécrétés en circulation lymphatique et, ultérieurement, atteignent la circulation systémique.

1.2 La captation des résidus de chylomicrons (RC) par le foie

En circulation systémique, les TAG formant le corps lipidique des CM sont hydrolysés par la *lipoprotéine lipase* (LPL), située sur la surface endothéliale des capillaires des tissus périphériques. L'activité de la LPL est contrôlée par des apolipoprotéines exprimées à la surface des CM. Les *apolipoprotéines C-I* et *C-II* (apoC-I et II) stimulent l'activité de la LPL alors que l'*apolipoprotéine C-III* (apoC-III) l'inhibe (Figure 2). Cette clairance périphérique des lipides alimentaires entraîne une déplétion d'environ 85 % du contenu en TAG des CM, la perte des *apolipoprotéine A-I* (apoA-I) et des apoC-I, II et III ainsi que l'acquisition de l'*apolipoprotéine E* (apoE), qui servira de ligand pour les récepteurs hépatiques [22, 23] (Figure 2).

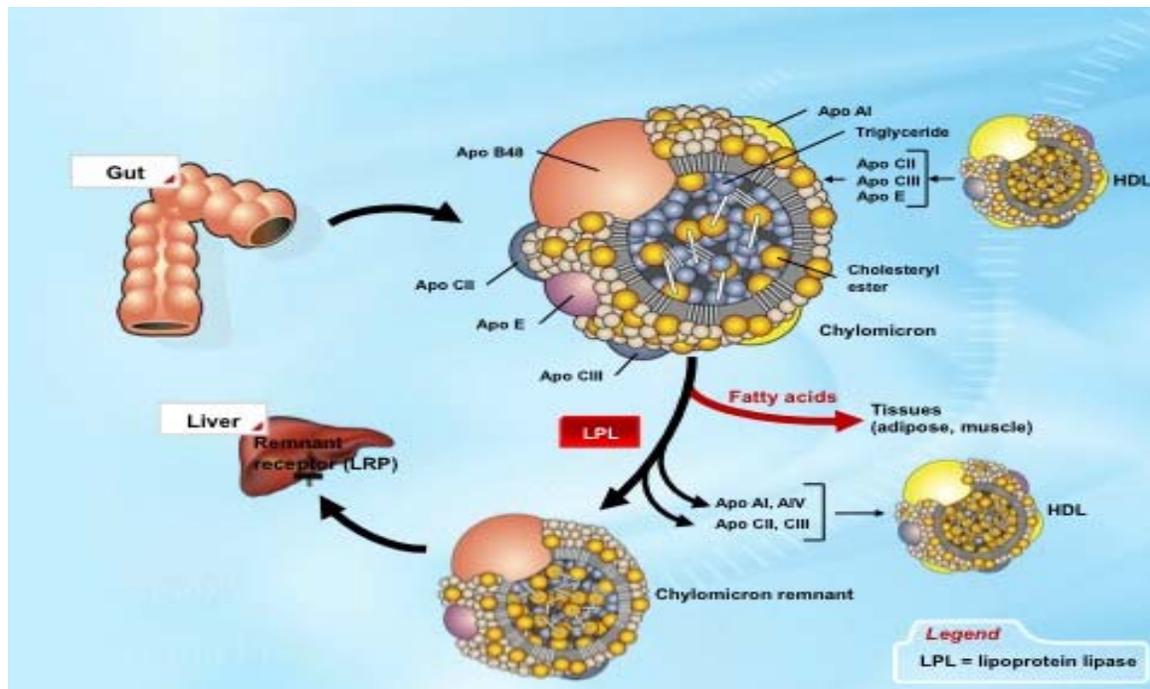


Figure 2 : Métabolisme des chylomicrons

Lorsque les chylomicrons atteignent la circulation systémique, ceux-ci sont délipidés sous l'action de la lipoprotéine lipase (LPL), enzyme catalysant l'hydrolyse des triglycérides retrouvés au centre des chylomicrons. L'activité de la LPL est régulée par les apolipoprotéines C-I, C-II et C-III (apoC-I, apoC-II et apoC-III). Image reproduite avec la permission de :

© International Chair on Cardiometabolic Risk (www.myhealthywaist.org).

Les transformations relatives au métabolisme des CM enrichissent les particules en cholestérol pour former les *résidus de chylomicrons* (RC), reconnus par les récepteurs hépatiques à l'apoE (Figure 2). Tout comme les voies de l'absorption de cholestérol et de la production des CM, la captation des RC est une voie métabolique essentielle à l'homéostasie du cholestérol dans l'organisme. C'est en 1953 que Gould et ses collègues ont découvert qu'au cours des heures suivant l'ingestion de cholestérol, la biosynthèse de cholestérol était largement diminuée au foie alors qu'elle demeurait inchangée dans les autres tissus [24]. Mahley, l'un des plus grands experts dans le domaine, décrit la captation des RC par trois mécanismes : 1) le *low density lipoprotein receptor* (LDLr), 2) l'*héparan sulfate proteoglycan* (HSPG) et 3) le complexe HSPG-*low density lipoprotein receptor-related protein 1* (LRP1) [25] (Figure 3).

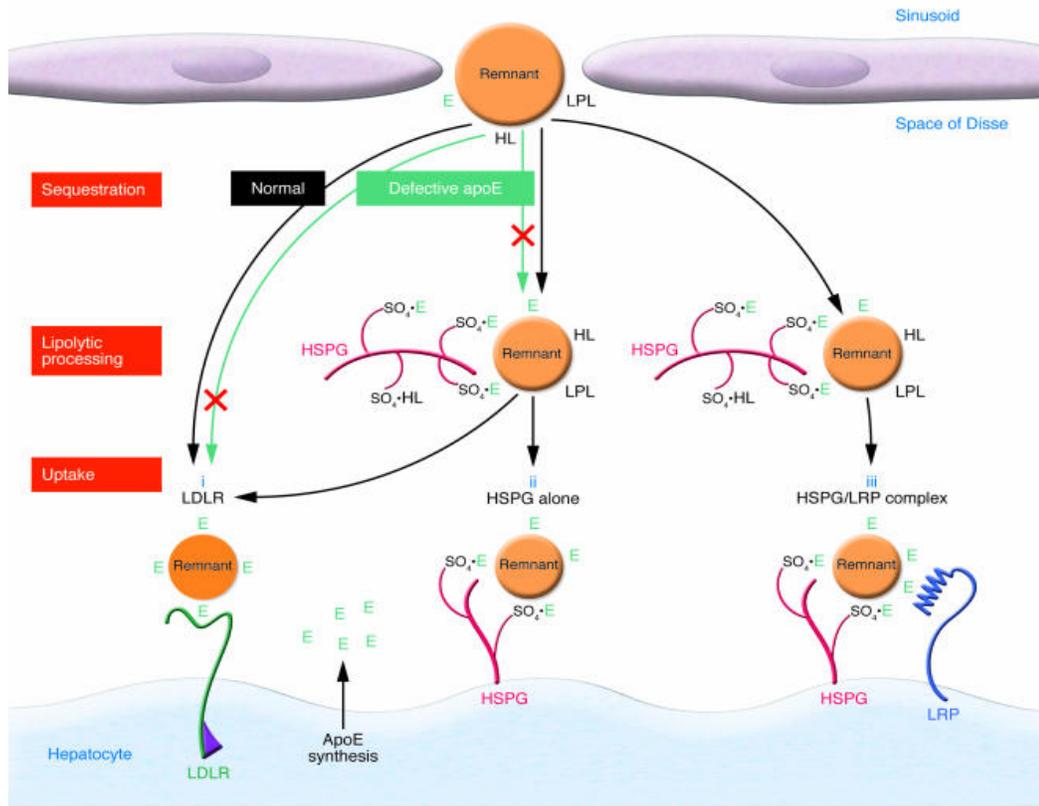


Figure 3 : Mécanismes de captation des RC au foie

Les résidus de lipoprotéines (remnant) sont captés par le LDLr, les HSPGs et le LRP. Les HSPGs se retrouvent abondamment dans la matrice de l'espace de Disse aussi bien qu'à la surface des hépatocytes. Les groupes sulfatés (SO_4) sur les HSPGs interagissent avec l'apolipoprotéine E (apoE), la lipoprotéine lipase (LPL) et la lipase hépatique (HL) en servant de « ligands » qui séquestrent, lient et captent les résidus de lipoprotéines. Image tirée de Mahley et collab. [26].

1.2.1 La captation des RC par le LDLr

Le LDLr est impliqué dans la voie de captation des RC grâce à son affinité pour l'apoE acquise au cours de la phase de distribution périphérique des lipides (Figure 3). L'apoE à la surface des RC est reconnue par le LDLr. À l'aide d'un marqueur aux CM et d'anticorps pour le LDLr, Choi et ses collaborateurs ont montré que les LDLr contribuaient activement à la clairance des RC [27]. De plus, en l'absence ou avec une dysfonction des LDLr, des mécanismes compensatoires prennent place pour empêcher une hyperlipémie postprandiale prolongée [28].

1.2.2 La captation des RC par le HSPG

L'un des autres candidats à la clairance des RC est le HSPG. Localisé à la surface des cellules hépatiques, le HSPG a une affinité pour la *lipase hépatique* (HL), la LPL et l'apoE située à la surface des RC [29] (Figure 3). Le rôle prépondérant du HSPG a été mis en évidence *in vitro* par l'équipe de Mahley ainsi que par Williams et Fuki à l'aide d'un traitement à l'héparinase qui inactive le HSPG. Étonnamment, l'infusion d'héparinase diminuait la capacité de liaison des RC de 80 à 90 % [30-33]. De manière encore plus importante, le rôle du HSPG a été mis en évidence *in vivo* grâce à un modèle animal dans lequel une infusion d'héparinase dans la veine porte diminuait semblablement la captation des RC par le foie [34]. Le HSPG intervient par d'autres façons à la clairance des RC, notamment en interagissant avec le LRP1.

1.2.3 La captation des RC par le complexe LRP1-HSPG

Ce n'est que vers la fin des années 1980 que l'équipe de Herz a identifié le LRP1 [35]. Exprimé abondamment dans le foie, le LRP1 est un récepteur aux RC localisé à la surface des hépatocytes ayant une affinité pour plusieurs ligands, dont l'apoE, la HL et la LPL [35]. L'HSPG contribue activement à cette voie en facilitant le transfert des RC dans l'espace de Disse [34, 36] et en formant un complexe actif sur la membrane des hépatocytes (Figure 3). Puisque le LRP1 est indispensable au développement embryonnaire normal [37], il est impossible de générer des souris LRP1 (-/-). Néanmoins, l'équipe de Rohlmann est parvenue à inactiver le gène LRP1 après la naissance de souris afin de confirmer son rôle dans le catabolisme des RC [38]. L'inactivation du LRP1 avait peu d'effets sur le profil lipidique en raison d'une compensation par surexpression du LDLr hépatique [38]. D'un autre côté, chez les sujets dépourvus du LDLr, l'inactivation du LRP1 entraînait une forte accumulation de lipoprotéines contenant l'apoB-48 (CM) qui, toutefois, n'était pas aussi prononcée que chez les sujets dépourvus de l'apoE [39]. Donc, le véritable facteur déterminant de la captation des RC est l'apoE puisque cette apolipoprotéine est le ligand des trois voies de la captation des CM (Figure 3).

1.3 La biosynthèse de cholestérol

En conditions normales, le corps humain contient près de 100 g de cholestérol, dont 90 % se trouvent en milieu cellulaire [40]. Ainsi, 10 g de cholestérol se retrouvent en circulation. La biosynthèse endogène représente à elle seule près de 70 % des renouvellements quotidiens assurés par le foie et les tissus extrahépatiques notamment l'intestin [40]. Même si le foie contribue largement aux remplacements des pertes quotidiennes de cholestérol, il ne peut combler les besoins de tous les tissus. Par exemple, le cerveau, contenant 25 % des réserves de cholestérol de l'organisme [41], synthétise localement son propre cholestérol [42]. À l'inverse, la stéroïdogénèse des glandes surrénales et des gonades dépend principalement du cholestérol plasmatique issu de la biosynthèse hépatique. Même si ces tissus possèdent l'équipement enzymatique pour synthétiser localement leur cholestérol, il a été démontré que la source principale de cholestérol pour la synthèse hormonale provient de la captation de cholestérol des HDL-C par le transporteur *scavenger receptor BI* (SR-BI) [43, 44]. Bien que seulement 10 % du cholestérol synthétisé par les hépatocytes soit relâché en circulation [40], le foie est le contributeur majeur de la distribution du cholestérol en périphérie grâce à sa production de VLDL et de HDL-C (décrit ultérieurement).

La biosynthèse de cholestérol comporte une série de réactions biochimiques cytoplasmiques initiée par la condensation de trois molécules d'acétate en 3-HMG-CoA catalysée par l'*HMG-CoA synthétase* [45] (Figure 4). Le 3-HMG-CoA est ensuite réduit en mévalonate sous l'action de l'*HMG-CoA réductase* (HMG-CoA r), cible des hypocholestérolémians appelés *statines*. Le mévalonate subit plusieurs autres réactions pour former le *farnesyl* (Figure 4) [45]. Subséquemment, à l'aide de la *squalène synthétase*, six molécules de farnesyl sont condensées en *squalène* [46]. Le squalène subit l'action de l'*oxydosqualène cyclase*, qui, après plusieurs cycles, forme le *lanostérol*. Finalement, le lanostérol est transformé en cholestérol par l'activité de 17 enzymes.

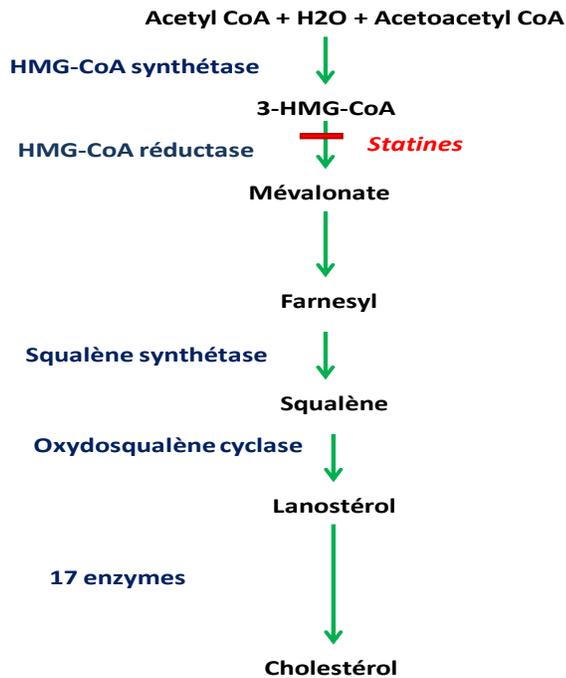


Figure 4 : Vue d'ensemble de la voie de biosynthèse hépatique du cholestérol

Résumé des réactions enzymatiques catalysant la biosynthèse du cholestérol. Image inspirée de Charlton-Menys et collab. [46].

1.4 La production hépatique de VLDL

La production de VLDL est cruciale au maintien de l'homéostasie lipidique du foie et du plasma. L'interruption de cette voie chez le rat avait entraîné le développement d'une stéatose hépatique sévère allant jusqu'à causer un stress du réticulum endoplasmique des hépatocytes [47]. La production de VLDL débute dans le réticulum endoplasmique et est semblable à la synthèse des CM, mais implique l'apoB-100 (forme hépatique de l'apoB-48) [48]. Tout comme lors de la synthèse des CM, les TAG et le cholestérol ester, obtenus sous l'action des DGAT-2 et de l'ACAT-2, respectivement, sont assemblés avec l'apoB-100 à l'aide de la MTP (Figure 5). Lors de cette phase appelée *lipidation initiale*, il a été démontré que la MTP incorpore les TAG et le cholestérol ester à la lipoprotéine dès la phase de traduction de l'apoB-100 [49] (Figure 5).

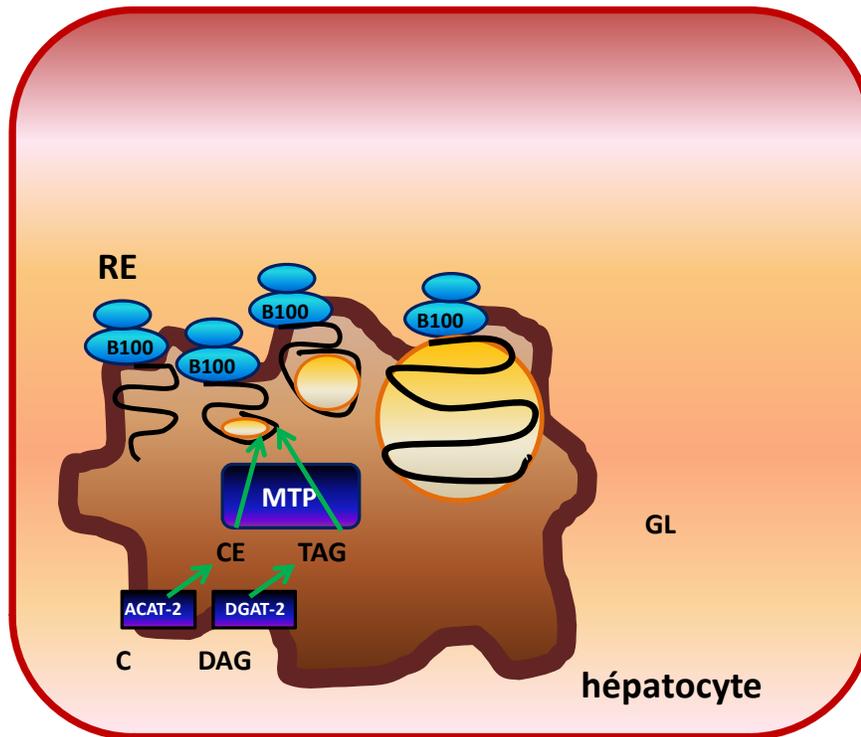


Figure 5 : Première phase de l'assemblage du VLDL : la lipodation initiale

Dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE), les triglycérides (TAG) et les esters de cholestérol (CE) obtenus sous l'action de la DGAT-2 et de l'ACAT-2, respectivement, sont incorporés à l'apoB-100 à l'aide de la microsomal transfer protein (MTP).

Puisque l'espace dans la lumière du réticulum endoplasmique est restreint, la phase de lipodation initiale se termine alors que les particules de VLDL sont relativement petites et denses [50]. Les particules sécrétées du foie pouvant atteindre une taille d'environ 10 fois celle obtenue à la sortie du réticulum endoplasmique, les VLDL poursuivent leur développement dans d'autres compartiments cellulaires [50]. En fait, la plus grande proportion des lipides incorporés au VLDL est issue de la seconde phase de l'étape d'assemblage du VLDL : la *maturation*. Les molécules de VLDL sont d'abord transférées à l'appareil de Golgi par la Sar1a, pour être finalement sécrétées.

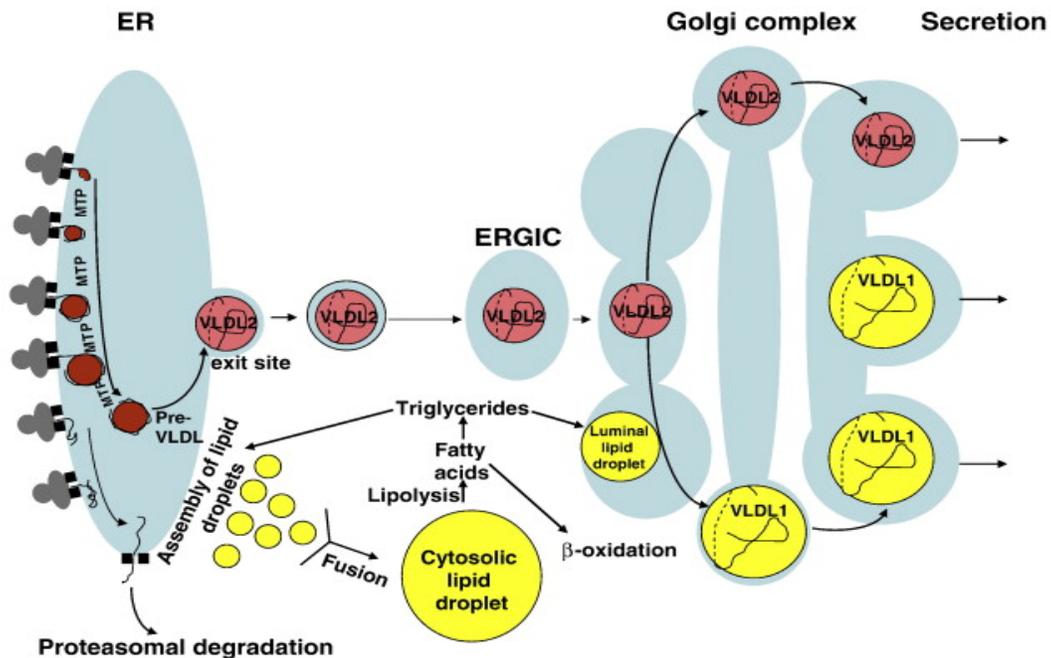


Figure 6 : Vue d'ensemble de l'assemblage et de la sécrétion des VLDL dans les divers compartiments cellulaires

Lors de l'assemblage et de la sécrétion des VLDL, l'apoB-100 est partiellement lipidée dans le réticulum endoplasmique (ER) par la MTP formant des molécules relativement petites (pré-VLDL). Cette phase de lipidation initiale est déterminante pour la sécrétion puisque les apoB-100 sortant du ER dépourvues de lipides sont dégradées. Après la phase de lipidation initiale, les pré-VLDL deviennent de petits VLDL (VLDL₂). Les VLDL₂ atteignent l'appareil de Golgi et peuvent être sécrétés ou encore lipidés davantage pour former de plus grosses particules (VLDL₁). Image tirée de Olofsson et collab. [51]

Une autre protéine aussi impliquée dans l'assemblage et la sécrétion de VLDL est le Cideb, membre de la famille des *cell death-inducing like-effector*, retrouvé dans divers tissus, mais avec le niveau d'expression le plus élevé dans le foie. Le Cideb, colocalisé sur la membrane du réticulum endoplasmique et sur les gouttelettes lipidiques, interagit avec l'apoB-100 pour le transfert des lipides vers les particules de VLDL [52] (Figure 7). Cette colocalisation permet le stockage des lipides non seulement lors de la phase de lipidation initiale, mais également lors de la maturation des VLDL. Ainsi, le Cideb joue un rôle prépondérant sur la taille des particules de VLDL sécrétées [52]. Particulièrement en état de jeûne, les souris dépourvues du gène Cideb présentent une augmentation significative des lipides hépatiques [52]. Ceci s'explique par le fait que l'absence du Cideb amoindrit substantiellement la taille des particules sécrétées. Le flux d'acides gras

libres vers le foie étant accentué durant le jeûne, le rétrécissement des VLDL chez les souris Cideb (-/-) a provoqué une rétention de lipides hépatiques. D'un autre côté, Ly et ses collègues rapportent que la souris invalidée du gène Cideb ingérant une diète riche en lipides est protégée de l'obésité et de l'accumulation de lipides hépatiques [53]. En fait, le Cideb intervient aussi sur d'autres voies métaboliques. Dans les hépatocytes, le Cideb stimule la lipogénèse et diminue l'oxydation des lipides, ce qui favorise doublement le développement d'une stéatose. D'un côté, le Cideb s'oppose au stockage des lipides au foie en facilitant l'incorporation des lipides aux VLDL [52] alors que, de l'autre, il le favorise en stimulant la lipogénèse et en diminuant l'oxydation des lipides. De prime abord, le rôle du Cideb sur l'homéostasie des lipides hépatiques semble ambigu. Toutefois, le Cideb pourrait tout simplement contribuer à la survie de l'organisme de trois façons : en 1) protégeant le foie d'une lipotoxicité, 2) favorisant la synthèse et la rétention des lipides dans l'organisme, la source d'énergie utilisable la plus dense et 3) permettant la distribution des lipides du foie vers les tissus périphériques requérant un plus grand niveau d'énergie, notamment le cœur et les muscles squelettiques. En quelques mots, le Cideb serait un hépatoprotecteur et un distributeur énergétique. Cette hypothèse concorde aussi bien avec l'action du Cideb sur la lipodation des VLDL qu'avec son effet lipogénique.

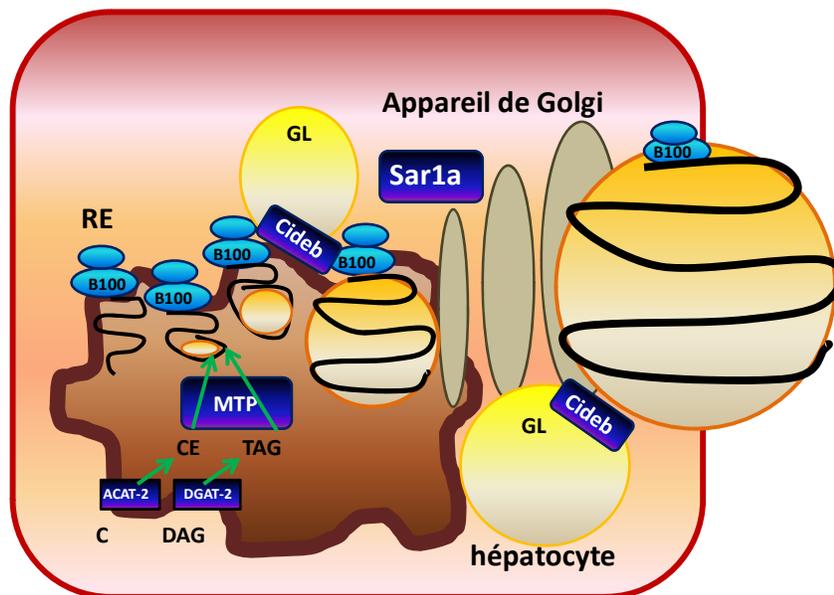


Figure 7 : Colocalisation du Cideb sur le réticulum endoplasmique et les gouttelettes lipidiques

Le Cideb transfère des lipides vers les particules d'apoB-100. Sa colocalisation sur la membrane du réticulum endoplasmique et sur les gouttelettes lipidiques lui confère un rôle important sur la lipodation totale des particules de VLDL.

1.5 La production intestinale de VLDL

En période post-absorptive, l'intestine produit également des VLDL. Pour cela, l'intestin exprime le gène apoB-100 qui, semblablement au gène exprimé dans le foie, permet l'intégrité structurale des VLDL [54]. Cette voie d'entrée et de transport des lipides dans l'organisme joueraient un rôle particulier dans l'athérosclérose en stimulant l'entrée de lipides dans l'organisme en état de jeûne et ce, en plus de la mise en circulation des acides gras libres provenant de la lipolyse du tissu adipeux. Ainsi, une stimulation de production intestinale de VLDL, notamment par une diète riche en lipides, est un processus athérogène.

1.6 Le devenir des VLDL

La dégradation des VLDL produits par le foie est identique à celle des CM sécrétés par l'intestin, elle dépend principalement de la LPL des tissus périphériques (régulée par les apo-C) qui forme des particules plus riches en cholestérol appelées *résidus de VLDL* ou les *lipoprotéines à densité intermédiaire* (IDL-C). Le métabolisme des IDL-C prend donc place par l'une des deux voies soit la voie des récepteurs ou celle de la lipase hépatique. Une grande quantité des IDL formées est internalisée et dégradée dans le foie via les récepteurs à l'apoB ou apoE, le récepteur aux VLDL (VLDLr) assurant la reconnaissance des apoE sous leur isomorphe normal. Une quantité plus faible de particules IDL est dégradée dans la circulation par la lipase hépatique (HL). La HL transforme les IDL-C en LDL-C, les produits finaux du catabolisme des VLDL et des IDL. La clairance des LDL se fait par leur apoB-100 avec le récepteur aux LDL (LDL) (élaboré davantage dans la section 2.3).

2. Voies d'élimination du cholestérol de l'organisme

L'incapacité de l'organisme à dégrader entièrement les molécules de stérol implique que l'excès de cholestérol emprunte la voie de transport à rebours (RCT) pour être éliminé. La voie de RCT se résume principalement en cinq étapes : 1) la biogenèse des HDL-C, 2) le recueil de l'excès de cholestérol en périphérie, 3) le transport et la captation des lipoprotéines par le foie, 4) la production biliaire et 5) l'efflux de cholestérol transintestinal.

2.1 Le métabolisme des HDL-C

La biogenèse des pré-HDL-C

Il est acquis que le foie et l'intestin sont les deux principaux organes synthétisant les pré-HDL-C. Respectivement, les hépatocytes et les entérocytes produisent 70 % et 30 % de l'ensemble des pré-HDL-C de l'organisme [55, 56]. Ces deux organes sont les seuls à synthétiser et à sécréter l'apoA-I, une protéine essentielle à l'intégrité structurale de tous les HDL-C. Également, les hépatocytes et les entérocytes expriment l'*ATP-binding cassette transporter A1* (ABCA1), un transporteur de cholestérol et de phospholipides qui transfère les lipides de la cellule vers les molécules d'apoA-I

appauvries en lipides (Figure 8). Sous la même appellation que la première phase de l'assemblage du VLDL, la *lipidation initiale* du HDL-C forme une lipoprotéine de forme discoïdale nommée *pré-HDL-C* (Figure 8) [56].

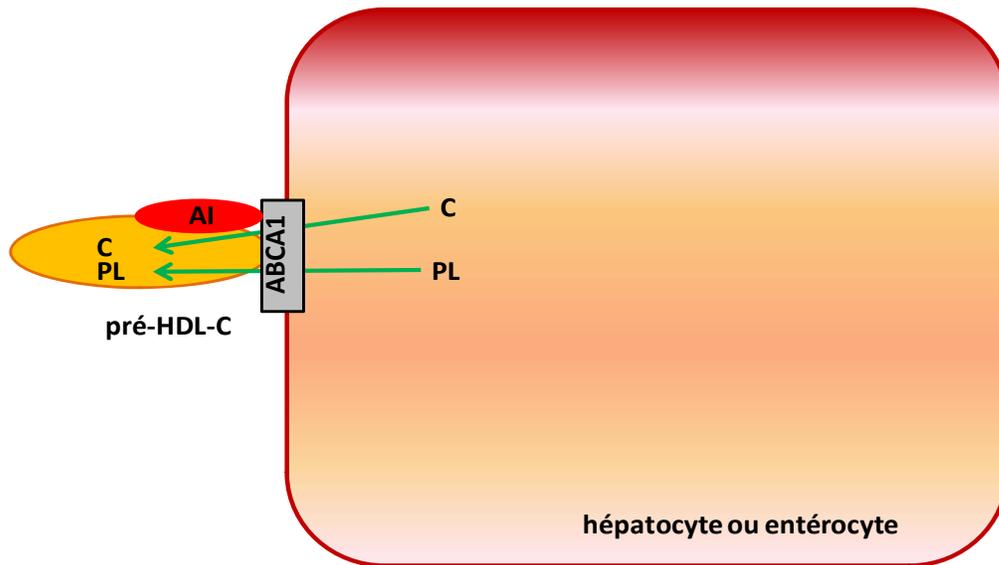


Figure 8 : Lipidation initiale : étape déterminante de la biogenèse des pré-HDL-C

Le cholestérol libre (C) et les phospholipides (PL) sont transférés à l'apolipoprotéine A-I (AI) à l'aide du transporteur basolatéral ABCA1, entraînant la formation de lipoprotéines de forme discoïdale appelées *pré-HDL-C*.

Le remodelage des HDL-C en circulation

Les pré-HDL-C sont subséquentement remodelés par la *lécithine-cholestérol acyltransférase* (LCAT), une enzyme dont le lieu d'activité est le plasma et qui hydrolyse les lécithines des lipoprotéines en produisant, entre autres, des esters de cholestérol (Figure 9). Cette phase de remodelage transforme les pré-HDL-C en particules appelées *HDL₃* et est essentielle à l'homéostasie lipidique puisque l'absence de la LCAT entraîne une diminution sévère des concentrations totales de HDL-C [57]. Toutefois, les scientifiques ne sont pas unanimes quant à l'importance de la LCAT ou des HDL-C sur le développement de l'athérosclérose. Alors que plusieurs chercheurs ont postulé qu'une dysfonction ou une absence de la LCAT aurait un impact négatif sur la santé

cardiovasculaire, des études chez l'animal ont révélé des effets bénéfiques sur la santé métabolique. Par exemple, l'absence de la LCAT chez l'animal exerce une certaine protection contre l'insulinorésistance, le diabète et l'obésité [58]. Les HDL₃ sont capables d'amasser du cholestérol accumulé dans les cellules périphériques (décrit dans la section suivante) et, après une nouvelle action de la LCAT, se transforment en particules de plus en plus riches en esters de cholestérol appelées HDL₂. Les HDL₂ ont une plus faible densité et un plus grand diamètre que ceux des HDL₃. Parallèlement, les particules de HDL₂ et HDL₃ sont la cible de la *cholesterol ester transfer protein* (CETP) sécrétée par le foie et le tissu adipeux, une protéine hautement athérogène qui favorise le transfert des CE obtenus des HDL-C vers les lipoprotéines contenant l'apoB [59] (Figure 9). En ce sens, les HDL-C peuvent aussi contribuer à l'athérosclérose lorsqu'elles demeurent longtemps en circulation. Lors de la maturation des HDL₃ en HDL₂, est également acquise l'apolipoprotéine A-II (apoA-II), un cofacteur activant la *lipase hépatique* (HL).

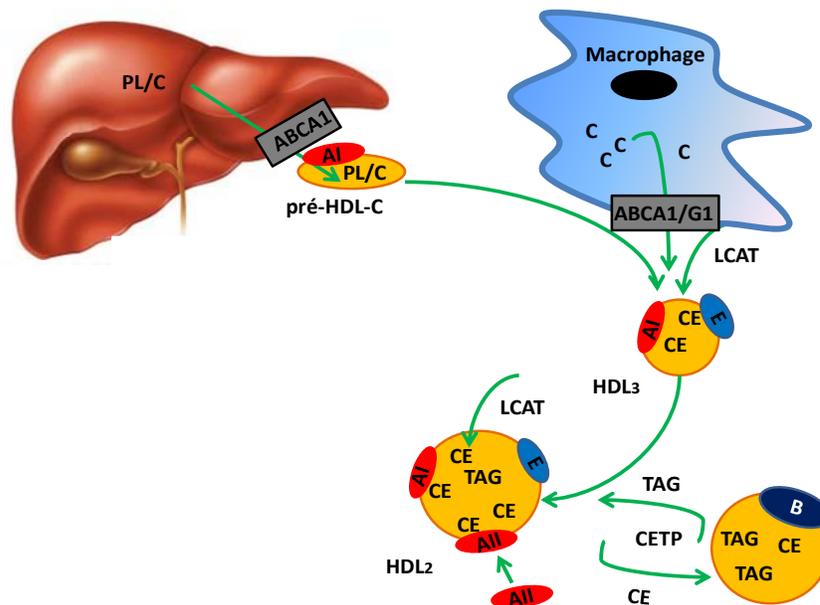


Figure 9 : Remodelage des HDL-C sous l'action de la LCAT et de la CETP

Les particules de pré-HDL-C sont enrichies de cholestérol ester (CE) à l'aide de la LCAT, une enzyme estérifiant le cholestérol libre en CE. L'efflux de cholestérol des macrophages permet également le remodelage des pré-HDL-C en HDL₃. L'apoA-I des pré-HDL-C se lie aux ABCA1 et ABCG1 des macrophages, ce qui induit un mouvement de cholestérol libre des macrophages vers les pré-HDL-C et les HDL₃. La présence de l'apoA-II, acquise durant la maturation, empêche ce mouvement de cholestérol.

2.2 L'efflux de cholestérol périphérique

L'efflux de cholestérol périphérique est le mouvement du cholestérol des cellules extrahépatiques vers les lipoprotéines plasmatiques qui seront éventuellement redirigées pour la plupart vers le foie. Puisque les HDL-C sont les principaux véhicules de la voie RCT, l'efflux de cholestérol périphérique est un processus contribuant à la maturation des HDL₃ en HDL₂ (Figure 9). Il est à préciser que seul le cholestérol sous forme libre peut être transféré aux molécules d'HDL-C [60]. Les macrophages et les cellules spumeuses des conduits vasculaires accumulent de grandes quantités de cholestérol qui peuvent être amassées par les HDL-C. L'apoA-I, située à la surface des HDL-C, se lie à l'ABCA1 ou à l'ABCG1 des cellules périphériques, permettant ainsi l'efflux de cholestérol [61] (Figure 9). L'apoA-II, acquise durant la maturation des HDL₃ en HDL₂, empêche ce mouvement de cholestérol et sa surexpression accentue la progression de l'athérosclérose [62].

2.3 Le catabolisme des lipoprotéines

Les phases de biogenèse, de remodelage et de maturation des HDL-C sont suivies du catabolisme qui débute dans le plasma (Figure 10). Sécrétée en circulation par les hépatocytes, la HL est primordiale au catabolisme des HDL-C [63-65]. Activée par l'apoA-II, la HL hydrolyse les phospholipides et les TAG des HDL₂. La délipidation des HDL₂ sous l'action de la HL réduit progressivement la taille des HDL₂ qui redeviennent des HDL₃ (Figure 10). Des données issues d'expériences sur des animaux indiquent que la surexpression de la HL affaiblit les concentrations d'HDL-C totaux plasmatiques [63-65], alors que, à l'opposé, la déficience en HL retarde le catabolisme des HDL-C qui s'accumulent en circulation [66-68]. Néanmoins, une élévation des concentrations de HDL-C occasionnée par une absence ou une dysfonction de la HL pourrait s'avérer athérogène. Toutefois, toutes les études ne font pas l'unanimité à cet effet. Par exemple, des expériences effectuées chez la souris hypercholestérolémique rapportent qu'une déficience en lipase retarde le processus d'athérosclérose, d'infarctus du myocarde augmente la longévité [69].

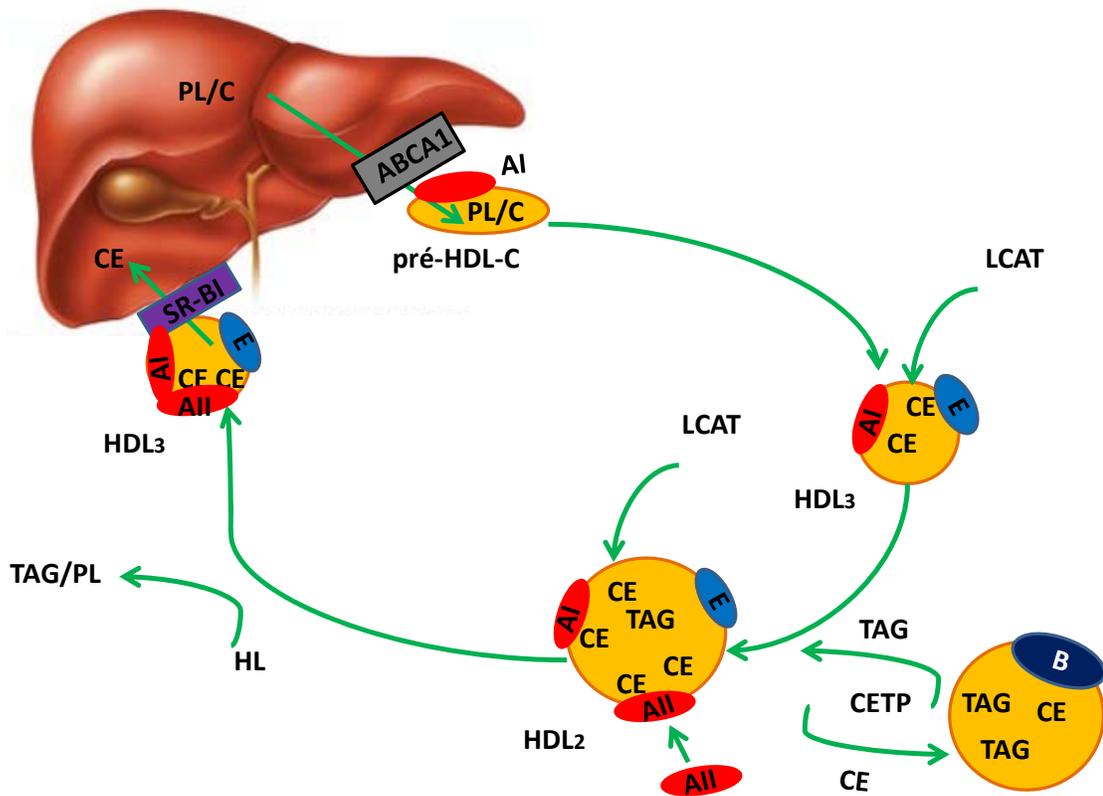


Figure 10 : Catabolisme des HDL-C

La formation des pré-HDL-C par le foie ou l'intestin est suivie d'une phase de remodelage sous l'action de la LCAT qui forme des particules appelées HDL₃. Le recueil du cholestérol en périphérie ainsi que l'action de la CETP augmentent la taille des HDL₃ qui deviennent alors les HDL₂. Les HDL₂ acquièrent l'apoA-II, un co-facteur de la lipase hépatique (HL). Enfin, le catabolisme des HDL₂ prend place en circulation à l'aide de la HL qui, progressivement, retire les TAG et les phospholipides (PL) pour reformer des HDL₃, qui pourront être délipidés davantage au foie par le SR-BI.

Le foie poursuit le catabolisme des HDL-C à l'aide d'un récepteur, le SR-BI, aussi qualifié de *transporteur éboueur* [70]. Par un processus appelé *captation sélective de cholestérol*, le SR-BI hépatique pompe les ester de cholestérol des particules de HDL-C vers les hépatocytes [70] (Figure 11). L'apoA-I de la surface des HDL₃ (préalablement des HDL₂) se lie au transporteur SR-BI hépatique. Par le transfert de cholestérol vers les

cellules hépatique, cette liaison des HDL₃ permet de libérer de l'espace dans ces lipoprotéines pour qu'elle puisse recueillir d'autre cholestérol de la périphérie.

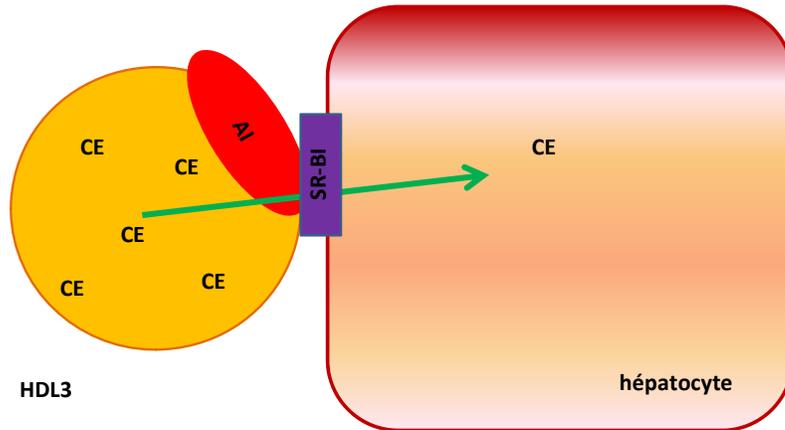


Figure 11 : Captation sélective de cholestérol des HDL-C par le SR-BI

Les particules de HDL-C se lient au SR-BI à l'aide de l'apolipoprotéine A-I (apoA-I) située à la surface des HDL-C. Les esters de cholestérol (CE) sont transférés depuis le centre lipidique des HDL-C jusqu'aux cellules hépatiques.

En plus de recueillir le cholestérol des HDL-C, le foie est responsable de 80 % de la captation et de la dégradation des LDL-C grâce à l'abondance des *récepteurs aux LDL* (LDLr) [71]. Cette glycoprotéine influence grandement la cholestérolémie et est impliquée dans l'hypercholestérolémie familiale autosomale, l'une des maladies métaboliques héréditaires les plus dévastatrices [72, 73]. Le principal ligand endogène du LDLr est l'apoB-100, seule apolipoprotéine présente sur les molécules de LDL-C. Même si le LDLr possède également une affinité pour l'apoE permettant l'internalisation d'autres lipoprotéines, la fonction première du LDLr est d'assurer la clairance du surplus de cholestérol des LDL-C, puisque ceux-ci recueillent approximativement 65 % du cholestérol circulant chez l'humain [74]. La liaison du LDL-C au LDLr provoque leur internalisation. La *clathrine*, une protéine structurale, recouvre cette vésicule qui sera acheminée vers les endosomes, où le faible pH dissocie la lipoprotéine de son récepteur, celui-ci pouvant être recyclé [75] (Figure 12).

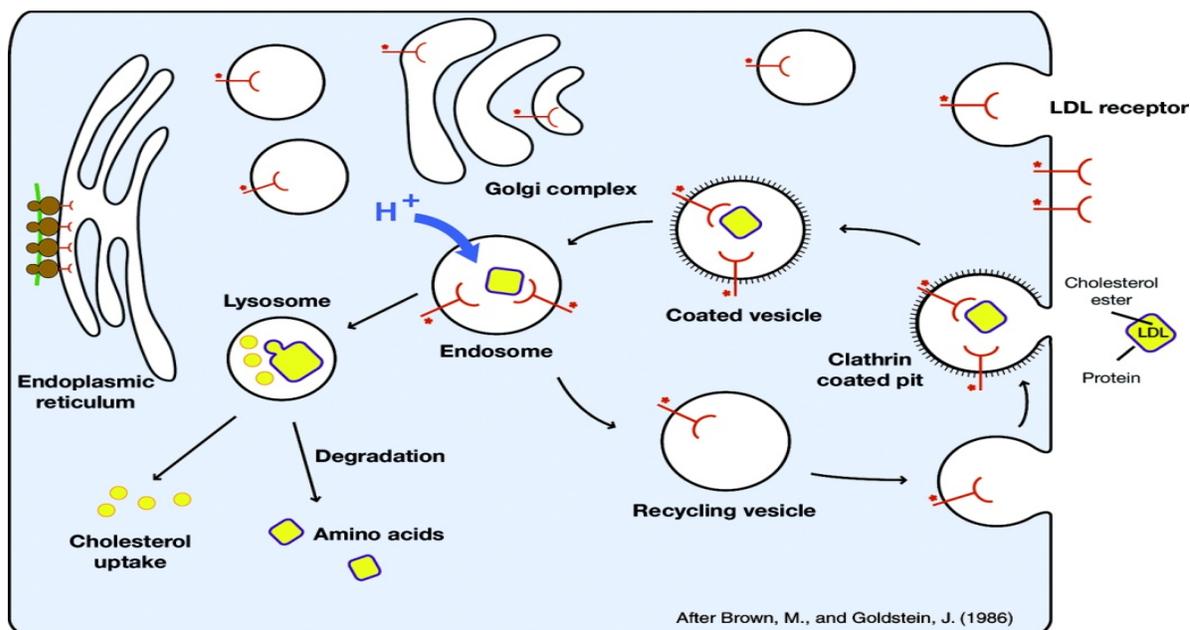


Figure 12 : Schéma de la voie de liaison, d'internalisation et de recyclage du LDLr

Illustration schématique de la captation des LDL par le LDLr. L'entrée du complexe « récepteur-ligand » dans les cellules implique des vésicules tapissées de clathrine (Clathrin coated pit). La vésicule est acheminée vers les endosomes où l'environnement acide permet la dissociation du complexe. Le récepteur peut être recyclé et réacheminé à la surface des cellules. Image tirée de Jeon et collab. [74].

Une autre protéine intervenant sur la captation des LDL-C est la *proprotein convertase subtilisin kexin type 9* (PCSK9), une protéine récemment reconnue comme impliquée dans l'hypercholestérolémie familiale autosomale [76]. La PCSK9 favorise la dégradation des LDLr [77]. La PCSK9 est intracellulaire ou plasmatique, mais, indépendamment de sa localisation, cette enzyme joue le même rôle [78]. L'absence de PCSK9 circulante chez la souris invalidée de la *PCSK9 hépatique* démontre que seul le foie sécrète cette protéine dans le plasma [78].

2.4 La sécrétion de cholestérol par la voie hépatobiliaire

Pour l'éliminer de l'organisme, le foie redirige le cholestérol capté des lipoprotéines vers les canaux biliaires ou le convertit en acides biliaires (AB). Pour gagner la lumière des conduits biliaires (canalicules), le cholestérol doit être hydrolysé puisque les transporteurs canaliculaires et les enzymes amorçant la synthèse d'AB sont

sélectifs au cholestérol libre. Dans le foie, il existe deux enzymes hydrolysant les esters de cholestérol [79]. L'une d'elles, la *cholestéryl estérase*, est exclusive au cholestérol provenant de la périphérie. La cholestéryl estérase est une enzyme située dans les lysosomes qui s'active en réponse à la captation des lipoprotéines par le foie, source préférentielle de cholestérol pour la sécrétion biliaire [80]. La deuxième hydrolase est la *cholestérol ester hydrolase* (CeH), une enzyme ubiquitaire cytoplasmique qui assure l'homéostasie du cholestérol libre cellulaire. Néanmoins, c'est la cholestéryl estérase qui joue un rôle prépondérant dans la sécrétion de cholestérol biliaire. La sécrétion d'*acides biliaires* (AB) constitue la force motrice de l'efflux de cholestérol canaliculaire [81, 82]. La sécrétion de cholestérol biliaire dépend aussi largement de l'efflux canaliculaire des phospholipides, essentiels à la formation de micelles mixtes de lipides dans les conduits biliaires [81]. L'importance des phospholipides dans la sécrétion de cholestérol biliaire a été mise en évidence chez la souris dépourvue de l'*ATP-binding cassette transporter B4* (ABCB4), protéine d'expulsion des phospholipides vers les canalicules (Figure 13), qui présentait une absence quasi complète de cholestérol dans la bile [83, 84]. Les ABCG5/G8, des protéines spécifiques à l'expulsion de cholestérol vers les canalicules (Figure 13), sont aussi de véritables facteurs déterminants de la sécrétion de cholestérol biliaire [85]. En effet, la double ablation des gènes encodant l'ABCG5 et l'ABCG8 interrompt profondément la sécrétion de cholestérol biliaire [85]. Les ABCG5/G8 forment un hétérodimère situé sur la membrane apicale des cellules épithéliales de la section proximale des canalicules (Figure 13).

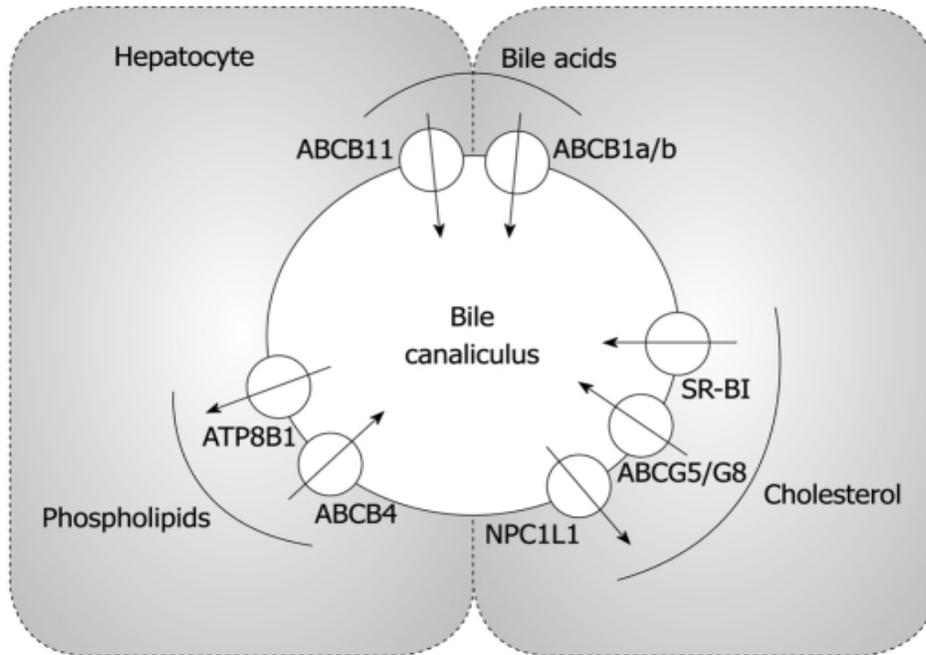


Figure 13 : Principaux transporteurs hépatiques du cholestérol, des acides biliaries et des phospholipides dans les conduits biliaries.

Image tirée de Dikkers et de Tietge [86] ©2010 Baishideng Publishing Group Co.

2.5 La synthèse d'acides biliaries

Dans le foie humain, approximativement 500 mg de cholestérol sont convertis en AB quotidiennement afin d'émulsifier les lipides de la lumière intestinale. Les AB sont ainsi essentiels à l'absorption intestinale des lipides, du cholestérol et des vitamines liposolubles [87]. Le cholestérol est converti en AB sous l'action de 17 enzymes exprimées au foie. Les molécules dérivées de ces actions enzymatiques constituent les AB primaires, soit l'acide cholique et l'acide chenodeoxycholic. La synthèse d'AB primaires inclut quatre étapes : 1) l'amorce, 2) les modifications structurales, 3) l'oxydation et le rétrécissement de la chaîne latérale et 4) la conjugaison.

L'amorce

L'étape d'amorce de la synthèse des AB de la voie classique débute par la conversion du cholestérol en 7α -hydroxycholesterol à l'aide de la *cholesterol 7 α -hydroxylase* (CYP7A1), l'enzyme déterminante de la synthèse des AB qui appartient à la

famille des cytochromes P450 [87] (Figure 14). Des résultats d'expériences par invalidation du gène CYP7A1 démontrent que 75 % des AB sont synthétisés par la voie classique. Une voie alternative, catalysée par la *cholesterol 27 α -hydroxylase* (CYP27A1), est régulée indépendamment de la voie classique et également à la formation d'acide cholique [87].

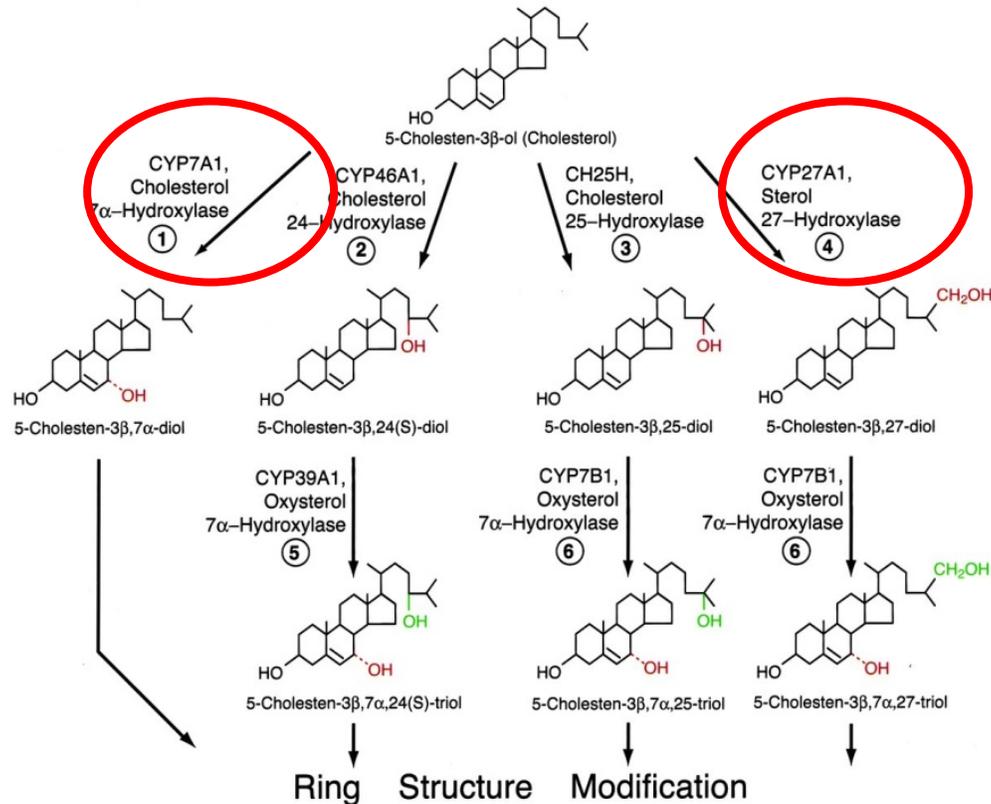


Figure 14 : Initiation de la synthèse d'acides biliaires

Image tirée de Russell DW [87]. © (2003) Clearance Center, Inc.

Les modifications structurelles

Les intermédiaires obtenus par la CYP7A1 ou la CYP27A1 sont ensuite convertis à l'aide de la *microsomal 3 β -hydroxy- Δ^5 -C₂₇-steroid oxidoreductase* (C₂₇ 3 β -HSD) (Figure 15) [87]. Puisque la fonction de la C₂₇ 3 β -HSD est unique et cruciale, la perte de sa fonction empêche toute production d'AB. Les produits de cette dernière transformation tombent sous l'action de la *sterol 12 α -hydroxylase* (CYP8B1) ou de la 3-oxosteroid-5 β -reductase (AKR1D1).

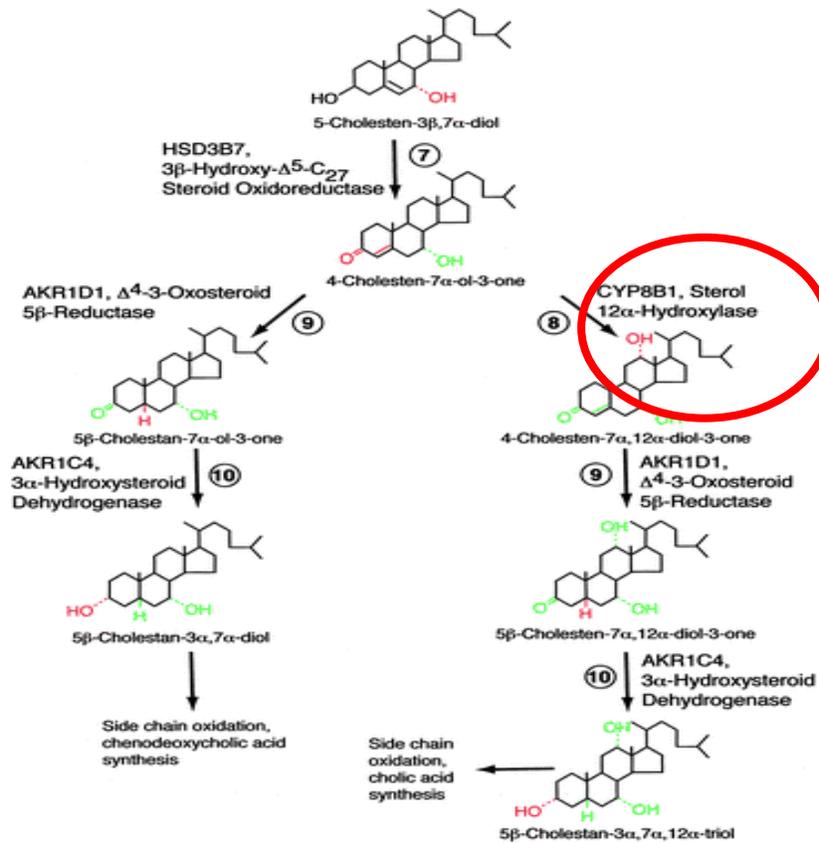


Figure 15 : Modifications structurelles des anneaux de stérol

Image tirée de Russell DW [87]. © (2003) Clearance Center, Inc.

L'oxydation et le rétrécissement de la chaîne latérale

Les produits obtenus de la phase de modification structurelle sont ensuite graduellement oxydés et raccourcis (Figure 16). La CYP27A1, l'enzyme amorçant la synthèse d'AB par voie alternative, participe également à la phase d'oxydation [88]. Cette double participation confère à la CYP27A1 un rôle déterminant sur la synthèse d'AB. Les humains dépourvus de la CYP27A1 accumulent du *cholestanol*, un composé neurotoxique dérivé d'une voie catabolique prenant place lorsque la production d'AB est interrompue. Ce composé s'accumule dans les tendons, mais également dans le cerveau à cause de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique. L'élévation de cholestanol cérébral mène au développement d'une pathologie rare appelée *cerebrotendinous xanthomatosis* [89]. Un fait intéressant est que la souris est protégée de cette maladie grâce au CYP3A1, une enzyme pouvant remplacer la fonction de la CYP27A1 [90, 91].

L'intermédiaire oxydé par la CYP27A1 est ensuite rétréci par une série de réactions s'apparentant à la β -oxydation des acides gras. Ce rétrécissement est déclenché par la *bile acid coenzyme A ligase* qui conjugue l'intermédiaire de stérol avec la coenzyme A (Figure 16). La dernière étape de l'oxydation de la chaîne latérale est lancée par la *peroxisomal thiolase 2*, formant un propionyl-coenzyme A et un intermédiaire d'AB.

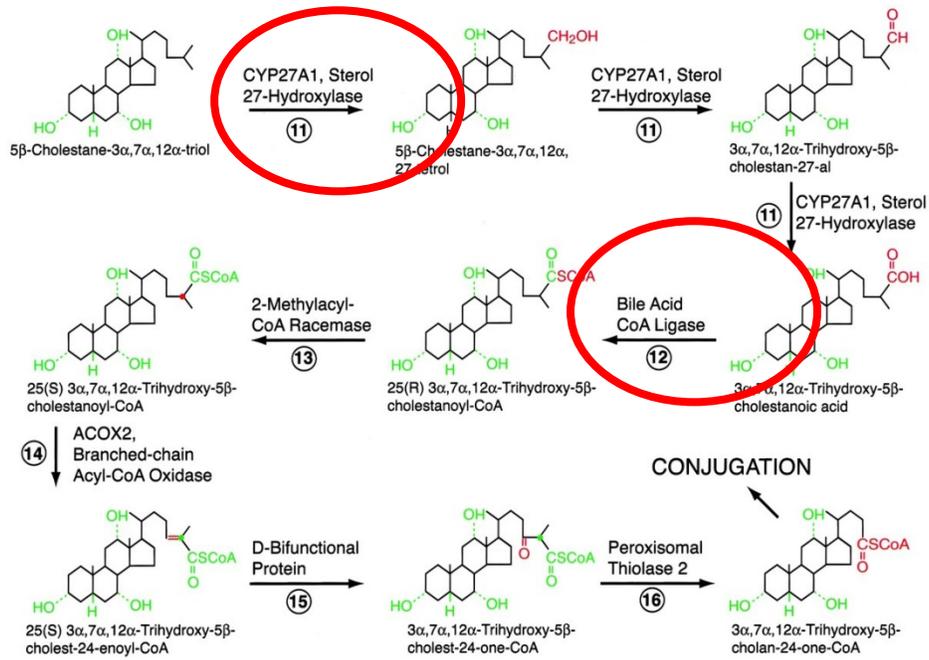


Figure 16 : Oxydation et rétrécissement de la chaîne latérale de stérol

Image tirée de Russell DW [87]. © (2003) Clearance Center, Inc.

La conjugaison

Enfin, l'étape finale de la synthèse d'AB consiste en sa conjugaison avec la glycine ou la taurine par la *bile acid coenzyme A:amino acid N-acyltransferase* (BAAT) (Figure 17). Cette réaction enzymatique est remarquablement efficace puisque plus de 98 % des AB excrétés du foie sont aminés [92]. La conjugaison des AB facilite la formation de micelles dans l'environnement très acide du duodénum et elle est suivie d'une ionisation, d'où l'appellation *sels biliaires*. Ces réactions sont essentielles à la saturation de la bile en AB puisque la solubilité passe de 0,28 g/L pour les AB non conjugués à 569 g/L pour les sels biliaires [87]. Les AB sont expulsés vers les canalicules

à l'aide de la *bile salt export protein* (BSEP) et du *multi drug resistant protein* (MDR), deux protéines transmembranaires du pôle apical des hépatocytes [93] (Figure 18).

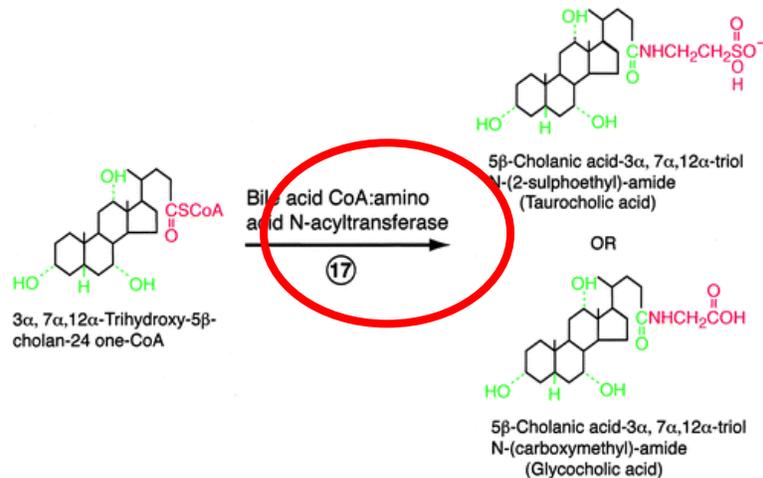


Figure 17 : Conjugaison des acides biliaires

Image tirée de Russell DW [87]. © (2003) Clearance Center, Inc.

2.6 Le recyclage des acides biliaires

Puisque l'intestin absorbe très efficacement les AB, près de 90 % des AB passant dans le tube digestif sont récupérés [94]. Ce phénomène de réabsorption, aussi appelé *cycle entérohépatique*, se fait tout au long de l'intestin par une combinaison de mécanismes de transport passif et actif. L'index d'hydrophobicité supérieur des AB conjugués empêche leur diffusion passive vers la circulation portale [95]. À l'opposé, la déconjugaison favorise ce mode d'absorption [95]. Les bactéries intestinales peuvent déshydroxyler les AB qui deviennent des *acides biliaires secondaires*, molécules hautement hydrophobes traversant passivement l'épithélium intestinal [95]. Toutefois, en conditions normales, la diffusion passive est peu déterminante sur le transport des AB. En plus grande importance, le transport actif requiert la présence de protéines de transport plus ou moins sélectives aux AB. Le jéjunum et l'iléon, expriment l'*organic anion transport protein 3* (OATP3), une protéine non sélective, mais qui possède une affinité pour les AB [96, 97]. En plus de l'OATP3, la recapture des AB s'effectue par un système de transport sélectif ayant lieu exclusivement dans les iléocytes. Le fait que la concentration d'AB dans la lumière intestinale des sections précédant l'iléon soit relativement constante [98] et qu'une résection de l'iléon provoque une malabsorption

des AB [99] sont des preuves que l'iléon constitue le principal siège d'absorption des AB. En fait, il a été démontré que le transport actif des AB par les iléocytes serait, à lui seul, suffisamment efficace pour assurer la réabsorption de l'ensemble des AB produits par le foie [100, 101]. Tout comme le cholestérol, les AB traversent deux membranes pour intégrer l'organisme. Les AB sont d'abord liés à l'*apical sodium bile acid transporter* (ASBT), une protéine transmembranaire située sur le pôle apical des iléocytes (Figure 18). L'ASBT est un symporteur sélectif aux AB conjugués qui fonctionne à l'aide du gradient de Na⁺ maintenu par l'activité de la pompe Na⁺/K⁺-ATPase [102, 103]. Les AB retrouvés à l'intérieur des entérocytes sont ensuite liés à l'*ileal bile acid binding protein* (IBABP), une protéine de transport cytosolique. Bien que la fonction physiologique exacte de l'IBABP ne soit pas clairement établie, son affinité de liaison pour les AB et son niveau d'expression élevé dans les iléocytes sont des facteurs appuyant son implication dans le transport des AB [102, 104]. Du côté basolatéral, les *organite solute transporters α et β* (OST α/β) transfèrent les AB vers la circulation portale [105, 106] (Figure 18).

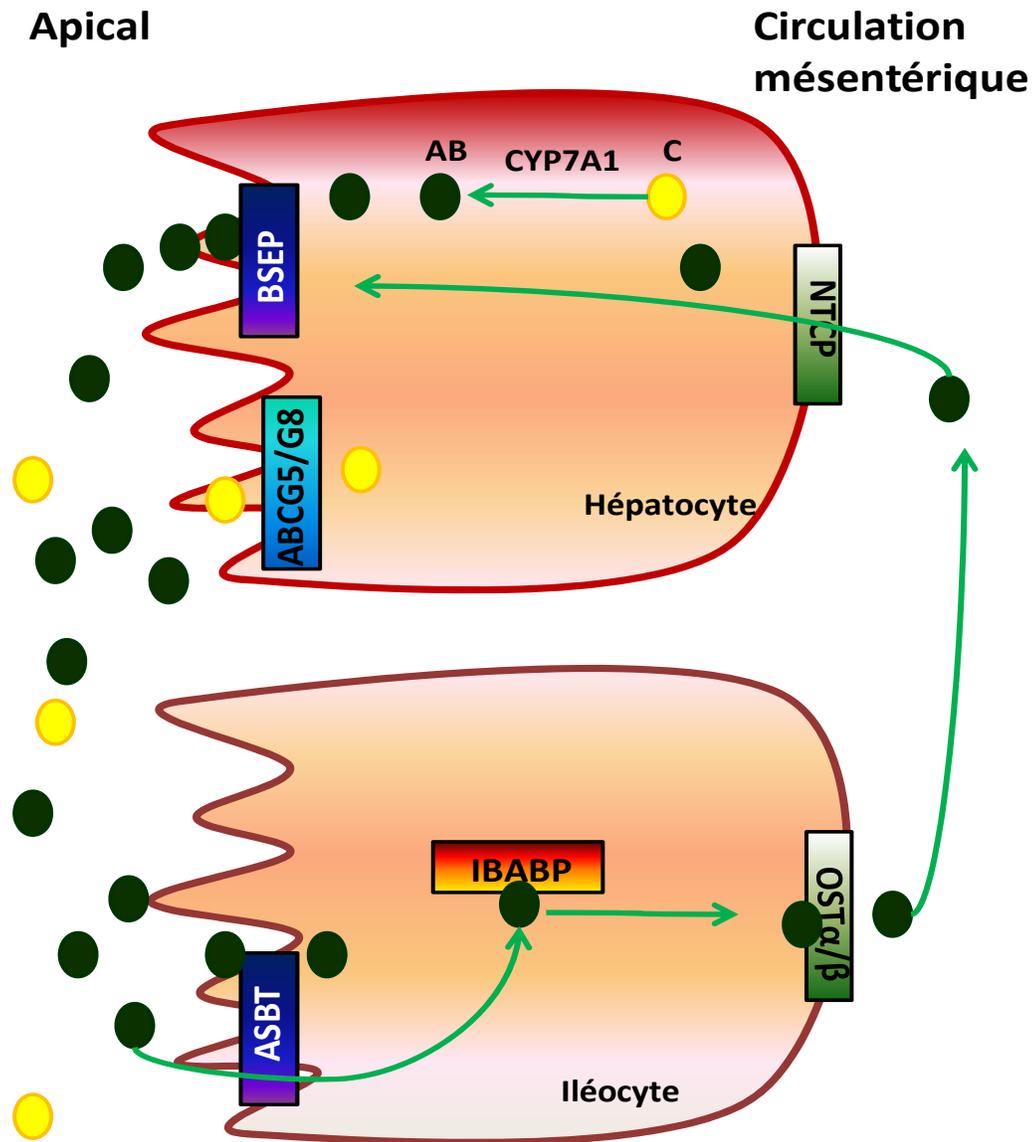


Figure 18 : Mécanismes de transport des acides biliaries dans les cellules intestinales et hépatiques

Les acides biliaries sont sécrétés à travers la membrane apicale des hépatocytes par le transporteur canalriculaire *Bile salt export pump* (BSEP). Les acides biliaries sont ainsi relâchés dans le duodénum et s'écoulent par la bile dans la lumière intestinale. Les acides biliaries sont réabsorbés dans l'iléon via l'*apical sodium bile acid transporter* (ASBT) et des *organite solute transporters α et β* (OSTα-OSTβ).

Subséquemment, les AB réintègrent les hépatocytes à l'aide du *sodium-dependent sodium/taurocholate co-transporting polypeptide* (NTCP) et du *sodium-independent multispecific organic anion transporters* (OATP) [107, 108] (Figure 18). Contribuant à près de 90 % de la recapture des AB au foie, le NTCP est le transporteur déterminant [107]. Comme l'organisme possède une grande capacité à réabsorber les AB et que ceux-ci influencent grandement le transport du cholestérol, la voie d'absorption intestinale des AB serait une cible thérapeutique de premier choix dans le traitement de l'hypercholestérolémie.

2.7 L'efflux de cholestérol transintestinal

Jusqu'à tout récemment, la voie hépatobiliaire était le seul mode d'élimination du cholestérol de l'organisme identifié. Toutefois, si cette voie était unique, l'interruption partielle ou complète de la sécrétion de cholestérol biliaire abolirait l'excrétion fécale. Trois modèles de cholestase, caractérisés par une incapacité d'excrétion de cholestérol biliaire, suggèrent l'existence d'une voie complémentaire à l'élimination du cholestérol de l'organisme. Tout d'abord, les souris dépourvues des ABCG5/G8 hépatiques, des protéines essentielles à l'excrétion de cholestérol biliaire, excrètent une importante quantité de cholestérol dans les fèces [85]. Ensuite, la souris invalidée du transporteur canaliculaire des phospholipides, l'ABCB4, aussi incapable d'excréter du cholestérol par voie biliaire, présente un niveau d'excrétion de cholestérol fécal similaire à celui de la souris sauvage [109]. Enfin, Cheng et ses collaborateurs ont décelé la présence de stérols d'origine non alimentaire dans les matières fécales de patients atteints d'une obstruction complète des conduits biliaires [110]. La présence de cholestérol dans les matières fécales de sujets incapables de l'excréter par la bile est un argument solide quant à l'existence d'une voie alternative. En effet, le tissu intestinal, indépendamment de la voie hépatobiliaire, est capable d'excréter du cholestérol. Appelé *sécrétion transintestinale de cholestérol* (TICE), ce processus participe activement à l'élimination du cholestérol de l'organisme. Des expériences à l'aide de marqueurs radioactifs ont pu déterminer la contribution du TICE à environ 30 % de l'excrétion totale de cholestérol de l'organisme [111-113]. Même si le jéjunum est le siège principal de l'absorption du cholestérol, le duodénum serait le contributeur majeur de son excrétion [114].

La voie TICE requiert la présence et l'activité de plusieurs protéines sur le côté basolatéral aussi bien que sur le côté apical des entérocytes. Même si tous les mécanismes ne sont pas entièrement définis à ce jour, quelques protéines ont clairement été identifiées pour leur participation dans le TICE, dont le LDLr. Étant le second organe le plus impliqué dans la captation et la dégradation des LDL-C [71], l'intestin contribue à environ 10 % de la dégradation des LDL-C. Par leur liaison sur le LDLr, les cellules intestinales internalisent les LDL-C de la circulation systémique vers la lumière intestinale [115]. En plus du LDLr, les cellules duodénales expriment également la PCSK9, impliquée dans la dégradation du LDLr. Bien que peu d'études documentent la fonction du PCSK9 sur l'homéostasie du cholestérol intestinal, des travaux récents ont pu éclaircir son rôle notamment sur le TICE. Quelques équipes de chercheurs ont observé que l'inactivation de la PCSK9 provoque une surexpression du LDLr intestinal [116, 117]. De plus, des expériences sur explants duodénaux rapportent un flux de cholestérol doublement plus élevé par voie TICE chez les souris PCSK9 (-/-) par rapport aux souris de type sauvage [118]. Dans cette même étude, une expérience effectuée dans des explants d'intestin humain dévoile que les LDL-C et les HDL-C contribuent de manière similaire au TICE [118]. Néanmoins, les HDL-C joueraient seulement un rôle « accessoire » sur le TICE. En effet, des souris déficientes en ABCA1, un gène essentiel à la biogenèse des HDL-C, excrètent du cholestérol par voie TICE en quantité similaire à celle des souris de type sauvage [119]. Néanmoins, le tissu intestinal étant doté d'une grande plasticité, il s'adapte aisément aux changements nutritionnels et biologiques. Il est donc possible qu'en absence d'HDL-C certaines compensations, telle une augmentation de la captation des LDL-C par les entérocytes, parviennent à normaliser le TICE. En dépit de leur fonction dite auxiliaire, il apparaît qu'en conditions normales les HDL-C contribuent activement au TICE.

Partie 2 : Mécanismes hépatiques de régulation des voies métaboliques du cholestérol

Outre son rôle structural en formant les membranes cellulaires, le cholestérol joue un rôle prépondérant sur diverses fonctions physiologiques en vertu d'être le précurseur des hormones stéroïdiennes et un constituant de la bile et des acides biliaires, essentiels à l'absorption des lipides et des vitamines liposolubles. Par conséquent, la régulation des voies métaboliques du cholestérol est indispensable à l'homéostasie de l'organisme. Le foie contribue à cette régulation à l'aide de facteurs de transcription et des récepteurs nucléaires, dont le SREBP-2, le liver X receptor (LXR) et le farnesoid X receptor (FXR).

3.1 Le sterol regulatory element binding protein-2 (SREBP-2)

Le SREBP-2 appartient à la famille des facteurs de transcription connue sous le nom de *sterol regulatory element-binding proteins* (SREBPs). La famille des SREBPs comprend trois membres : le SREBP-1a, le SREBP-1c ainsi que le SREBP-2. Le SREBP-1c est abondamment exprimé dans le foie et les glandes surrénales et régule le métabolisme des acides gras et des triglycérides alors que le SREBP-1a a pour double fonction d'activer la biosynthèse du cholestérol et d'acides gras. La surexpression du SREBP-1a se solde en une accumulation sévère de TAG et de CE hépatiques [120]. En raison de son rôle essentiel à la régulation du métabolisme du cholestérol, le SREBP-2, une protéine ubiquitaire, fera l'objet d'une attention plus particulière dans cette revue. Le SREBP-2 est indispensable à la survie puisque l'absence du gène entraîne un décès *in utero* vers le 11^e jour embryonnaire [121]. Situé sur la membrane du réticulum endoplasmique, le SREBP-2 subit un clivage protéolytique pour s'activer sur le plan transcriptionnel [122]. Ce clivage dépend d'abord de son association avec le *SREBP-cleavage activating protein* (SCAP) (Figure 17). Le SCAP comprend deux domaines contrôlant la fonction du SREBP-2 : le *domaine senseur aux stérols* et le *domaine d'interaction* [122] (Figure 19). Grâce au domaine senseur aux stérols, la déplétion de cholestérol intracellulaire active le SCAP qui, en se liant au domaine d'interaction du SREBP-2, l'escorte du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi, où il subira le clivage protéolytique. Ce clivage active ou inhibe la transcription de plusieurs gènes permettant la réplétion de cholestérol intracellulaire. De manière intéressante, l'absence

du SCAP dans le foie diminue de 80 % la biosynthèse hépatique du cholestérol [123]. Ceci s'explique par la capacité du SCAP à activer directement l'HMG-CoA r, l'enzyme déterminante de la biosynthèse de cholestérol. À l'opposé, l'accumulation de cholestérol, grâce au domaine senseur aux stérols du SCAP, change sa conformation, ce qui le réoriente vers une autre protéine, l'*Insig*, à laquelle il se lie [124] (Figure 19). L'*Insig* inhibe la biosynthèse de cholestérol de deux façons : 1) en fixant le complexe SREBP/SCAP dans le réticulum endoplasmique [125, 126] et 2) en s'associant avec l'HMG-CoA r pour entraîner son ubiquitination et sa dégradation [127] (Figure 19).

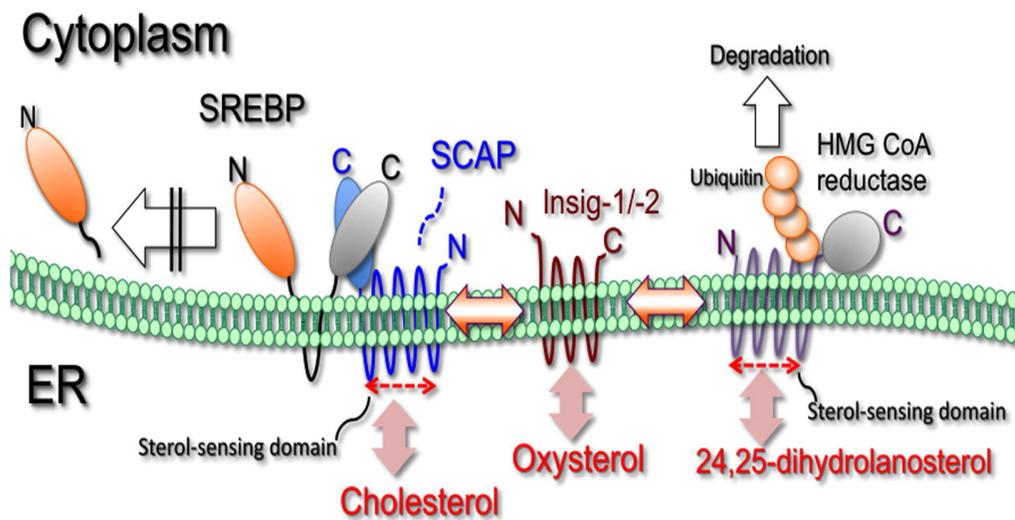


Figure 19 : Mécanismes de régulation du cholestérol intracellulaire par le SREBP-2

Lorsque le cholestérol s'accumule dans la cellule, les *Insig*s interagissent soit avec le complexe SREBP/SCAP ou l'HMG CoA reductase de la membrane du RE. L'interaction entre l'*Insig* et le SREBP/SCAT maintient ce complexe dans le réticulum endoplasmique et empêche la synthèse de nouveau cholestérol. D'un autre côté, l'*Insig* peut interagir avec l'HMG-CoA r afin qu'un ubiquitine se fixe pour favoriser sa dégradation. Image tirée de Sato R. [128]

3.1.1 Le SREBP-2 hépatique

Le SREBP-2 hépatique stimule l'expression génique de plusieurs enzymes de la voie de biosynthèse de cholestérol notamment l'HMG-CoA synthétase [129], l'HMG-CoA r [130] ainsi que la squalène synthétase [131]. Le SREBP-2 induit également l'expression génique du LDLr qui favorise la captation de plusieurs lipoprotéines par le foie [132]. En dépit de sa fonction opposée au LDLr, le PCSK9 est également stimulé par

le SREBP-2 [133]. Cette coactivation du LDLr et du PCSK9 par le SREBP-2 explique le phénomène de résistance aux statines sur la baisse de la cholestérolémie. C'est le ratio entre l'expression de PCSK9 et le LDLr qui dicte l'efficacité de ce traitement. Précisément, un ratio PCSK9:LDLr supérieur accroît la dégradation des LDLr et s'oppose à l'effet hypocholestérolémiant des statines [133]. D'un autre côté, le SREBP-2 inhibe l'expression de la MTP, un transporteur essentiel à l'assemblage du VLDL, bloquant ainsi la sécrétion de cholestérol du foie [134]. Ensemble, ces contrôles transcriptionnels exercés par le SREBP-2 rétablissent le niveau de cholestérol cellulaire. De plus, le SREBP-2 régule l'ABCA1, une protéine déterminante de la biogenèse des HDL-C. En périphérie, l'expression de l'ABCA1 est augmentée en réponse à un excès de cholestérol par l'activation du LXR (expliqué dans la section suivante). À l'opposé, dans les hépatocytes, l'excès de cholestérol diminue l'expression de l'ABCA1. Cette divergence s'explique par la régulation transcriptionnelle de l'ABCA1 unique au foie (Figure 20). Norimasa T. et ses collègues ont décelé deux régions promotrices sur l'ABCA1 hépatique. L'une des régions est contrôlée par le LXR qui réprime la transcription de ce transporteur [135]. La deuxième région promotrice, quant à elle, est régulée par le SREBP-2 qui stimule l'ABCA1 [135]. Cette régulation de l'ABCA1 par le SREBP-2 explique l'augmentation du niveau des HDL-C avec l'utilisation des statines. Ces médicaments diminuent les niveaux de cholestérol hépatiques, ce qui stimule le SREBP-2 et, par conséquent, l'expression de l'ABCA1 [135] (Figure 20).

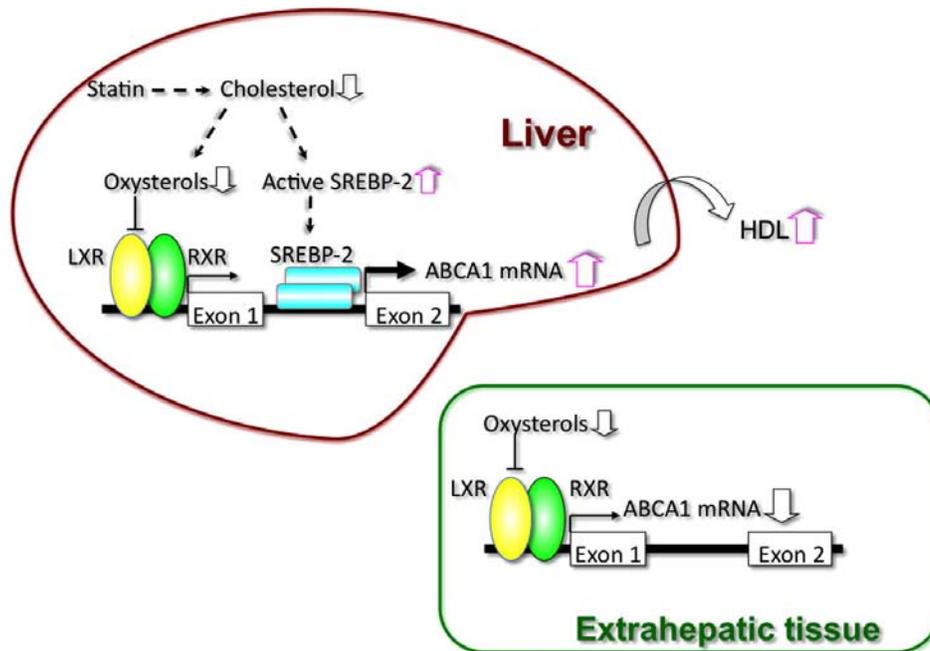


Figure 20 : Régulation de l'expression de l'ABCA1 hépatique

Le SREBP-2 contribue à l'augmentation des HDL-C à la suite d'un traitement aux statines. Dans le foie, l'activation du SREBP-2 stimule l'expression de l'ABCA1 alors que, dans les tissus extrahépatiques, son expression est diminuée par l'activation du LXR (oxysterols). Tirée de Sato R. [128]

3.1.2 Le SREBP-2 intestinal

L'intestin est l'un des sites les plus actifs, après le foie, dans la biosynthèse de cholestérol de l'organisme [136, 137]. Respectivement, le foie et l'intestin fournissent la moitié et le quart du cholestérol plasmatique [138]. Même si la biosynthèse de cholestérol par l'intestin est peu connue, cette voie s'avère pourtant un mécanisme contributif à l'hypercholestérolémie et à la stéatose hépatique. Les pathologies, notamment le diabète de type II, peuvent stimuler de près de deux fois le taux de synthèse de cholestérol intestinal [139]. Le SREBP-2 intestinal joue ainsi un rôle important sur l'homéostasie du cholestérol dans l'organisme qui, toutefois, semble incapable de s'ajuster face aux changements de flux de cholestérol dans la lumière intestinale. L'inadaptabilité de l'intestin par rapport à un plus grand arrivage de cholestérol vient du fait que c'est au niveau de l'iléon que le SREBP-2 est le plus abondamment exprimé [140]. Puisque l'absorption de cholestérol et le TICE se font principalement dans la partie proximale du petit intestin, peu de cholestérol traverse l'épithélium iléal. Le SREBP-2 étant activé par

la déplétion de cholestérol, il est donc plus abondant dans les iléocytes. Le faible niveau d'expression du NPC1L1 dans ces cellules fait que l'enrichissement d'une diète en cholestérol affecte peu leur contenu de cholestérol et donc le SREBP-2 [141]. Ainsi, en dépit d'une ingestion élevée de cholestérol, la biosynthèse par les iléocytes est maintenue. L'inadaptabilité des iléocytes à réajuster leur biosynthèse de cholestérol est donc un mécanisme pouvant contribuer à accentuer les effets délétères d'une diète riche en cholestérol. Le SREBP-2 intestinal joue aussi un rôle important sur l'absorption de cholestérol. Ce n'est que récemment que ce rôle a été mis en valeur. À l'aide d'essais *in vitro* par *retard sur gel*, une technique détectant l'interaction entre une protéine et l'ARN d'une autre protéine, Waddah et son équipe ont repéré une régulation directe de l'expression génique du NPC1L1, le transporteur déterminant de l'absorption de cholestérol, par le SREBP-2 [142]. Ce mécanisme a pu expliquer l'effet de certains nutriments sur la réduction de l'absorption intestinale de cholestérol. En effet, certains nutriments, notamment le curcuma, diminuent l'expression du NPC1L1 par la suppression du SREBP-2 intestinal [143].

3.2 Le liver X receptor (LXR)

Le liver X receptor (LXR) appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires constituant un groupe de 48 facteurs de transcription, dont les récepteurs aux hormones sexuelles, aux hormones thyroïdiennes, aux vitamines liposolubles ainsi qu'aux métabolites du cholestérol [144]. Les récepteurs nucléaires amorcent l'expression d'un réseau complet de gènes suivant leur activation par des molécules liposolubles, telles que les hormones stéroïdes, les oxystérols ou encore des vitamines. Certains récepteurs nucléaires jouent un rôle dans la protection des cellules de l'organisme contre une élévation brusque de composés potentiellement toxiques tels le cholestérol, les AB et les vitamines liposolubles. Le LXR α et le LXR β ont été identifiés chacun indépendamment par triage du génome vers le milieu des années 1990 [145-147]. Le LXR a ainsi été appelé en raison de l'abondance du LXR α hépatique, le premier isoforme à avoir été cloné [147, 148]. Des analyses de séquences d'ADN du LXR α et du LXR β ont démontré une importante homologie (77 %) des acides aminés situés dans les domaines de liaison du ligand (LBD) et de liaison de l'ADN (DBD), confirmant leur lien étroit [145-147].

C'est en 1997 que deux équipes de chercheurs ([149] et [150]) ont identifié les oxystérols comme étant les ligands endogènes pour le LXR. Un peu plus tard, un groupe spécifique de dérivés mono-oxydés du cholestérol ont été identifiés comme les ligands les plus puissants pour l'activation du LXR [149-151]. L'activité du LXR dépend de son hétérodimérisation avec le retinoid X receptor (RXR) [152] (Figure 21). Afin de produire des réponses physiologiques, l'hétérodimère LXR-RXR se lie à une séquence appelée *LXR-responsive element* (LXRE), située sur une région régulatrice de ses gènes cibles [150] (Figure 21).

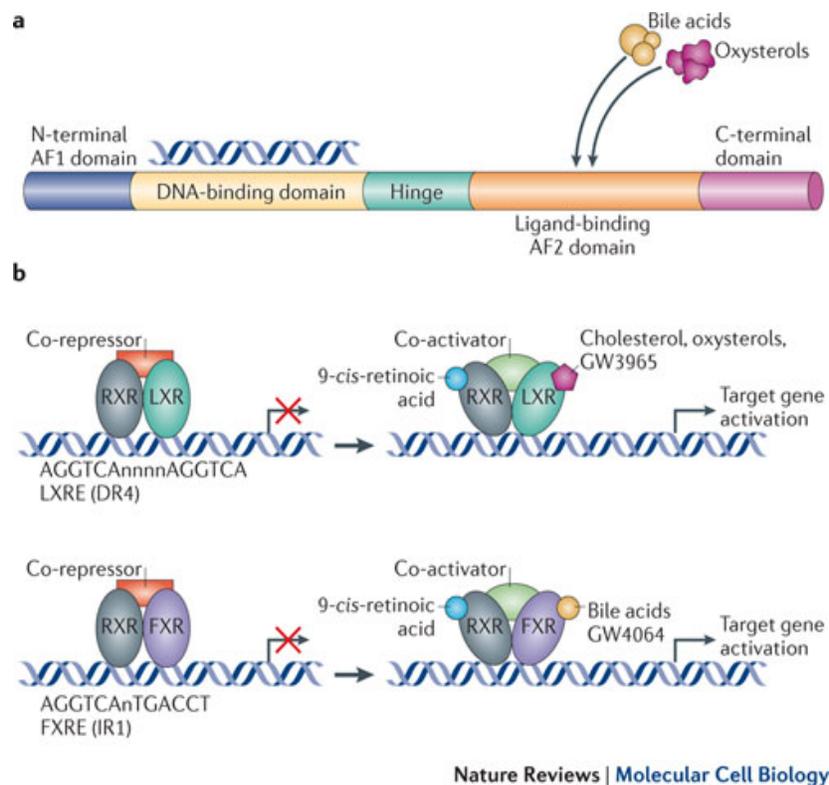


Figure 21 : Structure de base des récepteurs nucléaires et formation d'hétérodimères des récepteurs nucléaires avec le RXR

a La structure de base des récepteurs nucléaires mettant en évidence le ligand-binding domains. **b** Le liver X receptor (LXR) forme un hétérodimère avec le retinoid X receptor (RXR) qui se lie à une séquence appelée *LXR response element* (LXRE) de gènes cibles pour contrôler leur niveau d'expression. De manière similaire, le farnésoid X receptor (FXR) forme un hétérodimère avec le RXR pour se lier aux FXR response element (FXRE), des gènes cibles pour réguler leur niveau d'expression. Tiré de Calkin A. et de Tontonoz P. [153]

3.2.1 L'expression du LXR

L'isoforme LXR α est exprimé abondamment dans le foie ainsi que dans les reins, l'intestin, le tissu adipeux, les poumons, les macrophages et la rate, alors que l'isoforme LXR β est ubiquitaire. Le LXR exerce diverses fonctions physiologiques variant selon le tissu dans lequel il est activé. Des agonistes du LXR ont permis de détailler ses rôles dont la suppression de la néoglucogenèse, l'amélioration de la sensibilité à l'insuline systémique et son effet anti-inflammatoire. Le LXR a fait l'objet de cibles thérapeutiques dans le traitement de plusieurs maladies, notamment l'athérosclérose, le diabète et les maladies cardiovasculaires [154]. Ce récepteur nucléaire régule le métabolisme du cholestérol, particulièrement en orchestrant la voie du transport à rebours du cholestérol.

3.2.2 Les rôles du LXR sur la voie RCT

L'activation du LXR se solde en une stimulation globale de la voie RCT. Cette activation débute par la biogenèse des HDL-C (Figure 20). L'ABCA1, le transporteur clé de la lipidation initiale des HDL-C, est hautement régulé par le LXR et est l'un des premiers gènes cibles identifiés [155]. La thérapie par agoniste du LXR entraîne une surexpression de l'ABCA1 dans le foie, l'intestin et les macrophages, ce qui permet simultanément la biogenèse des HDL-C et l'efflux de cholestérol périphérique [156] (Figure 22). La perte de ces deux réponses à la suite d'une activation pharmacologique du LXR chez les sujets dépourvus de l'ABCA1 suggère l'implication de ce transporteur dans le RCT [155]. Conjointement au contrôle qu'il exerce sur l'ABCA1, le LXR régule d'autres gènes coopérant à l'efflux de cholestérol périphérique. Par exemple, le LXR induit l'expression d'ABCG1 qui, de concert avec l'ABCA1, coordonnent l'efflux de cholestérol périphérique vers les HDL-C (Figure 22) [157-159]. Le LXR augmente aussi l'expression d'apolipoprotéines dont l'apoE, l'apoC-I et l'apoC-II, impliquées dans le catabolisme lipoprotéique [160]. En outre, le LXR induit l'expression d'enzymes de remodelage telles la CETP et la LPL [161, 162]. Tous ces événements liés à l'activation du LXR facilitent le transport du cholestérol de la périphérie vers le foie. Chez la souris, l'activation du LXR confère un potentiel antiathérogène en prévenant la formation de plaques athéromateuses [163, 164]. Par conséquent, le développement d'agonistes sélectifs au LXR est devenu une cible thérapeutique convoitée pour limiter la progression

de l'athérosclérose. Dans la poursuite de l'investigation des rôles du LXR sur le RCT, l'équipe de Ishimoto a découvert un important potentiel du LXR α à induire l'expression du LDLr hépatique via un LXRE [165]. Ainsi, le LXR α favoriserait aussi la clairance du cholestérol de la circulation.

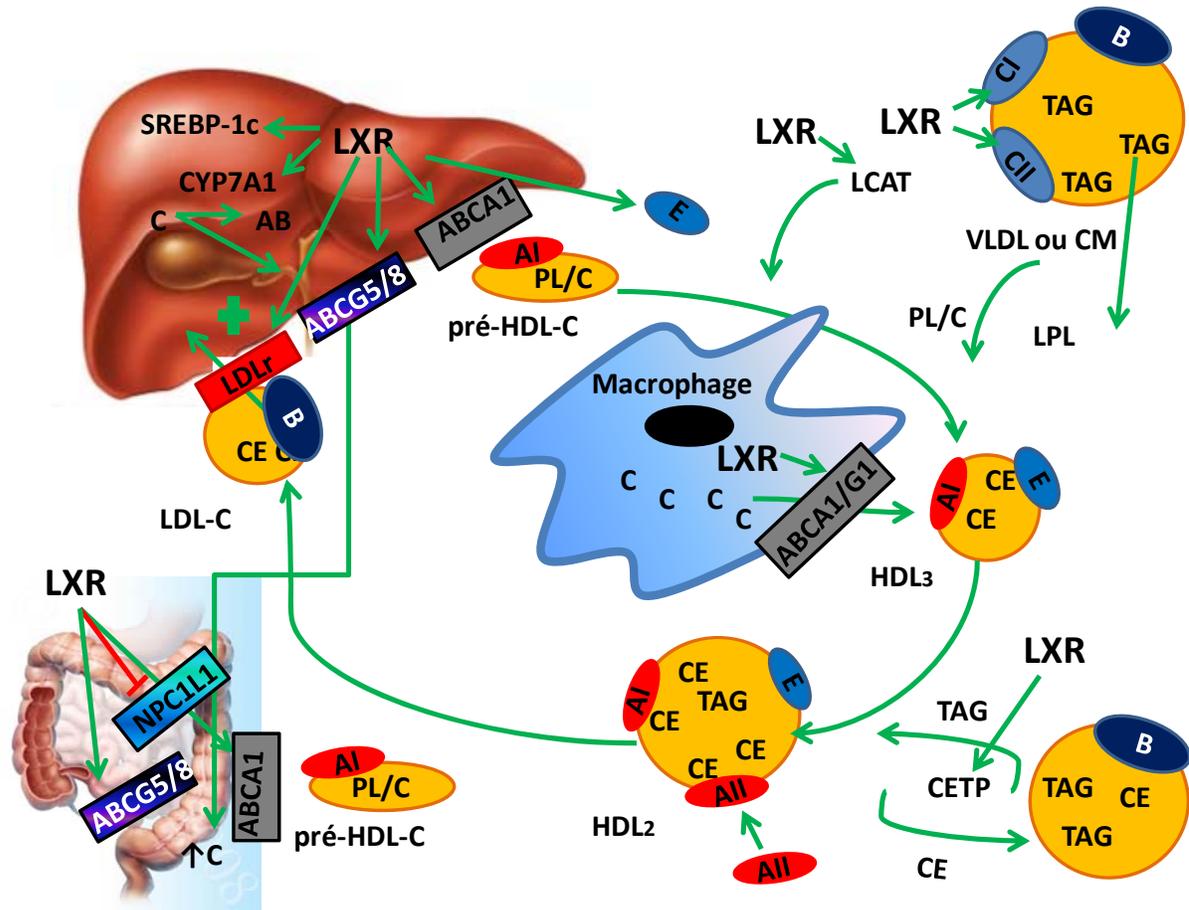


Figure 22 : Rôles du LXR dans la voie RCT

Le LXR stimule la lipogénèse hépatique par le SREBP-1c. Le LXR active la biogénèse des d'HDL-C en induisant l'expression de l'ABCA1 hépatique et intestinal. En périphérie, le LXR accélère le remodelage des HDL-C en stimulant l'expression de la LCAT, de la CETP ainsi que des ABCA1 et ABCG1 des macrophages. Le LXR induit l'expression de l'apoC-I et C-II qui, ensemble, stimulent l'activité de la LPL. Le LXR stimule également l'expression de l'apoE, une apolipoprotéine cruciale pour la captation des résidus de CM par le foie. Le LXR hépatique facilite l'excrétion de cholestérol par la voie hépatobiliaire en induisant la CYP7A1 pour synthétiser des AB, une force motrice pour la sécrétion canaliculaire de cholestérol et les transporteurs canaliculaires du cholestérol, les ABCG5/G8. Dans l'intestin, le LXR restreint l'absorption de cholestérol en induisant les ABCG8/G5 et en diminuant le NPC1L1.

Puisque le cholestérol ne peut être catabolisé, l'excrétion de l'organisme dépend grandement de la conversion du cholestérol en AB. Le gène CYP7A1, encodant l'enzyme clé de la synthèse des AB dans le foie, a été le premier gène identifié comme cible du LXR α [166]. Les souris invalidées du LXR α accumulent davantage de cholestérol hépatique que les souris de type sauvage lorsque nourries d'une diète riche en cholestérol en raison d'une diminution importante de l'élimination de cholestérol par la synthèse d'AB [166]. En revanche, il est à noter que le LXR α humain supprime l'expression du CYP7A1. Le LXR α humain se distingue du LXR α animal par sa capacité à induire directement l'expression du *small heterodimer partner* (SHP), un facteur de transcription qui inhibe l'activité du CYP7A1. Outre ces fonctions sur la biosynthèse des AB, le LXR active l'excrétion canaliculaire de cholestérol en stimulant l'expression des ABCG5/G8 [167, 168].

En dépit des multiples bénéfices sur le métabolisme du cholestérol, le LXR active la lipogenèse *de novo*. En effet, le LXR stimule la lipogenèse *de novo* en induisant l'expression du *sterol regulatory element binding protein 1c* (SREBP-1c), de l'*acetyl CoA carboxylase* (ACC), du steroyl CoA desaturase 1 (SCD1) et de la *fatty acid synthase* (FAS) [166, 169, 170] (Figure 22). Comme l'excès de cholestérol libre est cytotoxique, l'estérification est essentielle à l'homéostasie cellulaire. Ce sont les acides gras nouvellement synthétisés qui servent de substrats pour estérifier le cholestérol pour prévenir l'apoptose. Par conséquent, il n'est pas étonnant de retrouver une augmentation des TAG hépatiques après une ingestion élevée et chronique de cholestérol de même qu'avec l'emploi d'un ligand agoniste du LXR [166]. Cet effet secondaire est le principal obstacle s'opposant à l'efficacité des ligands spécifiques au LXR comme cible thérapeutique. Du même coup, cette activation de la lipogenèse par le LXR constitue l'un des liens importants entre le métabolisme du cholestérol et celui des acides gras.

Par le contrôle de l'étape initiale de l'entrée de cholestérol et de l'étape finale de l'élimination du cholestérol, l'intestin joue un rôle prépondérant sur l'homéostasie du cholestérol. Le LXR intestinal intervient à la fois sur l'absorption et sur l'excrétion du cholestérol en contrôlant l'expression des transporteurs déterminants de ces deux voies.

L'activation du LXR α entraîne une baisse de l'expression du NPC1L1 [171] et une surexpression des ABCG5/G8 [168] (Figure 22). Ces régulations par le LXR se traduisent par une excrétion fécale de cholestérol accrue [172], plus précisément par une stimulation du TICE [173].

3.3 Le farnesoid X receptor (FXR)

Le farnesoid X receptor (FXR) est également un facteur de transcription de la famille des récepteurs nucléaires. Le FXR, originalement nommé le *retinoic X receptor-interacting protein 14*, a été découvert en 1995 [174]. Au courant de la même année, Forman et ses collaborateurs ont identifié le farnesol, un intermédiaire de la voie de biosynthèse du cholestérol, comme ligand endogène de ce récepteur, d'où l'appellation actuelle [175]. Comme le niveau de farnesol nécessaire à l'activation du FXR est pharmacologique, la poursuite des recherches a permis de déterminer que les AB sont les véritables ligands endogènes du FXR [176, 177]. Le FXR est donc en fait un régulateur de la concentration intrahépatocytaire et intraentérocytaire des AB.

3.3.1 L'expression du FXR

Le FXR est exprimé abondamment dans le foie, l'intestin, les reins et les glandes surrénales [175]. Semblablement au LXR, le FXR forme un hétérodimère avec le RXR pour moduler l'expression d'un réseau de gènes cibles. Le FXR réprime la transcription de plusieurs gènes par l'induction du facteur de transcription inhibiteur SHP [178, 179]. L'un des obstacles de l'étude des fonctions biologiques du FXR fut que plusieurs autres récepteurs nucléaires, dont le *pregnane X receptor* (PXR), le *constitutive androstane receptor* (CAR) et le *récepteur à la vitamine D* (VDR), possèdent également une affinité pour les AB. De ce fait, l'ablation génique du FXR fut indispensable à la découverte des rôles spécifiques du FXR [180].

3.3.2 Le rôle du FXR sur l'homéostasie du cholestérol et des acides biliaires

Puisqu'un surplus d'AB est cytotoxique, le FXR hépatique intervient pour les résorber des hépatocytes. Le FXR régule la synthèse et les flux d'AB entre le foie et l'intestin. Par rétrocontrôle négatif, le FXR empêche la conversion du cholestérol en nouveaux AB par l'induction du SHP [178, 179]. Lorsqu'activé, le SHP forme un

hétérodimère avec le *liver receptor homologue 1* (LRH1) qui bloque l'expression génique du CYP7A1 [178, 179] (Figure 23). De manière semblable, l'expression du CYP8B1 est inhibée par le FXR par l'entremise du SHP qui diminue l'*hepatocyte nuclear factor 4 α* (HNF-4 α) [181]. Précisément, la déplétion du HNF-4 α diminue l'expression du CYP8B1 (Figure 23). En plus d'inhiber la synthèse de nouveaux AB, le FXR hépatique stimule leur conjugaison et facilite leur expulsion dans la bile, ce qui a pour effet d'accélérer le processus de détoxification des AB accumulés dans les cellules hépatiques. Pour cela, le FXR induit la surexpression de la BAAT, de la BSEP ainsi que de la ABCB4 [182-185]. Le FXR facilite également le transport canalriculaire du cholestérol, en induisant l'expression génique des ABCG5/G8 [186]. La présence du *FXR response element* (FXRE) sur le promoteur du gène de ces transporteurs démontre l'interaction directe entre ces gènes et le FXR hépatique [186]. Le FXR joue donc un rôle de premier plan sur les niveaux de cholestérol et d'AB hépatiques.

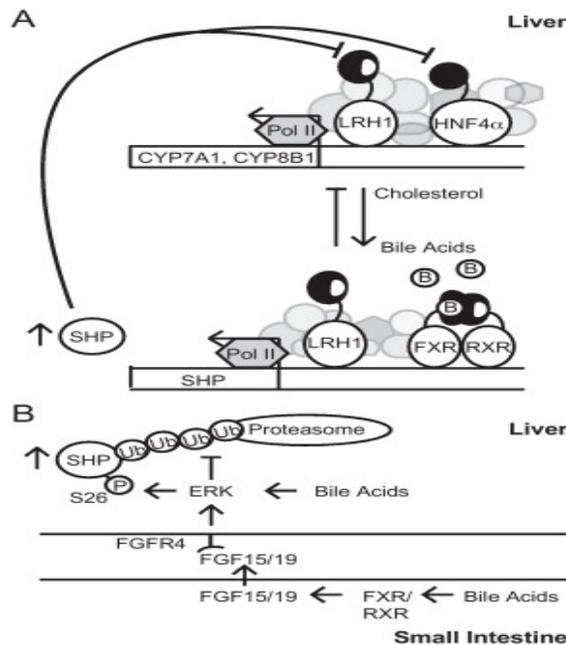


Figure 23 : Régulation de la synthèse des acides biliaires

A La synthèse des AB est régulée par rétrocontrôle négatif à l'aide du *small heterodimer partner* (SHP). Les AB se lient au FXR qui stimule le SHP hépatique, ce qui affaiblit l'expression des LRH1/HNF-4, complexe responsable d'inhiber la transcription du CYP7A1 et du CYP8B1. **B** Les AB induisent le *fibroblast growth factor* (FGF) 15/19 au petit intestin, un facteur servant de signal entérohépatique qui réprime également la transcription du CYP7A1. Adapté de Anna E. et de Eckardt T. [187].

La présence d'AB dans les entérocytes active le FXR qui régule l'expression de diverses molécules orchestrant leur résorption. Pour empêcher l'entrée d'autres AB à l'intérieur des cellules intestinales, le FXR inhibe l'expression du transporteur apical ASBT [188] (Figure 24). Toutefois, sur le pôle basolatéral, le FXR induit l'expression des protéines OST α et OST β . Même si cette action semble contradictoire au rôle du FXR sur la détoxification des AB, cette réentrée des AB dans l'organisme joue deux rôles essentiels. Tout d'abord, l'absorption des AB du côté basolatéral est la seule façon d'expulser ces composés cytotoxiques à l'extérieur des entérocytes puisque ceux-ci sont dépourvus de protéines apicales permettant leur reflux vers la lumière intestinale [189]. Le passage des AB par la membrane basolatérale est ainsi le seul moyen de les éliminer du milieu intracellulaire des iléocytes. Conjointement, cette réabsorption accentue le flux des AB vers le foie, ce qui renforce l'activation du FXR hépatique. De concert avec la régulation intrahépatique de la synthèse des AB, l'intestin sécrète le *fibroblast growth factor 15* (FGF15 ou FGF19 chez l'humain), signal émis en réponse à l'activation du FXR intestinal (Figure 24). Le FGF15/19 est relâché en circulation entérohépatique et se lie au récepteur hépatique *FGF receptor 4* (FGFR4) qui inhibe l'expression du CYP7A1 [190, 191]. Ce mécanisme complémentaire renforce le lien entre le foie et l'intestin dans le contrôle de l'homéostasie du cholestérol et des AB hépatiques. De manière intéressante, une activation spécifique du FXR intestinal chez la souris MDR (-/-), un modèle animal de cholestase, avait prévenu la pathologie [192]. Le fait que cette protection fut perdue en l'absence du FXR intestinal suggère un rôle important de ce récepteur sur l'homéostasie du cholestérol et des AB hépatiques [192].

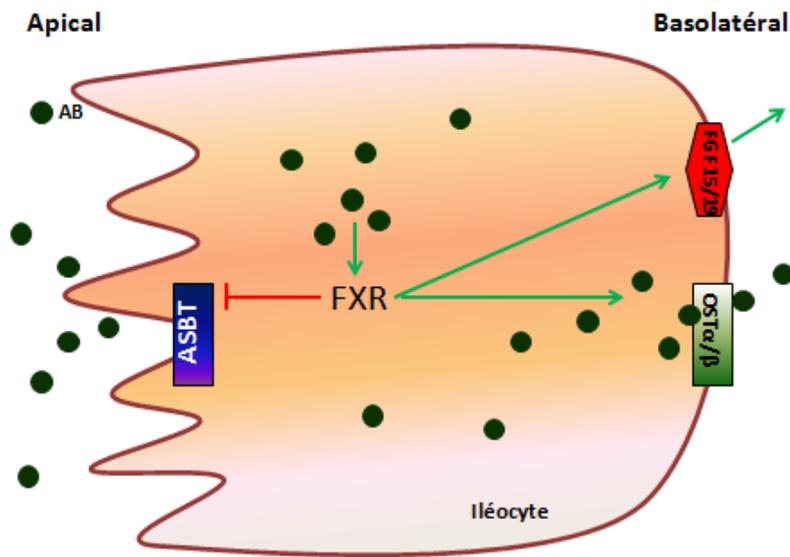


Figure 24 : Activation du FXR intestinal

L'élévation des niveaux d'AB à l'intérieur des iléocytes active le FXR. Pour limiter l'entrée de nouveaux AB, le FXR inhibe l'expression de l'ASBT situé sur le pôle apical. Simultanément, le FXR induit l'expression génique des OST α/β , les transporteurs basolatéraux, et la relâche du FGF15/19, une hormone destinée à un récepteur hépatique pour inhiber la synthèse de nouveaux AB.

3.3.3 Le rôle du FXR sur l'homéostasie des lipides

Le FXR et la clairance périphérique des lipides plasmatiques

La génération de souris dépourvues du FXR a mis en évidence l'importance de ce récepteur sur le métabolisme des AB, mais aussi sur l'homéostasie des lipides. En effet, les souris FXR (-/-) sont dyslipidémiques et absorbent davantage de cholestérol que les souris de type sauvage [180, 193]. Ce phénotype est attribuable en partie par le contrôle de l'expression génique d'apolipoprotéines impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines. Par exemple, le FXR régule l'expression de l'apoC-II par deux sites de la région promotrice du gène, qui stimulent l'activité de la LPL. En catabolisant les lipoprotéines, la LPL les libère de TAG de la circulation en fournissant de l'énergie utilisable par le muscle ou permet leur stockage dans le tissu adipeux [194] (Figure 25). Ceci explique l'effet hypolipémiant d'un ligand agoniste du FXR chez des souris dyslipidémiques [194]. Le fait que ce ligand n'ait aucun effet sur les TAG plasmatiques

de souris FXR (-/-) indique que ce récepteur contrôle les niveaux de lipides circulants. En plus de stimuler l'expression de l'apoC-II, le FXR réduit l'expression de l'apoC-III qui inhibe la LPL [195]. Conjointement, l'activation de l'apoC-II et l'inhibition de l'apoC-III par le FXR se soldent en une hyperactivité de la LPL et donc, en une baisse des concentrations de TAG plasmatiques (Figure 25).

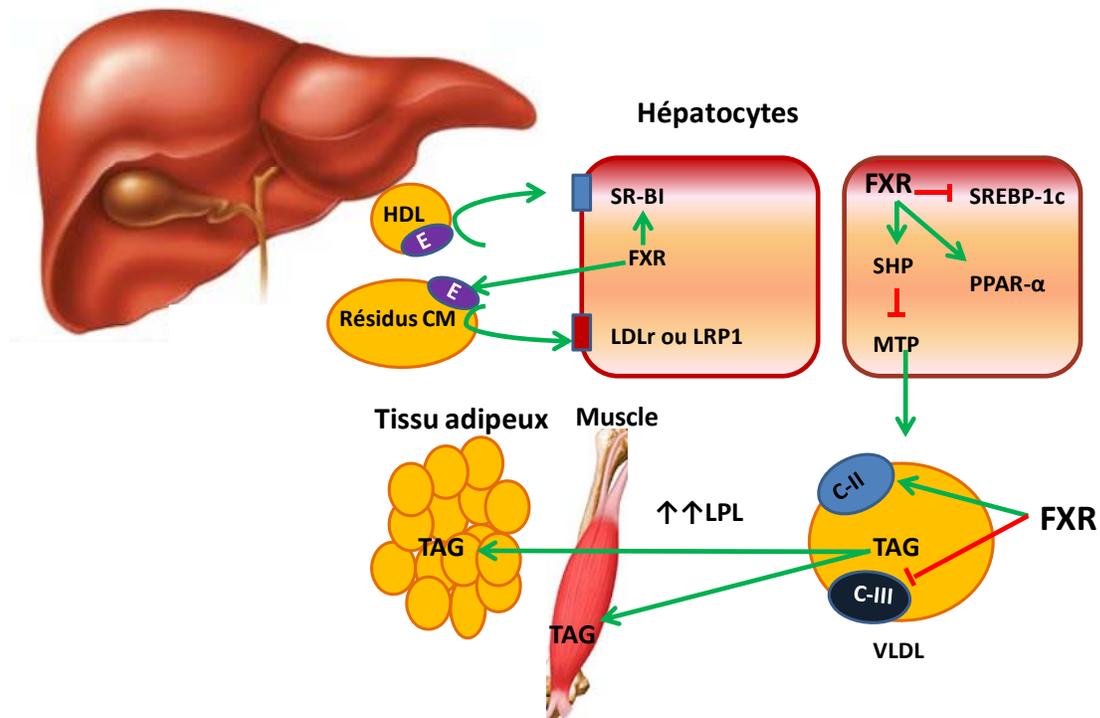


Figure 25 : Mécanismes de diminution des TAG plasmatiques par le FXR

L'activation du FXR hépatique inhibe l'expression du SREBP-1c et stimule le PPAR- α , ce qui, conjointement, diminue la concentration intrahépatique de TAG. Par l'induction du SHP, le FXR hépatique inhibe également la MTP, s'opposant ainsi à la distribution des TAG vers le plasma par la sécrétion de VLDL. En périphérie, le FXR stimule l'apoC-II et inhibe l'apoC-III, ce qui stimule doublement l'activité de la LPL, une enzyme hydrolysant les TAG des lipoprotéines circulantes. Les acides gras obtenus sous l'action de la LPL sont recombinaés en TAG dans le tissu adipeux ou oxydés par le muscle squelettique. Enfin, le FXR stimule le retour des lipoprotéines vers le foie en induisant le SR-BI, récepteur aux HDL-C, ainsi que l'apoE, apolipoprotéine présente à la surface des résidus de CM et des HDL-C et reconnue par le LDRr et le LRP1.

Le FXR et la production de VLDL

Un ligand agoniste du FXR chez le hamster nourri d'une diète riche en fructose avait amélioré le profil lipidique en minimisant la production de VLDL hépatiques [196]. Puisqu'une baisse de production de VLDL est un facteur protecteur, il est à noter que ce ligand avait également inhibé la lipogenèse *de novo*, prévenant ainsi le développement d'une stéatose [196]. Le déclin de la production de VLDL par le FXR s'explique par le contrôle qu'exerce ce récepteur nucléaire sur la MTP (Figure 25). En effet, le traitement de cellules hépatiques au CDCA, l'un des ligands agonistes les plus puissants du FXR, bloque l'expression génique et protéique de la MTP [197]. Ce contrôle s'explique par l'induction du SHP (Figures 23 et 24), l'un des régulateurs de la MTP [197]. Cette action indirecte du FXR sur la MTP explique le potentiel d'un ligand agoniste du FXR à corriger la dyslipidémie provoquée par une diète riche en fructose [196].

Le FXR et le métabolisme des lipides au foie

D'un autre côté, le FXR induit l'expression de l'apoE, une apolipoprotéine essentielle à la captation des résidus de CM, grâce à son affinité pour le LDLr, le HSPG et le LRP1 des hépatocytes [198]. De plus, le FXR facilite la captation sélective de cholestérol dans les HDL-C par l'induction du SR-BI hépatique [199, 200]. Parallèlement, le FXR atténue l'activité du SREBP-1c par l'entremise du SHP (Figure 24) [201]. Matsukuma et son équipe ont également identifié un site sur le promoteur du gène FAS qui est inhibé par le FXR [202]. Chez l'humain, l'activation du FXR stimule l'expression du PPAR α et un des gènes favorisant l'oxydation des lipides [203] (Figure 25). Somme toute, le FXR est un hypolipémiant par ses multiples actions sur la clairance lipoprotéique, la lipogenèse et l'oxydation des lipides. Par l'entremise des AB, le FXR établit donc un lien important entre le métabolisme du cholestérol et celui des lipides.

3.3.4 Le FXR et les niveaux de lipides hépatiques

La dysfonction du FXR est associée à diverses perturbations, dont la stéatose hépatique, la cholestase intrahépatique, le cancer du tractus hépatobiliaire ainsi que l'hypoxie [204-207]. Depuis les dernières années, beaucoup d'efforts ont été mis de l'avant afin d'établir le lien entre le FXR et la stéatose hépatique. La relation entre les

lipides hépatiques et le FXR est nettement exposée chez la souris dépourvue du FXR qui développe spontanément une stéatose hépatique sévère [208, 209]. De plus, la deuxième étude de cette thèse a fourni de nouveaux éléments selon lesquels des facteurs diététiques parviennent à inhiber le FXR (Chapitre 3). Dans cette étude, nous rapportons que des rats nourris d'une diète HFHC présentent une répression de l'ordre de 70 % de l'expression génique du FXR par rapport aux animaux nourris d'une diète standard. En outre, la sévérité de la stéatose était si prononcée qu'une hépatomégalie et une décoloration du foie étaient visibles à l'œil nu. Même s'il fut impossible de déterminer si la répression du FXR était une cause ou une conséquence de la stéatose, il semble exister un lien étroit entre l'expression du FXR et le niveau de lipides hépatiques. Par exemple, Yang et ses collaborateurs ont rapporté une corrélation négative entre les niveaux de lipides hépatiques et d'expression du FXR chez les patients atteints de stéatose hépatique [204]. Le FXR est également devenu une cible pharmacologique de premier choix dans le traitement de la stéatose hépatique. L'emploi de ligands spécifiques au FXR chez le rat obèse zucker (fa/fa) a contrecarré la stéatose [210]. De récents résultats d'une étude clinique au deuxième stade d'un ligand agoniste spécifique au FXR indiquent d'importants effets bénéfiques chez les patients atteints de diabète de type II et de stéatose hépatique [211]. L'emploi d'un ligand pharmacologique du FXR améliore la sensibilité à l'insuline et résorbe les lipides hépatiques, et ce, dès la sixième semaine d'utilisation [211]. À la lumière de ces résultats, le FXR s'avère une cible thérapeutique prometteuse. Malgré cela, la régulation endogène ainsi que les effets pléiotropes sont peu documentés.

Partie 3 : Les estrogènes et les voies métaboliques du cholestérol

Les estrogènes confèrent aux femmes une importante protection cardiovasculaire [212]. Ces hormones femelles exercent un large éventail d'actions biologiques prévenant à la fois l'athérogenèse et le dépôt de lipides ectopiques. L'arrivée de la ménopause déclenche une triade athérogène caractérisée par une réduction des niveaux d'HDL-C, une hausse des LDL-C ainsi qu'une hypertriglycémie, qui potentialise le risque de développer une stéatose hépatique [213]. En fait, plusieurs études démontrent la relation étroite entre la cholestérolémie et les lipides hépatiques, et les estrogènes auraient un impact majeur sur cet axe (pour des revues, voir références [214, 215]). Une dysrégulation du métabolisme du cholestérol pourrait donc être impliquée dans l'hypercholestérolémie et la stéatose hépatique. La présente section recensera les effets de la présence ou de l'absence des estrogènes sur les voies métaboliques du cholestérol (résumés dans le tableau 1). Cette partie vise également à mettre en évidence en quoi une dysrégulation du métabolisme de cholestérol lors d'un déficit en estrogènes peut favoriser l'accumulation de lipides hépatiques.

4.1 Les estrogènes et l'absorption intestinale de cholestérol

Même si ce secteur de recherche demeure peu documenté, certains éléments indiquent une influence des estrogènes sur l'absorption intestinale du cholestérol. Tout d'abord, les entérocytes expriment les deux isoformes du récepteur aux estrogènes, les récepteurs aux estrogènes α (ER α) et β (ER β) et, étonnamment, la présence d'estrogènes stimule leur expression [216]. Une rétroaction positive des estrogènes sur leurs propres récepteurs implique qu'une fluctuation des niveaux de ces hormones aura un impact important sur le tissu intestinal. Plusieurs différences sur le plan de l'absorption intestinale de cholestérol ont été découvertes en fonction du sexe et de l'âge [217-220], suggérant ainsi un rôle important des estrogènes. De manière intéressante, la baisse des concentrations d'estrogènes chez la souris âgée est associée à une surexpression du NPC1L1, le transporteur déterminant de l'absorption de cholestérol [216]. Une absorption intestinale du cholestérol accrue s'avère ainsi un mécanisme physiopathologique qui pourrait expliquer l'apparition de l'hypercholestérolémie à la

ménopause. Ce rôle des estrogènes sur le transport intestinal de cholestérol demeure toutefois contradictoire dans la littérature. Par exemple, dans l'étude citée plus haut [216], une série d'expériences complémentaires avaient été effectuées sur d'autres groupes d'animaux Ovx chez lesquels le déficit en estrogènes n'avait aucun impact sur le NPC1L1 intestinal. Étonnamment, un traitement à l'E2 chez les animaux Ovx avait triplé l'expression du NPC1L1 dans le petit intestin. En outre, les rates Ovx traitées à l'E2 absorbaient le cholestérol plus efficacement [216]. Le rôle des estrogènes sur le passage apical des cellules intestinales est donc incertain à ce jour. Comme l'absorption du cholestérol se complète par la traverse basolatérale des entérocytes, il est à considérer que les estrogènes puissent intervenir sur la production des CM. Il est bien reconnu que la chute des hormones femelles entraîne une perte de sensibilité à l'insuline [221, 222]. Qu'elle soit systémique ou localisée dans l'intestin, l'insulinorésistance provoque une surproduction de CM [223-226]. Une surproduction de CM est caractérisée par une accélération de l'absorption des lipides ingérés et une absorption supérieure de lipides par rapport à une quantité ingérée. Cela s'explique par le fait qu'une insulinorésistance intestinale stimule la lipogenèse *de novo* dans les entérocytes [224]. Par conséquent, il est possible que les femmes postménopausées produisent davantage de CM que les femmes préménopausées pour une même quantité de lipides ingérés. Par ailleurs, une étude comparant la cinétique de production de CM chez des femmes postménopausées à celle de femmes préménopausées de même âge, indice de masse corporelle et profil lipidique à jeun, révélait une surproduction de ces lipoprotéines postprandiales [227]. Cette étude soutient le rôle important des estrogènes sur la sécrétion de CM et une telle influence affecterait la capacité d'absorption intestinale de cholestérol. En accélérant l'entrée des lipides et du cholestérol par une surproduction de CM, la déficience en estrogènes accentue le flux de ces lipides vers le foie, un mécanisme favorisant la pathogenèse de la stéatose hépatique.

4.2 Les estrogènes et la clairance des lipoprotéines

Les estrogènes ont de multiples effets sur le profil lipidique qui préviennent le développement de l'athérosclérose [228]. Notamment, les estrogènes accélèrent la clairance des lipoprotéines postprandiales en induisant l'expression de l'apoE [229]. À

l'opposé, le retrait des estrogènes retarde la clairance des lipides postprandiaux [230-232]. Ce délai, étant contrecarré par la thérapie hormonale, indique que les estrogènes interviennent également sur cette voie métabolique [233]. Pareillement, une étude (non publiée) issue de notre laboratoire rapporte une répression génique du LDLr et du LRP1 par le retrait des estrogènes. La baisse de ces récepteurs sensibles à plusieurs lipoprotéines était accompagnée d'une hypercholestérolémie. Ces changements dans l'expression génique du LDLr par les estrogènes corroborent les résultats d'une étude dans laquelle une injection d'E2 chez le rat stimulait de huit fois l'expression génique et de dix fois l'expression protéique du LDLr hépatique [234]. Ensemble, ces données suggèrent qu'un déficit estrogénique entrave la clairance des lipoprotéines. Quoiqu'une défaillance dans la clairance des lipoprotéines n'explique pas l'accumulation de lipides hépatiques, ce mécanisme pourrait largement contribuer à l'hypercholestérolémie observée à partir de la ménopause.

4.3 Les estrogènes et la biosynthèse de cholestérol

Le retrait des estrogènes cause une hypercholestérolémie [235, 236] et une biosynthèse de cholestérol accrue en serait une cause potentielle. Chez la rate âgée, la baisse des niveaux d'estrogènes stimule l'activité de l'HMG-CoA r, sans toutefois affecter l'expression génique du SREBP-2 [237, 238]. En opposition à ces résultats, la perte des estrogènes par le retrait des ovaires affaiblit l'activité et l'expression de l'HMG-CoA r [213, 239]. La troisième étude reliée à cette thèse (Chapitre 4) confirme ces effets de l'Ovx sur l'HMG-CoA r et, en outre, rapporte une baisse de l'expression génique du SREBP-2, un régulateur de la biosynthèse du cholestérol. Paradoxalement, un modulateur sélectif aux récepteurs aux estrogènes (SERM), un autre modèle expérimental servant à étudier l'effet du retrait des estrogènes, n'affectait ni l'activité de l'HMG-CoA r ni l'expression du SREBP-2 [240]. Étant donnée la divergence des effets d'un déficit estrogénique sur la biosynthèse de cholestérol hépatique, il est difficile d'établir le rôle exact des estrogènes sur ce plan. Néanmoins, ces modèles comprennent chacun d'importants biais pouvant être à la source de ces différences (signalés au chapitre 5).

4.4 Les estrogènes et la production de VLDL

Il est de plus en plus évident que les estrogènes interviennent sur la voie d'assemblage et de sécrétion des VLDL. Lemieux et ses collègues ont observé que l'utilisation d'un SERM, un inhibiteur de la voie de signalisation des estrogènes, diminuait de 30 % l'expression génique de la MTP hépatique, un transporteur déterminant de l'assemblage du VLDL [240]. De manière similaire, le retrait des estrogènes par l'Ovx affaiblissait l'expression génique et protéique de la MTP hépatique [4, 241]. Au-delà de ces événements moléculaires dans la cellule hépatique, la perte des fonctions ovariennes chez la rate Ovx réduisait la production de VLDL *in vivo* [4]. Étant donné que cette dernière étude était la seule démontrant un affaiblissement de la production de VLDL en réponse au retrait des estrogènes, les travaux reliés à cette thèse avaient pour objectifs de confirmer ces données et d'ajouter des éléments nouveaux à ce secteur. À ce propos, l'étude présentée dans le quatrième chapitre rapporte que le retrait des estrogènes atténue substantiellement l'expression génique de molécules régulant diverses étapes de l'assemblage et de la sécrétion du VLDL, dont l'apoB, la MTP, la DGAT-2, l'ACAT-2, la Sar1a et le Cideb. La réduction importante de toutes ces enzymes en réponse à l'Ovx appuie notre hypothèse selon laquelle les hormones femelles stimulent la voie de production des VLDL. Allant dans le même sens que notre hypothèse, l'emploi de contraceptifs oraux à base d'éthinylestradiol (EE) et la thérapie de remplacement hormonale (E2) amplifient le taux de production de VLDL [242, 243]. Ensemble, ces données et celles issues d'études de notre laboratoire mettent en évidence qu'un déficit estrogénique puisse diminuer l'efficacité de la production de VLDL. L'hyposécrétion de lipoprotéines hépatiques occasionne une rétention de lipides dans le foie, ce qui concorde avec l'accumulation de lipides hépatiques chez les rates Ovx.

4.5 Le rôle des estrogènes sur la voie RCT

Métabolisme des HDL-C

Les estrogènes modulent le profil lipidique de la femme en affaiblissant les concentrations de LDL-C au profit des HDL-C, leur conférant ainsi une protection cardiovasculaire jusqu'à la ménopause [244]. Paradoxalement, chez la rate, le retrait des estrogènes par l'Ovx élève les concentrations d'HDL-C [9, 245, 246], les lipoprotéines

dites « cardioprotectrices » (pour une revue, voir référence [247]). Considérant que la ménopause chez la femme diminue les concentrations d'HDL-C d'environ 10 % [248], le retrait des ovaires chez l'animal pourrait altérer différemment le métabolisme lipoprotéique (expliqué au chapitre 5).

Efflux de cholestérol périphérique

L'effet antiathérogène des estrogènes réside également dans leur potentiel à promouvoir l'efflux de cholestérol périphérique. En effet, cette capacité a été démontrée par une expérience de culture de macrophages au cours de laquelle un traitement à l'E2 accentuait l'efflux de cholestérol [249], l'activité de la CeH et de la cholesteryl esterase [250] ainsi que l'expression de l'ABCA1 [251]. Bien que tous ces changements favorisent l'efflux de cholestérol périphérique, la présence d'estrogènes *in vivo* n'a pourtant aucun impact sur la capacité fonctionnelle de transfert de cholestérol des macrophages vers les HDL-C [252]. Selon de récentes données rapportées par Badeau et son équipe, le véritable potentiel antiathérogène des estrogènes serait induit par d'autres étapes de la voie RCT [249].

La captation des lipoprotéines au foie

L'un des puissants potentiels antiathérogènes des estrogènes est celui de stimuler la clairance des lipoprotéines circulantes par le foie. En plus d'induire le LDLr [234], ces hormones femelles abaissent la concentration de PCSK9 circulante, ce qui contribue à une plus grande activité de ce récepteur [253]. En plus de faciliter la captation des LDL-C par le foie, le LDLr a le potentiel d'internaliser les HDL-C contenant des estrogènes [254]. Ceci s'explique par le fait que la LCAT, une enzyme contribuant au remodelage et à la maturation des HDL-C, a aussi la capacité d'estérifier les estrogènes et de les incorporer aux HDL-C [255]. La présence d'estrogènes dans les HDL-C augmente jusqu'à dix fois leur capacité de liaison et d'internalisation par les cellules hépatiques [256]. Ceci pourrait expliquer en partie pourquoi les niveaux d'HDL-C sont plus élevés chez les animaux Ovx (Chapitre 4). Le catabolisme lipoprotéique étant une étape déterminante de la voie RCT, les estrogènes accélèrent donc l'élimination du cholestérol de l'organisme par le retour des LDL-C et des HDL-C au foie. Selon ces données, la

perte des fonctions ovariennes réduit le catabolisme des lipoprotéines par le foie, qui s'accumulent donc dans le compartiment plasmatique.

L'efflux de cholestérol biliaire

Une voie également influencée par la présence d'estrogènes est celle de la production biliaire. En stimulant la sécrétion totale de la bile, particulièrement la sécrétion canaliculaire de cholestérol, ces stéroïdes féminins contribuent d'autant plus à résorber le cholestérol de l'organisme. Cependant, les estrogènes exercent un contrôle biphasique de la sécrétion de cholestérol biliaire, selon lequel des niveaux physiologiques d'estrogènes favorisent l'excrétion, alors que des niveaux pharmacologiques (tel que retrouvés lors d'une grossesse) induisent une cholestase. En effet, des concentrations physiologiques de ces hormones femelles stimulent la sécrétion totale de la bile [257, 258] et l'efflux de cholestérol biliaire [259]. Ces effets permissifs peuvent s'expliquer par le fait que les estrogènes accélèrent la captation des lipoprotéines par les cellules hépatiques [254, 260]. Précisément, la captation des lipoprotéines par les hépatocytes stimule l'excrétion de cholestérol biliaire [80, 261]. En outre, lors d'une grossesse, les niveaux pharmacologiques d'estrogènes sursaturent la bile en cholestérol, ce qui peut provoquer une stase de la bile, une pathologie connue sous le nom de *cholestase gestationnelle*. L'administration d'*ethinyl estradiol* (EE) chez l'animal à dose équivalente aux concentrations d'estrogènes lors de la grossesse est devenue un modèle expérimental de la cholestase bien établi [262-264]. Le traitement à l'EE chez la souris perturbe l'écoulement de cholestérol biliaire de même que l'expression génique des ABCG5/G8 hépatiques, les facteurs déterminants de l'excrétion de cholestérol biliaire. Ces perturbations n'étant pas observées chez les animaux dépourvus de l'ER α suggèrent une interaction directe entre la voie de signalisation des estrogènes avec les transporteurs ABCG5/G8. Ces résultats ainsi que l'absence d'une cholestase chez les animaux invalidés du ER α mettent en évidence le rôle premier des hormones femelles sur les voies de sécrétion biliaire [265].

4.6 Les estrogènes et le métabolisme des acides biliaires au foie

Plusieurs arguments indiquent que le retrait des estrogènes diminue la synthèse d'AB. Par exemple, les animaux Ovx présentent des niveaux inférieurs d'activité et

d'expression génique et protéique de la CYP7A1, l'enzyme déterminante de la synthèse d'AB, que ceux des animaux du groupe contrôle [9, 266-268]. En outre, les rates Ovx présentent une réduction de l'expression génique de l'ordre de 50 % de la CYP8B1 et de 30 % la BSEP, catalysant la synthèse et l'excrétion des acides biliaires, respectivement. De plus, le retrait des estrogènes supprimait l'expression du facteur de transcription FXR. Ces effets concordent avec l'interaction directe entre le ER alpha et le FXR, observée lors d'une expérience par coimmunoprécipitation de ces deux récepteurs [269]. Paradoxalement, les changements associés au traitement à l'EE à dose pharmacologique sont similaires à ceux observés chez les animaux Ovx. Par exemple, la troisième étude de cette thèse (Chapitre 4) rapporte une réduction importante de la CYP8B1, de la BSEP et du FXR hépatiques, des changements similaires à ceux rapportés dans le modèle de la cholestase gestationnelle [270]. En réduisant la synthèse et l'excrétion de cholestérol et d'AB, l'absence ou l'exposition à de fortes concentrations d'estrogènes sont deux facteurs hépatotoxiques. Or, à niveaux physiologiques, les estrogènes *régulent* le métabolisme des AB et, à niveaux pharmacologiques, les estrogènes *dysrégulent* le métabolisme des AB en entraînant une obstruction des conduits biliaires. L'une des explications de la dysrégulation du métabolisme des AB par de fortes concentrations d'estrogènes est l'induction du SHP par le ER α [271]. Comme observé dans la cholestase induite par les estrogènes, le SHP inhibe l'expression du CYP7A1 [178], du CYP8B1 [181] et de la BSEP [272]. Il apparaît donc possible que l'interaction ER α -SHP soit à l'origine de la cholestase induite par les estrogènes. Puisqu'une diminution de ces gènes cibles est également observée par l'absence d'estrogènes, il existerait au moins un autre mécanisme reliant les estrogènes au métabolisme des AB.

4.7 Les estrogènes et le cycle entérohépatique des acides biliaires

Quoique le retrait des estrogènes semble diminuer la synthèse et l'efflux des AB du foie, il a été rapporté que les animaux Ovx surexpriment le gène et la protéine de l'IBABP et de l'ABST iléales [268, 273]. Ces surexpressions et le fait que les fèces de ces animaux Ovx soient appauvries en AB sont signe d'une réabsorption facilitée [268]. Puisque le circuit entérohépatique passe par la veine porte, les AB sont réacheminés vers le foie. La question qui demeure est : en réponse au retrait des estrogènes, le foie capte-t-

il davantage ces AB? Quelques indices permettent d'étayer l'hypothèse selon laquelle le retrait des estrogènes favoriserait la recapture des AB par le foie. Tout d'abord, des études *in vitro* ont révélé qu'un traitement à l'E2 sur des hépatocytes réduisait de 70 % le gène et de 33 % la protéine du NTCP, le transporteur déterminant de la captation des AB au foie [274]. De plus, le traitement à l'E2 réduisait de 60 % l'expression génétique et protéique de l'OATP, une deuxième protéine hépatique captant les AB [274]. Comme la présence d'estrogènes s'oppose à la recapture des AB, le retrait de ces hormones femelles pourrait, à l'inverse, accélérer ce processus. Si cette hypothèse était juste, le retrait des estrogènes accroîtrait le flux d'AB vers les hépatocytes. Combiné à une baisse des enzymes catalysant leur expulsion du foie, l'arrivage accéléré des AB dans les hépatocytes provoquerait leur accumulation. Parallèlement, la baisse des taux d'AB sériques chez les animaux Ovx [275] appuie la théorie selon laquelle l'absence d'estrogènes accélère la recapture des AB par les hépatocytes. Un flux accéléré d'AB expliquerait la répression du FXR hépatique chez les animaux Ovx du troisième projet (Chapitre 4) et donc la dysrégulation du métabolisme des AB. Certes, l'accélération du circuit entérohépatique des AB par le retrait des estrogènes est un mécanisme sous-jacent à la stéatose qui, toutefois, demeure à être élucidé. À cet égard, des travaux sont en cours dans notre laboratoire afin de valider cette hypothèse.

Tableau 1 : Résumé des effets des estrogènes ou du retrait des estrogènes sur les voies métaboliques et de transport du cholestérol et des acides biliaires

	Effets des estrogènes	Effets du retrait des estrogènes
Absorption du cholestérol	↑ NPC1L1 avec traitement E2 chez rates âgées [216]	↓ NPC1L1 chez rates âgées [216] ↑ production de CM chez femmes postménopausées [227]
Clairance des CM	↑ apoE avec E2 [229] ↑ LDLr avec E2 [234]	↓ LDLr et LRP1 chez rates Ovx (données de notre laboratoire non publiées)
Biosynthèse de cholestérol		↓ HMG CoA r chez rates Ovx (étude 3, chapitre 4) ↑ HMG CoA r chez rates âgées [237, 238] Pas d'effet avec SERM [240]
Production hépatique de VLDL	↑ taux de production de VLDL avec EE et E2 [242, 243]	↓ apoB, MTP, ACAT-2, DGAT-2, Cideb et Sar1a chez rates Ovx (étude 3, chapitre 4)
Métabolisme des HDL-C		↓ HDL-C chez femmes postménopausées [248] ↑ HDL-C chez rates Ovx (étude 3, chapitre 4)
Efflux de cholestérol périphérique	↑ Efflux de cholestérol des macrophages avec E2 [249] ↑ CeH, cholesteryl esterase [250] et ABCA1 macrophages avec E2 [251].	
Captation des lipoprotéines au foie	↑ PCSK9 circulante avec E2 [253] ↑ capacité de liaison de l'apoE avec cellules hépatiques avec E2 [256]	
Efflux de cholestérol biliaire	↑ sécrétion de cholestérol biliaire à niveau physiologique [259] ↓ ABCG5/G8 avec dose pharmacologique EE (modèle cholestase) [262-264]	
Métabolisme des acides biliaires au foie		↓ CYP7A1, CYP8B1, BSEP et FXR chez rates Ovx (étude 3, chapitre 4)
Cycle entérohépatique des acides biliaires	↓ NTCP et OATP [274]	↑ IBABP et ABST iléum chez rates Ovx [268, 273] ↓ excrétion fécale d'AB avec Ovx [268] ↓ AB plasmatiques [275]

Partie 4 : Les effets de l'exercice sur le transport à rebours du cholestérol

5.1 L'exercice et les lipides hépatiques

Actuellement, il n'existe aucune ligne directrice d'une pratique d'activité physique afin de prévenir et de gérer la stéatose hépatique chez l'humain. Cela s'explique par le manque de confirmations histologiques des niveaux de lipides hépatiques après les interventions par l'activité physique seule décrites dans la littérature. Néanmoins, certaines études chez l'humain ont démontré une plus grande efficacité clinique d'une approche thérapeutique par l'exercice seulement plutôt que par l'exercice combiné à une diète restrictive. Les approches diététiques proposées par les programmes de modification des habitudes alimentaires demandent beaucoup d'efforts, qui, fréquemment, mènent au désistement. À cet égard, notre laboratoire s'est intéressé à cette approche depuis plusieurs années en vue de promouvoir les bénéfices de l'activité physique sur la prévention ou la résorption de la stéatose hépatique. Des études animales indiquent qu'une pratique d'exercice quotidienne peut prévenir la stéatose hépatique induite par la diète riche en lipides [276]. Ces effets sont attribuables à une augmentation de l'oxydation des lipides en périphérie, ce qui diminuait le flux d'acides gras libres vers le foie. Lors de cette dernière étude citée, l'introduction de l'activité était concomitante à l'adoption du régime alimentaire riche en lipides. Pour vérifier le potentiel de résorption d'une stéatose établie, un programme d'exercice a été introduit au milieu d'une intervention de 16 semaines de diète riche en lipides. Étonnamment, les huit semaines d'activité physique avaient non seulement atténué la détérioration du profil lipidique, mais aussi largement diminué l'accumulation de lipides hépatiques. Ces résultats soutiennent l'efficacité d'un mode de vie actif pour traiter une stéatose hépatique déjà établie. En continuité avec les travaux précédents, cette section abordera des éléments nouveaux des potentiels de l'activité physique en lien avec la stéatose, soit les effets de l'exercice sur les voies métaboliques et de transport du cholestérol. Comme nous l'avons établi dans les sections précédentes de cette revue de littérature, il existe un lien étroit entre le métabolisme du cholestérol et les lipides hépatiques. En ce sens, cette partie de la

revue fera un survol des effets de l'exercice sur le profil lipidique et ensuite, recensera les effets connus de l'exercice sur le métabolisme du cholestérol.

5.2 L'exercice et le profil lipidique

L'exercice est reconnu comme un facteur préventif et thérapeutique des maladies cardiovasculaires, dont l'athérosclérose. En fait, la participation régulière à l'exercice physique réduit de 10 % à 20 % le risque de mortalité dans l'ensemble [277] et de 40 % le risque de mortalité par accident cardiovasculaire [278]. L'exercice améliore le profil lipidique en déclenchant une triade d'événements antiathérogènes, soit une élévation des concentrations d'HDL-C, une baisse des LDL-C et une réduction de la triglycéridémie [279, 280]. La variable du profil lipidique influencée par l'exercice la mieux documentée est la hausse des concentrations de HDL-C. Selon les données d'une méta-analyse publiée en 2007 [281], l'augmentation des HDL-C serait plutôt modeste (2,53 mg/dL [0,065 mmol/L]) mais significative ($P < 0.001$). Il est à noter qu'il existe une importante relation dose-réponse entre le volume d'activité physique et l'élévation des HDL-C. La dose minimale d'exercice ayant un impact sur les HDL-C s'élève à environ 900 kcal ou 120 minutes d'activité physique par semaine [281]. De plus, selon Couillard et son équipe [282], cet effet de l'exercice est encore plus profitable aux sujets dyslipidémiques. De la sorte, la pratique d'activité physique serait plus bénéfique chez les personnes plus à risque de développer des maladies cardiovasculaires, telles que les femmes postménopausées. Mais encore, le métabolisme du cholestérol comprend une série de réactions dynamiques qui doivent être examinées séparément, puis dans leur ensemble. Cette revue de littérature présentera donc un portrait détaillé des effets connus de l'exercice sur chacune des voies métaboliques et de transport du cholestérol depuis l'absorption intestinale du cholestérol jusqu'à son excrétion fécale. Ces voies sont d'ailleurs intégrées à la fin de cette section dans le tableau 2.

5.2.1 L'exercice et l'absorption intestinale de cholestérol

L'un des mécanismes potentiels de l'effet hypocholestérolémiant de l'exercice est une diminution de l'absorption intestinale de cholestérol. Dans une étude de Meissner et de ses collaborateurs, l'exposition à un programme d'entraînement volontaire chez la

souris abaissait les concentrations plasmatiques de biomarqueurs de l'absorption de cholestérol [283]. En outre, le NPC1L1, le transporteur apical déterminant de l'entrée de cholestérol dans l'entérocyte, était moins exprimé chez les souris entraînées relativement aux souris inactives. Même s'il apparaît cohérent qu'une diminution de l'absorption intestinale de cholestérol soit favorable à la santé, cela serait plutôt délétère chez l'humain. En fait, une détérioration du métabolisme du cholestérol est définie par une absorption réduite et une biosynthèse augmentée [284, 285]. Par conséquent, un faible rapport entre l'absorption et la biosynthèse de cholestérol est signe d'une détérioration du métabolisme du cholestérol. Afin de discriminer la provenance du cholestérol, de petites quantités de *stérols non-cholestérol* peuvent servir de biomarqueurs de l'absorption et de la biosynthèse. Par exemple, le *lathostérol*, un précurseur de la biosynthèse du cholestérol, est indicatif du cholestérol de provenance endogène, alors que le *sitostérol* et le *campestérol* sont des stérols alimentaires servant de biomarqueurs pour le cholestérol exogène. Le ratio campestérol : lathostérol est couramment utilisé pour déterminer le rapport entre l'absorption et la biosynthèse de cholestérol chez l'humain [286]. Contrairement à la conclusion de l'étude de Meissner [283] dans laquelle la pratique d'activité physique était associée à la réduction de l'absorption de cholestérol, Wilund et ses collègues rapportent que l'exercice régulier chez l'humain stimule l'absorption intestinale de cholestérol [287]. En effet, la pratique régulière d'activité physique chez l'humain élevait les niveaux de sitostérol et de campestérol ainsi que le ratio campestérol : lathostérol, ce qui suggère que l'exercice accroît l'absorption intestinale de cholestérol [287]. En raison des divergences entre les données compilées sur des humains et celles sur des animaux, ces effets de l'exercice sur l'absorption intestinale de cholestérol ne peuvent être interprétés de la même façon. Même si les expériences sur les sujets humains font état d'une amélioration de l'homéostasie du cholestérol, une augmentation de l'absorption de cholestérol est pourtant contradictoire à l'effet hypocholestérolémiant de l'activité physique. Il va de soi que, chez l'humain, l'exercice module le profil lipidique par d'autres mécanismes que celui de l'absorption du cholestérol.

5.2.2 L'exercice et le métabolisme des CM

Une diminution de la lipémie postprandiale, indicative de la production de CM, s'avère un mécanisme potentiel de l'exercice pouvant améliorer le profil lipidique à long terme. Pour vérifier cette potentialité, quelques chercheurs ont examiné les effets de l'activité physique sur la production de lipoprotéines postprandiales. Les résultats sont concluants : une séance d'exercice seule amenuise l'hyperlipémie postprandiale, et ce, qu'elle ait été exécutée avant [288-292] ou après [290, 293] l'ingestion d'un repas. Toutefois, l'état postprandial, étant dynamique et complexe, implique aussi bien la synthèse des CM que leur catabolisme par le foie. Pour distinguer l'effet d'un programme d'entraînement régulier sur cette dernière voie, Ferreira et ses collaborateurs ont mené une étude chez des sujets présentant ou non des mutations génétiques de l'apoE, l'apolipoprotéine essentielle à la captation des résidus de CM au foie [294]. De manière intéressante, les génotypes normaux entraînés présentaient une atténuation de la lipémie postprandiale, alors que les sujets invalidés de la fonction de l'apoE étaient insensibles à ce changement. Cette dernière étude citée indique que la réduction de la lipémie postprandiale par l'exercice est attribuable à une accélération de la recapture des résidus de CM au foie. En effet, la pratique d'exercice abrège la durée de demi-vie de l'apoB-48, apolipoprotéine unique à l'intestin [295]. L'exercice accélère aussi le catabolisme des CM par l'activité de la LPL musculaire [296]. L'activation du catabolisme des lipoprotéines postprandiales est à la fois antiathérogène et antistéatotique puisqu'elle ralentit le flux de lipides vers le foie. Ce mécanisme pourrait également, indirectement, diminuer la cholestérolémie par le remodelage d'autres lipoprotéines, particulièrement les HDL-C (élaboré dans la section 5.3.1). L'exercice en période postprandiale serait donc un moyen efficace pour contrecarrer la surproduction de CM chez les sujets insulino-résistants.

5.2.3 L'exercice et la biosynthèse de cholestérol

Comme mentionné précédemment, les maladies cardiométaboliques, dont le diabète de type II, sont associées à une faible absorption intestinale de cholestérol et à une biosynthèse accrue. De la sorte, une réduction de la biosynthèse de cholestérol s'avère un mécanisme antiathérogène qui cadrerait avec l'effet hypocholestérolémiant de

l'activité physique. Non seulement ce sujet est peu documenté, mais les études publiées ne sont pas unanimes. Tout d'abord, Wilund et son équipe rapportent que la pratique régulière d'exercice chez des personnes âgées avec au moins un facteur de risque du syndrome métabolique n'influençait pas les niveaux plasmatiques de lathostérol, le biomarqueur de la biosynthèse de cholestérol [287]. Une autre étude menée par Varady et ses collaborateurs indiquait qu'un programme d'entraînement de huit semaines chez des sujets sédentaires hypercholestérolémiques âgés de 40 à 80 ans tendait à hausser la concentration de lathostérol, un élément qui, toutefois, n'était pas significatif [297]. Finalement, la souris exposée à l'exercice volontaire avait des niveaux de lathostérol près de deux fois supérieur aux niveaux mesurés chez les animaux sédentaires, ce qui indique que l'exercice stimulerait la biosynthèse de cholestérol [283]. Au-delà des divergences, les données de la littérature suggèrent, par l'absence d'effet ou l'augmentation des niveaux de lathostérol, que la voie de biosynthèse du cholestérol ne peut être à l'origine de l'amélioration du profil lipidique par l'exercice.

5.2.4 L'exercice et la production de VLDL

Des études menées préalablement par notre laboratoire indiquent que l'entraînement régulier en endurance diminue la sécrétion de VLDL-TAG *in vivo* chez le rat nourri d'une diète riche en lipides aussi bien que chez la rate Ovx [4, 298]. Puisque ces lipoprotéines sont composées de TAG et de cholestérol, l'affaiblissement de la sécrétion de VLDL-TAG est un mécanisme hypocholestérolémiant. Tel que nous l'avons préalablement démontré, une baisse de la sécrétion de VLDL peut aussi induire une stéatose. Il est donc important de mentionner que, en dépit d'une diminution de la production de ces lipoprotéines hépatiques, l'exercice régulier était même parvenu à résorber les TAG du foie. Les mécanismes sous-jacents à cette résorption qui ont été proposés sont une stimulation de la β -oxydation des acides gras et une diminution de la lipogenèse *de novo* [299, 300]. Le fait que l'exercice puisse efficacement résorber les lipides hépatiques suggère que son effet sur l'oxydation des lipides et la lipogenèse surpasse largement l'affaiblissement de la production de VLDL. Bien que cette baisse de production de VLDL soit hypocholestérolémiante, cet effet de l'exercice, lui-même, ne peut toutefois être catégorisé antistéatotique.

5.3 L'exercice et la voie RCT

L'un des effets les mieux caractérisés des bénéfices de l'exercice est l'élévation des niveaux d'HDL-C qui pourrait être accompagnée d'une stimulation globale de la voie RCT. Les prochaines sections de la revue de littérature résumeront les effets de l'exercice sur chacune des étapes de la voie RCT.

5.3.1 L'exercice et le métabolisme des HDL-C

Il a été observé qu'une simple session d'exercice augmentait le taux de pré-HDL-C, et ce, sans augmenter les niveaux d'HDL-C totaux ni l'apoA-I [301]. Cela s'explique par le fait que l'un des effets aigus de l'exercice est d'augmenter l'efflux de cholestérol périphérique vers les molécules d'apoA-I (détaillé dans la section suivante). De manière intéressante, la pratique régulière d'activité physique amoindrit la concentration plasmatique et l'activité de la CETP [302]. En affaiblissant l'activité de la CETP, une enzyme athérogène qui favorise le transfert de cholestérol contenu dans les HDL-C vers les lipoprotéines, l'exercice pourrait, au même titre que des agents pharmacologiques, s'avérer une thérapie efficace pour la dyslipidémie (Figure 25). L'inhibition de la CETP par l'activité physique aide à la rétention du cholestérol à l'intérieur des HDL-C en empêchant son transfert vers les autres lipoprotéines contenant l'apoB. De la sorte, une réduction de l'activité de la CETP augmente les niveaux totaux d'HDL-C au détriment des lipoprotéines contenant l'apoB, notamment les LDL-C (Figure 26).

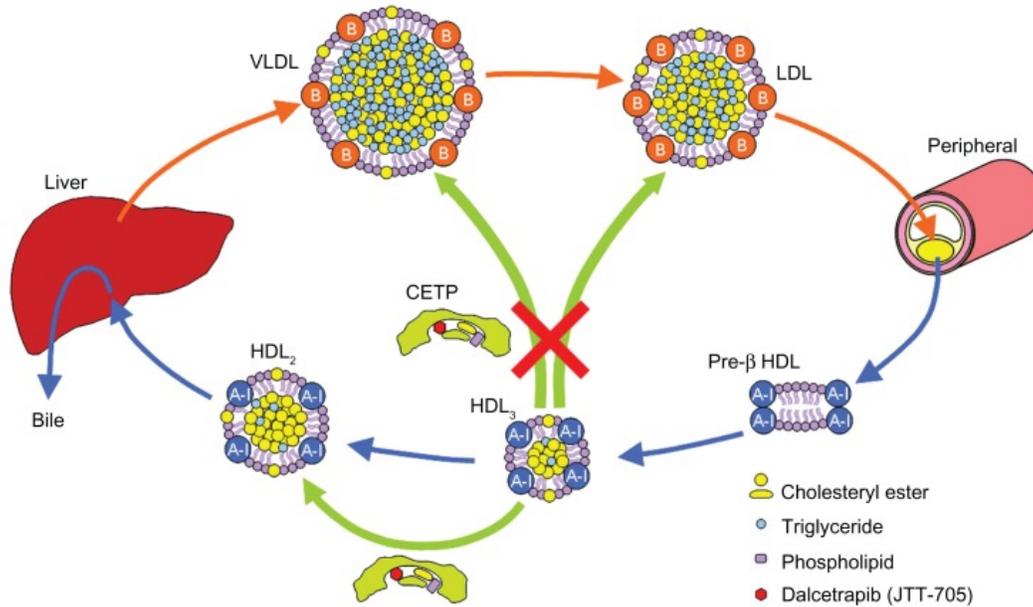


Figure 26 : Effets d'une inhibition de l'activité de la CETP sur le profil lipidique

L'inhibition de la CETP empêche le transfert du cholestérol ester des particules de HDL-C vers les VLDL et les LDL-C. La rétention de cholestérol à l'intérieur des particules de HDL-C facilite le mode de transport à rebours du cholestérol vers le foie, le cholestérol étant ensuite acheminé dans la bile. L'un des effets de l'exercice s'apparente au Dalcatrapid (JTT-705) illustré par le X rouge. Image tirée de Shinka et collab. [303].

En outre, la pratique d'activité physique stimule l'activité de la LCAT, une enzyme remodelant les pré-HDL-C en HDL₃ et les HDL₃ en HDL₂ [304]. Un autre contributeur à l'élévation des HDL-C par l'activité physique est le muscle squelettique. Au cours de l'exercice, on rapporte une stimulation importante de l'activité de la LPL musculaire. Particulièrement lorsque les muscles contiennent une grande proportion de *fibres de type I*, aussi nommées *fibres oxydatives*, les contractions musculaires répétées joueraient un rôle de premier plan sur l'amélioration du profil lipidique par l'exercice [305]. En fait, la contraction musculaire des fibres oxydatives active la LPL, l'étape initiale de la clairance des CM et des VLDL. Les pré-HDL-C et les HDL₃ servent alors de « réceptacles » des composants de surface excédentaires des CM et des VLDL (Figure 27). Précisément, l'activation de la lipolyse par le muscle rétrécit la taille des CM et des VLDL, ce qui génère un surplus de phospholipides et de cholestérol libre. Ces deux composants se délogent de la surface des particules des CM et des VLDL et sont saisis

par l'apoA-I des pré-HDL-C et des HDL₃ qui, à l'aide de la LCAT, sont remodelés en HDL₃ et HDL₂, respectivement (Figure 27). En ce sens, l'activation de la LPL par le muscle squelettique joue un rôle majeur sur trois plans, soit : 1) la hausse des concentrations de HDL₂-C et de HDL₃-C, 2) la déplétion de cholestérol dans les particules contenant l'apoB et 3) la diminution des TAG plasmatiques. Selon les évidences issues des travaux de Patsch et de son équipe [306], la hausse des HDL-C par l'activité physique serait une conséquence de la lipolyse des CM et des VLDL plutôt que de la biogenèse des pré-HDL-C.

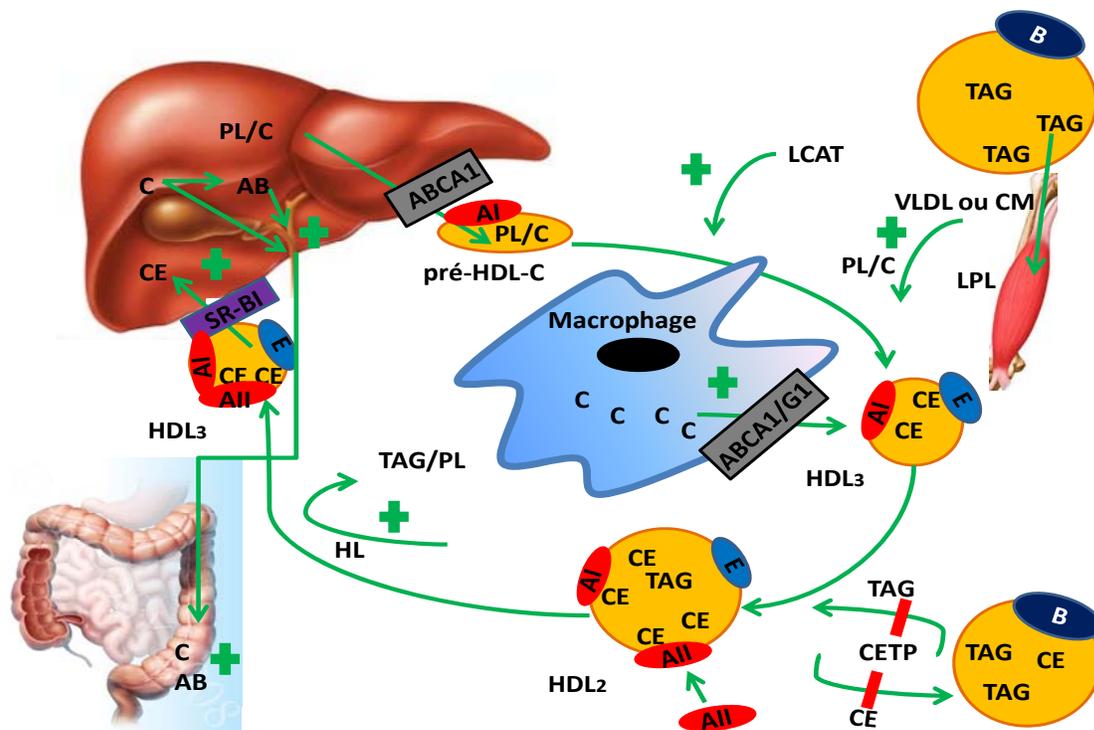


Figure 27 : Mécanismes d'action de l'exercice sur le métabolisme des HDL-C

L'exercice stimule le remodelage des pré-HDL-C et la maturation des HDL₃ par trois mécanismes : 1) l'activation de la LCAT, 2) l'efflux de cholestérol des macrophages et 3) la LPL musculaire. L'hydrolyse des TAG des VLDL ou les CM par la LPL musculaire fait rétrécir le centre lipidique de ces particules générant alors un surplus des composants de surface, soit le cholestérol libre (C) et les phospholipides (PL), saisis par les pré-HDL-C et les HDL₃. L'exercice inhibe la sécrétion et l'activité de la CETP, une enzyme athérogène. Enfin, l'activité physique accélère le catabolisme des HDL-C en stimulant l'activité de HL et l'expression du SR-BI hépatique.

5.4 L'augmentation de l'efflux de cholestérol périphérique par l'exercice

Étant l'une des étapes déterminantes du transport à rebours du cholestérol, l'efflux périphérique de cholestérol pourrait être accentué par l'exercice. En effet, selon les observations de Gupta et de ses collaborateurs, l'activité physique stimulerait la capacité d'efflux de cholestérol périphérique [307]. La culture de fibroblastes a démontré une capacité d'efflux de cholestérol environ quatre fois supérieur chez les athlètes par rapport aux sédentaires [307]. D'un autre côté, l'activité physique volontaire chez la souris élevait la capacité d'efflux de cholestérol des macrophages vers le plasma [308]. Comme les macrophages sont hautement athérogènes, l'efflux de cholestérol de ces cellules par l'exercice contribue à la protection cardiovasculaire.

5.5 L'amélioration de la capacité de clairance du cholestérol plasmatique par le foie par l'exercice

La clairance des lipoprotéines dans le processus de transport à rebours du cholestérol permet d'acheminer le cholestérol circulant vers la voie biliaire et l'exercice semble avoir également plusieurs effets bénéfiques sur cette voie. Un exemple est que la pratique d'activité physique stimule l'activité de la HL, l'enzyme initiant le catabolisme des HDL-C en circulation pour faciliter leur captation par le foie [309]. En outre, 30 minutes d'activité physique quotidienne chez la souris durant aussi peu que deux semaines stimulent de 14 fois l'expression du gène du LDLr et de trois fois celui du SR-BI dans les cellules hépatiques [310]. Ces changements profonds et rapides indiquent que le foie s'adapte aisément à l'exercice en facilitant le mode de transport à rebours du cholestérol. La surexpression du LDLr et du SR-BI chez les souris ayant été soumises à un programme d'exercice durant 12 semaines indique que le foie peut maintenir l'amélioration du transport à rebours dans le temps [311]. Un élément encore plus important est l'accélération de la clairance des LDL-C. À l'aide de marqueurs radioactifs, une équipe de chercheurs a montré que l'entraînement régulier renforce la capacité de clairance des LDL-C chez les sujets sains ainsi que chez les sujets hypercholestérolémiques [312, 313]. Ces données établissent un mécanisme fort important de l'amélioration du profil lipidique et de la diminution du risque cardiovasculaire par l'exercice.

5.6 Les effets de l'exercice sur la sécrétion de cholestérol par voie hépatobiliaire

L'une des voies contribuant largement à l'élimination de cholestérol de l'organisme et qui est sensible à l'exercice est la sécrétion canaliculaire de cholestérol. La production de bile, qui contient à la fois du cholestérol et des AB synthétisés à partir du cholestérol, constitue la voie d'élimination la plus importante de l'organisme. D'intéressantes études issues du laboratoire de Meissner ont démontré une stimulation de l'excrétion de cholestérol et d'AB dans la bile de souris entraînées [283, 314]. De manière plus prononcée chez les sujets hyperlipidémiques, l'exercice volontaire élevait jusqu'à 70 % l'excrétion d'AB dans la bile. Allant dans le même sens que ces résultats, la deuxième étude de cette thèse rapporte une augmentation importante de l'expression des ABCG5/G8 hépatiques chez les rats entraînés durant six semaines. Puisque les ABCG5/G8 sont les protéines déterminantes de l'efflux canaliculaire de cholestérol, une surexpression de ces transporteurs pourrait faciliter l'expulsion du cholestérol vers la lumière intestinale, c'est-à-dire à l'extérieur de l'organisme.

5.7 L'excrétion fécale de cholestérol après la pratique d'activité physique

Régulant à la fois les entrées et les sorties de cholestérol de l'organisme, l'intestin est le véritable chef déterminant le sort du cholestérol. Malgré les multiples bénéfices de l'activité physique qui ont été établis sur différentes étapes du transport à rebours du cholestérol, l'étape ultime de l'élimination du cholestérol de l'organisme est son excrétion fécale. Sur ce plan, Meissner et ses collègues ont clairement démontré une influence de l'exercice sur la capacité d'élimination fécale de cholestérol. De manière intéressante, l'entraînement volontaire avait augmenté de 35 % le cholestérol et de 90 % les acides biliaires retrouvés dans les fèces [283, 314] (Figure 27). Les expériences issues du deuxième projet rapportent une surexpression importante des ABCG5/G8 dans les cellules jéjunales de rats ayant été soumis à un programme d'activité physique durant six semaines (Chapitre 3). Cette surexpression a pour effet d'accentuer le reflux de cholestérol des entérocytes vers la lumière intestinale de même que l'excrétion du cholestérol plasmatique par voie transintestinale.

Collectivement, ces effets de l'exercice sur le profil lipidique et les voies de transport à rebours du cholestérol appuient le recours à un mode de vie actif pour prévenir ou traiter l'hypercholestérolémie. Comme les facteurs régulant la cholestérolémie affectent les niveaux de lipides hépatiques, ces bénéfices sont d'autant plus prometteurs dans le traitement de la stéatose.

Tableau 2 : Résumé des effets de l'exercice sur les voies métaboliques et de transport du cholestérol et des acides biliaires

	Études chez l'humain	Études chez l'animal
Absorption du cholestérol	<p>↑ sitostérol et campestérol</p> <p>↑ ratio campestérol : lathostérol [283]</p>	<p>↓ sitostérol et campestérol</p> <p>↓ expression génique du NPC1L1 [287]</p>
Clairance des CM	<p>↓ durée de demi-vie des CM [298]</p>	
Biosynthèse de cholestérol	<p>Pas d'effet [287]</p>	<p>↑ lathostérol [283]</p>
Production hépatique de VLDL		<p>↓ production de VLDL [4, 298]</p>
Métabolisme des HDL-C	<p>↑ HDL₂</p> <p>↓ activité de la CETP [315, 316]</p>	
Efflux de cholestérol périphérique	<p>↑ capacité d'efflux de cholestérol chez athlètes par rapport aux sédentaires [307]</p>	<p>↑ capacité d'efflux de cholestérol des macrophages vers le plasma [308]</p>
Captation des lipoprotéines au foie	<p>Accélération de la clairance des LDL-C chez les sujets sains ainsi que chez les sujets hypercholestérolémiques [312, 313]</p>	<p>↑ expression génique du LDLr et SR-BI hépatiques avec deux semaines d'entraînement volontaire [310]</p> <p>↑ LDLr et du SR-BI au foie chez les souris entraînées 12 semaines [311]</p>
Efflux de cholestérol biliaire		<p>↑ excrétion de cholestérol biliaire chez souris entraînées avec ↑ ABCG5/G8 [283, 314]</p>
Métabolisme des acides biliaires au foie		<p>↑ excrétion d'AB dans la bile de souris entraînées [283, 314]</p>
Excrétion fécale de cholestérol		<p>↑ 35 % cholestérol fécal et ↑ 90 % les AB retrouvés dans les fèces à la suite d'un entraînement volontaire [283, 314]</p>

Chapitre 2 : Article original 1

Titre:

Liver fat accumulation may be dissociated from adiposity gain in ovariectomized rats.

Auteurs:

Isabelle Côté, Siham Yasari, Abdolnaser Pighon, Razieh Barsalani, Rémi Rabasa-Lhoret,

Denis Prud'homme et Jean-Marc Lavoie

Numéro de référence du journal:

Climacteric. 2012 Dec;15(6):594-601.

Reproduit avec la permission de Climacteric, le journal de la Société internationale de la ménopause (IMS).

**LIVER FAT ACCUMULATION MAY BE DISSOCIATED FROM ADIPOSITY
GAIN IN OVARIECTOMIZED RATS**

Isabelle Côté¹, Siham Yasari², Abdolnaser Pighon¹, Razieh Barsalani¹, Rémi Rabasa-Lhoret³, Denis Prud'homme², and Jean-Marc Lavoie¹

¹Department of Kinesiology Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

²Faculty of Health Sciences, School of Human Kinetics, University of Ottawa, Ottawa, Canada.

³Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM) & Department of Nutrition, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Short title: Adipocyte and liver fat accumulation in ovariectomized rat

Key words: hepatic steatosis, adipose tissue, microsomal transfer protein, Ob receptors, DGAT.

Abstract

Objective. The purpose of the present study was to establish a model of rats prone and resistant to intra-abdominal fat accumulation in response to ovariectomy (Ovx-P and Ovx-R) and to determine its relationship with molecular bio-markers.

Materials/Methods. Two experiments were conducted in which female rats were either sham-operated (Sham) or ovariectomized (Ovx). Ovx rats exhibited a large variation in abdominal fat accumulation. Rats in the lower tertile labelled as Ovx-R displayed similar abdominal fat gain than Sham rats whereas those in the upper tertile labelled as Ovx-P depicted abdominal fat mass twice as high as Sham and Ovx-R rats. **Results.** Despite the difference in abdominal adiposity, liver fat content was ~ 50% higher ($P < 0.01$) in both Ovx-R and Ovx-P compared to Sham rats. In addition, Both Ovx-R and Ovx-P rats depicted higher HOMA-IR scores ($P < 0.05$) and lower ($P < 0.01$) hepatic gene expression of leptin receptors-b and -e (ObR-b and -e), microsomal transfer protein (MTP), and diacylglycerol acyltransferase-2 (DGAT-2) compared to Sham rats.

Conclusions. The present findings indicate that estrogens withdrawal-induced hepatic steatosis may be dissociated from abdominal fat accumulation and suggest that a decrease in leptin action through a down regulation of leptin receptors and a decrease in VLDL production through a down regulation of MTP and DGAT-2 may be factors responsible for this observation in absence of peripheral fat gain.

ABBREVIATIONS:

ANOVA : analysis of variance

DGAT-2 : diacylglycerol acyl transferase 2

DIO : diet-induced obesity

HOMA-IR : homeostasis model assessment of insulin resistance

ObR : receptor of leptin

Ovx : ovariectomized

MTP : microsomal transfert protein

SCD-1 : stearoyl-CoA desaturase 1

SEM : standard error of the mean

TAG/TG : triacylglycerol

VLDL : very low density lipoprotein

Introduction

It is becoming increasingly clear that estrogens withdrawal in rats through ovariectomy (Ovx) as well as in others animal models of menopause is associated with an important gain in fat mass^{1,2}. The tendency for weight and, more specifically, fat gain in post-menopausal women is also frequently observed (for a review see³). Nevertheless, not all women gain weight after menopause suggesting metabolic variations related to this critical hormonal change^{4,5}. In animal models of diet-induced obesity (DIO), there are large differences in fat mass gain, so that animals may be easily classified as obesity-prone and obesity-resistant^{6,7}. We used the same approach to investigate fat mass gain in ovariectomized (Ovx) animals classified as Ovx-prone (Ovx-P) and Ovx-resistant (Ovx-R) in terms of fat accretion. The first aim of the present study was to establish the extent to which fat mass in a group of Ovx rats differs between the upper and the lower tertiles. Besides fat mass gain, estrogen withdrawal in animals as well as in menopausal women is also associated with an important gain in liver triacylglycerol (TAG) accumulation^{1,2}. Although increase in liver fat is often associated with obesity¹⁻³, there are some studies in humans and animals suggesting that liver fat accumulation in the absence of estrogens may be dissociated from body fat mass^{8,9}. For instance we reported that liver of Ovx rats are resistant to lipid resorption when switching from a high-fat to a normal-fat diet that resulted in a decrease in weight of abdominal fat depots⁹. It is thus possible that, despite large difference in overall body fat accumulation in Ovx rat, similar liver fat accumulation occurs. A second aim of the present investigation was, therefore, to determine the extent to which livers of Ovx-P and Ovx-R rats accumulate fat.

There are several intrahepatic pathways responsible for liver fat accumulation in Ovx rats¹⁰. The anti-steatotic action of leptin through its leptin receptors (ObRs) has

recently retained our interest ¹¹. Leptin is known for its anti-steatotic action in liver by enhancing fat oxidation ¹². The expression of ObRs in liver therefore constitutes an interesting variable that links peripheral adiposity and liver fat accumulation. Gene expression of key molecules involved in lipogenesis (SCD-1) and very low density lipoprotein (VLDL) production (MTP and DGAT-2) have also been reported to be largely modified in Ovx rats ^{13,14}. We, therefore, targeted these key molecules and determine whether their gene expressions are similar in Ovx-P and Ovx-R rats.

Materials and methods

The present study consisted of two experiments conducted separately at different times

Experiment 1

Female Sprague-Dawley rats (n=30) weighing 230-250 g (10-week-old) were obtained from Charles River (St-Constant, PQ, Canada) and were housed individually. The 12: 12-h light-dark cycle started at 06:00 and the room temperature was maintained at 20-23°C. All animals had free access to a standard diet and tap water. The diet, now referred to as the standard diet (SD; 12.5% lipid, 63.2% carbohydrate, and 24.3% protein; kcal) consisted of usual pellet rat chow (Agribrands Canada, Woodstock, ON). The experiments described in this report were conducted according to the directives of the Canadian Council on Animal Care after institutional approval.

Groups and surgery

Two days after their arrival in the laboratory, rats were randomly assigned to sham-operated (Sham, n = 5) and ovariectomized (Ovx, n = 25) groups. Body weight and food intake in g were monitored every other day. Ovx was conducted according to the

technique described by Robertson et al ¹⁵. Animals were injected with antibiotics (Tribrissen 24%; 0.125 cc/kg, subcutaneously) for 3 days, starting the day prior to surgery. For surgery, rats were anaesthetized with a mixture of ketamine-xylazine (61.5-7.6 mg/kg, ip). Animals were killed 8 wk after the surgery and Ovx rats were then assigned to different groups according to their adiposity levels. Rats showing the highest fat mass were classified as Ovx-prone (Ovx-P; n = 9) and those showing the lowest fat mass were referred to as Ovx-resistant (Ovx-R; n = 8). Rats with the fat mass in the middle tertile were discarded.

Experiment 2

The experimental design of experiment 2 was the same as the one used in experiment 1 with the exception of the time duration between the Ovx surgery and the sacrifice. This second experiment was conducted to strengthen findings of the first experiment by increasing the number of rats in each group, to determine if reducing the duration of the Ovx (6 instead of 8 wk) would lead to the same observations, and by measuring new molecular markers. In the second experiment, female Sprague-Dawley rats (n = 43) weighing ~ 230 g (6-8 wk old rats) were again sham-operated (n =12) or ovariectomized (n = 31 with n = 12 in Ovx-P and Ovx-R).

Blood and tissue sampling

All of the following methodological details were the same for experiment 1 and 2. Rats were sacrificed between 09:00 and 12:00. Any remaining food was removed from the animal's cage at least 3 h before sacrifice. Immediately after complete anesthesia (pentobarbital sodium; 50 mg/kg, ip), the abdominal cavity was opened following the median line of the abdomen and approximately 4 ml of blood was collected from the

abdominal vena cava (<45 s) into syringes pre-treated with ethylenediaminetetraacetic acid (15%; EDTA). Blood was centrifuged (3000 rpm; 4°C; 12 min; Beckman GPR Centrifuge) and the plasma was kept for further analysis. Several organs and tissues were removed and weighed (Mettler AE 100) in the following order: liver, uterus, mesenteric, urogenital, and retroperitoneal fat deposits along with four skeletal muscles of the right hind limb (soleus, plantaris, medial gastrocnemius and lateral gastrocnemius). All tissue samples were frozen in liquid nitrogen immediately after they were weighed. The liver median lobe was freeze-clamped and used for triacylglycerol (TAG) and mRNA determinations. It is important to recall that direct sampling of liver tissue is considered the reference standard for quantifying liver fat¹⁶. Variability between lobes for steatosis has also been reported to be minimal¹⁷. The dissection technique used by our group to sample the mesenteric, urogenital, and retroperitoneal fat deposits in rat has been previously described¹⁸. It must be pointed out that dissection is used as the criterion method to validate more sophisticated but indirect *in-vivo* techniques of adiposity measurements. High correlation levels (0.94-0.99) between dissection and DEXA or CT scan have been reported for fat mass determination in animals^{19,20}. Approximately 25 mg of the mesenteric fat depot was used for mRNA analysis. All tissue and plasma samples were stored at -80°C until analyses were performed.

Molecular analyses

Quantitative real-time PCR

RNA extraction:

Total RNA was extracted from frozen liver and the mesenteric fat depot with the use of RNeasy Lipid tissue Mini kit (Qiagen Sciences, Maryland USA) according to the

manufacturer's protocol. RNA was thereafter treated with DNase (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) in order to avoid genomic contamination.

Reverse transcription (RT):

Treated RNA was reverse transcribed into cDNA using high capacity cDNA reverse transcription kits (Applied Biosystems). RT samples were stored at -20°C.

q-PCR reaction:

Gene expression for GAPDH was determined using a pre-validated Taqman Gene Expression Assay (Applied Biosystems, Hs00266705) Gene expression level for target genes was determined using assays designed with the Universal Probe Library from Roche (www.universalprobelibrary.com) except for leptin soluble receptor (-e) gene since no probe was available at the time of this experiment. The primer sets served to generate amplicons are presented in Table 1. For leptin soluble receptor (-e) gene expression, a SYBR green assay was designed. To validate the qPCR assays, we used a mix of the samples tested in the study. For the SYBR Green assay, a melt curve was performed to ensure that only a single product was amplified.

Table 1. Real time PCR primer sequences

<i>Gene</i>	<i>Ref Seq NCBI</i>	<i>Oligo Fwd</i>	<i>Oligo Rev</i>
DGAT-2	NM_001012345	aggatctgccctgtcacg	gtcttgaggggccgagag
MTP	NM_001107727	gcgagtctaaaacccgagtg	cactgtgatgtcgtggttatt
ObR-b	AF287268	ctttagttttccccaactagg	Tccatatgacagatgaataatgg
ObR-e	AF007819	atgtcaccttgcttggagccac	atgtcccattgtgggcagtacgat
SCD-1	NM_139192	gaagctggtgatgtccagag	gaagctggtgatgtccagag

Detection and analysis

The ABI PRISM[®] 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) was used to detect the amplification level and was programmed with an initial step of 3 minutes at 95°C, followed by 45 cycles of: 5 seconds at 95°C and 30 seconds at 60°C. All reactions were run in triplicate and the average values of Cts were used for quantification. GAPDH was used as endogenous control.

The relative quantification of target genes was determined using the $\Delta\Delta CT$ method. Briefly, the Ct (threshold cycle) values of target genes were normalized to an endogenous control gene (GAPDH) ($\Delta CT = Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{GAPDH}}$) and compared with a calibrator: $\Delta\Delta CT = \Delta Ct_{\text{Sample}} - \Delta Ct_{\text{Calibrator}}$. Relative expression (RQ) was calculated using the Sequence Detection System (SDS) 2.2.2 software (Applied Biosystems) and the formula is $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$.

Biochemical analyses

Plasma insulin and leptin concentrations were measured with commercially available radioimmunoassay kits (Linco Research, St-Charles, Missouri, USA). Plasma glucose concentrations were determined with the use of a glucose analyzer (Yellow Springs Instruments 2300, Yellow Springs, OH). Plasma glucose and insulin values were used to calculate a homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) as followed ²¹: $\text{glucose (mmol/l)} \times \text{insulin (mIU/ml)} / 22.5$. Liver TAG concentration was estimated from glycerol released after ethanolic KOH hydrolysis by a colorimetric method using commercial kits from Sigma (St-Louis, Missouri, USA).

Statistical analysis

Values are expressed as mean \pm standard error. Statistical analyses were performed by one-way ANOVA for non-repeated measures. Fisher's post hoc test was used in the event of a significant ($p < 0.05$) *F* ratio.

Results

Experiment 1

Body weight gain and caloric intake were significantly ($P < 0.05$) higher in both Ovx groups compared to Sham rats and higher ($P < 0.01$) in Ovx-P than in Ovx-R (Table 2). The sum of 4 leg muscle weights was also higher ($P < 0.01$) in Ovx than in Sham rats but there were no statistical differences between the two Ovx groups. Uterus weight was largely lower ($P < 0.01$) in both Ovx groups compared to the Sham group confirming total ovariectomy (Table 2).

Despite differences in body weight gain and caloric intake, intra-abdominal fat mass was similar between Ovx-R and Sham rats and approximately two times higher ($P < 0.01$) in Ovx-P than in Ovx-R and Sham rats (Figure 1A). On the other hand, fat accumulation in liver was as much higher ($P < 0.05$) in Ovx-R and Ovx-P rats as compared to Sham animals (Figure 1B). There was no statistical difference in liver fat accumulation between Ovx-P and Ovx-R rats. Insulin resistance as evaluated from HOMA-IR shows a similar pattern as liver fat accumulation (Figure 1C). Similar high values for liver fat accumulation and HOMA-IR was also found in Ovx rats of the middle tertile of peripheral fat accumulation (Figure 1C).

To gain an insight into potential mechanisms linking adipose tissue to fat metabolism in liver, we measured gene expression of leptin receptors in liver and in adipose tissue. Surprisingly, ObR-b and -e mRNA levels were significantly ($P < 0.05$) decreased in liver of Ovx-R and Ovx-P animals showing different adiposity levels (Figure 2A and B). On the other hand, the gene expression of these leptin receptors was not changed in the mesenteric adipose tissue (Figure 2C and D).

Experiment 2

Consistent with data of experiment 1, body weight and food intake values were higher ($P < 0.01$) in both Ovx compared to Sham rats and higher ($P < 0.01$) in Ovx-P than in Ovx-R animals (Table 2). The sum of 4 muscle weights was higher in both Ovx compared to the Sham rats and somewhat lower ($P < 0.05$) in Ovx-P compared to Ovx-R. As expected, uterus weight was reduced ($P < 0.01$) in Ovx rats (Table 2).

As observed in the first set of data, there was no difference in intra-abdominal fat mass between Ovx-R and Sham rats while Ovx-P showed ~50% higher values ($P < 0.01$) than Ovx-R and Sham animals (Figure 1D). Confirming results of the first experiment, both Ovx-R and Ovx-P rats showed significant hepatic steatosis ($P < 0.01$) as compared to Sham rats, although liver fat content was slightly higher ($P < 0.05$) in Ovx-P than in Ovx-R rats (Figure 1E). In agreement with the intra-abdominal fat mass response, plasma leptin was higher ($P < 0.01$) only in Ovx-P compared to Ovx-R and Sham rats (Figure 1F).

To further explore underlying mechanisms, the second set of data was used to perform molecular analyses in an attempt to identify which lipid metabolic pathway in liver might be associated with the fact that Ovx-R rats still develop hepatic steatosis. As a first element of response, gene expression of MTP and DGAT2, two key enzymes involved in very low density lipoprotein (VLDL) production and lipid exportation were similarly decreased ($P < 0.01$) in both Ovx groups compared to Sham rats, suggesting a decrease in VLDL production and secretion in both Ovx groups (Figure 3A and B). On the other hand, gene expression of SCD-1, a key lipogenic enzyme, was higher ($P < 0.01$) only in Ovx-P animals (Figure 3C).

Table 2. Anthropometric and plasma parameters in sham-operated (Sham), ovariectomized-resistant (Ovx-R), and prone (Ovx-P) rats. Values are presented as the mean \pm SE.

<i>Experiment 1</i>	<i>Sham (5)</i>	<i>Ovx-R (8)</i>	<i>Ovx-P (9)</i>
Initial body weight(g)	245 \pm 6	252 \pm 2	249.6 \pm 3.5
Final body weight (g)	311 \pm 6	380 \pm 4 **	429 \pm 11 **††
Body weight gain (g)	65 \pm 11	128 \pm 3 **	180 \pm 10 **††
Caloric intake (kcal/day)	72 \pm 3	83 \pm 1 *	97 \pm 3 **††
Sum of muscle weight (g)	2.1 \pm 0.04	2.39 \pm 0.04**	2.5 \pm 0.1**
Uterus weight (g)	0.52 \pm 0.03	0.11 \pm 0.06 **	0.11 \pm 0.08 **
<i>Experiment 2</i>	<i>Sham (12)</i>	<i>Ovx-R (12)</i>	<i>Ovx-P (12)</i>
Initial body weight(g)	232 \pm 7	234 \pm 8	237 \pm 8
Final body weight (g)	322 \pm 10	376 \pm 16 **	399 \pm 16 **††
Body weight gain (g)	91 \pm 9	143 \pm 16 **	163 \pm 13 **††
Caloric intake (kcal/day)	74 \pm 3	83 \pm 5 **	91 \pm 5 **††
Sum of muscle weight (g)	2.0 \pm 0.2	2.6 \pm 0.2 **	2.3 \pm 0.1*†
Uterus weight (g)	0.63 \pm 0.19	0.13 \pm 0.02**	0.14 \pm 0.04**

*Significantly different from Sham rats; $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

† Significantly different from Ovx-R rats; $P < 0.05$, †† $P < 0.01$

Figure legends

Fig. 1. Intra-abdominal fat mass (sum of 3 fat pad weights), liver triacylglycerol (TAG), and HOMA-IR measured in sham-operated (Sham), ovariectomized-resistant (Ovx-R) and prone (Ovx-P) rats of experiment 1. Data given are mean \pm SE with $n = 5$ rats/group for Sham and 8-9 for Oxv-R and Oxv-P, respectively) and with $n=12$ /group for experiment 2. * Significantly different from Sham rats; $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. †† Significantly different from Oxv-R rats; $P < 0.01$. HOMA-IR: homeostatic model of assessment of insulin resistance (glucose (mmol/l) x insulin (mIU/L/22.5), (3-h fasted state).

Fig. 2. Gene expression of leptin receptor (ObR)-b, and -e measured in liver and mesenteric adipose tissue of sham-operated (Sham), ovariectomized-resistant (Ovx-R) and prone (Ovx-P) rats of experiment 1. Values are mean \pm SE with $n = 5$ rats/group for Sham and 8-9 for Oxv-R and Oxv-P, respectively).

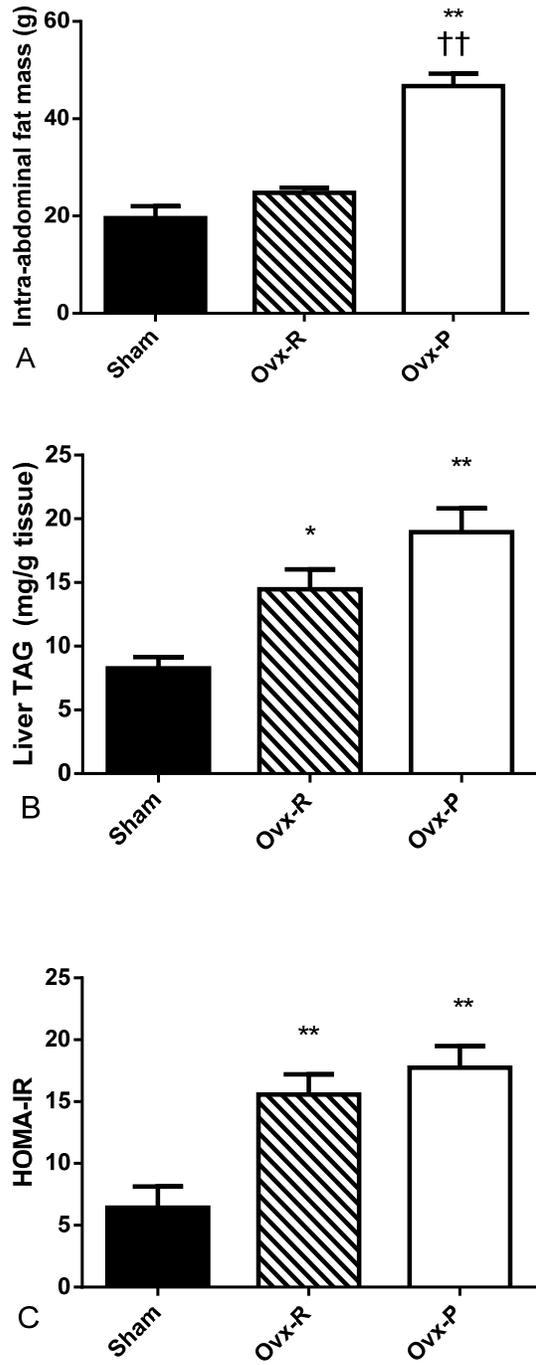
* Significantly different from Sham. Rats; $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Fig. 3. Microsomal triglyceride transfer protein (MTP), diacylglycerol acyltransferase-2 (DGAT-2), and stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD-1) mRNA abundance in sham-operated (Sham), ovariectomized-resistant (Ovx-R) and prone (Ovx-P) rats of experiment 2. Values are mean \pm SE with $n = 12$ rats/group.

** Significantly different from Sham rats; $P < 0.01$.

†† Significantly different from Oxv-R rats; $P < 0.01$.

Experiment 1



Experiment 2

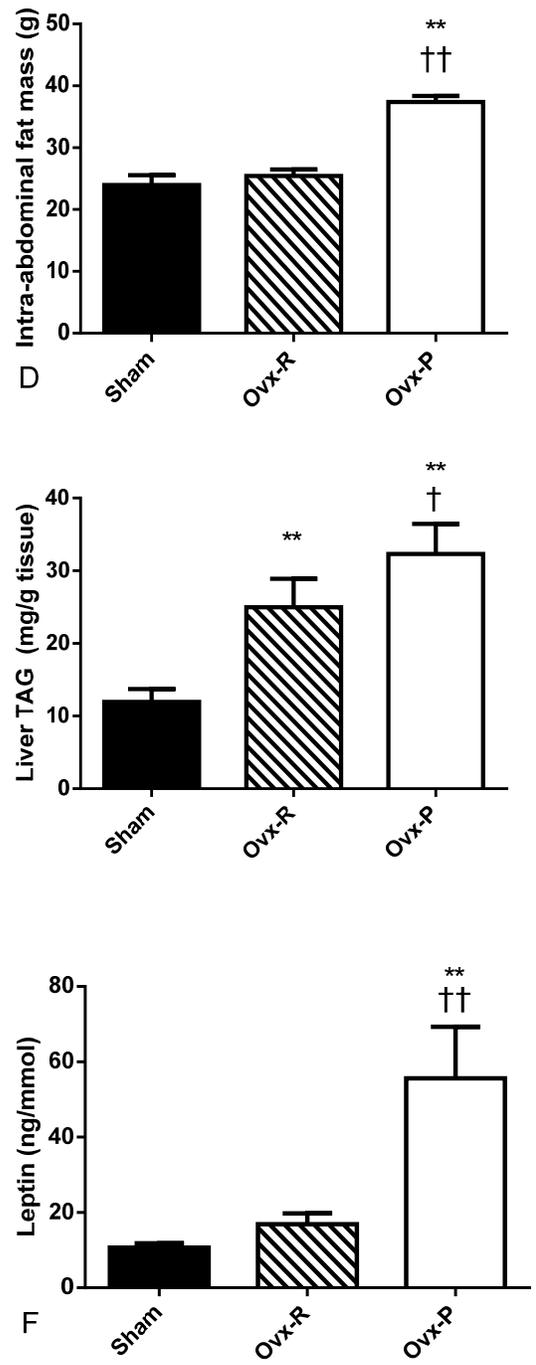


Fig. 1

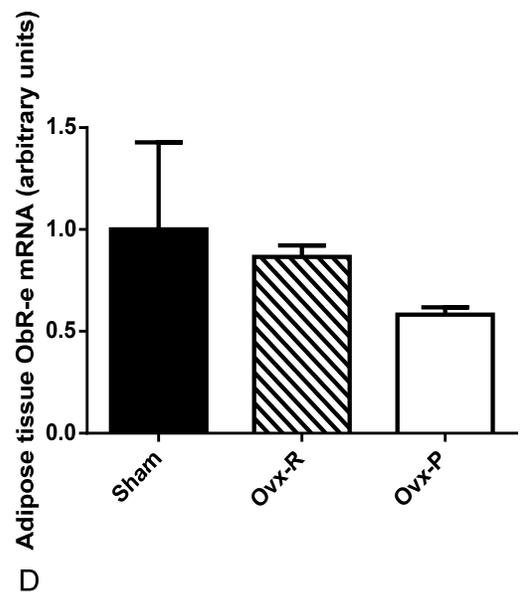
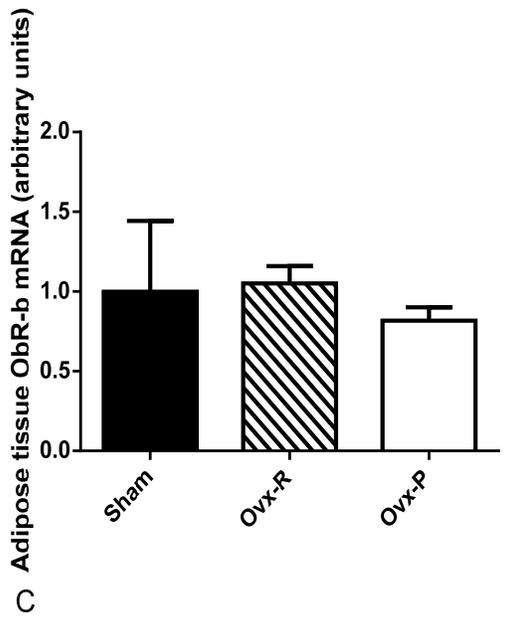
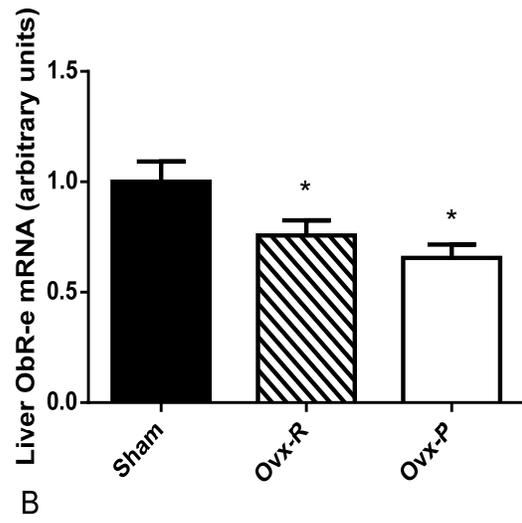
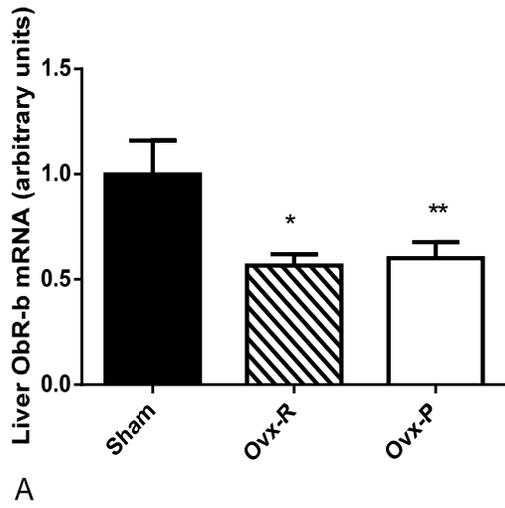


Fig. 2

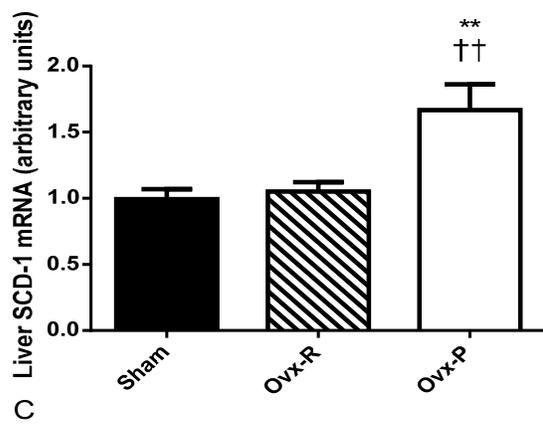
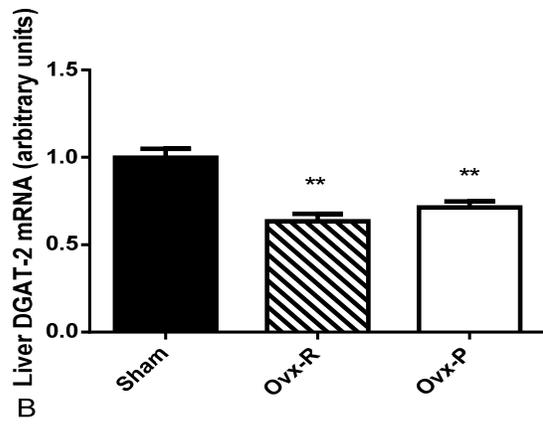
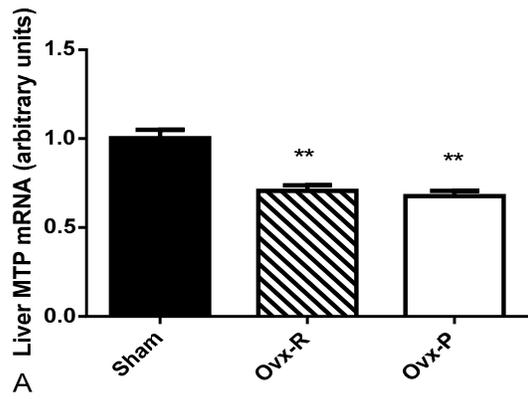


Fig. 3

Discussion

The first observation of the present study is that 6-8 wk after being ovariectomized, rats in the higher tertile (Ovx-P) of the sum of three intra-abdominal fat depot weights show adiposity values almost two times as high as values measured in Ovx rats of the lower tertile (Ovx-R). This was observed in both set of data of the present study. This clearly indicates that similarly to DIO-P and -R animals ⁸ it is possible to establish an experimental model of Ovx-P and Ovx-R animals as far as fat mass gain is concerned.

In spite of the fact that intra-abdominal fat mass was twice as low in Ovx-R as in Ovx-P animals, liver fat accumulation and the HOMA-IR index were increased in both Ovx-R and Ovx-P as compared to Sham rats. It is possible that Ovx-P developed a somewhat higher level of hepatic steatosis than Ovx-R animals, as observed in rats of experiment 2. This, however, does not invalidate the fact that in Ovx-R rats liver fat accumulation was dissociated from peripheral fat accumulation. The dissociation between liver and peripheral fat accumulation in Ovx-R animals differs from what is observed in DIO-P and -R rats in which fat accumulation in liver has been reported to be closely related to adipose tissue fat mass ^{7,22}. This discrepancy suggests that the accumulation of fat in liver of Ovx-R animals is not solely related to an increased fat uptake, linked to peripheral fat accumulation, but also to a lack of estrogens action in liver causing a dysregulation of liver fat metabolism. It is thus possible that even though Ovx-R rats seem to be protected from peripheral fat accumulation, they are not protected from liver lipid accumulation due to the absence of action of estrogens on properly regulating fat metabolism in liver.

In addition to similar liver fat accumulation, Ovx-P and -R rats show similar levels of increased HOMA-IR index compared to Sham rats suggesting an increase in insulin resistance in both of these groups. Such an increase in HOMA-IR index has been previously reported in Ovx rats^{14,23}. Although we acknowledge the fact that HOMA-IR is only an index and must be interpreted as such, it is revealing that, similarly to liver fat accumulation, it was increased in all Ovx rats whether peripheral fat was increased or not. It is also revealing that, in the DIO-P and -R rat model, in which liver fat is increased only in DIO-P rats, HOMA-IR is increased significantly only in DIO-P animals as well²². There are indications that estrogens withdrawal is associated with the development of an insulin resistant state²⁴. Although no firm conclusion may be drawn from the present HOMA-IR values, the present data support the concept that hepatic fat accumulation following estrogens withdrawal may be associated with metabolic consequences even though fat mass and/or body weight changes remain low.

In an attempt to shed some light on mechanisms possibly involved in liver fat accumulation in Ovx-R rats in spite of the lack of peripheral fat accumulation, we measured Ob receptors in liver and in mesenteric adipose tissue. Leptin exerts an anti-steatotic action in several peripheral tissues including liver by enhancing lipid oxidation¹². The present finding that gene expressions of ObR-b and -e in liver are decreased in Ovx rats is an interesting complement to previous findings that in Ovx rats hepatic fatty acid oxidation is decreased while central leptin insensitivity and hepatic leptin resistance are increased^{25,26}. On the other hand, we could not find any statistical evidence of such a decrease in ObR gene expression in the mesenteric adipose tissue. This suggests that the action of estrogens in regulating gene expression of ObR is tissue specific. This

specificity is particularly relevant to the ObR-e, for which the liver is thought to be a major source ²⁷. Plasma leptin levels measured in experiment 2 follow precisely peripheral fat accumulation in Ovx-P and Ovx-R rats, confirming in this Ovx model that leptin reflects adiposity level ²⁸. It thus seems that the decrease in gene expression of ObR in liver of Ovx rats is not related to peripheral fat accumulation or to plasma leptin levels but to the absence of estrogens. This possibility is in line with the contention that estrogens have specific metabolic effects in liver and might, to an undermined extent, explain why fat accumulation in liver of Ovx may be dissociated from adiposity level. Alternatively, recent evidence suggests that leptin may have a dual role in liver pathophysiology in which persistent hyperleptinemia may be implicated in fibrinogenesis and carcinogenesis ²⁹. This implies that downregulation of ObR-b with estrogens withdrawal might have a protective role in situations of persistent high peripheral fat accumulation (i.e. Ovx-P).

To pursue our analyses of potential factors involved in Ovx-induced hepatic steatosis in Ovx-P and -R animals, we measured gene expression in liver of SCD-1, a rate limiting enzyme of lipogenesis in liver ³⁰. SCD-1 gene expression that has been reported to increase in Ovx rats ¹⁴ was increased only in Ovx-P animals. Therefore, while increased lipogenesis may explain the important increase in liver fat content in Ovx-P animals, it was not a contributing factor to liver fat accumulation in the present Ovx-R rats. It is possible that increased lipogenesis is not a primary event in the development of hepatic steatosis in Ovx rats.

Besides possible defects in lipogenesis and/or oxidation, liver fat accumulation in Ovx rats has been recently associated with a decrease in VLDL-TG production along with a decreased in MTP and DGAT-2 gene expressions³¹. MTP and DGAT-2 gene expression, two key enzymes of VLDL synthesis, were decreased similarly in both Ovx-R and -P rats. Although this does not necessarily reflect a cause-effect relationship, it does suggest that the absence of estrogens may reduce VLDL synthesis and production, thus resulting in hepatic fat accumulation without being necessarily associated with peripheral fat accumulation. In a recent report, VLDL production through reduced hepatic MTP has been identified as a primary defect in the inbred Fatty Liver Shionogi mouse which develops hepatic steatosis under normal diet as polygenic trait³². The possibility that indeed VLDL secretion was reduced in both of our Ovx groups of rats raises the interesting speculation that a lack of leptin action through downregulation of leptin receptors as in the present Ovx rats might trigger a decrease in VLDL secretion via the inhibition of the transcription factor STAT3³³. Taking together, results of the present molecular markers point to the direction that fat accumulation in liver of Ovx-R rats is more related to a lack of lipid utilisation and/or exportation than to increased activity of metabolic pathways involved in lipid uptake and/or synthesis.

The observation that Ovx-R rats were able to maintain to a minimum their fat mass gain in spite of estrogens withdrawal deserves to be discussed in regard to body weight gain and caloric intake. The higher gain in adiposity and body weight in Ovx-P compared to Ovx-R and Sham animals may, at least partially, be attributed to their propensity to higher caloric intake. Alternatively, it is also possible that that energy expenditure might be affected differently by estrogens withdrawal. A 40% reduction in

ambulatory activity levels has been reported after ovariectomy in mice³⁴. The hypothesis that the reduction in energy expenditure is less pronounced in Ovx-R than in Ovx-P rats remains, however, to be tested.

In summary, data of the present study first indicate that when Ovx rats are subdivided into Ovx-P and Ovx-R on the basis of their intra-abdominal fat accumulation, liver still accumulates fat to a similar extent in both of these groups. This suggests that hepatic fat accumulation may be dissociated from peripheral fat accumulation with estrogens withdrawal. In search of an explanation for these observations, the decrease in leptin receptors expression, possibly leading to a decrease in fat oxidation, and the decrease in gene expression of key molecular makers of VLDL synthesis potentially leading to a decrease in lipid exportation were identified as likely factors. Although extrapolation from animal studies to human situation must be made with caution, the present results indicate that women who gain a limited amount of weight or body fat after menopause may still undergo an increased fat accumulation in liver.

Funding: This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research

(RRL, DP, JML; T 0602 145.02) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (JML; 7594).

DISCLOSURE STATEMENT

Siham Yasari is presently employed by the Canadian Institutes of Health Research and she declares no conflict of interests.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

This work was performed at the University of Montreal. Côté I. (conception, design, data collection, analysis and writing), Yasari S., Pighon A. and Barsalani R. (design, data analysis), Rabasa-Lhoret R, Prud'homme (conception, manuscript, correction) and Lavoie JM (conception, design, data analysis, writing). All authors contributed to data interpretation and drafting/revising the article for important intellectual content. All authors approved the final version to be published.

References

1. Paquette A, Shinoda M, Rabasa Lhoret R, Prud'homme D, Lavoie JM. Time course of liver lipid infiltration in ovariectomized rats: impact of a high-fat diet. *Maturitas* 2007; 20:182-90
2. Picard F, Deshaies Y, Lalonde J et al. Effects of the estrogen antagonist EM-652.HCl on energy balance and lipid metabolism in ovariectomized rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24(7): 830-4
3. Lobo RA. Metabolic syndrome after menopause and the role of hormones. *Maturitas* 2008; 60: 10-18
4. Crawford SL, Casey VA, Avis NE, McKinlay SM. A longitudinal study of weight and the menopause transition: results from the Massachusetts Women Health Study. *Meneopause* 2000; 7: 96-104
5. Dubnov-Raz G, Pines A, Berry EM. Diet and lifestyle in managing postmenopausal obesity. *Climacteric* 2007; 10 (2): 38-41
6. Levin BE, Dunn-Meynell AA. Defense of body weight against chronic caloric restriction in obesity-prone and -resistant rats. *Am J Physiol* 2000; 278: 231-37
7. Madsen AN, Hansen G, Paulsen SJ et al. Long-term characterization of the diet-induced obese and diet-resistant rat model: a polygenetic rat model mimicking the human obesity syndrome. *J Endocrinol* 2010; 206: 287-96
8. Speliotes EK, Massaro JM, Hoffmann U et al. Fatty liver is associated with dyslipidemia and dysglycemia independent of visceral fat: The framingham heart study. *Endocrinology* 2009; 150: 2161-68
9. Barsalani R, Pighon A, Rabasa-Lhoret R, Yasari S, Lavoie JM. Liver of ovariectomized rats is resistant to resorption of lipids. *Physiol & Behav.* 2008; 95: 216-21
10. Lavoie JM, Gauthier MS. Regulation of fat metabolism in the liver: link to non-alcoholic hepatic steatosis and impact of physical exercise. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63: 1393-1409

11. Yasari S, Wang D, Prud'homme D, Jankowski M, Gutkowska J, Lavoie JM. Exercise training decreases plasma leptin levels and the expression of hepatic leptin receptor-a, -b, and, -e in rats. *Mol Cell Biochem* 2009; 324: 13-20
12. Unger RH. The physiology of cellular liporegulation. *Annu Rev Physiol* 2003; 65: 333-47
13. Barsalani R, Chapados NA, Lavoie JM. Hepatic VLDL-TG production and MTP gene expression are decreased in ovariectomized rats: effects of exercise training. *Horm Metab Res* 2010; 42: 860-67
14. Pighon A, Gutkowska Y, Jankowski M, Rabasa-Lhoret R, Lavoie JM. Exercise training in ovariectomized rats stimulates estrogenic-like effects on expression of genes involved in lipid accumulation and subclinical inflammation in liver. *Metabolism* 2011; 60: 629-39
15. Robertson MC, Owens RE, Klindt J, Friesen HG. Ovariectomy leads to a rapid increase in rat placental lactogen secretion. *Endocrinology* 1984; 114:1805-11
16. Johnson NA, Walton DW, Sachinwalla T et al. Non-invasive assessment of hepatic lipid composition: advancing understanding and management of fatty liver disorders. *Hepatology* 2008; 47: 1513-23
17. Larson SP, Bowers SP, Palekar NA, Ward JA, Pulcini JP, Harrison SA. Histopathologic variability between the right and left lobes of the liver in morbidly obese patients undergoing Roux-en-Y bypass. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 1329-32
18. Gauthier M-S, Couturier K, Charbonneau A, Lavoie JM. Effects of introducing physical training in the course of a 16-week high-fat diet regimen on hepatic steatosis, adipose tissue fat accumulation, and plasma lipid profile. *Int J Obes* 2004; 28: 1064-71
19. Luu YK, Lublinsky S, Ozcivici E et al. In vivo quantification of subcutaneous and visceral adiposity by micro-computed tomography in a small animal model. *Medical Engineering & Physics* 2009; 31: 34-41
20. Probyn S, Clarys JP, Wallace J, Scafoglieri A, Reilly T. Quality control, accuracy, and prediction capacity of dual energy X-ray absorptiometry variables and data acquisition. *J Physiol Anthropol* 2008; 27: 317-23

21. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28: 412-19
22. Li H, Xie Z, Lin J et al. Transcriptomic and metabonomic profiling of obesity-prone and obesity-resistant rats under high fat diet. *J Proteome Res* 2008; 7: 4775-83
23. Pighon A, Paquette A, Barsalani R et al. Substituting food restriction by resistance training prevents liver and body fat regain in ovariectomized rats. *Climacteric* 2009; 12:153-64
24. Saengsirisuwan V, Pongseeda S, Prasannarong M, Vichaiwong K, Toskulkao C. Modulation of insulin resistance in ovariectomized rats by endurance exercise training and estrogen replacement. *Metabolism* 2009; 58: 38-47
25. Paquette A, Chapados N, Bergeron R, Lavoie JM. Fatty acid oxidation is decreased in the liver of ovariectomized rats. *Horm Metab Res* 2009; 41: 511-15
26. Meli R, Pacilio M, Raso GM et al. Estrogen and raloxifene modulate leptin and its receptor in hypothalamus and adipose tissue from ovariectomized rats. *Endocrinology* 2004; 145: 3115-21
27. Cohen P, Yang G, Yu X et al. Induction of leptin receptor expression in the liver by leptin and food deprivation. *J Biol Chem* 2005; 280: 10034-39
28. Zastrow O, Seidel B, Kiess W et al. The soluble leptin receptor is crucial for leptin action: evidence from clinical and experimental data. *Int J Obes.* 2003; 27: 1472-78
29. Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C, Deretzi G. The potential adverse role of leptin resistance in nonalcoholic fatty liver disease : a hypothesis based on critical review of literature. *J Clin Gastroenterol* 2011; 45: 50-4
30. Cohen P, Friedman JM. Leptin and the control of metabolism: role for stearoyl-CoA desaturase (SCD-1). *J Nutr* 2004; 134: 2455-63
31. Barsalani R, Chapados NA, Lavoie JM. Hepatic VLDL-TG production and MTP gene expression are decreased in ovariectomized rats: effects of exercise training. *Horm Metab Res* 2010; 42: 860-67

32. Shindo N, Fujisawa T, Sugimoto K et al. Involvement of microsomal triglyceride transfer protein in nonalcoholic steatohepatitis in novel spontaneous mouse model. *J of Hepatology* 2010; 52: 903-12
33. Kinoshita S, Ogawa W, Okamoto Y et al. Role of STAT3 in the regulation of lipid metabolism. *Kobe J Med Sci* 2008; 54: E200-8
34. Rogers NH, Perfield JW 2nd, Strissel KJ, Obin MS, Greenberg AS. Reduced energy expenditure and increased inflammation are early events in the development of ovariectomy-induced obesity. *Endocrinology* 2009; 150: 2161-68

Chapitre 3 : Article original 2

Titre:

An atherogenic diet decreases liver FXR gene expression and causes severe hepatic steatosis and hepatic cholesterol accumulation: effect of endurance training

Auteurs:

Isabelle Côté, Émilienne T Ngo Sock, Émile Lévy et Jean-Marc Lavoie

Numéro de référence du journal:

Eur J Nutr. 2013 Aug;52(5):1523-32.

Reproduit avec la permission de Springer Science et Business Media.

An atherogenic diet decreases liver FXR gene expression and causes severe hepatic steatosis and hepatic cholesterol accumulation: effect of endurance training

Isabelle Côté¹, Émilienne T Ngo Sock¹, Émile Lévy² and Jean-Marc Lavoie¹

¹Department of Kinesiology Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

²Department of Nutrition, Centre de recherche du CHU Ste-Justine, Québec, Canada

Running title; Adipocyte and liver fat accumulation with atherogenic diet

Key words: cholesterol transport, bile acid synthesis, liver cholesterol, exercise

Abstract

Purpose The aim of this study was to determine the effects of an atherogenic diet (AD; 40 % lipid, 1.25 % cholesterol, kcal) on triglyceride (TAG) and cholesterol accumulation in liver and on gene expression of liver X receptor (LXR) and farnesoid X receptor (FXR) and their target genes and to observe if these responses are affected by endurance training.

Methods Sprague–Dawley rats ($n = 32$) were divided into two groups and randomly assigned to an AD or a standard diet (SD) for 7 weeks. Half of the rats in each group were assigned to an exercise training program for 5 days/week.

Results The AD resulted in a large ($P < 0.01$) accumulation in liver TAG ($4\times$) along with elevated liver and plasma cholesterol without any gain in peripheral fat mass. The liver TAG and cholesterol accumulations were associated with an important reduction ($P < 0.01$; 60 %) in FXR, but no change in LXR transcripts. Accompanying the reduction in FXR gene expression, we found an increase ($P < 0.001$) in SREBP-1c and a decrease ($P < 0.01$) in MTP mRNAs suggesting an increased lipogenesis and a reduced VLDL production, respectively. The AD was also associated with lower HMG-CoA-r, squalene synthase, and ABCG8 transcripts ($P < 0.001$). In the intestine, exercise training resulted in higher NPC1L1, ABCG5, and ABCG8 in SD-fed animals, while all these increases were suppressed under the AD feeding.

Conclusions It is concluded that dietary cholesterol favors liver TAG and cholesterol accumulations associated with an important reduction in FXR transcripts.

Introduction

There is growing evidence that dietary cholesterol is a preponderant factor responsible for inducing hepatic steatosis [1]. For instance, it was shown that the addition of cholesterol to a standard diet increases hepatic triglycerides and cholesterol content [2, 3]. Dietary cholesterol also interferes with other dietary fats to exacerbate hepatic steatosis [4]. In this way, high-fat/high-cholesterol atherogenic diets (AD) in animals are a novel model for inducing hepatic steatosis [5]. However, the mechanism behind these observations remains obscure. Knowing the deleterious metabolic consequences of liver fat accumulation on, for instance, the development of hepatic insulin resistance, there is a need for a better understanding of how these AD affect liver metabolic pathways.

In an attempt to shed some light on how an AD diet stimulates liver fat accumulation, we first looked at nuclear factors liver X receptor (LXR) and farnesoid X receptor (FXR) and some of their target genes. LXR is a molecule that can relate dietary cholesterol to hepatic steatosis [6]. LXR stimulates bile acids synthesis through its target gene cytochrome P450, family 7, subfamily a, polypeptide 1 (Cyp7a1), the main enzyme in the conversion of cholesterol into bile acids [7]. Consequently, LXR protects the body against cholesterol toxicity by enhancing cholesterol elimination [8]. Paradoxically, however, LXR also stimulates hepatic sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) which strongly stimulates lipogenesis in liver. On the other hand, nuclear factor FXR, activated by bile acids, stimulates bile and cholesterol efflux from the liver. Opposite to LXR, FXR suppresses bile acids synthesis and lipogenesis by inhibiting Cyp7a1 and SREBP-1c. Administration of pharmacological FXR agonist reversed hepatic steatosis and insulin resistance in Zucker (fa/fa) obese rats [9]. On the opposite,

FXR deficiency increases hepatic fat content in LDL receptor null mice [10]. These observations indicate that FXR acts to protect the liver against steatosis. It is not known, however, if FXR gene expression is changed following an AD. A negative correlation between FXR expression and steatosis level in liver of NAFLD patients was recently reported [11]. These findings, therefore, suggest that in addition to LXR, FXR gene is a potential transcription factor associated with AD-induced hepatic steatosis pathology. The first purpose of the experiment was to determine the extent to which the present AD affects liver TAG and cholesterol accumulation and if these responses may be linked to the LXR and FXR transcripts and some of their key target gene expressions. Based on the above-described information, we postulated that the AD will result in an increase and a decrease in LXR and FXR gene expression, respectively.

Besides liver, intestine is a central organ that influences hepatic fat content. For instance, a partial resection of intestine has been reported to decrease hepatic lipids [12]. Ezetimibe, a drug that blocks NPC1L1, the main intestinal cholesterol transporter in intestine, has been recently proposed as a potential molecule for treatment of NAFLD [13]. As recently reviewed, activation of intestinal FXR might be the main mechanism to inhibit *Cyp7 α 1* gene expression in liver, thus suppressing bile acids synthesis [14]. By controlling whole body cholesterol flux, the intestine is an organ that might contribute to liver lipid accumulation following the AD. To better characterize the effect of AD on liver TAG and cholesterol accumulation, we also determined FXR gene expression in jejunum along with some key molecular factors involved in cholesterol and fat absorption.

At the present time, there are no specific or effective pharmacological treatments for NAFLD and lifestyle modifications such as nutrition and exercise are regarded as first line treatments [15]. Evidence showing that exercise training prevents or attenuates fat accumulation in animals submitted to a high-fat diet is mounting [16, 17]. Although there is a paucity of data on this topic, it seems that exercise training failed to attenuate TAG and cholesterol accumulation in liver of rat fed on hypercholesterolemic diet [18]. To further explore this avenue, the present experiment was conducted in sedentary and exercise-trained rats.

Materials and methods

Animal cares

Female Sprague-Dawley rats ($n=32$) weighing 170-190 g (8-wk old) were obtained from Charles River (St-Constant, PQ, Canada) and were housed individually. The 12: 12-h light-dark cycle started at 06:00 and the room temperature was maintained at 20-23°C. All animals had *ad libitum* access to food and tap water. Body weight and food intake in g were monitored two times per wk. The experiments described in this report were conducted according to the directives of the Canadian Council on Animal Care after institutional approval.

Groups and exercise training

Two days after their arrival to our laboratory, animals were randomly assigned either to a standard (SD) or an atherogenic diet (AD; $n = 16$ per diet). The SD (Agribrands) was constituted of 15% lipid, 65% carbohydrate, and 20% protein (kcal) and the AD (TD-02028, Harlan Laboratories) was made of 40% lipid, 1.25% cholesterol, 0.5% cholic acid, 40% carbohydrate, and 20% protein (kcal). One week later, half of the rats in each group

(n = 8) were submitted to an exercise training program. Exercise training (Tr) consisted of continuous running on a rodent treadmill (Quinton Instruments, Seattle, WA) 5 times per wk for the duration of the experiment (6 wk). The Tr rats progressively ran from 15 min/d at 15 m/min, 0% slope, up to 60 min/d at 26 m/min, 10% slope (\approx 75% of VO_2 max). At the 7th wk, all trained and sedentary rats were killed.

Blood and tissue sampling

Rats were sacrificed between 09:00 and 12:00. Food was removed from the animal's cage 3 h before sacrifice. Immediately after complete anaesthesia (isoflurane), the abdominal cavity was opened following the median line of the abdomen and approximately 4 ml of blood was collected from the abdominal vena cava (<45 s) into syringes pre-treated with ethylenediaminetetraacetic acid (15%; EDTA). Blood was centrifuged (3000 rpm; 4°C; 12 min; Beckman GPR Centrifuge) and the plasma was kept for further analysis. Several organs and tissues were removed and weighed (Mettler AE 100): liver, jejunum, fat deposits and muscles. The liver median lobe was freeze-clamped and used for triacylglycerol (TAG), cholesterol (TC) and mRNA determinations. To separate the jejunum, the first 5 cm of the small intestine following the pyloric sphincter was removed as the duodenum and the 10 cm following the ligament of Trietz was discarded. The next 20 cm was identified as the jejunum. The mesenteric fat pad consisted of adipose tissue surrounding the gastrointestinal tract from the gastroesophageal sphincter to the end of the rectum. The urogenital fat pad included adipose tissue surrounding the kidneys, ureters and bladder as well as ovaries, oviducts and uterus. The retroperitoneal fat pad was taken as that distinct deposit behind each kidney along the lumbar muscles. All tissue

samples were frozen in liquid nitrogen immediately after weighing. All tissue and plasma samples were stored at -80°C until analyses were performed.

Molecular analyses

Quantitative real-time PCR

Total RNA was extracted from frozen liver and jejunum with the use of RNA extraction Mini kit (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. RNA was thereafter treated with DNase (Invitrogen) in order to avoid genomic contamination. 2 µg of total RNA was reverse transcribed into cDNA using high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems). RT samples were stored at -20°C.

q-PCR reaction:

Gene expression for GAPDH was determined using a pre-validated Taqman Gene Expression Assay (Applied Biosystems, Rn01462661, Foster City, CA). Gene expression level for target genes was determined using assays designed with the Universal Probe Library from Roche. The primer sets and UPL probe numbers are presented in Table 1. To validate the efficiency of the qPCR assays, we used a mix of the samples tested in the study.

Detection and analysis

The ABI PRISM[®] 7900HT (Applied Biosystems) was used to detect the amplification level and was programmed with an initial step of 3 min at 95°C, followed by 40 cycles of: 5 sec at 95°C and 30 sec at 60°C. All reactions were run in triplicate and the average values of Cts were used for quantification. GAPDH was used as endogenous control.

The relative quantification of target genes was determined using the $\Delta\Delta CT$ method. Briefly, the Ct (threshold cycle) values of target genes were normalized to an endogenous

control gene (GAPDH) ($\Delta CT = Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{GAPDH}}$) and compared with a calibrator:
 $\Delta\Delta CT = \Delta Ct_{\text{Sample}} - \Delta Ct_{\text{Calibrator}}$. Relative expression (RQ) was calculated using the
Sequence Detection System (SDS) 2.2.2 software (Applied Biosystems) and the formula
is $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$.

Table 1. Real time PCR primer sequences

Gene	Oligo FWD	Oligo REV
Srebp-1c	tacagcgtggctgggaac	ggctgagcgatacagttcaa
Mtp	gcgagtctaaaacccgagtg	cactgtgatgctgctgggtatt
Cyp7a1	ggagcttattcaaagatcagg	cactctgtaaagctccactcact
LXR	agggctccaggaagagatgt	caactccgttcgagagtcag
FXR	ccacgaccaagctatgcag	tctctgtttgctgtatgagcca
Npc1l1	cagcctctccgactgctg	gaggggtgcggttgttctg
Acat2	gtaccctggccatcgactt	ctgtccgaagctgaagagga
Squalene synthase	gcaaggagaagcaccgagta	ttctaaactccagggagatcgt
Hmg Co-A- r	caaccttctacctcagcaagc	acagtgccacacacaattcg
Abcg5	cggagagttggtgttctgtg	caccgatgtcaagtcctatgt
Abcg8	cagatgctggctatcataggg	ctgatttcatttggccacca
Tnf- α	gcctcttctcattctgctc	gagcccatgtgggaacttct
Fabp2	aactcggcgtcgactttg	ccaacaagttatttccctccat
Cd36	tgagaagtctcgaactgagg	tccaacacagcatagatggac

Biochemical analyses

Liver TAG concentration was estimated from glycerol released after ethanolic KOH hydrolysis by a colorimetric method using commercial kits from Sigma (St-Louis, Missouri, USA). Liver cholesterol was extracted using the procedure developed by Folch et al. [19]. The dried lipid residues were dissolved in 1 ml of ethanol for cholesterol assay with enzymatic kits (Hitachi; Mannheim, Germany). Plasma TAG and glucose levels were measured using a colorimetric method (Sigma; St-Louis, Missouri, USA).

Statistical analysis

Values are expressed as mean \pm standard error. Statistical analyses were performed by two-way ANOVA for non-repeated measures. Fisher's post hoc test was used in the event of a significant ($P < 0.05$) F ratio.

Results

Anthropometric parameters and food intake

In spite of the lower level of lipid consumption (10.5 ± 0.5 vs 29.4 ± 1.0 kcal/day; $P < 0.01$) in SD compared with AD, respectively, total daily caloric intake was similar in both dietary groups (Table 2). Accordingly, peripheral fat accumulation and final body weight were not different between groups (Table 2), indicating that atherogenic diet consumption did not induce obesity. Physical activity lightly stimulated food intake with a 5 % increase ($P < 0.05$) of caloric intake in Tr groups compared with Sed groups (Table 2). However, this increase did not affect intra-abdominal fat accumulation neither bodyweight.

Table 2. Anthropometric parameters

	SD-Sed	SD-Tr	AD-Sed	AD-Tr
Intra-abdominal fat pads weight (g)	25.12 ± 1.6	19.6 ± 2.3	22.4 ± 1.8	21.7 ± 1.5
Initial Body Weight (g)	183 ± 1	178 ± 0.9	180 ± 1.8	178 ± 1.9
Final Body Weight (g)	326 ± 6	325 ± 12	333 ± 9	337 ± 9
Body Weight Gain (g)	143 ± 7	147 ± 11	153 ± 9	159 ± 9
Caloric Intake (kcal/day)	70 ± 6	$76 \pm 4^\dagger$	74 ± 6	$79 \pm 4^\dagger$

SD: standard diet; AD: atherogenic diet; Sed: sedentary; Tr: trained

Liver and plasma TAG and cholesterol content

Despite an absence of peripheral fat accumulation, liver TAG content in AD-fed animals reached 4 times ($P < 0.001$) the level found in SD-fed animals (Fig. 1a). Moreover, liver total cholesterol significantly ($P < 0.01$) accumulated in AD compared to SD-fed animals (Fig. 1b). Plasma TAG and cholesterol levels were also higher ($P < 0.01$) in AD-fed rats (Fig. 1c, d). Contrary to previous findings showing beneficial effects of regular physical activity on diet-induced hepatic steatosis [16], AD-fed rats were resistant to lipid resorption under the exercise training program as liver TAG content was similar in Tr and Sed rats. Moreover, training had an unexpected effect of exacerbating cholesterol accumulation with a 30 % higher value ($P < 0.01$) found in AD-Tr compared to AD-Sed group. (Fig. 1b). Plasma TAG and cholesterol levels were unaffected by exercise training in all dietary conditions.

Key molecular markers of lipids and cholesterol in liver

Nuclear factor LXR involved in cholesterol reverse transport was unchanged under the AD (Fig. 2a). On the other hand, the nuclear factor FXR involved in bile acids and cholesterol export from the liver was largely decreased (70 %; $P < 0.01$) in rats fed the AD diet (Fig. 2b). Exercise did not affect liver FXR and LXR gene expression. Hepatic SREBP-1c mRNA, a lipogenic factor that is stimulated by LXR and inhibited by FXR was strongly increased (260 %) in AD compared to SD-fed rats ($P < 0.001$) suggesting an increased lipogenesis (Fig. 2c). As for liver cholesterol accumulation, SREBP-1c gene expression was increased (60 %) in AD-Tr compared to AD-Sed animals ($P < 0.05$). Also regulated by LXR and FXR, the rate-limiting enzyme for bile acid synthesis, hepatic

Cyp7 α 1 was unchanged by the diet and exercise manipulations (Fig. 2d). MTP gene expression displayed a 25–30 % decrease ($P < 0.01$) in AD compared to SD-fed animals (Fig. 2e) suggesting a decrease in lipid and cholesterol export from the liver under the form of VLDL. Hepatic gene expression of ACAT, an enzyme responsible for cholesterol esterification was, however, unchanged by diet or exercise (Fig. 2f). HMG-CoA reductase and squalene synthase transcripts were both decreased (75–80 %; $P < 0.001$) in liver of AD-fed rats (Fig. 3a, b), suggesting a suppression of cholesterol biosynthesis pathway. The cholesterol biosynthesis markers were not affected by exercise. On the other hand, ABCG5 transcript was stimulated by the AD diet (Fig. 3c). However, its complementary subunit ABCG8 was 70 % decreased under the AD (Fig. 3d) suggesting a reduction in biliary cholesterol exportation. Interestingly, training induced a large increase in ABCG8 gene expression under the SD diet.

Gene expression of key markers of cholesterol turnover and intestinal lipid transport

Contrary to the large decrease found in liver, FXR gene expression in jejunum was not affected by the diet (Fig. 4a). Surprisingly, intestinal cholesterol transporters NPC1L1, ABCG5, and ABCG8 gene expressions were not affected by the AD diet but were all upregulated following training in the SD diet condition ($P < 0.05$; Fig. 4b, d). Opposite to the decrease found in liver, jejunum MTP gene expression was not altered by the diet and the exercise treatment (Fig. 5a). Intestinal fatty acid transporters, FABP and CD36 transcripts, were also unaffected by diet or exercise (Fig. 5b, c).

Figure Legends

Fig.1. Liver and plasma triacylglycerol (TAG) and cholesterol levels in rats fed an atherogenic (AD) or a standard (SD) diet in the sedentary or the trained (Tr) state. ** Significantly different from the diet counterparts ($P < 0.01$), *** ($P < 0.001$); †† Significantly different from the sedentary counterparts ($P < 0.01$).

Fig.2. Hepatic gene expression of liver X receptor (LXR), farnesoid X receptor (FXR), sterol regulatory element-binding protein1c (SREBP1c), cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1), microsomal triglyceride transfer protein (MTP), and (ACAT) in rats fed an atherogenic (AD) or a standard (SD) diet in the sedentary or the trained (Tr) state. ** Significantly different from the diet counterparts ($P < 0.01$), *** ($P < 0.001$); †† Significantly different from the sedentary counterparts ($P < 0.01$).

Fig.3. Hepatic gene expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMG-CoA-r), squalene synthase, and ATP-binding cassette, subfamily G, member 5 and 8 (ABCG5, ABCG8) in rats fed an atherogenic (AD) or a standard (SD) diet in the sedentary or the trained (Tr) state. * Significantly different from the diet counterparts ($P < 0.05$), *** ($P < 0.001$); ††† Significantly different from the sedentary counterparts ($P < 0.001$).

Fig. 4. Intestinal (jejunum) gene expression of farnesoid X receptor (FXR), Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1), and ATP-binding cassette, subfamily G, member 5 and 8 (ABCG5, ABCG8) in rats fed an atherogenic (AD) or a standard (SD) diet in the sedentary or the trained (Tr) state. † Significantly different from the sedentary counterparts ($P < 0.05$) ††† ($P < 0.01$).

Fig. 5. Intestinal (jejunum) gene expression of microsomal triglyceride transfer protein (MTP), fatty acid binding protein (FABP) and (CD 36) in rats fed an atherogenic (AD) or a standard (SD) diet in the sedentary or the trained (Tr) state.

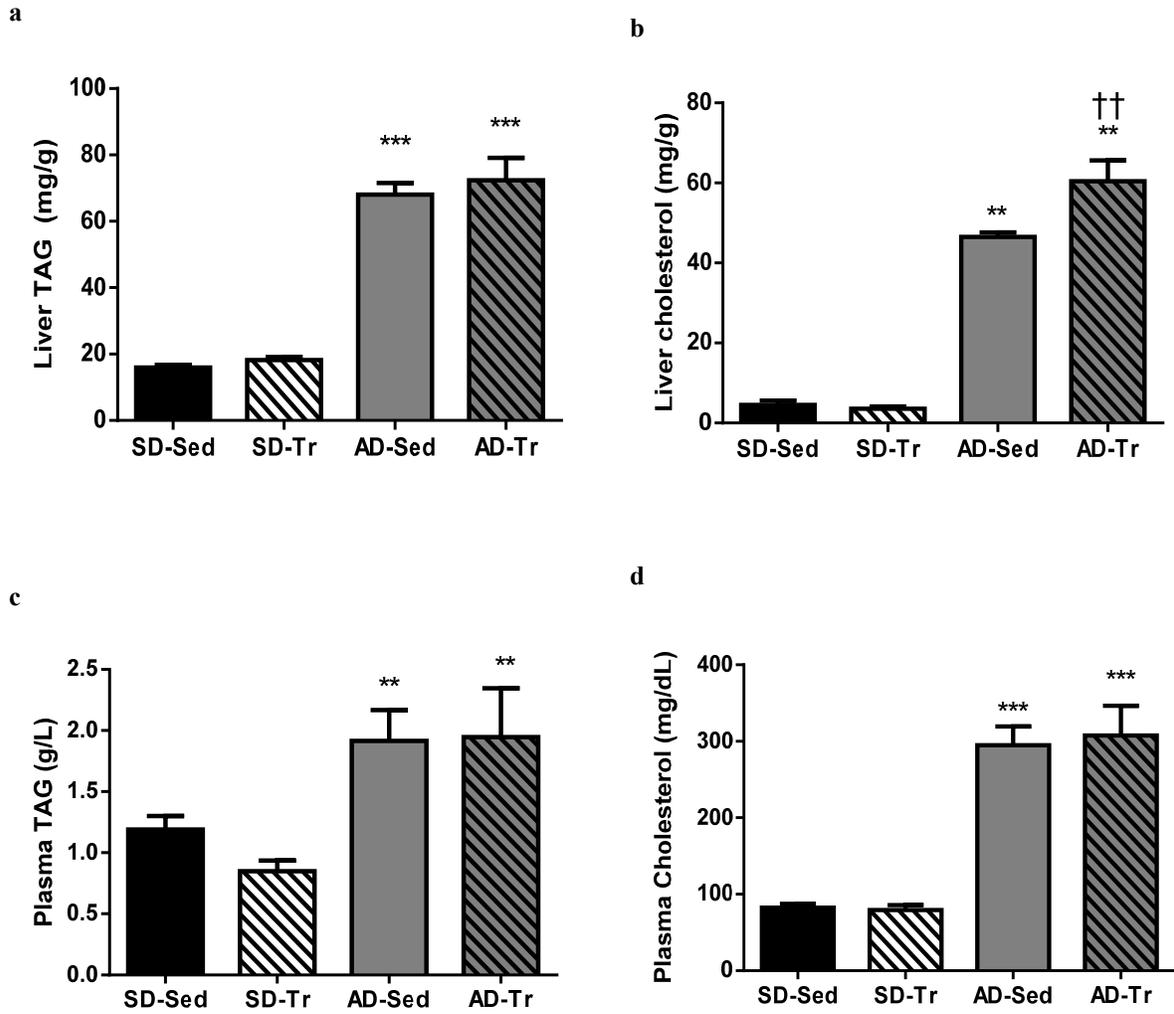
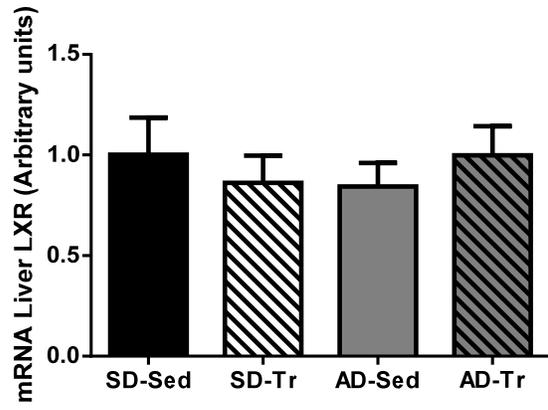


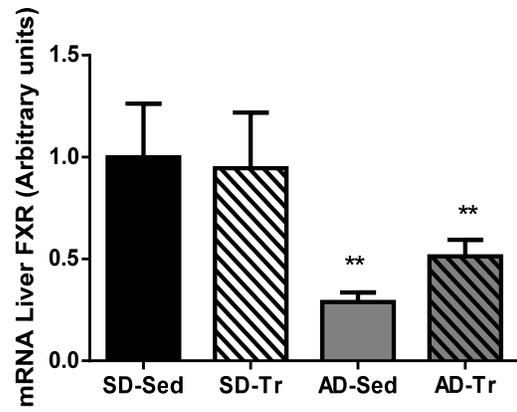
Fig. 1

LIVER

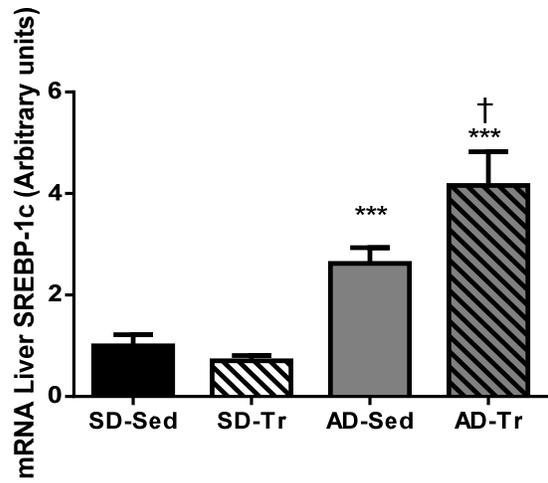
a



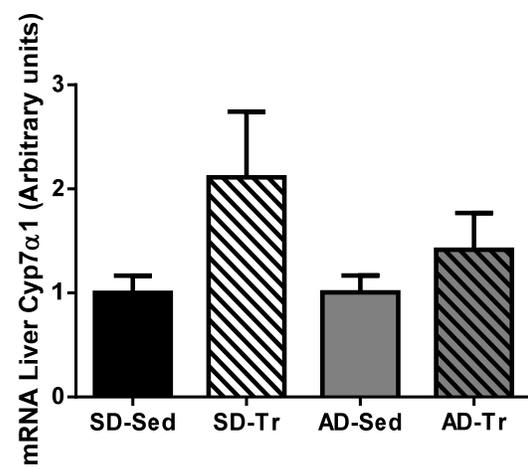
b



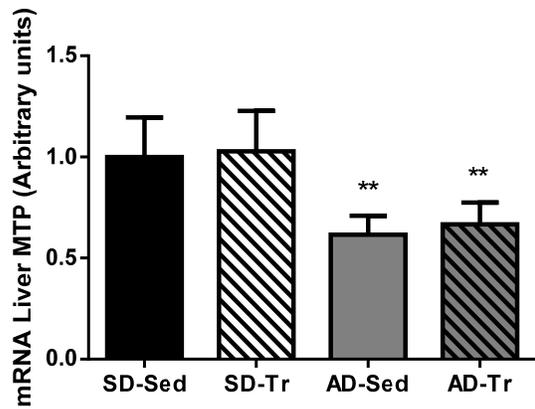
c



d



e



f

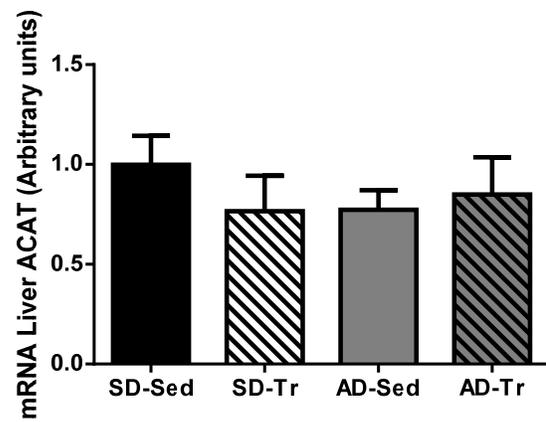
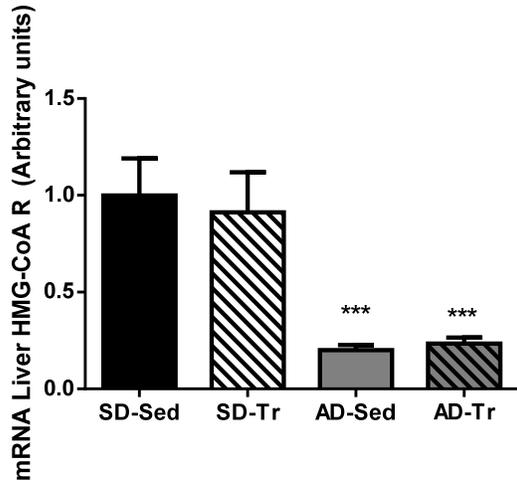


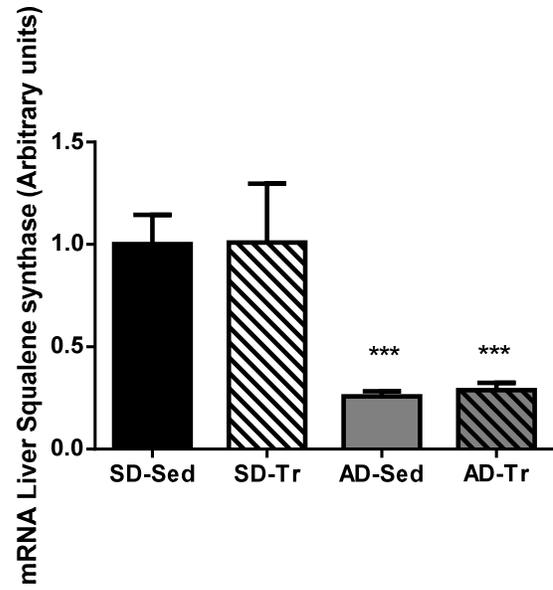
Fig. 2

LIVER

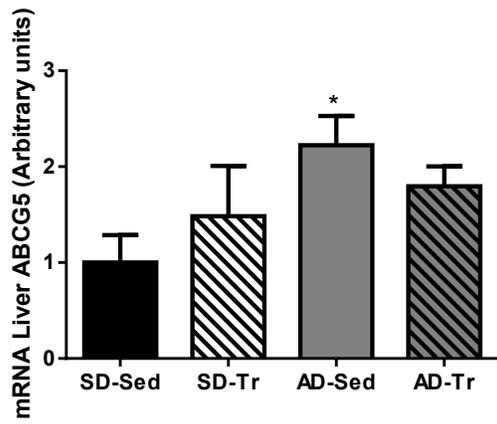
a



b



c



d

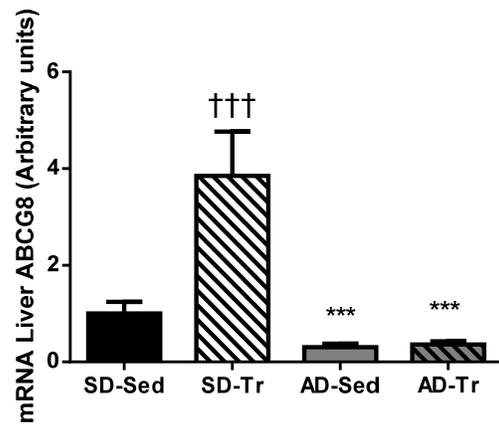
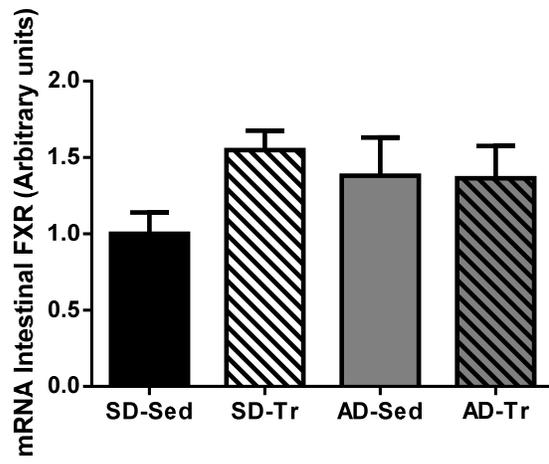


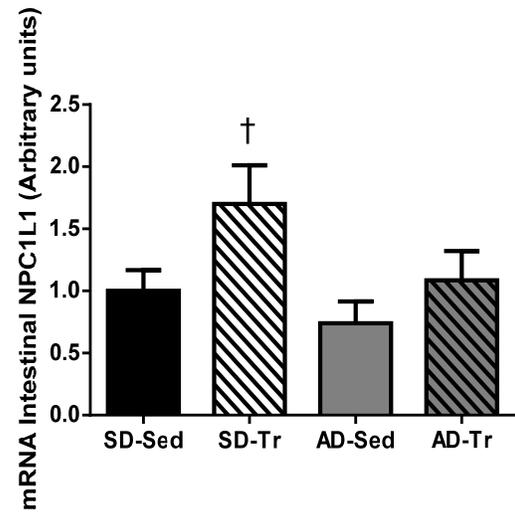
Fig. 3

INTESTINE

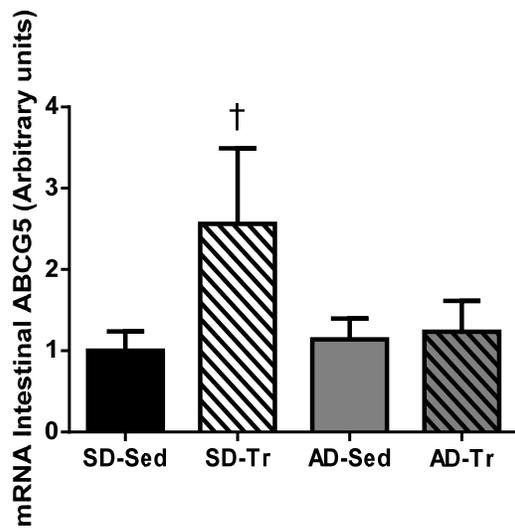
a



b



c



d

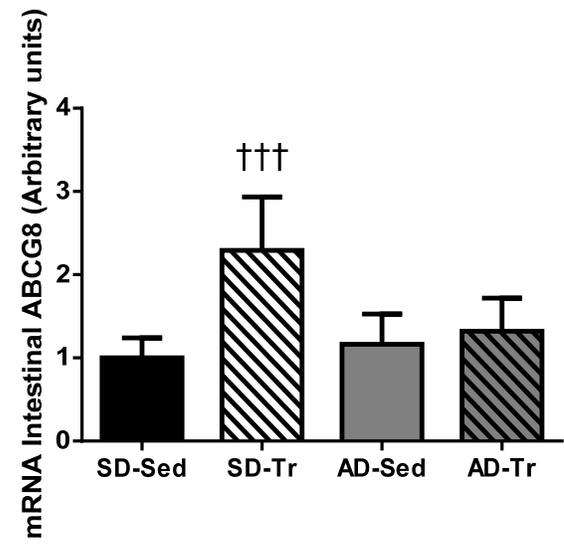
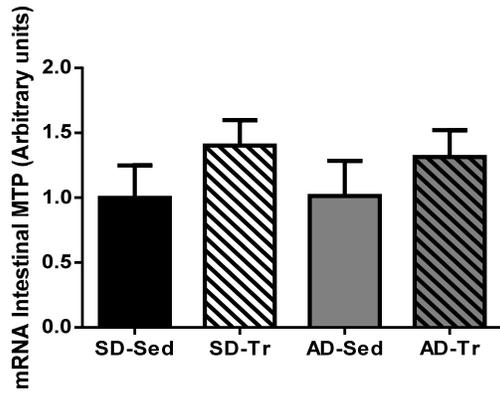


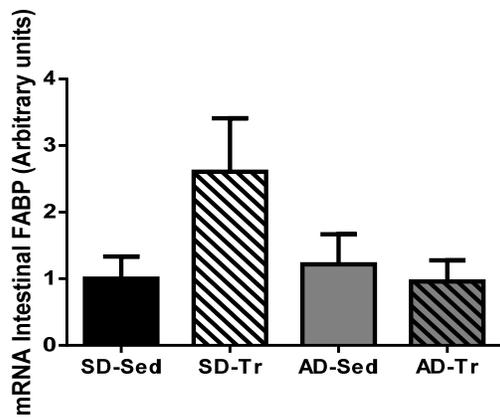
Fig. 4

INTESTINE

a



b



c

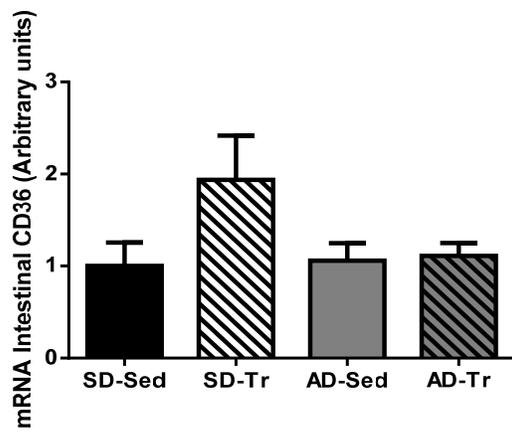


Fig. 5

Discussion

The main findings of the present study were that the AD induced a severe hepatic steatosis and cholesterol accumulation without peripheral adiposity gain. These responses were accompanied with an important downregulation in hepatic FXR gene expression along with an increase in lipogenic SREBP-1c transcripts and a decrease in MTP gene expression involved in lipogenesis and VLDL production, respectively. Exercise training did not circumvent the AD-induced metabolic events.

The present study is the first to report an important decrease in FXR transcripts following an atherogenic diet. FXR mRNA levels are controlled by bile acids [20] so as to protect hepatocytes against the deleterious effects of increased bile acid levels by inhibiting endogenous bile acid synthesis and accelerating excretion. FXR dysfunction has been associated with several pathologies including hepatic steatosis, intrahepatic cholestasis, biliary tract cancer, and hypoxia [11, 21–23]. Taking into account these observations, it is likely that the present downregulation of FXR gene expression is a factor associated with the accumulation of TAG and cholesterol in liver of AD animals. Accordingly, therapeutic activation of FXR has been recently suggested as a treatment for NAFLD [24].

In association with the 70 % decrease of hepatic FXR, we found a 250–400 % increase in SREBP-1c gene expression. FXR activation is required to suppress SREBP-1c gene expression [25]. The present increase in SREBP-1c transcripts suggests enhanced lipogenesis in liver that could contribute to hepatic steatosis in AD-fed animals. In

addition to increasing lipogenesis, FXR repression would also decrease very low density lipoprotein synthesis by repressing the expression of MTP and apolipoprotein B [26]. Accordingly, MTP gene expression was largely decreased in liver of the present AD-fed rats suggesting a reduction in VLDL synthesis and exportation that could likely contribute to fat and cholesterol accumulation. Indeed, we previously reported that inhibition of MTP action results in large accumulation of lipids in liver [27]. Another target gene for FXR is ABCG5/G8 transporters that play a major role for biliary cholesterol efflux [28, 29]. Biliary excretion of cholesterol via ABCG5/8 is positively regulated by FXR [30]. FXR and ABCG8 were proportionally decreased (70 %), while the ABCG5 was increased in AD-fed rats (Fig. 3c, d). To form a functional heterodimer, both ABCG5 and ABCG8 are needed. In this sense, a decrease in ABCG8 transcripts with the AD might have invalidated the whole complex.

Surprisingly, the present AD did not influence bile acid synthesis as evaluated from the absence of effects on Cyp7 α 1 transcripts. The conversion of cholesterol into bile acids by Cyp7 α 1 is repressed by FXR and activated by LXR. However, there is evidence that LXR alpha is the dominant regulator of CYP7A1 and the absence of changes in LXR following the present AD may explain the absence of changes in Cyp7 α 1 [31]. On the other hand, the regulation of Cyp7 α 1 by an atherogenic diet is not consistent in the literature, and an absence of effect of an atherogenic diet on Cyp7 α 1 expression has been reported [32]. Accompanying the large cholesterol accumulation in liver under the AD diet, there was a strong repression (70 %) of HMG-CoA reductase and squalene synthase gene expression suggesting a repression of cholesterol biosynthesis. However, we did not observe any change in gene expression of liver ACAT following the AD diet. It has been

reported in human and monkey that cholesterol supplementation stimulates ACAT expression and activity [33]. The absence of change in ACAT transcripts following the AD diet might, therefore, have contributed to the retention of cholesterol in liver.

Besides liver, FXR also plays a key role in the intestine with respect to regulation of bile acids [34]. Opposite to what we observed in liver, FXR gene expression in the jejunum was not changed by the AD diet. In addition, NPC1L1 along with ABCG5/G8 transcripts involved in cholesterol trafficking in intestine were not affected by the atherogenic diet. At first glance, these results suggest that the intestine did not actively contribute to the present fat and cholesterol accumulation in liver of AD-fed rats. However, plasma LDL cholesterol levels are positively correlated to cholesterol absorption in humans [35]. It also appears that NPC1L1 protein is crucial for cholesterol absorption [36, 37]. Even though NPC1L1 gene expression was unchanged by the AD, the high level of plasma cholesterol measured strongly suggests that total cholesterol absorption was increased by the AD diet. However, the present results would suggest that NPC1L1 is not involved.

Under the present AD intervention, the exercise training program failed to affect hepatic triglycerides and cholesterol accumulation as well as most gene transcripts. In view of the previously reported positive effects of exercise on liver fat accumulation [16], it is likely that the absence of response may be due to the powerful effect of the diet [18]. An unexpected effect was that physical activity had an exacerbating effect on hepatic cholesterol accumulation in the AD-fed rats. This might be due to an increase in plasma cholesterol transport back to the liver [38]. On the other hand, it is more difficult to explain the increase in the lipogenic transcription factor SREBP-1c with training in rats

fed the AD. This paradoxical response might simply be a reflection of the fact that exercise training did not alleviate the metabolic consequences of the present atherogenic diet. This is consistent with a report published almost 50 years ago, indicating that regular exercise is not sufficient to prevent or reduce lipids accumulation in high-cholesterol-fed rats [18].

On the other hand, exercise training in SD-fed animals was associated with an increase in gene expression of NPC1L1 and ABCG5/G8 in the jejunum. The increase in NPC1L1 transcripts is contrary to a previous report in which voluntary exercise decreased intestinal NPC1L1 as well as cholesterol absorption plasma markers in mice [39]. However, it has been reported that endurance exercise in human significantly increased campesterol and sitosterol, two important markers of cholesterol absorption, suggesting that exercise stimulates intestinal cholesterol absorption [40]. Ultimately, it seems that the increase of NPC1L1 is compensated for by the increase of jejunal ABCG5/G8 expression, suggesting that exercise favored intestinal cholesterol efflux. Accordingly, it has recently been reported an increase in fecal cholesterol excretion in exercising animals [41].

The large increase in liver TAG content (400 %) under the present AD diet is surprising in view of previous works showing that the same HF diet without cholesterol resulted in a maximum of 50 % increase in liver TAG [16, 42]. This strongly suggests that the addition of cholesterol to the HF diet accentuated liver fat accumulation. Indeed, previous works clearly indicate that dietary cholesterol combined to dietary fat is particularly efficient in stimulating hepatic TAG and cholesterol accumulation [1, 4, 43, 44]. An intriguing observation of the present study is that in spite of the high fat

content of the AD, there was no gain in intra-abdominal fat pad weights. In previous studies, it was clearly established that supplementing a normal or a high-fat diet with cholesterol is associated with TAG and cholesterol trapping in liver [3, 44–46]. However, it is not clearly established if the addition of cholesterol to a high-fat diet reduces the diet-induced fat mass gain. In one study [46], it was reported that the addition of cholesterol to a saturated fat diet reduced the amount of retroperitoneal fat compared to an unsaturated fat diet. The addition of cholesterol to a high-fat diet also been reported to result in an absence of gain of epididymal fat pad weight as compared to a normal diet [44]. Resistance to high-fat diet-induced weight gain has also been reported in FXR^{-/-} mice and attributed to increased energy expenditure in these mice [47]. However, liver-specific FXR^{-/-} mice were not protected from diet-induced obesity [48]. The authors mentioned that this is a surprising result considering the importance of hepatic FXR for the metabolic control of lean mice. On the whole, further works will be needed to clarify the mechanism through which and AD and/or an attenuation of FXR transcripts protects against diet-induced obesity.

In summary, results of the present study indicate that the atherogenic diet-induced accumulation of TAG and cholesterol is associated with a substantial decrease in gene expression of the FXR nuclear receptor. The decrease in FXR transcripts was accompanied with an increase in the SREBP-1c transcription factor and a decrease in the transfer protein MTP suggesting an increased lipogenesis and a decreased VLDL production. Alternatively, FXR gene expression was not altered by the diet in the jejunum.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; T 0602 145.02) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC; 7594).

Conflict of interest

All authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Comhair TM, Garcia Caraballo SC, Dejong CH, Lamers WH, Kohler SE (2011) Dietary cholesterol, female gender and n-3 fatty acid deficiency are more important factors in the development of non-alcoholic fatty liver disease than the saturation index of the fat. *Nutr Metab (Lond)* 8:4
2. Treguier M, Briand F, Boubacar A, Andre A, Magot T, Nguyen P, Krempf M, Sulpice T, Ouguerram K (2011) Diet-induced dyslipidemia impairs reverse cholesterol transport in hamsters. *Eur J Clin Invest* 41(9):921–928
3. Wang YM, Zhang B, Xue Y, Li ZJ, Wang JF, Xue CH, Yanagita T (2010) The mechanism of dietary cholesterol effects on lipids metabolism in rats. *Lipids Health Dis* 9:4
4. Subramanian S, Goodspeed L, Wang S, Kim J, Zeng L, Ioannou GN, Haigh WG, Yeh MM, Kowdley KV, O'Brien KD et al (2011) Dietary cholesterol exacerbates hepatic steatosis and inflammation in obese LDL receptor-deficient mice. *J Lipid Res* 52(9):1626–1635
5. Bhatena J, Kulamarva A, Martoni C, Malgorzata A, Malhotra UM, Paul A, Prakash S (2011) Diet-induced metabolic hamster model of nonalcoholic fatty liver disease. *Diabetes Metab Syndr Obes* 4:195–203
6. Wojcicka G, Jamroz-Wisniewska A, Horoszewicz K, Beltowski J (2007) Liver X receptors (LXRs). Part I: structure, function, regulation of activity, and role in lipid metabolism. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 61:736–759

7. Redinger RN (2003) Nuclear receptors in cholesterol catabolism: molecular biology of the enterohepatic circulation of bile salts and its role in cholesterol homeostasis. *J Lab Clin Med* 142(1):7–20
8. Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ (1996) An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* 383(6602):728–731
9. Cipriani S, Mencarelli A, Palladino G, Fiorucci S (2010) FXR activation reverses insulin resistance and lipid abnormalities and protects against liver steatosis in Zucker (fa/fa) obese rats. *J Lipid Res* 51(4):771–784
10. Kong B, Luyendyk JP, Tawfik O, Guo GL (2009) Farnesoid X receptor deficiency induces nonalcoholic steatohepatitis in low-density lipoprotein receptor-knockout mice fed a high-fat diet. *J Pharmacol Exp Ther* 328(1):116–122
11. Yang ZX, Shen W, Sun H (2010) Effects of nuclear receptor FXR on the regulation of liver lipid metabolism in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Int* 4(4):741–748
12. Correa Antunez MI, Moran Penco JM, Amaya Lozano JL, Leal Macho A, Macia Botejara E, Saenz Santamaria J (2010) Changes in the fat composition and histomorphology of the liver after partial intestinal resections. *Nutr Hosp* 25(6):999–1005
13. Yoshida M (2011) Novel role of NPC1L1 in the regulation of hepatic metabolism: potential contribution of ezetimibe in NAFLD/NASH treatment. *Curr Vasc Pharmacol* 9(1):121–123

14. Zhu Y, Li F, Guo GL (2011) Tissue-specific function of farnesoid X receptor in liver and intestine. *Pharmacol Res* 63(4):259–265
15. Frith J, Newton JL (2010) Liver disease in older women. *Maturitas* 65(3):210–214
16. Gauthier MS, Couturier K, Latour JG, Lavoie JM (2003) Concurrent exercise prevents high-fat-diet-induced macrovesicular hepatic steatosis. *J Appl Physiol* 94(6):2127–2134
17. Meissner M, Havinga R, Boverhof R, Kema I, Groen AK, Kuipers F (2010) Exercise enhances whole-body cholesterol turnover in mice. *Med Sci Sports Exerc* 42(8):1460–1468
18. Gollnick PD (1963) Chronic effect of exercise on liver cholesterol of normal and hypercholesteremic rats. *Am J Physiol* 205:453–456
19. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226(1):497–509
20. Xu G, Pan LX, Li H, Forman BM, Erickson SK, Shefer S, Bollineni J, Batta AK, Christie J, Wang TH et al (2002) Regulation of the farnesoid X receptor (FXR) by bile acid flux in rabbits. *J Biol Chem* 277(52):50491–50496
21. Fujino T, Murakami K, Ozawa I, Minegishi Y, Kashimura R, Akita T, Saitou S, Atsumi T, Sato T, Ando K et al (2009) Hypoxia downregulates farnesoid X receptor via a hypoxia-inducible factor-independent but p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *FEBS J* 276(5):1319–1332
22. Shi QY, Lin YG, Zhou X, Lin YQ, Yan S (2010) Expression of FXR mRNA, PPAR alpha mRNA and bile acid metabolism related genes in intrahepatic cholestasis of pregnant rats. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 18(12):927–930

23. Zhong XY, Yu JH, Zhang WG, Wang ZD, Dong Q, Tai S, Cui YF, Li H (2012) MicroRNA-421 functions as an oncogenic miRNA in biliary tract cancer through down-regulating farnesoid X receptor expression. *Gene* 493(1):44–51
24. Fuchs M (2012) Non-alcoholic Fatty liver disease: the bile Acid-activated farnesoid x receptor as an emerging treatment target. *J Lipids* 2012:934396
25. Watanabe M, Houten SM, Wang L, Moschetta A, Mangelsdorf DJ, Heyman RA, Moore DD, Auwerx J (2004) Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. *J Clin Invest* 113(10):1408–1418
26. Zhang Y, Castellani LW, Sinal CJ, Gonzalez FJ, Edwards PA (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha) regulates triglyceride metabolism by activation of the nuclear receptor FXR. *Genes Dev* 18(2):157–169
27. Chapados NA, Lavoie JM (2010) Exercise training increases hepatic endoplasmic reticulum (er) stress protein expression in MTP-inhibited high-fat fed rats. *Cell Biochem Funct* 28(3):202–210
28. Kosters A, Frijters RJ, Schaap FG, Vink E, Plosch T, Ottenhoff R, Jirsa M, De Cuyper IM, Kuipers F, Groen AK (2003) Relation between hepatic expression of ATP-binding cassette transporters G5 and G8 and biliary cholesterol secretion in mice. *J Hepatol* 38(6):710–716
29. Yu L, Gupta S, Xu F, Liverman AD, Moschetta A, Mangelsdorf DJ, Repa JJ, Hobbs HH, Cohen JC (2005) Expression of ABCG5 and ABCG8 is required for regulation of biliary cholesterol secretion. *J Biol Chem* 280(10):8742–8747

30. Lambert G, Amar MJ, Guo G, Brewer HB Jr, Gonzalez FJ, Sinal CJ (2003) The farnesoid X-receptor is an essential regulator of cholesterol homeostasis. *J Biol Chem* 278(4):2563–2570
31. Gupta S, Pandak WM, Hylemon PB (2002) LXR alpha is the dominant regulator of CYP7A1 transcription. *Biochem Biophys Res Commun* 293(1):338–343
32. Ando H, Tsuruoka S, Yamamoto H, Takamura T, Kaneko S, Fujimura A (2005) Regulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase mRNA expression in C57BL/6 mice fed an atherogenic diet. *Atherosclerosis* 178(2):265–269
33. Pramfalk C, Angelin B, Eriksson M, Parini P (2007) Cholesterol regulates ACAT2 gene expression and enzyme activity in human hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 364(2):402–409
34. Gadaleta RM, van Mil SW, Oldenburg B, Siersema PD, Klomp LW, van Erpecum KJ (2010) Bile acids and their nuclear receptor FXR: relevance for hepatobiliary and gastrointestinal disease. *Biochim Biophys Acta* 1801(7):683–692
35. Alvaro A, Rosales R, Masana L, Vallve JC (2010) Polyunsaturated fatty acids down-regulate in vitro expression of the key intestinal cholesterol absorption protein NPC1L1: no effect of monounsaturated nor saturated fatty acids. *J Nutr Biochem* 21(6):518–525
36. Levy E, Spahis S, Sinnott D, Peretti N, Maupas-Schwalm F, Delvin E, Lambert M, Lavoie MA (2007) Intestinal cholesterol transport proteins: an update and beyond. *Curr Opin Lipidol* 18(3):310–318

37. Altmann SW, Davis HR Jr, Zhu LJ, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, Iyer SP, Maguire M, Golovko A, Zeng M et al (2004) Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* 303(5661):1201–1204
38. Durstine JL, Grandjean PW, Davis PG, Ferguson MA, Alderson NL, DuBose KD (2001) Blood lipid and lipoprotein adaptations to exercise: a quantitative analysis. *Sports Med* 31(15):1033–1062
39. Meissner M, Havinga R, Boverhof R, Kema I, Groen AK, Kuipers F (2010) Exercise enhances whole-body cholesterol turnover in mice. *Med Sci Sports Exerc* 42(8):1460–1468
40. Wilund KR, Feeney LA, Tomayko EJ, Weiss EP, Hagberg JM (2009) Effects of endurance exercise training on markers of cholesterol absorption and synthesis. *Physiol Res* 58(4):545–552
41. Meissner M, Lombardo E, Havinga R, Tietge UJ, Kuipers F, Groen AK (2011) Voluntary wheel running increases bile acid as well as cholesterol excretion and decreases atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Atherosclerosis* 218(2):323–329
42. Gauthier MS, Favier R, Lavoie JM (2006) Time course of the development of non-alcoholic hepatic steatosis in response to high-fat diet-induced obesity in rats. *Br J Nutr* 95(2):273–281
43. Basciano H, Miller AE, Naples M, Baker C, Kohen R, Xu E, Su Q, Allister EM, Wheeler MB, Adeli K (2009) Metabolic effects of dietary cholesterol in an animal model of insulin resistance and hepatic steatosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297(2):E462–E473

44. Matsuzawa N, Takamura T, Kurita S, Misu H, Ota T, Ando H, Yokoyama M, Honda M, Zen Y, Nakanuma Y et al (2007) Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. *Hepatology* 46(5):1392–1403
45. Yiu WF, Kwan PL, Wong CY, Kam TS, Chiu SM, Chan SW, Chan R (2011) Attenuation of fatty liver and prevention of hypercholesterolemia by extract of *Curcuma longa* through regulating the expression of CYP7A1, LDL-receptor, HO-1, and HMG-CoA reductase. *J Food Sci* 76(3):H80–H89
46. Koopmans SJ, Dekker R, Ackermans MT, Sauerwein HP, Serlie MJ, van Beusekom HM, van den Heuvel M, van der Giessen WJ (2011) Dietary saturated fat/cholesterol, but not unsaturated fat or starch, induces C-reactive protein associated early atherosclerosis and ectopic fat deposition in diabetic pigs. *Cardiovasc Diabetol* 10:64
47. Zhang Y, Ge X, Heemstra LA, Chen WD, Xu J, Smith JL, Ma H, Kasim N, Edwards PA, Novak CM (2012) Loss of FXR protects against diet-induced obesity and accelerates liver carcinogenesis in ob/ob mice. *Mol Endocrinol* 26(2):272–280
48. Prawitt J, Abdelkarim M, Stroeve JH, Popescu I, Duez H, Velagapudi VR, Dumont J, Bouchaert E, van Dijk TH, Lucas A et al (2011) Farnesoid X receptor deficiency improves glucose homeostasis in mouse models of obesity. *Diabetes* 60(7):1861–1871

Chapitre 4 : Article original 3

Titre:

Estrogen deficiency and high fat/high cholesterol diet concomitantly stimulate hepatic lipids and cholesterol accumulation: impaired VLDL assembly?

Auteurs:

Isabelle Côté, Natalie A. Chapados et Jean-Marc Lavoie

Article soumis à Br J Nutr

Estrogen deficiency and high fat/high cholesterol diet concomitantly stimulate hepatic lipids and cholesterol accumulation: impaired VLDL assembly?

Isabelle Côté¹, Natalie A. Chapados², and Jean-Marc Lavoie¹

¹Department of Kinesiology Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

²Montfort Hospital Research Institute, Ottawa, Ontario, Canada

Short title: Hepatic cholesterol in ovariectomized rats

Abstract

The purpose of the study was to determine the effect of a high fat-high cholesterol (HFHC) diet and ovariectomy (Ovx) on liver fat and cholesterol accumulation and how they affect molecular markers of VLDL assembly. Rats were either Ovx or sham-operated (Sham) and fed one of the following diets: standard (SD), HF, HF + 0.25 % cholesterol (HFHC (0.25%)) or HF + 0.5% cholesterol (HFHC (0.5%)) for 6 weeks. Ovx resulted in higher liver TAG ($P < 0.001$) concentrations than Sham rats under all dietary interventions. All animals fed HFHC diets had higher liver TAG ($P < 0.05$) compared to SD fed rats. Surprisingly, hepatic cholesterol was Ovx higher ($P < 0.001$) in Ovx than in Sham animals only when fed HFHC diets. Sham animals fed the HFHC diets accumulated more ($P < 0.01$) hepatic cholesterol than SD-fed animals. Interestingly, liver cholesterol in Ovx fed HFHC diets reached up to 520% of levels measured in Sham-SD animals. To go one step further, we found that microsomal triglyceride transfer protein (MTP), a key molecule involved in VLD synthesis, was lower ($P < 0.01$) in Ovx than in Sham rats and in all animals fed HFHC diets as compared to SD-fed animals. The combination of Ovx and HFHC diets repressed MTP transcripts to levels as low as 31% of levels measured in Sham-SD-fed animals. It is concluded that HFHC diets and Ovx concomitantly potentiate hepatic lipids and cholesterol accumulation and that these effects may be mediated by defects in VLDL production.

Key words: dietary cholesterol, dietary lipids, MTP, hepatic steatosis, hepatic cholesterol accumulation.

Introduction

It is well documented that dietary cholesterol stimulates liver fat accumulation^(1,2). Specifically, it has been reported that dietary cholesterol induces hepatic inflammation^(1, 3, 4), decreases biliary cholesterol secretion⁽⁵⁾, increases fatty acid synthesis⁽⁶⁾, and stimulates liver lipogenesis^(1, 7), all contributing to the development of hepatic steatosis. Dietary cholesterol itself has a strong steatotic potential that is exacerbated by dietary lipids, thus indicating a synergism between these two nutrients⁽⁸⁻¹⁰⁾. This synergism was recently confirmed by Savard *et al.* who reported that hepatic lipid levels upon HFHC diet were higher than the sum of levels obtained by consumption of each dietary component alone⁽¹¹⁾.

Similarly to dietary cholesterol, estrogen deficiency alters lipid and cholesterol metabolism by inducing hepatic steatosis and plasma hypercholesterolemia⁽¹²⁾. Livers of ovariectomized (Ovx) rats, an estrogen deficiency model, are more prone to triacylglycerol (TAG) and total cholesterol (TC) accumulation following a high fat diet⁽¹³⁾. In line with these observations, Kamada *et al.* recently reported that estrogens withdrawal exacerbated hepatic steatosis in mice fed a HFHC diet [14]. However, the authors of this study used a very high cholesterol level diet (1.25 %) aiming at inducing steatohepatitis. Hence, it remains unclear whether a HFHC diet with a lower cholesterol level (0.25 %) in absence of estrogens will result in a large hepatic fat and cholesterol accumulation.

We previously reported that very low density lipoprotein (VLDL) production and gene expression of key related enzymes, especially microsomal transfer protein (MTP), are decreased in Ovx rats^(15, 16). Similarly to Ovx, estrogen receptor blocker, *acolbifene*, has been reported to induce hepatic steatosis along with a decrease in liver MTP gene expression hence supporting the fact that estrogens withdrawal impairs VLDL production⁽¹⁷⁾. Dietary cholesterol has also been shown to increase cholesterol ester (CE) storage in hepatocytes and to reduce hepatic VLDL-TAG secretion resulting in neutral lipids retention within the liver⁽¹⁸⁾. Based on this information, we postulated that HFHC diets would favour liver lipid accumulation through disrupting VLDL assembly and that these responses will be exacerbated by estrogen withdrawal. To test this hypothesis, we targeted key molecules involved in VLDL synthesis including microsomal triglyceride

transfer protein (MTP), diacylglycerol acyltransferase 2 (DGAT-2) involved in converting fatty acids into TAG, and acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase 2 (ACAT-2) that converts free cholesterol into CE, also an essential component of VLDL secretion ⁽¹⁹⁾. Involved in the second phase of VLDL assembly, the maturation, we also targeted small GTP-binding protein a (Sar1a) that transfers particles from the ER compartment to the Golgi complex, and cell death-inducing like-effector type B (Cideb) that plays a role in determining VLDL particle size.

In addition to VLDL production, bile acids metabolism could also be involved in liver fat accumulation in Ovx rats under HFHC feeding. We recently reported that HFHC diet suppressed farnesoid X receptor (FXR) gene expression, a nuclear receptor involved in hepatic bile acids, cholesterol and lipid metabolism ⁽¹⁰⁾. Since FXR deficiency induces hepatic fat accumulation ⁽²⁰⁾, lower FXR gene expression is a potential mechanism associated with hepatic steatosis development. Bile duct ligation has become a novel model for hepatic steatosis, thus demonstrating a key role of bile acid excretion pathway on hepatic lipids homeostasis ⁽²¹⁾. To evaluate the contribution of bile acids in hepatic fat accumulation, we measured key molecules involved in bile acid homeostasis including hepatic FXR and its target genes sterol 12-alpha-hydroxylase (Cyp8b1), which converts cholesterol into bile acids ⁽²²⁾, and bile salt export pump (BSEP), which stimulates bile acid excretion ⁽²³⁾.

The aim of the present study was to investigate synergic action of dietary lipids and cholesterol (HFHC diet) under normal and estrogen deficient state on hepatic fat and cholesterol accumulation. To explore possible underlying mechanisms, we measured gene expression of key molecules involved in lipids, cholesterol and bile acids metabolism, mainly targeting key markers of VLDL synthesis.

Experimental methods

Animal care

Female Sprague-Dawley rats ($n=64$) weighing 190-210 g were obtained from Charles River (St-Constant, PQ, Canada) and were housed individually to monitor food intake in each animal. The 12: 12-h light-dark cycle started at 06:00 and the room temperature was maintained at 20-23°C. Animals had free access to food and water. Body weight and food intake were monitored twice a week. All experiments in this report were conducted according to the ARRIVE guidelines for animal research and the directives of the Canadian Council on Animal Care after institutional approval (CDEA: 12-108)

Diets and surgery

One week after their arrival rats were either sham-operated ($n = 32$) or ovariectomized (Ovx, $n=32$) according to the technique described by Robertson *et al.* ⁽²⁴⁾. Animals were injected with antibiotics (Tribrissen 24 %; 0.125 cc/kg, sc) and analgesic (Carprofen; 4.4 mg/kg, sc) for 3 days, starting the day of the surgery. Thereafter, Ovx and Sham rats were randomly assigned one of the following 4 diets: standard (SD), high fat (HF), HF + 0.25 % cholesterol (HFHC (0.25 %)) or HF + 0.5 % cholesterol (HFHC (0.5 %)) described in Table 1.

Blood and tissue sampling

Six weeks after surgeries, rats were sacrificed between 09:00AM and 12:00PM. Any remaining food was removed from the animal's cage at least 12 h before sacrifice. Immediately after complete anesthesia with isoflurane, the abdominal cavity was opened following the median line of the abdomen. Blood was collected into syringes treated with EDTA (15%) and centrifuged (3000 rpm; 4°C; 10 min; Beckman GPR Centrifuge). After blood collection, the liver median lobe was removed and freeze-clamped. The uterus, mesenteric, urogenital, retroperitoneal, and subcutaneous fat deposits were removed and weighed (Mettler AE 100). All tissues and plasma samples were stored at -80°C until analyses were performed.

Molecular analyses

Total RNA was extracted from liver with the use of RNA extraction Mini kits (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. RNA was, thereafter, treated with

DNase (Invitrogen) to avoid genomic contamination. Two ug of total RNA was reverse transcribed into cDNA using high capacity cDNA reverse transcription kits (Applied Biosystems). RT samples were stored at -20°C. Gene expression for target genes was determined using assays designed with the Universal Probe Library. The primer sets and UPL probe numbers are presented in Table 2. The ABI PRISM® 7900HT (Applied Biosystems) was used to detect the amplification level and was programmed with an initial step of 3 min at 95°C, followed by 40 cycles of 5 s at 95°C and 30 sec at 60°C. All reactions were run in triplicate and the average of threshold cycle (CT) was used for quantification. The relative quantification of target genes was determined using the $\Delta\Delta CT$ method. Briefly, the CT values of target genes were normalized to an endogenous control gene (beta actin) ($\Delta CT = Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{beta actin}}$) and compared with a calibrator: $\Delta\Delta CT = \Delta Ct_{\text{Sample}} - \Delta Ct_{\text{Calibrator}}$. Relative expression (RQ) was calculated using the Sequence Detection System (SDS) 2.2.2 software (Applied Biosystems) and the formula is $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$.

Liver and plasma lipids measurements

Liver TAG concentration was estimated from glycerol released after ethanolic KOH hydrolysis by a colorimetric method using commercial kits from Sigma (St-Louis, Missouri, USA). To measure liver cholesterol, liver lipids were extracted using an adapted procedure developed by Folch et al. ⁽²⁵⁾. Homogenate of liver in a chloroform-methanol solution (2:1) was filtrated and rinsed with chloroform. Methanol and water (20 % of the filtrate volume each) were added to the filtrated solution. After vortexing, the solution with water and methanol was centrifuged for 20 min at 2400 rpm. The lower phase was transferred to clean tubes and evaporated overnight at 30°C. The dried lipid residues were dissolved in 0.2 ml of triton X100-isopropanol solution (10 %). Total cholesterol was measured with enzymatic kits (Wako; Osaka, Japan). Plasma total cholesterol, HDL-cholesterol (HDL-C), and triglycerides (TAG) were measured using the COBAS INTEGRA 400 analyzer (Roche Diagnostic, Montreal, Canada). Total cholesterol, HDL-cholesterol and TAG values were used in the Friedewald formula to calculate LDL-cholesterol (LDL-C) concentration.

Statistical analysis

Values are expressed as mean \pm SE. Differences between means were tested for statistical significance ($P < 0.05$) using a two-way ANOVA for non-repeated measures with Ovx surgery and diets as main factors. Fisher LSD post hoc test was used in the event of a significant interaction effect ($P < 0.05$). In a case of significant diet effect without interaction, a Fisher LSD from a one-way ANOVA was performed.

Results

Anthropometric parameters

Under all dietary conditions, estrogen withdrawal increased food intake ($P < 0.001$) and induced several changes in body composition including higher final body weight ($P < 0.001$), intra-abdominal fat pads ($P < 0.001$) and subcutaneous adiposity ($P < 0.05$; Table 3). Lower uterus weight in Ovx compared to Sham animals confirmed total ovariectomy (Table 3). In Sham and Ovx rats, HF and HFHC (0.25 %) diets did not affect intra-abdominal and subcutaneous fat deposits, food intake, and final bodyweight. However, Sham and Ovx animals fed the HFHC (0.5 %) diet had higher food intake ($P < 0.01$) and final bodyweight ($P < 0.01$) (Table 3).

Liver lipids

As expected, estrogen withdrawal significantly increased liver TAG (37 to 78 %; $P < 0.001$) in all dietary interventions compared to corresponding Sham group (Fig. 1A). In Sham animals fed the two HFHC diets, liver TAG levels were increased by 90 % (27.4 ± 3.4 vs 14.4 ± 1.7 mg/g ; $P < 0.01$) (0.25 % HC) and 76 % (25.4 ± 3.3 vs 14.4 ± 1.7 mg/g; $P < 0.05$) (0.5 % HC) compared to SD fed rats. Interestingly, estrogen withdrawal and the two HFHC diets concomitantly induced higher level of hepatic steatosis. In fact, liver TAG levels in Ovx-HFHC diets fed animals reached up to 151 % of levels found in Ovx-SD fed rats and up to 270 % of levels measured in Sham-SD fed rats. Liver total cholesterol (TC) content was not increased in Ovx compared to Sham rats when fed SD and HF diets (Fig. 1B). However, under both HFHC diets, liver TC content in Ovx rats was 131 % (0.25 % HC; $P < 0.001$) and 144 % (0.5 % HC; $P < 0.001$) higher than values measured in corresponding Sham animals (Fig. 1B). In response to HFHC diets, hepatic TC levels in Sham rats were 170 % (0.25 % HC; $P < 0.001$) and 280 % (0.5 % HC; $P < 0.001$) of levels reported in Sham-SD fed animals. In Ovx animals fed the two HFHC diets liver TC values reached 270-400 % ($P < 0.01$) of values measured in Ovx-SD and 350-520 % ($P < 0.001$) of values measured in Sham-SD animals, indicating a concomitant increase (Fig. 1B).

Plasma lipids

Plasma TAG concentrations were higher ($P < 0.05$) following estrogens withdrawal under all dietary interventions (Fig. 1C). In spite of a large increase in liver

TAG following HFHC diets, plasma TAG levels were lowered by 40-64 % ($P < 0.001$) in Sham as well as in Ovx rats compared to their corresponding SD fed group (Fig. 1C). On the other hand, the effect of Ovx on plasma TC was largely influenced by dietary conditions. Under the SD diet, plasma TC concentrations in Ovx animals were higher by 64 % (2.87 vs 1.75 mmol/L; $P < 0.01$) compared to Sham rats while differences between Sham and Ovx animals were attenuated under HF and HFHC (0.25 %) diets (Fig. 1D). Surprisingly, increasing the dietary cholesterol content to 0.5 % (HFHC) reversed the effect of estrogen withdrawal on plasma TC reported in SD-fed animals. Indeed, in response to HFHC (0.5 %), plasma TC in Ovx animals was 28% lower compared to the corresponding Sham group (2.72 vs 3.74 mmol/L; $P < 0.05$). By comparison, plasma TC levels in response to the two HFHC diets was more linear in Sham than in Ovx rats with increases reaching 56 ($P < 0.05$) (0.25 % HC) and 113 % ($P < 0.01$) (0.5 % HC) compared to SD fed animals (Fig. 1D).

Plasma lipoproteins profile

Estrogens withdrawal induced several changes in serum lipoproteins levels. Under SD and HF diets, Ovx rats showed higher VLDL-C ($P < 0.05$), LDL-C ($P < 0.01$) and HDL-C levels ($P < 0.001$) compared to Sham rats (Fig. 2). In all animals, ingesting the HF diet did not change VLDL-C and LDL-C but decreased ($P < 0.01$) HDL-C levels compared to SD fed animals. In Sham as well as in Ovx groups, both HFHC diets decreased VLDL-C ($P < 0.001$), increased LDL-C ($P < 0.01$) and decreased HDL-C ($P < 0.001$) levels compared to SD fed groups. However, similarly to plasma TC, HFHC diets inverted the effect of Ovx on LDL-C levels. More specifically, under the two HFHC diets, Ovx rats showed lower LDL-C level by 47 % (0.25 % HC; $P < 0.01$) and by 57 % (0.5 % HC; $P < 0.01$) compared to their corresponding Sham group (Fig. 2).

Molecular markers of VLDL assembly and secretion

Gene expression of MTP and DGAT-2, two key molecules in VLDL assembly, was lower ($P < 0.001$) in Ovx animals and this, regardless of dietary interventions (Fig. 3A, B). In addition, gene expressions of apoB-100, ACAT-2, Sar1a, and Cideb, also involved in VLDL synthesis and secretion, were lower ($P < 0.001$) in Ovx than in Sham rats in all dietary interventions (Fig. 3E, F). In Sham and Ovx animals, both HFHC diets were associated with lower ($P < 0.001$) MTP gene expression (Fig. 3A). Considering the

cumulative effects, Ovx-HFHC animals depicted such a large decrease in MTP gene expression that levels dropped as low as 31 % of level reported in Sham-SD rats.

Molecular marker of cholesterol metabolism

Gene expressions of nuclear receptors FXR and LXR were lower ($P < 0.05$ and $P < 0.001$) in Ovx than in Sham animals and this, following all dietary interventions (Fig. 4A, B). In Sham as well as in Ovx rats, both HFHC diets decreased FXR gene expression ($P < 0.01$) while only the (0.5 % HC) diet downregulated LXR gene expression ($P < 0.01$). Regardless of dietary conditions, estrogen withdrawal decreased hepatic Cyp8b1 and BSEP suggesting that synthesis and excretion of bile acids are decreased in Ovx animals (Fig. 4C, D). In addition, HFHC diets further decreased Cyp8b1 levels ($P < 0.001$) in Sham as well as in Ovx while BSEP was not affected by these dietary interventions (Fig. 4C). Finally, transcripts of canalicular cholesterol excretion transporters ABCG5/G8 were not affected by estrogen withdrawal. However, gene expression of ABCG5/G8 was 2 to 3-fold higher ($P < 0.01$) in Ovx and Sham animals fed the HF diet compared to the SD diet.

Gene expression of sterol regulatory element binding protein 2 (SREBP-2) and its target genes LDL receptor (LDLr) and 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase (HMG-CoAr) were downregulated ($P < 0.001$) in Ovx compared to Sham rats in SD and HF conditions (Fig. 5A, C). In Sham, HF diet did not affect SREBP-2 and LDLr but stimulated ($P < 0.05$) HMG-CoAr gene expression (Fig. 5A, C). However, adding cholesterol to the HF diet highly suppressed SREBP-2 ($P < 0.01$), LDLr ($P < 0.001$) and HMG-CoA ($P < 0.05$) gene expressions in Sham rats. On the other hand ingesting HFHC diets did not further decreased gene expression of SREBP-2, LDLr and HMG-CoAr transcripts in Ovx animals (Fig. 4C, D).

Discussion

The main finding of the present study was that estrogen withdrawal combined to HFHC diets concomitantly stimulated hepatic TAG and cholesterol accumulation. Additionally, our experiments uncovered a potential novel mechanism through which Ovx and HFHC diets may collectively enhance hepatic steatosis: a defect in VLDL assembly.

Estrogen withdrawal and HFHC diets concomitantly stimulated hepatic steatosis

The first aim of the present study was to investigate the synergic action of dietary lipids and cholesterol (HFHC diets) under an estrogen deficiency state on the development of hepatic steatosis. We report that liver TAG was higher by 37 to 78 % in all Ovx compared to Sham rats fed corresponding diets. More importantly, highest liver TAG levels were measured in Ovx animals fed HFHC diets reaching up to 270 % of level measured in Sham-SD animals. The propensity of Ovx rats to accumulate liver TAG has been well characterized^(13, 16). Several mechanisms have been identified as contributing to Ovx-induced hepatic steatosis, including a decrease in liver lipid oxidation⁽²⁶⁾, a decrease in VLDL-TAG secretion⁽¹⁵⁾, and an increase in lipogenesis *de novo*⁽²⁷⁾. Notwithstanding these mechanisms, massive accumulation of liver TAG in Ovx rats fed HFHC diets may also result from diets themselves as a result of increased lipids arrival to the liver. Accordingly, liver TAG accumulation was largely increased by HFHC diets in Sham as well as in Ovx animals. In this sense, HFHC diets and Ovx simultaneously stimulated liver TAG accumulation thus generating a massive accumulation.

Estrogen withdrawal and HFHC diets concomitantly repressed VLDL assembly related enzymes

In search of an additional explanation for the severity of hepatic steatosis observed in Ovx rats fed HFHC diets we looked at molecular changes in enzymes involved in several steps of VLDL assembly and secretion. We observed that Ovx compared to Sham animals present substantially lower gene expressions of ACAT-2 and DGAT-2 enzymes involved in the synthesis of CE and TAG, respectively, components of VLDL lipid core^(28,29). In addition, MTP gene expression, a determinant enzyme interacting with the N-terminus of apoB allowing initial lipid transfer into nascent VLDL particles, was lower in Ovx compared to Sham animals⁽³⁰⁾. Finally, Cideb, a molecule

recently identified as implicated in VLDL lipidation, and Sar1 GTPase, involved in VLDL transfer from endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus were also both lower in Ovx compared to Sham animals. Collectively, these results are consistent with the interpretation that VLDL assembly is disrupted following estrogen withdrawal.

Besides estrogens withdrawal, it appears that HFHC feeding also disrupted VLDL assembly and secretion. MTP gene expression measured in all HFHC fed animals was decreased to levels as low as 31 % of levels reported in Sham-SD animals (Fig 3a). Similar decreases in MTP gene expression upon HFHC diets have been previously reported by us ⁽¹⁰⁾ and others ⁽¹¹⁾. In addition, we found that plasma TAG levels were largely reduced in Sham and Ovx rats fed the HFHC diets. Since liver provides the major source of plasma TAG under fasted state, it has been reported that fasted plasma TAG level can be considered as an indirect marker for hepatic VLDL production ⁽³¹⁾. Therefore, lower levels of fasted plasma TAG found in Sham and Ovx HFHC-fed animals further supports the possibility that HFHC feeding impairs liver VLDL secretion. Taken together, the present results suggest that impaired VLDL production contributes to hepatic lipid accumulation in Ovx animals as well as in all animals fed HFHC diets. Moreover, disruption of VLDL production is a mechanism that may explain the high liver TAG accumulation found in Ovx fed HFHC diets compared to all other groups.

Estrogen withdrawal and HFHC diets concomitantly stimulated hepatic cholesterol accumulation

Liver TC content was not changed in Ovx compared to Sham rats under the present SD and HF diets conditions. Similar findings have been previously reported ^(12, 14). However an increase in liver TC content in Ovx rats fed a HF diet was recently reported by our group ⁽¹³⁾. In the present study, liver TC accumulated in both Ovx and Sham rats following the HFHC diets and to a larger extent in Ovx than in Sham rats, indicating a synergistic action of these two interventions (Fig 1b). Liver TC accumulated in these animals in spite of the fact that cholesterol synthesis, as seen from HMG-CoAr, was decreased in Ovx rats and by the HFHC diets in Sham animals. An increase in TC content in liver of Ovx rats has been associated with a reduction in the transcripts of the transcription factor SREBP2 and its target gene LDLr ^(32, 33). Accordingly, SREBP2 and LDLr mRNA levels were decreased following Ovx and the HFHC diets in the present

study. A decrease in liver LDLr may explain the increase in plasma TC in Ovx animals under the present SD and HF diet conditions. On the other hand, the higher liver cholesterol levels found in Ovx compared to Sham rats fed HFHC diets might be related, as mentioned above, to a reduction in VLDL synthesis and secretion. An additional plausible explanation for hepatic cholesterol accumulation in Ovx animal fed HFHC diet is a decreased biliary acid synthesis and excretion. This view is supported by the observation that animals fed the HFHC diets had lower gene expression of FXR, the regulator of hepatic bile acid metabolism, and its target gene CYP8B1. The specific role of hepatic FXR is to initiate expression of a complete gene network involved in bile acids synthesis and excretion in order to prevent bile acids hepatotoxicity. Since bile acids are synthesized from cholesterol in hepatocytes, bile acid synthesis is also an important pathway to remove cholesterol from the liver⁽³⁴⁾. Furthermore, bile acids secretion exerts the driving force for biliary cholesterol excretion, another pathway for liver cholesterol output^(35, 36). The role of bile acids on liver lipids and cholesterol metabolism has been enlightened by the generation of FXR null mice, which depicted massive accumulation of TAG and cholesterol within hepatocytes⁽³⁷⁾. Dietary interventions, such as HFHC diets, have also been reported to repress hepatic FXR gene expression^(10, 11). The present decrease in FXR and CYP8B1 gene expression in Ovx animals and with the HFHC diets may thus be taking as an indication that bile acid metabolism may be reduced and in turn favours cholesterol accumulation in liver.

Disruption in bile acids metabolism might also be involved in the higher TC accumulation found in livers of Ovx compared to Sham animals. Estrogen withdrawal suppressed transcription factors FXR and LXR as well as CYP8B1 and BSEP gene expressions, enzymes involved in bile acid synthesis and excretion, respectively. In line with these results, Czerny *et al.* found a significant decrease of total bile production in Ovx rats⁽³⁸⁻⁴⁰⁾ thus supporting the hypothesis that biliary metabolic pathways are disrupted upon estrogen withdrawal. Since disrupted biliary metabolic pathways restrain hepatic cholesterol output, repression of key enzymes involved in bile acids excretion by estrogen withdrawal as well as by HFHC is consistent with the massive accumulation of liver TC in Ovx animals fed HFHC diets.

Ovx and HFHC diets differently affected plasma lipid profile

Several changes in plasma lipid profile were reported in Ovx rats, these responses being largely affected by the dietary interventions. As previously reported ⁽⁴¹⁾, Ovx animals had significantly higher plasma TC and LDL-C than Sham animals under the SD diet. Unexpectedly, this difference between Ovx and Sham animals was entirely abolished under HF and HFHC diets. An intriguing outcome was that under HFHC diets the difference between Ovx and Sham rats on plasma cholesterol was even reversed with higher levels in Sham than in Ovx animals. Given that these lower plasma cholesterol levels in Ovx rats under HFHC diets are accompanied by higher liver TC levels, one may deduce that estrogen withdrawal impaired cholesterol mobilization from the liver.

An intriguing feature in plasma lipid profile of Ovx animals is the higher plasma HDL-C levels found in all dietary conditions (Fig. 2c). There are several plausible explanations for these results. An increase in plasma HDL-C levels in Ovx animals could be a consequence of increased HDL biogenesis and would constitute one of the defending mechanisms to counteract hypercholesterolemia by favouring reverse cholesterol transport. It is also possible that estrogen withdrawal might have impaired HDL-C catabolism by the liver thus resulting in HDL-C accumulation. This hypothesis is supported by *in vitro* experiments in which estrogen treatment (E2) increased by up to 10-fold apoE liaison to hepatocytes, an important step for hepatic HDL-C internalization by LDLr, an alternative pathway to scavenger receptor B-I (SR-BI) ⁽⁴²⁾. Finally, an increase in HDL-C levels could be the result of a decrease in steroidogenesis by ovaries. This interpretation is supported by the demonstration that HDL-C molecules are the major suppliers of cholesterol for estrogen synthesis ⁽⁴³⁾. In this context, ovaries removal would have reduced cholesterol utilization from HDL-C that subsequently resulted in their accumulation in the plasma compartment.

In summary, results of the study indicate that HFHC diets and Ovx concomitantly stimulated hepatic lipid and cholesterol accumulation. Changes observed in VLDL assembly and bile acids regulation key molecules suggest that HFHC diet and estrogens withdrawal both affect hepatic lipid retention through a decrease in VLDL assembly and in bile acid synthesis.

Financial support

This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC; 7594) and from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; T 0602 145.02).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Authorship

This work was performed at the University of Montreal. IC (conception, design, acquisition of data), NAC. (Acquisition of data) JML (conception, design). All authors contributed to data interpretation and drafting/revising the article for important intellectual content. All authors approved the final version to be published

References

1. Subramanian S, Goodspeed L, Wang S *et al.* (2011) Dietary cholesterol exacerbates hepatic steatosis and inflammation in obese LDL receptor-deficient mice. *J Lipid Res* **52**,1626-1635.
2. Comhair TM, Garcia Caraballo SC, Dejong CH *et al.* (2011) Dietary cholesterol, female gender and n-3 fatty acid deficiency are more important factors in the development of non-alcoholic fatty liver disease than the saturation index of the fat. *Nutr Metab (Lond)* **8**,4.
3. Dimitrova-Shumkovska J, Veenman L, Ristoski T *et al.* (2010) Chronic high fat, high cholesterol supplementation decreases 18 kDa Translocator Protein binding capacity in association with increased oxidative stress in rat liver and aorta. *Food Chem Toxicol* **48**, 910-921.
4. Kainuma M, Fujimoto M, Sekiya N *et al.* (2006) Cholesterol-fed rabbit as a unique model of nonalcoholic, nonobese, non-insulin-resistant fatty liver disease with characteristic fibrosis. *J Gastroenterol* **41**, 971-980.
5. Treguier M, Briand F, Boubacar A *et al.* (2011) Diet-induced dyslipidemia impairs reverse cholesterol transport in hamsters. *Eur J Clin Invest* **41**, 921-928.
6. Fungwe TV, Fox JE, Cagen LM *et al.* (1994) Stimulation of fatty acid biosynthesis by dietary cholesterol and of cholesterol synthesis by dietary fatty acid. *J Lipid Res* **35**, 311-318.
7. Kamisako T, Ogawa H & Yamamoto K (2007) Effect of cholesterol, cholic acid and cholestyramine administration on the intestinal mRNA expressions related to cholesterol and bile acid metabolism in the rat. *J Gastroenterol Hepatol* **22**, 1832-1837.
8. Matsuzawa N, Takamura T, Kurita S *et al.* (2007) Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. *Hepatology* **46**, 1392-1403.
9. Zheng S, Hoos L, Cook J *et al.* (2008) Ezetimibe improves high fat and cholesterol diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Eur J Pharmacol*, **584**, 118-124.

10. Cote I, Ngo Sock ET, Levy E *et al.* (2012) An atherogenic diet decreases liver FXR gene expression and causes severe hepatic steatosis and hepatic cholesterol accumulation: effect of endurance training. *Eur J Nutr* **52**, 1523-1532.
11. Savard C, Tartaglione EV, Kuver R *et al.* (2012) Synergistic interaction of dietary cholesterol and dietary fat in inducing experimental steatohepatitis. *Hepatology* **57**, 81-92.
12. Kato M, Ogawa H, Kishida T *et al.* (2009) The mechanism of the cholesterol-lowering effect of water-insoluble fish protein in ovariectomised rats. *Br J Nutr* **102**, 816-824.
13. Ngo Sock ET, Cote I, Mentor JS *et al.* (2013): Ovariectomy Stimulates Hepatic Fat and Cholesterol Accumulation in High-fat Diet-fed Rats. *Horm Metab Res* **45**, 283-290.
14. Kamada Y, Kiso S, Yoshida Y *et al.* (2011) Estrogen deficiency worsens steatohepatitis in mice fed high-fat and high-cholesterol diet. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **301**, 1031-1043.
15. Barsalani R, Chapados NA & Lavoie JM (2010) Hepatic VLDL-TG production and MTP gene expression are decreased in ovariectomized rats: effects of exercise training. *Horm Metab Res* **42**, 860-867.
16. Cote I, Yasari S, Pighon A *et al.* (2012) Liver fat accumulation may be dissociated from adiposity gain in ovariectomized rats. *Climacteric* **15**, 594-601.
17. Lemieux C, Gelinias Y, Lalonde J *et al.* (2005) Hypolipidemic action of the SERM acolbifene is associated with decreased liver MTP and increased SR-BI and LDL receptors. *J Lipid Res* **46**, 1285-1294.
18. Alger HM, Brown JM, Sawyer JK *et al.* (2010) Inhibition of acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase 2 (ACAT2) prevents dietary cholesterol-associated steatosis by enhancing hepatic triglyceride mobilization. *J Biol Chem* **285**, 14267-14274.
19. Cianflone KM, Yasruel Z, Rodriguez MA *et al.* (1990) Regulation of apoB secretion from HepG2 cells: evidence for a critical role for cholesteryl ester synthesis in the response to a fatty acid challenge. *J Lipid Res* **31**, 2045-2055.

20. Kong B, Luyendyk JP, Tawfik O *et al.* (2009) Farnesoid X receptor deficiency induces nonalcoholic steatohepatitis in low-density lipoprotein receptor-knockout mice fed a high-fat diet. *J Pharmacol Exp Ther* **328**, 116-122.
21. Gabbi C, Bertolotti M, Anzivino C *et al.* (2012) Effects of bile duct ligation and cholic acid treatment on fatty liver in two rat models of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Liver Dis* **44**, 1018-1026.
22. Russell DW (2003) The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu Rev Biochem* **72**, 137-174.
23. Alrefai WA & Gill RK (2007) Bile acid transporters: structure, function, regulation and pathophysiological implications. *Pharm Res* **24**, 1803-1823.
24. Robertson MC, Owens RE, Klindt J *et al.* (1984) Ovariectomy leads to a rapid increase in rat placental lactogen secretion. *Endocrinology* **114**, 1805-1811.
25. Folch J, Lees M & Sloane Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* **226**, 497-509.
26. Paquette A, Chapados NA, Bergeron R *et al.* (2009) Fatty acid oxidation is decreased in the liver of ovariectomized rats. *Horm Metab Res* **41**, 511-515.
27. Paquette A, Wang D, Jankowski M *et al.* (2008) Effects of ovariectomy on PPAR alpha, SREBP-1c, and SCD-1 gene expression in the rat liver. *Menopause* **15**, 1169-1175.
28. Willner EL, Tow B, Buhman KK *et al.* (2003) Deficiency of acyl CoA:cholesterol acyltransferase 2 prevents atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 1262-1267.
29. Liu Y, Millar JS, Cromley DA *et al.* (2008) Knockdown of acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase 2 with antisense oligonucleotide reduces VLDL TG and ApoB secretion in mice. *Biochim Biophys Acta* **1781**, 97-104.
30. Hussain MM, Bakillah A, Nayak N *et al.* (1998) Amino acids 430-570 in apolipoprotein B are critical for its binding to microsomal triglyceride transfer protein. *J Biol Chem* **273**, 25612-25615.
31. Bjorkegren J, Karpe F, Milne RW *et al.* (1998) Differences in apolipoprotein and lipid composition between human chylomicron remnants and very low density

- lipoproteins isolated from fasting and postprandial plasma. *J Lipid Res* **39**, 1412-1420.
32. Ngo Sock ET, Chapados NA, & Lavoie J-M (2014) LDL receptor and Pcsk9 transcripts are decreased in liver of ovariectomized rats: effects of exercise training. *Horm Metab Res* In revision.
 33. Ge XZ, Tian PF, Lin Q *et al* (2006) The influence of soybean isoflavone on expression of low density lipoprotein receptor (LDLR) mRNA in ovariectomized rats. *Zhong Tao Cai* **29**: 349-351.
 34. Vlahcevic ZR (1996) Regulation of cholesterol 7 alpha-hydroxylase by different effectors. *Ital J Gastroenterol* **28**, 337-339.
 35. Oude Elferink RP, Paulusma CC & Groen AK (2006) Hepatocanalicular transport defects: pathophysiologic mechanisms of rare diseases. *Gastroenterology* **130**, 908-925.
 36. Oude Elferink RP & Groen AK (2000) Mechanisms of biliary lipid secretion and their role in lipid homeostasis. *Semin Liver Dis* **20**, 293-305.
 37. Sinal CJ, Tohkin M, Miyata M *et al.* (2000) Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell* **102**, 731-744.
 38. Czerny B, Teister M, Juzyszyn Z *et al.* (2011) The effect of retinoic acid receptor agonist acitretin on the production of bile and concentrations of some serum components in ovariectomized rats. *Menopause* **18**, 213-218.
 39. Czerny B, Teister M, Juzyszyn Z *et al.* (2006) Effect of tamoxifen and raloxifene on the conjugation of bile acids with taurine and glycine in ovariectomized rats. *Pharmacol Rep* **58**, 435-438.
 40. Czerny B, Teister M, Juzyszyn Z *et al.* (2005) Effect of tibolone on turnover of cholesterol to bile acids in ovariectomized rats. *Menopause* **12**, 609-612.
 41. Lucas EA, Mahajan SS, Soung do Y *et al.* (2011) Flaxseed but not flaxseed oil prevented the rise in serum cholesterol due to ovariectomy in the Golden Syrian hamsters. *J Med Food* **14**, 261-267.
 42. Windler EE, Kovanen PT, Chao YS *et al.* (1980) The estradiol-stimulated lipoprotein receptor of rat liver. A binding site that membrane mediates the uptake of rat lipoproteins containing apoproteins B and E. *J Biol Chem* **255**, 10464-10471.

43. Andersen JM & Dietschy JM (1978) Relative importance of high and low density lipoproteins in the regulation of cholesterol synthesis in the adrenal gland, ovary, and testis of the rat. *J Biol Chem* **253**, 9024-9032.

Figure legends

Figure 1. Liver TAG (A), TC (B), plasma TAG (C) and TC (D) levels in sham-operated (Sham) or Ovariectomized (Ovx) rats fed a standard (SD) diet, high fat diet (HF), high fat + 0.25% cholesterol (HFHC (0.25%)) or high fat + 0.5% cholesterol (HFHC (0.5%)). Values are mean \pm SEM * Significantly different from the Sham ($P < 0.05$), **($P < 0.01$), *** ($P < 0.001$); † Significantly different from SD diet ($P < 0.05$), †† ($P < 0.01$), ††† ($P < 0.001$).

Figure 2. Very low density lipoprotein cholesterol (VLDL-C) (A), LDL-C (B) and HDL-C (C) in sham-operated (Sham) or Ovariectomized (Ovx) rats fed a standard (SD) diet, high fat diet (HF), high fat + 0.25% cholesterol (HFHC (0.25%)) or high fat + 0.5% cholesterol (HFHC (0.5%)). Values are mean \pm SEM * Significantly different from the Sham ($P < 0.05$), **($P < 0.01$), *** ($P < 0.001$); † Significantly different from SD diet ($P < 0.05$), †† ($P < 0.01$), ††† ($P < 0.001$).

Figure 3. Hepatic gene expression of microsomal triglyceride transfer protein (MTP) (A), diacylglycerol acyl transferase-2 (DGAT-2) (B), apolipoprotein B-100 (apoB-100) (C), acyl-coA cholesterol acyl transferase-2 (ACAT-2) (D), small GTP-binding protein a (Sar1a) (E), and cell death-inducing like-effector type B (Cideb) (F) in sham-operated (Sham) or Ovariectomized (Ovx) rats fed a standard (SD) diet, high fat diet (HF), high fat + 0.25% cholesterol (HFHC (0.25%)) or high fat + 0.5% cholesterol (HFHC (0.5%)). Values are mean \pm SEM * Significantly different from the Sham ($P < 0.05$), **($P < 0.01$), *** ($P < 0.001$); † Significantly different from SD diet ($P < 0.05$), †† ($P < 0.01$), ††† ($P < 0.001$).

Figure 4. Hepatic gene expression of farnesoid X receptor (FXR) (A), liver X receptor (LXR) (B), sterol 12-alpha-hydroxylase (Cyp8b1) (C), bile salt export pump (BSEP) (D), ATP-cassette binding protein G5 and G8 (ABCG5/G8) (E) and (F) in sham-operated (Sham) or Ovariectomized (Ovx) rats fed a standard (SD) diet, high fat diet (HF), high fat + 0.25% cholesterol (HFHC (0.25%)) or high fat + 0.5% cholesterol (HFHC (0.5%)).

Values are mean \pm SEM * Significantly different from the Sham ($P < 0.05$), **($P < 0.01$), *** ($P < 0.001$); † Significantly different from SD diet ($P < 0.05$), †† ($P < 0.01$), ††† ($P < 0.001$).

Figure 5. Hepatic sterol regulatory element binding protein-2 (SREBP-2) (A), low density lipoprotein receptor (LDLr) (B), and hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase (HMG-CoA r) (C) in sham-operated (Sham) or Ovariectomized (Ovx) rats fed a standard (SD) diet, high fat diet (HF), high fat + 0.25% cholesterol (HFHC (0.25%)) or high fat + 0.5% cholesterol (HFHC (0.5%)). Values are mean \pm SEM *** Significantly different from the Sham ($P < 0.001$), † Significantly different from SD diet ($P < 0.05$), †† ($P < 0.01$), ††† ($P < 0.001$).

Table 1. Diet description

	Standard D12450J	High D01021204	fat High fat + Chol (0.25%) D01021203	High fat + Chol (0.50%) D01021202G
% (g/kg)				
Protein	19	23	23	23
Carbohydrate	67	46	46	46
Fat	4	20	20	20
Casein, 80	200	200	200	200
Mesh				
L-Cystine	3	3	3	3
Corn starch	550	98.2	98.2	98.2
Maltodextrin	150	100	100	100
10				
Sucrose	0	198.2	198.2	198.2
Cellulose, BW200	50	50	50	50
Soybean oil	25	25	25	25
Lard	20	155	155	155
Mineral mix	10	10	10	10
S10026				
DiCalcium	13	13	13	13
Phosphate				
Calcium	5.5	5.5	5.5	5.5
carbonate				
Potassium	16.5	16.5	16.5	16.5
citrate, 1 H2O				
Vitamin Mix	10	10	10	10
V10001				
Choline	2	2	2	2
Bitartrate				
Cholesterol	0	0	2.2	4.43
USP				
Kcal/g	3.85	4.58	4.57	4.55

Table 2. Real time PCR primer sequences

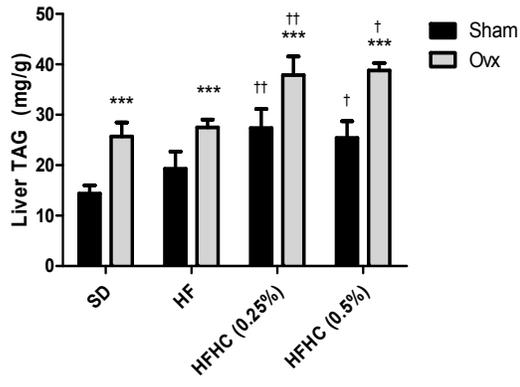
Gene	Oligo FWD	Oligo REV
ABCG5	cggagagttggtgttctgtg	caccgatgtcaagtccatgt
ABCG8	cagatgctggctatcataggg	ctgatttcattcttgccacca
ACAT-2	gtaccctggccatcgactt	ctgtccgaagctgaagagga
apoB	gatggagatgggagatgaggt	gggctcctcatcaacaagag
BSEP	cgggtggctgagagatcaaat	tgcgatagtggaggagaaca
Cideb	gctccaatggcctgctaag	ttatgatcacagacacggaagg
Cyp8b1	ctgtttctgggccctect	ctctcgcacagccttcac
DGAT-2	aggatctgccctgtcacg	gtcttgaggggccgagag
FXR	ccacgaccaagctatgcag	tctctgtttgctgtatgagtcca
HMG-CoAr	caaccttctacctcagcaagc	acagtgccacacacaattcg
LDLr	tgctactggccaaggacat	ctgggtggtcggtacagtg
LXR	agggctccaggaagagatgt	caactccgttgagagtcag
Mtp	gcgagtctaaaacccgagtg	cactgtgatgtcgctggttatt
Sar1a	gggcaaaccacaggaaag	cactgcacatgaacactcca
SREBP-2	gtgcagacagtcgctacacc	aatctgaggctgaaccagga

Table 3. Anthropometric parameters and food intake

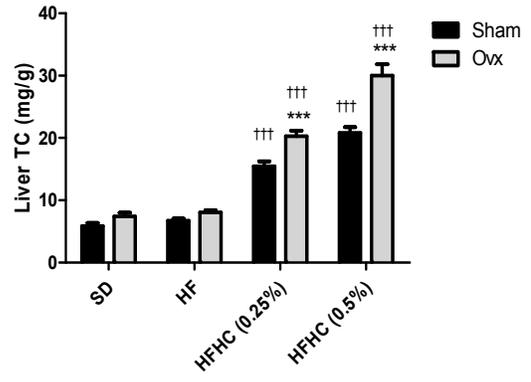
	SD		HF		HFHC (0.25%)		HFHC (0.5%)	
Final bodyweight (g)	<i>Sham</i> 323 ± 11	<i>Ovx</i> 393 ± 17 ***	<i>Sham</i> 350 ± 17	<i>Ovx</i> 402 ± 12 ***	<i>Sham</i> 346 ± 9	<i>Ovx</i> 419 ± 10 ***	<i>Sham</i> 370 ± 14 ††	<i>Ovx</i> 444 ± 17 *** ††
Intra-Abdominal fat pads weight (g)	22.5 ± 2	29.9 ± 3.4 ***	33.4 ± 5.1	37.7 ± 4.3 ***	29.7 ± 2.8	34.6 ± 2.6 ***	31 ± 5.1	37.4 ± 3.5***
Subcutaneous fat pad (g)	4 ± 0.3	5.7 ± 0.8*	5.1 ± 0.7	7.8 ± 0.9*	5 ± 0.5	7.4 ± 0.6*	4.9 ± 0.9	7.5 ± 1*
Food intake (kcal/day)	73.2 ± 1.8	87.1 ± ***	80.5 ± 4.7	92 ± 4.2 ***	82.1 ± 2.6	95.6 ± 4.2 ***	87.9 ± 5 †	102.6 ± 4.7*** †
Uterus (g)	0.63 ± 0.05	0.14 ± 0.01 **	0.68 ± 0.11	0.14 ± 0.02 **	0.41 ± 0.02	0.12 ± 0.01 **	0.52 ± 0.07	0.11 ± 0.01**

Values are mean ± SEM * Significantly different from the Sham ($P < 0.05$), **($P < 0.01$), *** ($P < 0.001$); † Significantly different from SD diet ($P < 0.05$), †† ($P < 0.01$), ††† ($P < 0.001$). Sham: sham-operated; Ovx: ovariectomized; SD: standard diet; HF: high fat diet; HFHC: HF high cholesterol diet.

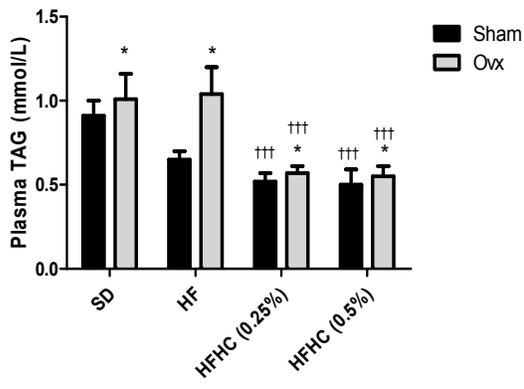
Figure 1



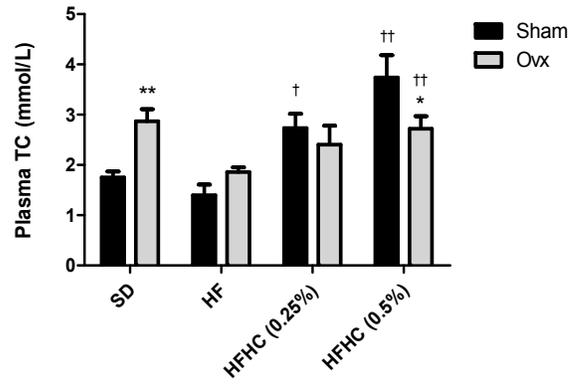
(a)



(b)

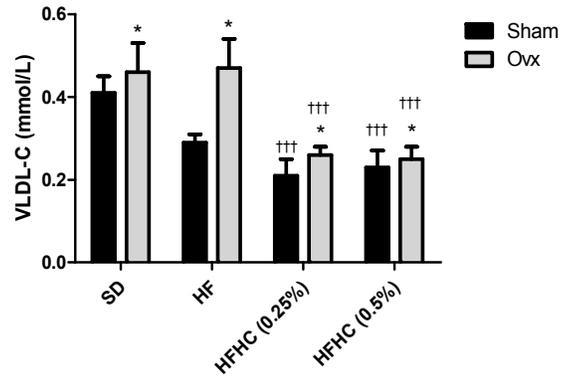


(c)

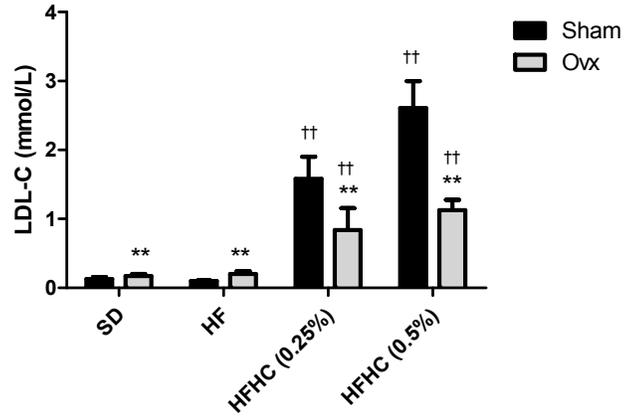


(d)

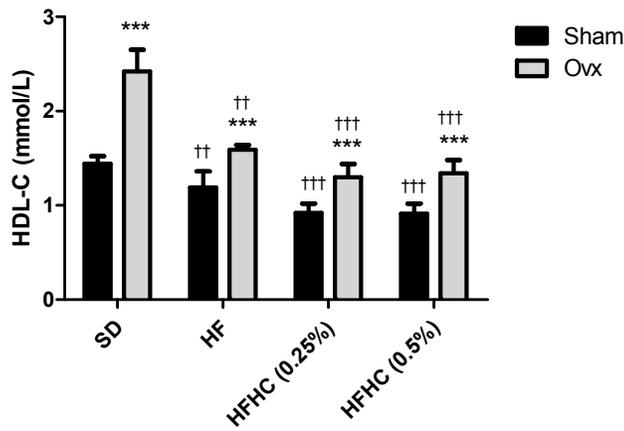
Figure 2



(a)



(b)



(c)

Figure 3

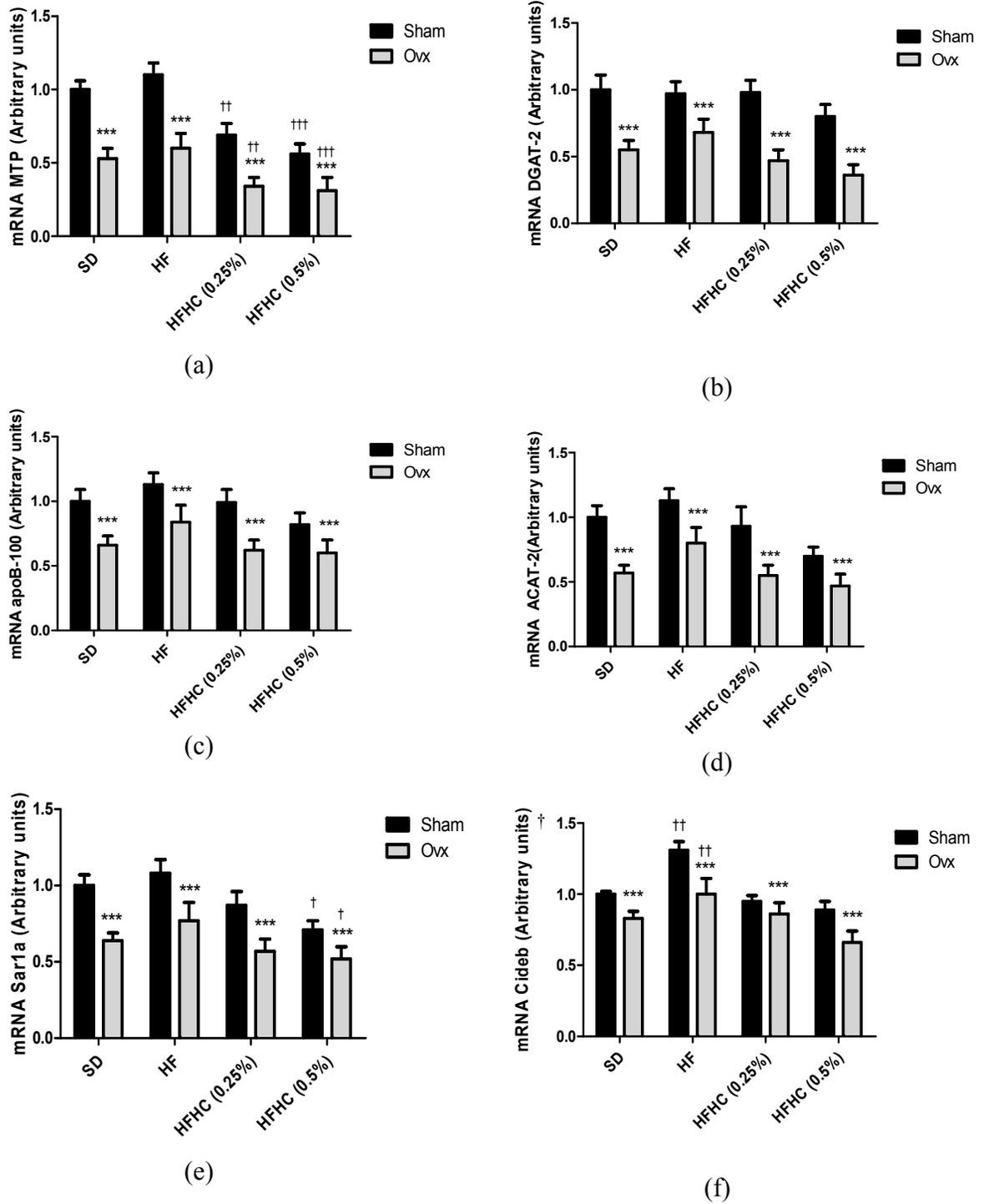
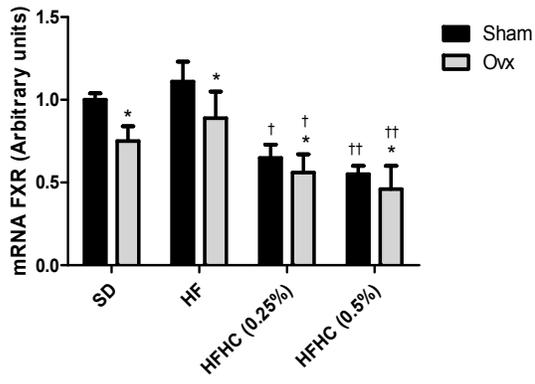
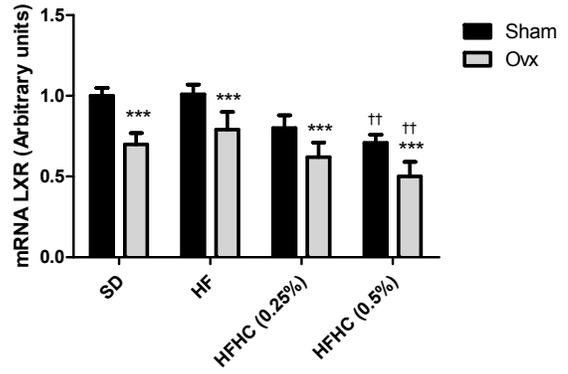


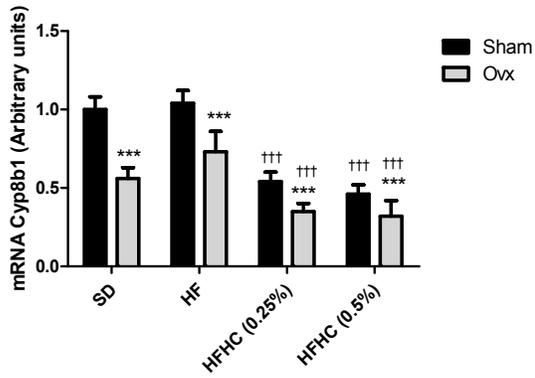
Figure 4



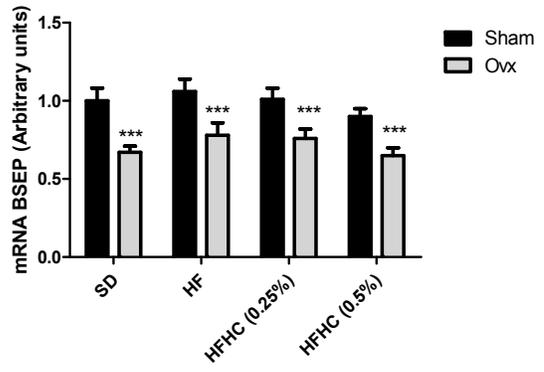
(a)



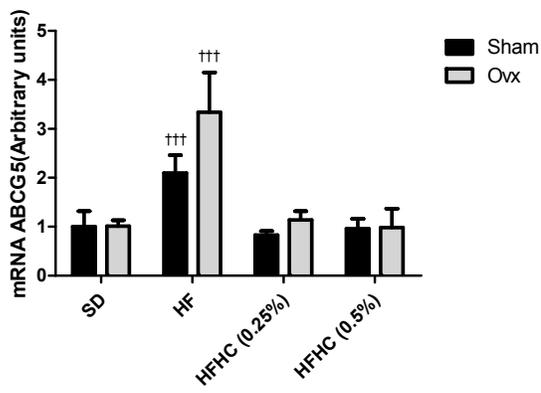
(b)



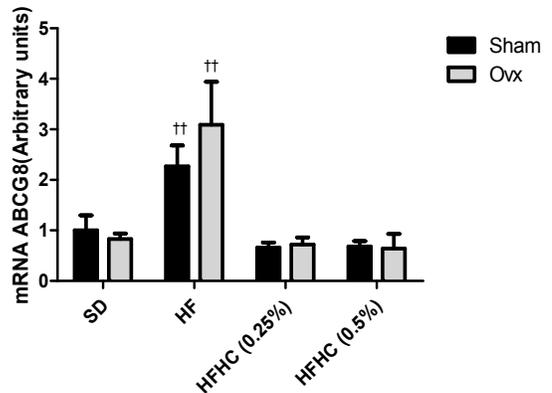
(c)



(d)

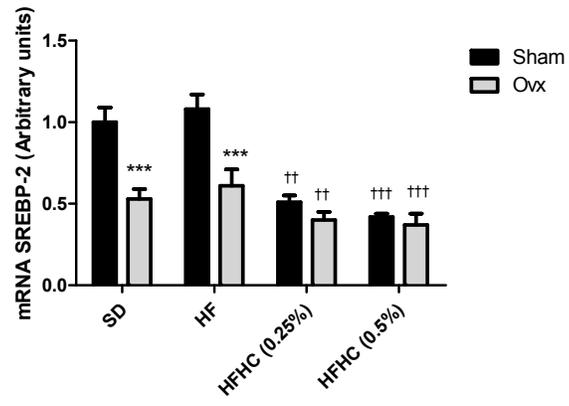


(e)

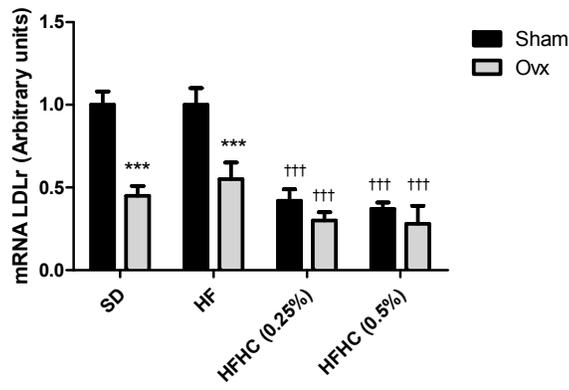


(f)

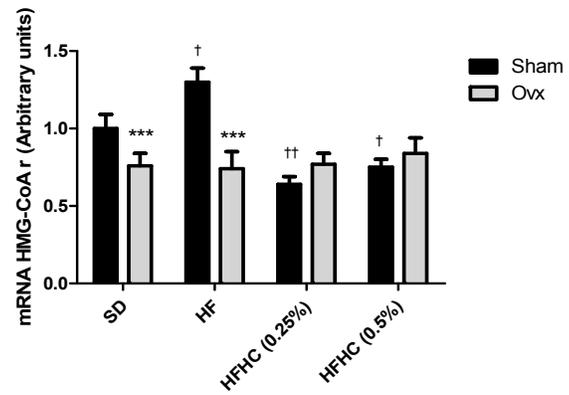
Figure 5



(a)



(b)



(c)

Chapitre 5 : Discussion générale et conclusion

Un faisceau d'arguments décrits dans cette thèse plaide en faveur d'un effet bénéfique des estrogènes sur le risque cardiovasculaire, spécifiquement en raison de leurs effets antiathérogènes et antistéatotiques. La perte des fonctions ovariennes retire donc tous ces bénéfices cardiovasculaires féminins, notamment par la dysrégulation du métabolisme du cholestérol, ce qui affecte à la fois la cholestérolémie et les lipides hépatiques. Cette thèse visait à exposer les mécanismes d'action du retrait des estrogènes sur les voies métaboliques et de régulation du cholestérol pouvant contribuer au développement d'une stéatose. Dans cette perspective, une revue de littérature systématique de l'effet de la présence ou de l'absence des estrogènes sur les voies de régulation du métabolisme du cholestérol a permis de situer les actions connues des estrogènes sur ces voies. Pour explorer d'autres mécanismes sous-jacents, nos travaux ont d'abord été consacrés à la stéatose induite par l'Ovx, un modèle animal bien établi de la ménopause. Au cours de la première étude, nous rapportions que les rates Ovx présentaient des niveaux significativement réduits de l'expression génique de la MTP hépatique, une enzyme essentielle et déterminante de la sécrétion de VLDL. En vue de mieux comprendre la relation entre le métabolisme du cholestérol et les lipides hépatiques, nous avons effectué notre deuxième étude chez les rates soumises à une diète riche en lipides et en cholestérol (HFHC). Enfin, pour exposer les effets précis du retrait des estrogènes sur les voies métaboliques du cholestérol et leur lien avec l'accumulation des lipides hépatiques, nous avons combiné ces deux interventions. Considérant le très faible nombre d'études expérimentales portant sur le retrait des estrogènes chez des sujets confrontés à une perturbation du métabolisme du cholestérol par une diète HFHC sur l'accumulation de lipides au foie, nous estimons que ces travaux ont contribué à l'avancement des connaissances dans ce domaine. De plus, ces études ont permis d'identifier au moins deux mécanismes contribuant à l'accumulation de lipides et de cholestérol hépatiques dans les modèles utilisés, soit la diminution de l'assemblage du VLDL et la diminution de l'excrétion hépatique d'AB. Au-delà de ces observations, ces travaux sont d'autant plus importants que des évidences moléculaires remettent en question l'usage de thérapies couramment employées telles les statines.

Dans la première étude, nous avons démontré que, dans un contexte de déficit estrogénique, l'adiposité et les lipides hépatiques sont des variables pouvant être dissociées. Cette étude démontrait que l'absence de gain d'adiposité chez les animaux Ovx ne prévenait pas l'accumulation de triglycérides hépatiques. Cette observation est basée sur deux séries d'expériences effectuées chez des rates Ovx qui ont été comparées aux rates d'un groupe contrôle (Sham). Des analyses statistiques indépendantes de la première et de la seconde expérience rapportent une différence significative entre les niveaux de lipides hépatiques de tous les groupes de rates Ovx alors que certaines des rates Ovx furent résistantes au gain d'adiposité (groupe Ovx-R; Chapitre 2, Fig. 1). En dépit d'une différence significative des niveaux d'adiposité abdominale entre les rates Ovx-R et les rates Ovx-P, les données issues de la première expérience ne dévoilent aucune différence entre ces deux groupes. Cependant, dans la deuxième expérience, les rates sujettes au gain d'adiposité (Ovx-P) accumulaient significativement plus de lipides hépatiques que les rates Ovx-R, ce qui suggère qu'il existe une certaine relation entre ces variables. Pour déterminer l'importance de cette différence entre les Ovx-R et Ovx-P de l'expérience 2, des analyses statistiques supplémentaires ont été effectuées. En effet, des tests de Pearson à partir des données issues chaque expérience démontrent un faible niveau de corrélation ($r < 0.5$) entre les niveaux d'adiposité abdominale et les lipides hépatiques chez toutes les rates Ovx. Dans la première et la deuxième expérience, le coefficient de corrélation fut de 0,4276 et 0,4339, respectivement (Figure 28).

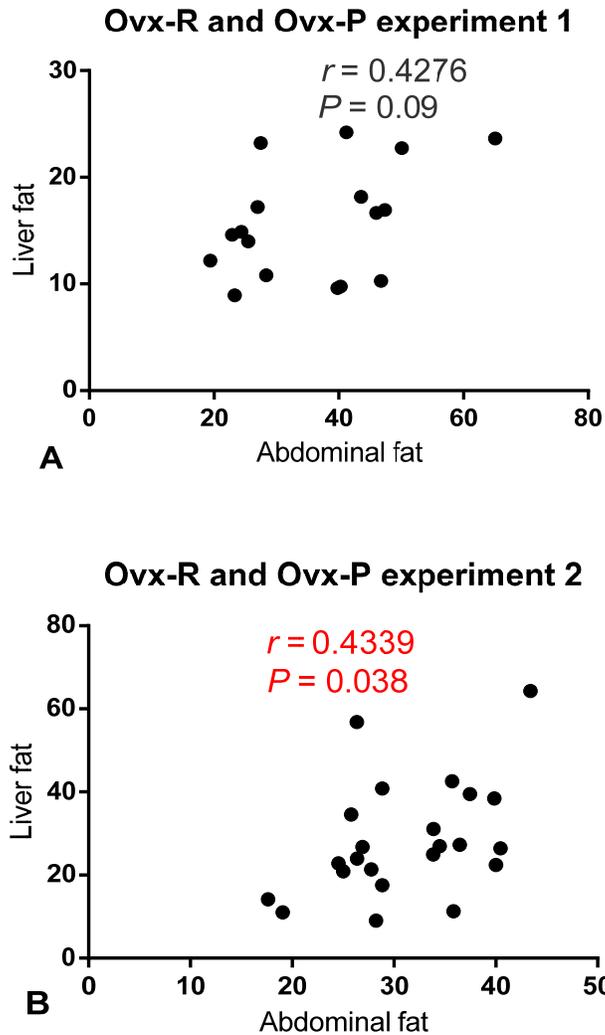


Figure 28 : Analyses de corrélation entre les niveaux d'adiposité abdominale et les niveaux de lipides hépatiques chez les rates ovariectomisées résistantes au gain d'adiposité (Ovx-R) et sujettes au gain d'adiposité (Ovx-P) à partir des données issues de l'expérience 1 (A) et de l'expérience 2 (B) de l'article original du chapitre 2.

Même si les niveaux d'adiposité abdominale et de lipides hépatiques peuvent être deux variables dissociées, certains marqueurs moléculaires pourraient expliquer pourquoi certains animaux sont davantage sujets à l'obésité dans le contexte du déficit estrogénique. Par exemple, les niveaux d'expression génique au foie de la steroyl--CoA desaturase (SCD-1), une enzyme lipogénique catalysant la synthèse d'acides gras

monoinsaturés, sont plus élevés chez les rates Ovx-P que chez les Ovx-R et les Sham. Une synthèse accrue d'acides gras monoinsaturés dans les hépatocyte pourrait favoriser leur distribution vers la périphérie puisqu'ils sont les types d'acides gras préférentiellement stocké dans le tissu adipeux. Est-il possible que les animaux Ovx-P produisent de plus grosses particules de VLDL qui seraient efficacement mis en réserve dans le tissu adipeux? D'autres données issues de nos travaux sont, toutefois, en défaveur de cette hypothèse. En effet, nous avons démontré que le déficit estrogénique réduit substantiellement l'expression génique d'enzymes relatives à l'assemblage et à la sécrétion des VLDL ainsi que le flux de production de VLDL-TG par le foie [4]. La grande variabilité au gain d'adiposité s'expliquerait-elle plutôt par des facteurs périphériques? Même si nous n'avons pas mesuré l'expression génique d'enzyme lipogéniques dans le tissu adipeux, cette possibilité est appuyée par les travaux d'autres chercheurs. Comparablement à notre modèle chez la rate Ovx, Cedernaes et ses collègues ont soumis un groupe de rats *sprague dawley* à une diète enrichie de lipides, lesquelles furent plus ou moins sensibles au gain d'adiposité [317]. Après avoir classifié les rates « résistante » ou « sujettes » à l'obésité, cette équipe de chercheurs a quantifié différents types d'acides gras dans le tissu adipeux, dont le produit de SCD-1, *l'acide palmitoléique*. De manière intéressante, le tissu adipeux des rates sujettes à l'obésité avait une proportion supérieure d'acide palmitoléique par rapport aux autres types d'acides gras, suggérant une plus grande action de cette enzyme. Mais existe-t-il un lien entre l'activité et l'expression de la SCD-1 hépatique et adipocytaire? D'après les expériences de l'équipe de Hu et ses collaborateurs, des souris sujettes au gain d'adiposité lorsque soumises à une diète riche en lipides ont un niveau d'expression génique supérieur de la SCD-1 dans le foie que celui des souris résistantes à l'obésité [318].

Ces résultats ont stimulé notre intérêt pour le métabolisme des lipoprotéines et nous ont incités à nous documenter davantage sur cet aspect. En remarquant les liens étroits entre le métabolisme du cholestérol et celui des lipides hépatiques, nous avons porté notre attention sur l'implication des voies régulatrices du métabolisme et du

transport du cholestérol sur la stéatose hépatique. Dans la deuxième étude, des rates furent nourries d'une diète HFHC, aussi appelée *diète athérogène* (AD), un modèle diététique récemment établi pour le développement de la stéatose [319]. De manière similaire aux effets de l'Ovx rapportés dans la première étude, les rates soumises à la diète AD présentaient une stéatose ainsi qu'une diminution significative de l'expression génique de la MTP, l'une des enzymes déterminantes de l'assemblage du VLDL. De plus, la diète AD réduisait drastiquement l'expression du FXR, le régulateur clé du métabolisme hépatique des AB. Étant donné la forte concentration de cholestérol (1,25 %) et la présence d'AB (0,5 % d'acide cholique) dans la diète utilisée, nous soupçonnions le développement d'une *stéatohépatite* (inflammation du foie). Comme l'inflammation en soi est une variable intrinsèque affectant les lipides hépatiques, la présence de molécules inflammatoires a probablement influencé nos résultats. Considérant cette possibilité, il demeure incertain que les altérations moléculaires observées soient une *cause* ou une *conséquence* de la stéatose induite par cette diète. À cet égard, les travaux suivants ont été réalisés sur des animaux nourris de diètes enrichies avec des niveaux de cholestérol nettement inférieurs à celui de la deuxième étude (0,25 % et 0,5 %, comparés à 1,25 %). Afin d'établir de nouveaux mécanismes d'action du retrait des estrogènes sur les voies métaboliques du cholestérol pouvant contribuer au développement d'une stéatose, nous avons combiné ces interventions diététiques à l'Ovx. Outre la confirmation des effets observés au cours des deux premières études, ce protocole expérimental nous permettait également d'évaluer les effets concomitants de l'Ovx et de la diète HFHC. De manière intéressante, ces deux interventions combinées potentialisaient l'accumulation de lipides hépatiques, et ce, possiblement à cause d'un défaut de l'assemblage et de la sécrétion des VLDL. Cette interprétation est appuyée par des altérations moléculaires d'enzymes relatives à l'assemblage du VLDL, mesurées dans ce projet (Chapitre 4), ainsi que par les mesures *in vivo* obtenues par des expériences préalablement menées dans notre laboratoire [4]. L'un des effets de la diète HFHC fut de réprimer l'expression génique de la MTP. La MTP jouant un rôle indispensable dans la synthèse et la sécrétion de VLDL [49], cet effet, à lui seul, était suffisant pour perturber l'ensemble de la voie de production des VLDL chez les animaux nourris à la diète HFHC. Puisque le retrait des estrogènes et la diète HFHC réduisaient conjointement

l'expression génique de la MTP, les animaux Ovx nourris à la diète HFHC présentaient le plus faible niveau d'expression de cette enzyme (31 % du niveau des animaux Sham nourris à la diète SD), ce qui suggère un affaiblissement maximal de la production de VLDL chez ces rates par rapport à tous les autres groupes d'animaux. Une perturbation plus prononcée de la sécrétion de VLDL concorde avec le fait que ces animaux accumulaient les quantités les plus élevées de lipides et de cholestérol au foie que tous les autres groupes d'animaux de cette étude. Une observation faite au cours de ces travaux pouvant susciter un important questionnement sur les approches thérapeutiques actuelles fut la répression génique de l'HMG-CoA r chez les rates Ovx qui, par ailleurs, était encore plus marquée lorsqu'elles étaient nourries d'une diète HFHC. Ainsi, les questions soulevées sont les suivantes : 1) Si l'HMG-CoA r est diminuée par le retrait des estrogènes, quelle est l'utilité des statines, des bloqueurs de l'HGM-Co A r, chez les femmes postménopausées hypercholestérolémiques? 2) Pourquoi les statines sont-elles parmi les molécules les plus prescrites dans le contrôle de la cholestérolémie chez ces femmes? 3) La voie de la biosynthèse de cholestérol est-elle une cible appropriée pour les femmes postménopausées hypercholestérolémiques? À la lumière des données de la littérature et de celles fournies par les trois études de cette thèse, l'usage des statines ne serait pas la cible thérapeutique de premier choix. Pourtant, plus du quart de la population âgée de 50 ans et plus est traitée avec une statine [320]. Une récente méta-analyse des plus importants essais cliniques contrôlés indique la prise régulière de statines augmente de 9 % les risques de développer un diabète de type II et des risques peuvent s'élever jusqu'à 12 % lorsque la thérapie est plus agressive [320]. Malgré cela, les cliniciens recommandent encore l'usage des statines en stipulant que les bénéfices d'une réduction importante des incidents cardiovasculaires l'emportent sur les risques de développer un diabète de type II. Certes, auprès de la population générale, «l'ère des statines» camouffle l'existence et l'importance des autres traitements pour contrer l'hypercholestérolémie. Par exemple, il convient d'introduire un programme d'exercice régulier avec une intervention diététique. Ce type d'intervention induit une baisse supplémentaire des niveaux de LDL-C aux thérapies pharmacologiques. De plus, les approches non pharmacologiques sont susceptibles de fournir un bénéfice qui s'étend au-

delà de la baisse des LDL-C. Ces approches ont un impact sur l'ensemble du métabolisme des glucides, des lipides, du cholestérol et des acides biliaires.

L'ensemble des résultats des trois études de cette thèse renforce le concept selon lequel le déficit estrogénique exacerbe la stéatose hépatique induite par une surconsommation modérée et chronique d'aliments athérogènes. Cette notion souligne l'importance d'adopter ou de conserver de saines habitudes de vie au moment de l'arrivée de la ménopause. Considérant que la chute hormonale modifie les comportements alimentaires, notamment en stimulant l'appétit et le goût pour les aliments salés et sucrés (aussi sources de lipides et de cholestérol), les données de cette étude contribuent à sensibiliser les femmes à adopter ou à conserver de saines habitudes de vie lors de la ménopause. Comme mentionné à la partie 4 de la revue de littérature, la pratique régulière d'activité physique pourrait à la fois prévenir, limiter et traiter l'hypercholestérolémie et la stéatose hépatique induite par le déficit en estrogènes. Toutefois, puisqu'un mode de vie actif ne parvient pas totalement à contrecarrer les effets délétères d'une alimentation riche en lipides et en cholestérol [321], les femmes postménopausées doivent impérativement limiter leur consommation d'aliments athérogènes lorsqu'elles entreprennent un programme d'entraînement afin d'en tirer le maximum de bénéfices. D'un autre côté, il est à considérer que la restriction calorique n'est pas primordiale à l'efficacité de la thérapie par l'exercice. En fait, l'adoption d'un mode de vie actif, et ce, sans restriction calorique, permet la résorption des lipides hépatiques [276]. Un fait encore plus important est que la substitution d'une diète restrictive par l'exercice régulier maintient efficacement la résorption de lipides hépatiques après une perte de poids, et ce, même s'il y a un regain de poids [322]. Malgré la préconisation des approches combinant l'exercice et la restriction calorique dans la prise en charge des maladies cardiométaboliques, la difficulté à suivre conjointement ces deux interventions peut mener à l'abandon complet du programme. Pour cela, il incombe au personnel médical, aux nutritionnistes ainsi qu'aux kinésiothérapeutes de formuler des recommandations nutritionnelles plus simples aux femmes postménopausées lorsqu'elles entreprennent un mode de vie actif. Un exemple de recommandation qui accompagnerait l'introduction d'une pratique d'activité physique régulière serait de limiter la consommation d'aliments riches en cholestérol et en acides gras saturés au profit

d'aliments contenant des acides gras insaturés. De la sorte, ces femmes pourraient se concentrer davantage sur la constance de leur pratique d'activité physique, ce qui leur permettrait d'en retirer les bénéfices sans avoir à modifier l'intégralité de leur alimentation. La simplicité de ces recommandations faciliterait leur conformité au programme à long terme, qui est essentielle à l'efficacité thérapeutique de l'activité physique.

Un autre aspect novateur de cette thèse fut la démonstration que l'adiposité peut être un facteur dissocié des lipides hépatiques dans les contextes du déficit estrogénique et de consommation chronique d'aliments athérogènes. Lors de la première étude, nous avons établi un modèle selon lequel des rates Ovx étaient résistantes ou sujettes à l'obésité. De manière intéressante, nous avons démontré que même les rates Ovx n'ayant pas accumulé de gras intra-abdominal étaient toutes aussi enclines à développer une stéatose que les rates Ovx obèses. Au cours de la deuxième étude, un phénomène similaire a été observé chez les rates nourries à la diète athérogène. En dépit d'une absence complète de gain d'adiposité chez ces animaux, les niveaux de triglycérides et de cholestérol hépatiques atteignaient respectivement quatre et dix fois les niveaux mesurés chez les rates nourries à la diète standard. Ceci met en valeur l'importance des hormones femelles et d'une saine alimentation sur le maintien de l'homéostasie des lipides hépatiques. Par conséquent, le niveau d'adiposité relié au déficit estrogénique ou à de mauvaises habitudes alimentaires ne correspond pas forcément aux niveaux de lipides et de cholestérol hépatiques. En outre, un faible gain d'adiposité dans ces conditions pourrait augmenter la prévalence de la stéatose. Comme le tissu adipeux exerce une fonction indirecte primordiale sur l'homéostasie des lipides hépatiques, sa dysfonction favorise le stockage des lipides dans les tissus ectopiques. Il a été démontré que les sujets souffrant d'une *lipodystrophie*, dystrophie du tissu graisseux, accumulent une quantité massive de lipides au foie [323]. Il est donc possible que la stéatose chez les sujets résistants au gain d'adiposité après l'arrivée de la ménopause ou lors d'une surconsommation chronique de lipides et de cholestérol ne soit qu'une complication d'un déficit ou d'une dysfonction des cellules adipeuses.

Limites des études

Les modèles du retrait des estrogènes

Les différences du profil lipidique et du risque de mortalité par accident cardiovasculaire entre les hommes et les femmes ont suscité un intérêt scientifique important pour l'étude des effets des estrogènes. De ce fait, divers modèles ont été établis afin d'évaluer l'impact biologique de la présence ou de l'absence des estrogènes. Parmi ceux-ci, l'ovariectomie est un modèle expérimental animal couramment utilisé afin d'évaluer l'effet de l'absence des estrogènes sur des fonctions spécifiques de l'organisme difficiles, voire impossibles, à évaluer chez l'humain. Puisque les conditions expérimentales peuvent être bien contrôlées, le retrait des ovaires chez l'animal est un moyen efficace pour évaluer les conséquences du déficit en estrogènes sur une multitude de variables spécifiques. Cette possibilité d'isoler les variables par le modèle Ovx a largement contribué à l'avancement des connaissances au regard des voies métaboliques du cholestérol et des lipides hépatiques. Cependant, sur le plan du métabolisme du cholestérol, l'Ovx comprend quelques biais. En premier lieu, cette intervention chirurgicale provoque une chute radicale des niveaux d'estrogènes, ce qui ne survient pas chez l'humain à moins d'une hystérectomie. La diminution brusque du taux circulant d'estrogènes entraîne des modifications qui ne seraient pas forcément observées si cette diminution avait été graduelle. Par exemple, il a été noté une réduction importante de l'activité et de l'expression de l'HMG-CoA r [213, 239], l'enzyme déterminante de la biosynthèse de cholestérol. Avec l'arrêt spontané de la stéroïdogénèse ovarienne, il n'est pas étonnant que le foie, le plus grand fournisseur de cholestérol plasmatique, en diminue la synthèse. Ce phénomène est également observé avec l'*hypophysectomie*, où la diminution de 70 % de l'activité de l'HMG-CoA r concorde avec l'arrêt de la stéroïdogénèse pour la synthèse d'hormones posthypophysaires [324]. Il apparaît donc que l'effet de l'Ovx sur l'expression et l'activité de l'HMG-CoA r semble être un mécanisme compensatoire en réponse à la baisse d'utilisation périphérique du cholestérol pour limiter l'hypercholestérolémie.

Une observation intrigante chez la rate Ovx est l'augmentation des niveaux d'HDL-C, un phénomène qui n'est pourtant pas observé chez la femme postménopausée.

Certains des éléments de la discussion du troisième article, présenté au chapitre 4, permettent d'expliquer ces divergences. Pour un, l'arrêt spontané de l'utilisation du cholestérol contenu dans les HDL-C par les ovaires coïncide avec l'accumulation des niveaux circulants de HDL-C [43, 44]. D'après les travaux d'Anderson et ses collègues, les ovaires utilisent préférentiellement le cholestérol provenant des HDL-C plutôt que celui provenant d'autres lipoprotéines pour synthétiser les stéroïdes sexuels [325]. Un deuxième élément expliquant les différences entre les niveaux d'HDL-C chez l'humain et le rat après le retrait des estrogènes est la particularité dans la répartition du cholestérol dans les différentes lipoprotéines. Alors que le cholestérol plasmatique chez le rat se trouve en plus grande proportion dans les HDL-C, l'humain, quant à lui, véhicule davantage le cholestérol au niveau des LDL-C [326]. Considérant ces caractéristiques, il n'est donc pas surprenant d'observer une accumulation d'HDL-C chez le rat et de LDL-C chez l'humain lors d'une déficience en estrogènes. Néanmoins, la hausse des HDL-C ou des LDL-C provoque une hypercholestérolémie. En dépit du rôle cardioprotecteur des HDL-C, l'accumulation chronique de ces lipoprotéines les rend sujettes à l'oxydation et à des altérations protéomiques invalidant leur fonction [327]. Ce phénomène de *dysfonction des HDL-C* met en évidence le fait que le niveau plasmatique des HDL-C ne constitue pas un biomarqueur approprié de la santé cardiovasculaire chez le rat. L'augmentation d'HDL-C est hautement athérogène chez les rates Ovx puisque l'absence d'estrogènes retarde leur catabolisme par le foie, ce qui entraîne leur accumulation pour une durée prolongée. Pour contourner ces biais de l'Ovx tout en conservant la possibilité d'isoler des variables difficiles à évaluer chez l'humain, certains chercheurs ont étudié l'effet du déficit en estrogènes chez la rate âgée (qui présente une diminution significative du taux circulant d'estrogènes). Bien que les rates âgées perdent progressivement les fonctions ovariennes comme chez l'humain, l'âge est également une variable affectant le métabolisme du cholestérol. Entre autres, l'âge modifie la morphologie et les fonctions du foie pouvant affecter la biosynthèse de cholestérol [328]. D'un autre côté, l'utilisation d'un modulateur sélectif des récepteurs aux estrogènes (SERM) semble *a priori* éviter les biais de l'âge et de l'Ovx. Toutefois, l'utilisation de SERM pose également un problème. Puisque le SERM est un inhibiteur des récepteurs aux estrogènes, il n'affecte pas la production endogène d'hormones sexuelles. Il est

possible que le fait de maintenir normalement la synthèse d'hormones sexuelles, une voie qui requiert le cholestérol en provenance des HDL-C, masque plusieurs changements du métabolisme du cholestérol, se produisant normalement avec la perte des fonctions ovariennes. Contribuant à près de 70 % du pool des HDL-C [56], le foie fournit une grande proportion de cholestérol aux gonades nécessaires à la stéroïdogenèse [43, 44]. L'utilisation du cholestérol par des gonades étant maintenue, il est donc normal qu'aucun changement de la biosynthèse hépatique de cholestérol ne soit observé avec le SERM [240]. Tandis qu'aucun de ces modèles mentionnés précédemment ne permet d'établir le rôle exact des estrogènes sur la biosynthèse de cholestérol, une étude est parvenue à contourner ces différents biais. À l'aide d'expériences *in vitro*, Wang et ses collègues ont démontré qu'il existe une interaction moléculaire directe entre le ER α et le facteur de transcription SREBP-2 [329]. L'activation du ER α augmente proportionnellement l'expression du SREBP-2 et de l'activité des enzymes régulant la biosynthèse du cholestérol, dont l'HMG CoA r. L'existence d'un axe SREBP-2-ER α est un mécanisme pouvant expliquer concrètement la diminution du facteur SREBP-2 et des enzymes cibles HMG CoA r et LDLr après l'Ovx. Dans l'ensemble, et même s'il comprend certains biais telle l'accumulation d'HDL-C plasmatiques, l'Ovx s'avère un modèle adéquat afin d'évaluer les effets du retrait des estrogènes sur les voies intrahépatiques du métabolisme du cholestérol.

Les modèles HFHC

Le type d'acides gras et la quantité de cholestérol alimentaire sont deux variables affectant les niveaux plasmatiques et hépatiques de cholestérol. Les études sont concluantes : les acides gras saturés causent une hypercholestérolémie et une stéatose hépatique alors que les acides gras polyinsaturés sont hypocholestérolémiantes et antistéatotiques [330-332]. De plus, il est bien établi que la quantité de cholestérol ingérée a un impact important sur les niveaux de lipides plasmatiques et hépatiques. Deux éléments compliquant l'interprétation des données de la littérature sont l'espèce étudiée et la variabilité dans la composition des diètes.

Les espèces utilisées dans l'étude du métabolisme du cholestérol

L'une des caractéristiques du rat pouvant expliquer certaines des différences observées en lien avec le métabolisme du cholestérol par rapport aux autres espèces est l'absence de vésicule biliaire (VB). Cet attribut anatomique particulier confère au rat une plus grande susceptibilité à la stéatose. Cette susceptibilité est mise en évidence par l'augmentation significative des lipides hépatiques chez les patients ayant subi une *cholecystectomy* (ablation de la VB). Étant la chirurgie abdominale la plus fréquente au monde, les effets de la cholecystectomy sur les lipides hépatiques ont largement été étudiés et révisés. Les données d'études épidémiologiques et animales (souris) sont consistantes et concluantes : l'ablation de la VB favorise le développement d'une stéatose hépatique [333-335]. Mais la question qui demeure est : quels sont les mécanismes sous-jacents aux liens entre l'absence de VB et la stéatose hépatique? Pour aborder cette question, il faut examiner l'ensemble de l'axe « foie-VB-intestin ». La fonction de la vésicule biliaire est intégrée dans l'axe foie-VB-intestin, qui est responsable du maintien de l'homéostasie des TAG, des acides gras, du cholestérol et des AB dans l'organisme entier. Précisément, le rôle de la VB est de coordonner les cycles quotidiens des AB avec la digestion. Au cours de la dernière décennie, plusieurs études ont caractérisé les AB comme des *molécules de signalisation* régulant les cycles entérohépatiques [336]. Les AB régulent plusieurs voies métaboliques hépatiques et systémiques en vertu d'être les ligands endogènes du FXR, un récepteur nucléaire contrôlant de multiples fonctions métaboliques et sécrétoires du foie, de l'intestin et d'autres tissus [337]. Dans le circuit entérohépatique, les AB inhibent leur propre synthèse au foie par des mécanismes dépendants et indépendants du FXR (le FGF15/19). Le FGF15/19 est une hormone relâchée par l'intestin réprimant la synthèse d'AB, mais qui possède également des fonctions hépatiques similaires à l'insuline, notamment la stimulation de la synthèse de protéines et de glycogène hépatiques et l'inhibition de la synthèse d'acides gras [338]. Alors pourquoi l'ablation de la VB entraîne-t-elle une accumulation de lipides au foie? Deux mécanismes pourraient être en cause. Premièrement, l'augmentation du nombre de cycles quotidiens empruntant la voie de la circulation entérohépatique pourrait altérer les voies de signalisation entérohépatiques et périphériques des AB par une perte de sensibilité de celles-ci. Cette perte de sensibilité aux AB pourrait s'expliquer, entre

autres, par une diminution du nombre de récepteurs, phénomène appelé *rétroaction négative*, qui n'a cependant jamais été évalué. Deuxièmement, l'ablation de la VB pourrait supprimer la production de facteurs hormonaux, dont le FGF15/19. Cette hypothèse est appuyée par des données préliminaires tirées d'une étude de Eren et ses collègues rapportant une baisse des concentrations plasmatiques de FGF19 après la cholecystectomie chez les patients présentant une stéatose hépatique [339].

La variabilité dans la composition des diètes HFHC

La plupart des diètes enrichies de cholestérol utilisées dans les protocoles expérimentaux contiennent de fortes teneurs en cholestérol. Les taux de cholestérol des diètes administrées peuvent atteindre plus de dix fois celui de l'apport maximal quotidien recommandé chez l'humain. L'utilisation de taux pharmacologiques de cholestérol en recherche est justifiée par le fait que, jusqu'à un certain seuil, des mécanismes compensatoires normalisent le cholestérol plasmatique. Puisque la diète HFHC était, *a priori*, un modèle d'athérosclérose, les études mécanistiques et cliniques chez les animaux ont été réalisées avec des niveaux pharmacologiques de cholestérol en vue d'accélérer ce processus. Il est donc impératif de discuter de ce détail dans l'interprétation des résultats des modèles de la stéatose induite par la diète HFHC. Alors qu'un faible apport de cholestérol alimentaire exerce peu d'influence sur le profil lipidique, il en est tout autrement pour les lipides hépatiques. En effet, un faible supplément de cholestérol (0,08 %) modifie peu les niveaux de cholestérol plasmatiques alors qu'il augmente de 200 % les niveaux de cholestérol libre et de plus de 300 % les niveaux de cholestérol ester hépatiques par rapport à une diète dépourvue de cholestérol, et ce, indépendamment du type et de la quantité d'acides gras consommés [340]. Cette démonstration de Lin et de ses collaborateurs indique que le cholestérol s'accumule plus facilement au foie que dans le compartiment plasmatique. Comme le cholestérol alimentaire est un facteur pro-inflammatoire pour le foie [341] et que l'inflammation influence les niveaux de lipides hépatiques [342], il est important de réviser les quantités de cholestérol utilisées dans l'étude des mécanismes de la stéatose induite par la diète HFHC. Dans cette perspective, lors de notre troisième projet, nous avons sélectionné des diètes avec un taux inférieur de cholestérol (0,25 % et 0,5 %) par rapport aux diètes

HFHC administrées couramment (jusqu'à 2 %) pour induire une stéatose hépatique [1, 11, 319]. Comme nous l'avions postulé, ces faibles quantités de cholestérol ajoutées à une diète riche en lipides augmentaient substantiellement les niveaux de lipides et de cholestérol hépatiques. Plusieurs questions demeurent toutefois sans réponses. Quel est le seuil de tolérance au cholestérol pour l'homéostasie des lipides hépatiques? Ce seuil de tolérance est-il variable d'un individu à l'autre et d'une espèce à une autre? Certes, les réponses à ces questions seront difficiles à établir chez l'humain puisque beaucoup trop de variables nutritionnelles peuvent biaiser les résultats d'une telle étude. Connaissant aussi le danger potentiel du cholestérol alimentaire, les comités d'éthique ne pourraient approuver ce genre d'études expérimentales. Un autre élément de discussion important à souligner concernant les modèles HFHC est la présence d'acide cholique. Un supplément d'acide cholique, un AB déjà abondant au foie, est utilisé dans les modèles HFHC afin de stimuler l'absorption intestinale du cholestérol et des lipides. Néanmoins, l'ajout d'acide cholique a forcément plusieurs effets sur le métabolisme et le transport des lipides et du cholestérol. Tout d'abord, l'accélération de l'absorption du cholestérol et des lipides augmente inévitablement le flux de ces éléments vers le foie. À long terme, un flux accru de lipides et de cholestérol peut favoriser le développement d'une stéatose et même d'une inflammation du foie. De plus, il est possible qu'une administration chronique d'acide cholique désensibilise l'intestin à leur présence et diminue le nombre de transporteurs pour éviter la toxicité. Dans le cas échéant, une répression des récepteurs diminuerait le passage d'AB dans la cellule intestinale. Comme les mécanismes de régulations les plus importants des AB sont les facteurs de transcription nucléaires, ceux-ci ne répondraient pas aussi bien qu'en conditions nutritionnelles normales. Même si l'acide cholique est utilisé pour amplifier le développement de l'athérosclérose et de la stéatose hépatique, l'emploi de cet AB peut occasionner certains biais. Même si les données issues d'études animales ne peuvent pas être entièrement transposées à l'humain, ces modèles sont les méthodes les plus efficaces pour étudier les mécanismes intrahépatiques de la stéatose induite par la surconsommation de cholestérol alimentaire.

Conclusions et perspectives

Les trois études de cette thèse mettent en évidence la fonction majeure qu'exercent les estrogènes sur l'homéostasie des lipides hépatiques. En opposition aux effets de ces hormones femelles, la diète athérogène dérègle profondément le métabolisme des lipides et du cholestérol hépatiques, et ce, de manière plus prononcée lors d'un déficit estrogénique. De manière intéressante, la diète athérogène et le retrait des estrogènes répriment conjointement l'expression génique d'enzymes relatives à la production de VLDL et à l'excrétion d'AB, deux mécanismes sous-jacents à la stéatose. Le fait que les changements de l'expression génique d'enzymes déterminantes de ces voies corrélaient positivement avec le degré de sévérité de la stéatose suggère la contribution de ces voies dans l'accumulation de lipides hépatiques.

Considérant l'état actuel faible de la littérature portant sur l'effet d'une diète athérogène dans le contexte du déficit estrogénique, cette thèse a contribué à l'avancement des connaissances. Les cibles cellulaires des estrogènes dans le contrôle du métabolisme du cholestérol impliquent à la fois les tissus périphériques et le foie. La mise en évidence de l'effet athérogène de l'absence des estrogènes par des mécanismes cellulaires et moléculaires observés dans cette thèse pourrait éventuellement permettre d'ajuster les cibles thérapeutiques.

En revanche, la présence des estrogènes ne suffit pas à contrecarrer les effets délétères d'une consommation chronique d'aliments athérogènes. Les données recueillies tout au long de cette thèse soulignent l'importance de limiter la consommation de cholestérol chez les sujets atteints de stéatose, et ce, avant ou après la ménopause. Étant donné les divergences existant entre les lipides plasmatiques et hépatiques, ces études soulignent également la nécessité de poursuivre l'investigation des effets du cholestérol et du retrait des estrogènes aux niveaux cellulaire et moléculaire. Cette démarche est d'autant plus indispensable que l'utilisation inappropriée de molécules comme les statines demeure parmi les pratiques les plus courantes dans le traitement de l'hypercholestérolémie et de la stéatose hépatique.

Bibliographie

1. Savard, C., et al., *Synergistic interaction of dietary cholesterol and dietary fat in inducing experimental steatohepatitis*. Hepatology, 2012.
2. Matsuzawa, N., et al., *Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet*. Hepatology, 2007. **46**(5): p. 1392-403.
3. Cote, I., et al., *Liver fat accumulation may be dissociated from adiposity gain in ovariectomized rats*. Climacteric, 2012.
4. Barsalani, R., N.A. Chapados, and J.M. Lavoie, *Hepatic VLDL-TG production and MTP gene expression are decreased in ovariectomized rats: effects of exercise training*. Horm Metab Res, 2010. **42**(12): p. 860-7.
5. Barsalani, R., et al., *Liver of ovariectomized rats is resistant to resorption of lipids*. Physiol Behav, 2008. **95**(1-2): p. 216-21.
6. Paquette, A., et al., *Time course of liver lipid infiltration in ovariectomized rats: impact of a high-fat diet*. Maturitas, 2007. **58**(2): p. 182-90.
7. Pighon, A., et al., *Exercise training in ovariectomized rats stimulates estrogenic-like effects on expression of genes involved in lipid accumulation and subclinical inflammation in liver*. Metabolism, 2011. **60**(5): p. 629-39.
8. Pighon, A., et al., *Resistance training attenuates fat mass regain after weight loss in ovariectomized rats*. Maturitas, 2009. **64**(1): p. 52-7.
9. Lucas, E.A., et al., *Flaxseed but not flaxseed oil prevented the rise in serum cholesterol due to ovariectomy in the Golden Syrian hamsters*. J Med Food, 2011. **14**(3): p. 261-7.
10. Kato, M., et al., *Hypocholesterolaemic effect of water-insoluble fish protein from Alaska pollock in ovariectomised rats is not abolished by methionine addition*. Br J Nutr, 2011. **106**(1): p. 57-62.
11. Kamada, Y., et al., *Estrogen deficiency worsens steatohepatitis in mice fed high-fat and high-cholesterol diet*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2011. **301**(6): p. G1031-43.
12. Kato, M., et al., *The mechanism of the cholesterol-lowering effect of water-insoluble fish protein in ovariectomised rats*. Br J Nutr, 2009. **102**(6): p. 816-24.
13. Choi, M.J. and K.J. Chang, *The effects of dietary taurine supplementation on plasma and liver lipid in ovariectomized rats*. Adv Exp Med Biol, 2009. **643**: p. 389-95.
14. Bhathena, J., et al., *Diet-induced metabolic hamster model of nonalcoholic fatty liver disease*. Diabetes Metab Syndr Obes, 2011. **4**: p. 195-203.
15. Lecerf, J.M. and M. de Lorgeril, *Dietary cholesterol: from physiology to cardiovascular risk*. The British journal of nutrition, 2011: p. 1-9.
16. Yoshida, M., *Novel role of NPC1L1 in the regulation of hepatic metabolism: potential contribution of ezetimibe in NAFLD/NASH treatment*. Current vascular pharmacology, 2011. **9**(1): p. 121-3.

17. Labonte, E.D., et al., *Class B type I scavenger receptor is responsible for the high affinity cholesterol binding activity of intestinal brush border membrane vesicles*. *Biochimica et biophysica acta*, 2007. **1771**(9): p. 1132-9.
18. Altmann, S.W., et al., *Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption*. *Science*, 2004. **303**(5661): p. 1201-4.
19. Davis, H.R., Jr., et al., *Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(32): p. 33586-92.
20. Levy, E., et al., *Intestinal cholesterol transport proteins: an update and beyond*. *Curr Opin Lipidol*, 2007. **18**(3): p. 310-8.
21. Repa, J.J., et al., *ACAT2 deficiency limits cholesterol absorption in the cholesterol-fed mouse: impact on hepatic cholesterol homeostasis*. *Hepatology*, 2004. **40**(5): p. 1088-97.
22. Redgrave, T.G., *Formation of cholesteryl ester-rich particulate lipid during metabolism of chylomicrons*. *J Clin Invest*, 1970. **49**(3): p. 465-71.
23. Mjos, O.D., et al., *Characterization of remnants produced during the metabolism of triglyceride-rich lipoproteins of blood plasma and intestinal lymph in the rat*. *J Clin Invest*, 1975. **56**(3): p. 603-15.
24. Gould, R.G., et al., *Cholesterol metabolism. I. Effect of dietary cholesterol on the synthesis of cholesterol in dog tissue in vitro*. *J Biol Chem*, 1953. **201**(2): p. 519-28.
25. Mahley, R.W., et al., *Role of heparan sulfate proteoglycans and the LDL receptor-related protein in remnant lipoprotein metabolism*. *Ann N Y Acad Sci*, 1994. **737**: p. 39-52.
26. Mahley, R.W. and Y. Huang, *Atherogenic remnant lipoproteins: role for proteoglycans in trapping, transferring, and internalizing*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(1): p. 94-8.
27. Choi, S.Y., et al., *Use of an anti-low density lipoprotein receptor antibody to quantify the role of the LDL receptor in the removal of chylomicron remnants in the mouse in vivo*. *J Clin Invest*, 1991. **88**(4): p. 1173-81.
28. Hui, D.Y., T.L. Innerarity, and R.W. Mahley, *Lipoprotein binding to canine hepatic membranes. Metabolically distinct apo-E and apo-B,E receptors*. *J Biol Chem*, 1981. **256**(11): p. 5646-55.
29. MacArthur, J.M., et al., *Liver heparan sulfate proteoglycans mediate clearance of triglyceride-rich lipoproteins independently of LDL receptor family members*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(1): p. 153-64.
30. Williams, K.J. and I.V. Fuki, *Cell-surface heparan sulfate proteoglycans: dynamic molecules mediating ligand catabolism*. *Curr Opin Lipidol*, 1997. **8**(5): p. 253-62.
31. Ji, Z.S., et al., *Heparan sulfate proteoglycans participate in hepatic lipase and apolipoprotein E-mediated binding and uptake of plasma lipoproteins, including high density lipoproteins*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(50): p. 31285-92.
32. Ji, Z.S., S. Fazio, and R.W. Mahley, *Variable heparan sulfate proteoglycan binding of apolipoprotein E variants may modulate the expression of type III hyperlipoproteinemia*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(18): p. 13421-8.

33. Ji, Z.S., et al., *Role of heparan sulfate proteoglycans in the binding and uptake of apolipoprotein E-enriched remnant lipoproteins by cultured cells.* J Biol Chem, 1993. **268**(14): p. 10160-7.
34. Ji, Z.S., D.A. Sanan, and R.W. Mahley, *Intravenous heparinase inhibits remnant lipoprotein clearance from the plasma and uptake by the liver: in vivo role of heparan sulfate proteoglycans.* J Lipid Res, 1995. **36**(3): p. 583-92.
35. Herz, J., et al., *Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor.* EMBO J, 1988. **7**(13): p. 4119-27.
36. Ji, Z.S., et al., *Secretion-capture role for apolipoprotein E in remnant lipoprotein metabolism involving cell surface heparan sulfate proteoglycans.* J Biol Chem, 1994. **269**(4): p. 2764-72.
37. Herz, J., D.E. Clouthier, and R.E. Hammer, *LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation.* Cell, 1992. **71**(3): p. 411-21.
38. Rohlmann, A., et al., *Inducible inactivation of hepatic LRP gene by cre-mediated recombination confirms role of LRP in clearance of chylomicron remnants.* J Clin Invest, 1998. **101**(3): p. 689-95.
39. Jeong, T., et al., *Increased sphingomyelin content of plasma lipoproteins in apolipoprotein E knockout mice reflects combined production and catabolic defects and enhances reactivity with mammalian sphingomyelinase.* J Clin Invest, 1998. **101**(4): p. 905-12.
40. Iglesias, P. and J.J. Diez, *New drugs for the treatment of hypercholesterolaemia.* Expert opinion on investigational drugs, 2003. **12**(11): p. 1777-89.
41. Dietschy, J.M. and S.D. Turley, *Cholesterol metabolism in the brain.* Curr Opin Lipidol, 2001. **12**(2): p. 105-12.
42. Jurevics, H. and P. Morell, *Cholesterol for synthesis of myelin is made locally, not imported into brain.* J Neurochem, 1995. **64**(2): p. 895-901.
43. Plump, A.S., et al., *Apolipoprotein A-I is required for cholesteryl ester accumulation in steroidogenic cells and for normal adrenal steroid production.* J Clin Invest, 1996. **97**(11): p. 2660-71.
44. Trigatti, B., et al., *Influence of the high density lipoprotein receptor SR-BI on reproductive and cardiovascular pathophysiology.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(16): p. 9322-7.
45. Voet, D. and J.G. Voet, *Biochimie.* 2e éd. ed. 2005, Bruxelles: De Boeck. xv, 1,583 p.
46. Charlton-Menys, V. and P.N. Durrington, *Squalene synthase inhibitors : clinical pharmacology and cholesterol-lowering potential.* Drugs, 2007. **67**(1): p. 11-6.
47. Chapados, N.A. and J.M. Lavoie, *Exercise training increases hepatic endoplasmic reticulum (er) stress protein expression in MTP-inhibited high-fat fed rats.* Cell Biochem Funct, 2010. **28**(3): p. 202-10.
48. Tran, K., et al., *Intracellular assembly of very low density lipoproteins containing apolipoprotein B100 in rat hepatoma McA-RH7777 cells.* J Biol Chem, 2002. **277**(34): p. 31187-200.

49. Gordon, D.A. and H. Jamil, *Progress towards understanding the role of microsomal triglyceride transfer protein in apolipoprotein-B lipoprotein assembly*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1486**(1): p. 72-83.
50. Rustaeus, S., et al., *The microsomal triglyceride transfer protein catalyzes the post-translational assembly of apolipoprotein B-100 very low density lipoprotein in McA-RH7777 cells*. J Biol Chem, 1998. **273**(9): p. 5196-203.
51. Olofsson, S.O., et al., *Lipid droplets as dynamic organelles connecting storage and efflux of lipids*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1791**(6): p. 448-58.
52. Ye, J., et al., *Cideb, an ER- and lipid droplet-associated protein, mediates VLDL lipidation and maturation by interacting with apolipoprotein B*. Cell Metab, 2009. **9**(2): p. 177-90.
53. Li, J.Z., et al., *Cideb regulates diet-induced obesity, liver steatosis, and insulin sensitivity by controlling lipogenesis and fatty acid oxidation*. Diabetes, 2007. **56**(10): p. 2523-32.
54. Hoeg, J.M., et al., *Both apolipoproteins B-48 and B-100 are synthesized and secreted by the human intestine*. J Lipid Res, 1990. **31**(10): p. 1761-9.
55. Attie, A.D., *ABCA1: at the nexus of cholesterol, HDL and atherosclerosis*. Trends Biochem Sci, 2007. **32**(4): p. 172-9.
56. Timmins, J.M., et al., *Targeted inactivation of hepatic Abca1 causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of apoA-I*. J Clin Invest, 2005. **115**(5): p. 1333-42.
57. Lambert, G., et al., *Analysis of glomerulosclerosis and atherosclerosis in lecithin cholesterol acyltransferase-deficient mice*. J Biol Chem, 2001. **276**(18): p. 15090-8.
58. Ng, D.S., *The role of lecithin:cholesterol acyltransferase in the modulation of cardiometabolic risks - a clinical update and emerging insights from animal models*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1821**(4): p. 654-9.
59. Smaoui, M., et al., *Modulation of plasma cholesteryl ester transfer protein activity by unsaturated fatty acids in Tunisian type 2 diabetic women*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2006. **16**(1): p. 44-53.
60. Francone, O.L., C.J. Fielding, and P.E. Fielding, *Distribution of cell-derived cholesterol among plasma lipoproteins: a comparison of three techniques*. J Lipid Res, 1990. **31**(12): p. 2195-200.
61. Wang, N., et al., *Specific binding of ApoA-I, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABC1*. J Biol Chem, 2000. **275**(42): p. 33053-8.
62. Castellani, L.W., et al., *Overexpression of apolipoprotein AIII in transgenic mice converts high density lipoproteins to proinflammatory particles*. J Clin Invest, 1997. **100**(2): p. 464-74.
63. Amar, M.J., et al., *Hepatic lipase facilitates the selective uptake of cholesteryl esters from remnant lipoproteins in apoE-deficient mice*. J Lipid Res, 1998. **39**(12): p. 2436-42.
64. Kobayashi, J., et al., *Analysis of protein structure-function in vivo. Adenovirus-mediated transfer of lipase lid mutants in hepatic lipase-deficient mice*. J Biol Chem, 1996. **271**(42): p. 26296-301.

65. Applebaum-Bowden, D., et al., *Hepatic lipase gene therapy in hepatic lipase-deficient mice. Adenovirus-mediated replacement of a lipolytic enzyme to the vascular endothelium.* J Clin Invest, 1996. **97**(3): p. 799-805.
66. Breckenridge, W.C., et al., *Lipoprotein abnormalities associated with a familial deficiency of hepatic lipase.* Atherosclerosis, 1982. **45**(2): p. 161-79.
67. Santamarina-Fojo, S., C. Haudenschild, and M. Amar, *The role of hepatic lipase in lipoprotein metabolism and atherosclerosis.* Curr Opin Lipidol, 1998. **9**(3): p. 211-9.
68. Kuusi, T., P.K. Kinnunen, and E.A. Nikkila, *Hepatic endothelial lipase antiserum influences rat plasma low and high density lipoproteins in vivo.* FEBS Lett, 1979. **104**(2): p. 384-8.
69. Karackattu, S.L., B. Trigatti, and M. Krieger, *Hepatic lipase deficiency delays atherosclerosis, myocardial infarction, and cardiac dysfunction and extends lifespan in SR-BI/apolipoprotein E double knockout mice.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(3): p. 548-54.
70. Glass, C., et al., *Dissociation of tissue uptake of cholesterol ester from that of apoprotein A-I of rat plasma high density lipoprotein: selective delivery of cholesterol ester to liver, adrenal, and gonad.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(17): p. 5435-9.
71. Spady, D.K., D.W. Bilheimer, and J.M. Dietschy, *Rates of receptor-dependent and -independent low density lipoprotein uptake in the hamster.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(11): p. 3499-503.
72. Khachadurian, A.K., *The Inheritance of Essential Familial Hypercholesterolemia.* Am J Med, 1964. **37**: p. 402-7.
73. Myant, N.B., *The metabolic basis of familial hypercholesterolemia.* Klin Wochenschr, 1983. **61**(8): p. 383-401.
74. Jeon, H. and S.C. Blacklow, *Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor.* Annu Rev Biochem, 2005. **74**: p. 535-62.
75. Davis, C.G., et al., *Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region.* Nature, 1987. **326**(6115): p. 760-5.
76. Abifadel, M., et al., *Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia.* Nat Genet, 2003. **34**(2): p. 154-6.
77. Zhang, D.W., et al., *Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation.* J Biol Chem, 2007. **282**(25): p. 18602-12.
78. Horton, J.D., J.C. Cohen, and H.H. Hobbs, *PCSK9: a convertase that coordinates LDL catabolism.* J Lipid Res, 2009. **50** Suppl: p. S172-7.
79. Stone, B.G., et al., *Regulation of hepatic cholesterol ester hydrolase and acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase in the rat.* J Lipid Res, 1989. **30**(11): p. 1681-90.
80. Schwartz, C.C., et al., *Preferential utilization of free cholesterol from high-density lipoproteins for biliary cholesterol secretion in man.* Science, 1978. **200**(4337): p. 62-4.

81. Oude Elferink, R.P., C.C. Paulusma, and A.K. Groen, *Hepatocanalicular transport defects: pathophysiologic mechanisms of rare diseases*. Gastroenterology, 2006. **130**(3): p. 908-25.
82. Oude Elferink, R.P. and A.K. Groen, *Mechanisms of biliary lipid secretion and their role in lipid homeostasis*. Semin Liver Dis, 2000. **20**(3): p. 293-305.
83. Smit, J.J., et al., *Homozygous disruption of the murine mdr2 P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease*. Cell, 1993. **75**(3): p. 451-62.
84. Oude Elferink, R.P., et al., *Regulation of biliary lipid secretion by mdr2 P-glycoprotein in the mouse*. J Clin Invest, 1995. **95**(1): p. 31-8.
85. Yu, L., et al., *Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(25): p. 16237-42.
86. Dikkers, A. and U.J. Tietge, *Biliary cholesterol secretion: more than a simple ABC*. World J Gastroenterol, 2010. **16**(47): p. 5936-45.
87. Russell, D.W., *The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis*. Annu Rev Biochem, 2003. **72**: p. 137-74.
88. Rosen, H., et al., *Markedly reduced bile acid synthesis but maintained levels of cholesterol and vitamin D metabolites in mice with disrupted sterol 27-hydroxylase gene*. J Biol Chem, 1998. **273**(24): p. 14805-12.
89. Bjorkhem, I., *Cerebrotendinous xanthomatosis*. Curr Opin Lipidol, 2013.
90. Honda, A., et al., *Side chain hydroxylations in bile acid biosynthesis catalyzed by CYP3A are markedly up-regulated in Cyp27^{-/-} mice but not in cerebrotendinous xanthomatosis*. J Biol Chem, 2001. **276**(37): p. 34579-85.
91. Honda, A., et al., *Differences in hepatic levels of intermediates in bile acid biosynthesis between Cyp27^{-/-} mice and CTX*. J Lipid Res, 2001. **42**(2): p. 291-300.
92. Steinberg, S.J., et al., *Human liver-specific very-long-chain acyl-coenzyme A synthetase: cDNA cloning and characterization of a second enzymatically active protein*. Mol Genet Metab, 1999. **68**(1): p. 32-42.
93. Alrefai, W.A. and R.K. Gill, *Bile acid transporters: structure, function, regulation and pathophysiological implications*. Pharm Res, 2007. **24**(10): p. 1803-23.
94. Dawson, P.A., T. Lan, and A. Rao, *Bile acid transporters*. J Lipid Res, 2009. **50**(12): p. 2340-57.
95. Bahar, R.J. and A. Stolz, *Bile acid transport*. Gastroenterol Clin North Am, 1999. **28**(1): p. 27-58.
96. Abe, T., et al., *Molecular characterization and tissue distribution of a new organic anion transporter subtype (oatp3) that transports thyroid hormones and taurocholate and comparison with oatp2*. J Biol Chem, 1998. **273**(35): p. 22395-401.
97. Walters, H.C., et al., *Expression, transport properties, and chromosomal location of organic anion transporter subtype 3*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2000. **279**(6): p. G1188-200.

98. Dietschy, J.M., *Mechanisms for the intestinal absorption of bile acids*. J Lipid Res, 1968. **9**(3): p. 297-309.
99. Hofmann, A.F. and J.R. Poley, *Role of bile acid malabsorption in pathogenesis of diarrhea and steatorrhea in patients with ileal resection. I. Response to cholestyramine or replacement of dietary long chain triglyceride by medium chain triglyceride*. Gastroenterology, 1972. **62**(5): p. 918-34.
100. Marcus, S.N., et al., *Active absorption of conjugated bile acids in vivo. Kinetic parameters and molecular specificity of the ileal transport system in the rat*. Gastroenterology, 1991. **100**(1): p. 212-21.
101. Aldini, R., et al., *Intestinal absorption of bile acids in the rabbit: different transport rates in jejunum and ileum*. Gastroenterology, 1996. **110**(2): p. 459-68.
102. Wong, M.H., et al., *Expression cloning and characterization of the hamster ileal sodium-dependent bile acid transporter*. J Biol Chem, 1994. **269**(2): p. 1340-7.
103. Wong, M.H., P. Oelkers, and P.A. Dawson, *Identification of a mutation in the ileal sodium-dependent bile acid transporter gene that abolishes transport activity*. J Biol Chem, 1995. **270**(45): p. 27228-34.
104. Lucke, C., et al., *Solution structure of ileal lipid binding protein in complex with glycocholate*. Eur J Biochem, 2000. **267**(10): p. 2929-38.
105. Dawson, P.A., et al., *The heteromeric organic solute transporter alpha-beta, OSTalpha-OSTbeta, is an ileal basolateral bile acid transporter*. J Biol Chem, 2005. **280**(8): p. 6960-8.
106. Seward, D.J., et al., *Functional complementation between a novel mammalian polygenic transport complex and an evolutionarily ancient organic solute transporter, OSTalpha-OSTbeta*. J Biol Chem, 2003. **278**(30): p. 27473-82.
107. Hagenbuch, B. and P.J. Meier, *Molecular cloning, chromosomal localization, and functional characterization of a human liver Na⁺/bile acid cotransporter*. J Clin Invest, 1994. **93**(3): p. 1326-31.
108. Kullak-Ublick, G.A., et al., *Functional characterization of the basolateral rat liver organic anion transporting polypeptide*. Hepatology, 1994. **20**(2): p. 411-6.
109. Kruit, J.K., et al., *Increased fecal neutral sterol loss upon liver X receptor activation is independent of biliary sterol secretion in mice*. Gastroenterology, 2005. **128**(1): p. 147-56.
110. Cheng, S.H. and M.M. Stanley, *Secretion of cholesterol by intestinal mucosa in patients with complete common bile duct obstruction*. Proc Soc Exp Biol Med, 1959. **101**(2): p. 223-5.
111. Chevallier, F., *[Study of the origin of fecal sterols in the rat by means of radioactive indicators. I. Demonstration of the secretion of sterols into the intestinal contents]*. Bull Soc Chim Biol (Paris), 1960. **42**: p. 623-32.
112. Grundy, S.M. and E.H. Ahrens, Jr., *Measurements of cholesterol turnover, synthesis, and absorption in man, carried out by isotope kinetic and sterol balance methods*. J Lipid Res, 1969. **10**(1): p. 91-107.
113. Lindstedt, S. and E.H. Ahrens, Jr., *Conversion of cholesterol to bile acids in man*. Proc Soc Exp Biol Med, 1961. **108**: p. 286-8.

114. van der Velde, A.E., et al., *Direct intestinal cholesterol secretion contributes significantly to total fecal neutral sterol excretion in mice.* Gastroenterology, 2007. **133**(3): p. 967-75.
115. Pathak, R.K., et al., *Tissue-specific sorting of the human LDL receptor in polarized epithelia of transgenic mice.* J Cell Biol, 1990. **111**(2): p. 347-59.
116. Rashid, S., et al., *Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(15): p. 5374-9.
117. Le May, C., et al., *Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 null mice are protected from postprandial triglyceridemia.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(5): p. 684-90.
118. Le May, C., et al., *Transintestinal Cholesterol Excretion Is an Active Metabolic Process Modulated by PCSK9 and Statin Involving ABCB1.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013.
119. Vrins, C.L., et al., *Trans-intestinal cholesterol efflux is not mediated through high density lipoprotein.* J Lipid Res, 2012. **53**(10): p. 2017-23.
120. Shimano, H., et al., *Overproduction of cholesterol and fatty acids causes massive liver enlargement in transgenic mice expressing truncated SREBP-1a.* J Clin Invest, 1996. **98**(7): p. 1575-84.
121. Shimano, H., et al., *Elevated levels of SREBP-2 and cholesterol synthesis in livers of mice homozygous for a targeted disruption of the SREBP-1 gene.* J Clin Invest, 1997. **100**(8): p. 2115-24.
122. Brown, M.S. and J.L. Goldstein, *A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(20): p. 11041-8.
123. Matsuda, M., et al., *SREBP cleavage-activating protein (SCAP) is required for increased lipid synthesis in liver induced by cholesterol deprivation and insulin elevation.* Genes Dev, 2001. **15**(10): p. 1206-16.
124. Yang, T., et al., *Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER.* Cell, 2002. **110**(4): p. 489-500.
125. Engelking, L.J., et al., *Overexpression of Insig-1 in the livers of transgenic mice inhibits SREBP processing and reduces insulin-stimulated lipogenesis.* J Clin Invest, 2004. **113**(8): p. 1168-75.
126. Yabe, D., M.S. Brown, and J.L. Goldstein, *Insig-2, a second endoplasmic reticulum protein that binds SCAP and blocks export of sterol regulatory element-binding proteins.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(20): p. 12753-8.
127. Sever, N., et al., *Accelerated degradation of HMG CoA reductase mediated by binding of insig-1 to its sterol-sensing domain.* Mol Cell, 2003. **11**(1): p. 25-33.
128. Sato, R., *Sterol metabolism and SREBP activation.* Arch Biochem Biophys, 2010. **501**(2): p. 177-81.
129. Smith, J.R., et al., *Multiple sterol regulatory elements in promoter for hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase.* J Biol Chem, 1988. **263**(34): p. 18480-7.

130. Vallett, S.M., et al., *A direct role for sterol regulatory element binding protein in activation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene*. J Biol Chem, 1996. **271**(21): p. 12247-53.
131. Guan, G., et al., *Multiple sequence elements are involved in the transcriptional regulation of the human squalene synthase gene*. J Biol Chem, 1997. **272**(15): p. 10295-302.
132. Smith, J.R., et al., *Identification of nucleotides responsible for enhancer activity of sterol regulatory element in low density lipoprotein receptor gene*. J Biol Chem, 1990. **265**(4): p. 2306-10.
133. Dong, B., et al., *Strong induction of PCSK9 gene expression through HNF1alpha and SREBP2: mechanism for the resistance to LDL-cholesterol lowering effect of statins in dyslipidemic hamsters*. J Lipid Res, 2010. **51**(6): p. 1486-95.
134. Sato, R., et al., *Sterol regulatory element-binding protein negatively regulates microsomal triglyceride transfer protein gene transcription*. J Biol Chem, 1999. **274**(35): p. 24714-20.
135. Tamehiro, N., et al., *Sterol regulatory element-binding protein-2- and liver X receptor-driven dual promoter regulation of hepatic ABC transporter A1 gene expression: mechanism underlying the unique response to cellular cholesterol status*. J Biol Chem, 2007. **282**(29): p. 21090-9.
136. Dietschy, J.M. and M.D. Siperstein, *Effect of cholesterol feeding and fasting on sterol synthesis in seventeen tissues of the rat*. J Lipid Res, 1967. **8**(2): p. 97-104.
137. Spady, D.K. and J.M. Dietschy, *Sterol synthesis in vivo in 18 tissues of the squirrel monkey, guinea pig, rabbit, hamster, and rat*. J Lipid Res, 1983. **24**(3): p. 303-15.
138. Turley, S.D., J.M. Andersen, and J.M. Dietschy, *Rates of sterol synthesis and uptake in the major organs of the rat in vivo*. J Lipid Res, 1981. **22**(4): p. 551-69.
139. Gleeson, A., et al., *The relationship between cholesterol absorption and intestinal cholesterol synthesis in the diabetic rat model*. Int J Exp Diabetes Res, 2000. **1**(3): p. 203-10.
140. Field, F.J., et al., *Gene expression of sterol regulatory element-binding proteins in hamster small intestine*. J Lipid Res, 2001. **42**(1): p. 1-8.
141. Field, F.J., et al., *Regulation of sterol regulatory element-binding proteins in hamster intestine by changes in cholesterol flux*. J Biol Chem, 2001. **276**(20): p. 17576-83.
142. Alrefai, W.A., et al., *Modulation of human Niemann-Pick C1-like 1 gene expression by sterol: Role of sterol regulatory element binding protein 2*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **292**(1): p. G369-76.
143. Kumar, P., et al., *SREBP2 mediates the modulation of intestinal NPC1L1 expression by curcumin*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2011. **301**(1): p. G148-55.
144. Mangelsdorf, D.J., et al., *The nuclear receptor superfamily: the second decade*. Cell, 1995. **83**(6): p. 835-9.
145. Shinar, D.M., et al., *NER, a new member of the gene family encoding the human steroid hormone nuclear receptor*. Gene, 1994. **147**(2): p. 273-6.

146. Song, C., et al., *Ubiquitous receptor: a receptor that modulates gene activation by retinoic acid and thyroid hormone receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(23): p. 10809-13.
147. Willy, P.J., et al., *LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway*. Genes Dev, 1995. **9**(9): p. 1033-45.
148. Apfel, R., et al., *A novel orphan receptor specific for a subset of thyroid hormone-responsive elements and its interaction with the retinoid/thyroid hormone receptor subfamily*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(10): p. 7025-35.
149. Janowski, B.A., et al., *An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha*. Nature, 1996. **383**(6602): p. 728-31.
150. Lehmann, J.M., et al., *Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway*. J Biol Chem, 1997. **272**(6): p. 3137-40.
151. Forman, B.M., et al., *The orphan nuclear receptor LXRalpha is positively and negatively regulated by distinct products of mevalonate metabolism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(20): p. 10588-93.
152. Greschik, H. and D. Moras, *Structure-activity relationship of nuclear receptor-ligand interactions*. Curr Top Med Chem, 2003. **3**(14): p. 1573-99.
153. Calkin, A.C. and P. Tontonoz, *Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(4): p. 213-24.
154. Nomiyama, T. and D. Bruemmer, *Liver X receptors as therapeutic targets in metabolism and atherosclerosis*. Curr Atheroscler Rep, 2008. **10**(1): p. 88-95.
155. Venkateswaran, A., et al., *Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(22): p. 12097-102.
156. Repa, J.J., et al., *Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers*. Science, 2000. **289**(5484): p. 1524-9.
157. Kennedy, M.A., et al., *Characterization of the human ABCG1 gene: liver X receptor activates an internal promoter that produces a novel transcript encoding an alternative form of the protein*. J Biol Chem, 2001. **276**(42): p. 39438-47.
158. Wang, N., et al., *ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(26): p. 9774-9.
159. Kennedy, M.A., et al., *ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation*. Cell Metab, 2005. **1**(2): p. 121-31.
160. Mak, P.A., et al., *Regulated expression of the apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II gene cluster in murine and human macrophages. A critical role for nuclear liver X receptors alpha and beta*. J Biol Chem, 2002. **277**(35): p. 31900-8.
161. Luo, Y. and A.R. Tall, *Sterol upregulation of human CETP expression in vitro and in transgenic mice by an LXR element*. J Clin Invest, 2000. **105**(4): p. 513-20.
162. Zhang, Y., et al., *Regulation of lipoprotein lipase by the oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta*. J Biol Chem, 2001. **276**(46): p. 43018-24.
163. Joseph, S.B., et al., *Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(11): p. 7604-9.

164. Levin, N., et al., *Macrophage liver X receptor is required for antiatherogenic activity of LXR agonists*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(1): p. 135-42.
165. Ishimoto, K., et al., *Identification of human low-density lipoprotein receptor as a novel target gene regulated by liver X receptor alpha*. *FEBS Lett*, 2006. **580**(20): p. 4929-33.
166. Peet, D.J., et al., *Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha*. *Cell*, 1998. **93**(5): p. 693-704.
167. Berge, K.E., et al., *Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters*. *Science*, 2000. **290**(5497): p. 1771-5.
168. Repa, J.J., et al., *Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(21): p. 18793-800.
169. Repa, J.J., et al., *Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRA and LXRbeta*. *Genes Dev*, 2000. **14**(22): p. 2819-30.
170. Schultz, J.R., et al., *Role of LXRs in control of lipogenesis*. *Genes Dev*, 2000. **14**(22): p. 2831-8.
171. Duval, C., et al., *Niemann-Pick C1 like 1 gene expression is down-regulated by LXR activators in the intestine*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **340**(4): p. 1259-63.
172. Plosch, T., et al., *Increased hepatobiliary and fecal cholesterol excretion upon activation of the liver X receptor is independent of ABCA1*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(37): p. 33870-7.
173. van der Veen, J.N., et al., *Activation of the liver X receptor stimulates trans-intestinal excretion of plasma cholesterol*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(29): p. 19211-9.
174. Seol, W., H.S. Choi, and D.D. Moore, *Isolation of proteins that interact specifically with the retinoid X receptor: two novel orphan receptors*. *Mol Endocrinol*, 1995. **9**(1): p. 72-85.
175. Forman, B.M., et al., *Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites*. *Cell*, 1995. **81**(5): p. 687-93.
176. Parks, D.J., et al., *Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor*. *Science*, 1999. **284**(5418): p. 1365-8.
177. Makishima, M., et al., *Identification of a nuclear receptor for bile acids*. *Science*, 1999. **284**(5418): p. 1362-5.
178. Goodwin, B., et al., *A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis*. *Mol Cell*, 2000. **6**(3): p. 517-26.
179. Lu, T.T., et al., *Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors*. *Mol Cell*, 2000. **6**(3): p. 507-15.
180. Sinal, C.J., et al., *Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis*. *Cell*, 2000. **102**(6): p. 731-44.
181. Zhang, M. and J.Y. Chiang, *Transcriptional regulation of the human sterol 12alpha-hydroxylase gene (CYP8B1): roles of hepatocyte nuclear factor 4alpha in mediating bile acid repression*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(45): p. 41690-9.

182. Pircher, P.C., et al., *Farnesoid X receptor regulates bile acid-amino acid conjugation*. J Biol Chem, 2003. **278**(30): p. 27703-11.
183. Strautnieks, S.S., et al., *A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis*. Nat Genet, 1998. **20**(3): p. 233-8.
184. de Vree, J.M., et al., *Mutations in the MDR3 gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(1): p. 282-7.
185. Huang, L., et al., *Farnesoid X receptor activates transcription of the phospholipid pump MDR3*. J Biol Chem, 2003. **278**(51): p. 51085-90.
186. Li, T., et al., *Overexpression of cholesterol 7alpha-hydroxylase promotes hepatic bile acid synthesis and secretion and maintains cholesterol homeostasis*. Hepatology, 2011. **53**(3): p. 996-1006.
187. Ehlund, A. and E. Treuter, *Ligand-independent actions of the orphan receptors/corepressors DAX-1 and SHP in metabolism, reproduction and disease*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2012. **130**(3-5): p. 169-79.
188. Chen, F., et al., *Liver receptor homologue-1 mediates species- and cell line-specific bile acid-dependent negative feedback regulation of the apical sodium-dependent bile acid transporter*. J Biol Chem, 2003. **278**(22): p. 19909-16.
189. Landrier, J.F., et al., *The nuclear receptor for bile acids, FXR, transactivates human organic solute transporter-alpha and -beta genes*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006. **290**(3): p. G476-85.
190. Holt, J.A., et al., *Definition of a novel growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis*. Genes Dev, 2003. **17**(13): p. 1581-91.
191. Inagaki, T., et al., *Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis*. Cell Metab, 2005. **2**(4): p. 217-25.
192. Modica, S., et al., *Selective activation of nuclear bile acid receptor FXR in the intestine protects mice against cholestasis*. Gastroenterology, 2012. **142**(2): p. 355-65 e1-4.
193. Lambert, G., et al., *The farnesoid X-receptor is an essential regulator of cholesterol homeostasis*. J Biol Chem, 2003. **278**(4): p. 2563-70.
194. Kast, H.R., et al., *Farnesoid X-activated receptor induces apolipoprotein C-II transcription: a molecular mechanism linking plasma triglyceride levels to bile acids*. Mol Endocrinol, 2001. **15**(10): p. 1720-8.
195. Claudel, T., et al., *Farnesoid X receptor agonists suppress hepatic apolipoprotein CIII expression*. Gastroenterology, 2003. **125**(2): p. 544-55.
196. Bilz, S., et al., *Activation of the farnesoid X receptor improves lipid metabolism in combined hyperlipidemic hamsters*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006. **290**(4): p. E716-22.
197. Hirokane, H., et al., *Bile acid reduces the secretion of very low density lipoprotein by repressing microsomal triglyceride transfer protein gene expression mediated by hepatocyte nuclear factor-4*. J Biol Chem, 2004. **279**(44): p. 45685-92.
198. Mak, P.A., et al., *Identification of PLTP as an LXR target gene and apoE as an FXR target gene reveals overlapping targets for the two nuclear receptors*. J Lipid Res, 2002. **43**(12): p. 2037-41.

199. Li, G., et al., *Farnesoid X receptor induces murine scavenger receptor Class B type I via intron binding*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e35895.
200. Chao, F., et al., *Upregulation of scavenger receptor class B type I expression by activation of FXR in hepatocyte*. Atherosclerosis, 2010. **213**(2): p. 443-8.
201. Watanabe, M., et al., *Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c*. J Clin Invest, 2004. **113**(10): p. 1408-18.
202. Matsukuma, K.E., et al., *Coordinated control of bile acids and lipogenesis through FXR-dependent regulation of fatty acid synthase*. J Lipid Res, 2006. **47**(12): p. 2754-61.
203. Pineda Torra, I., et al., *Bile acids induce the expression of the human peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene via activation of the farnesoid X receptor*. Mol Endocrinol, 2003. **17**(2): p. 259-72.
204. Yang, Z.X., W. Shen, and H. Sun, *Effects of nuclear receptor FXR on the regulation of liver lipid metabolism in patients with non-alcoholic fatty liver disease*. Hepatol Int, 2010. **4**(4): p. 741-8.
205. Fujino, T., et al., *Hypoxia downregulates farnesoid X receptor via a hypoxia-inducible factor-independent but p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway*. FEBS J, 2009. **276**(5): p. 1319-32.
206. Shi, Q.Y., et al., *[Expression of FXR mRNA, PPAR alpha mRNA and bile acid metabolism related genes in intrahepatic cholestasis of pregnant rats]*. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi, 2010. **18**(12): p. 927-30.
207. Zhong, X.Y., et al., *MicroRNA-421 functions as an oncogenic miRNA in biliary tract cancer through down-regulating farnesoid X receptor expression*. Gene, 2012. **493**(1): p. 44-51.
208. Bjursell, M., et al., *Ageing Fxr deficient mice develop increased energy expenditure, improved glucose control and liver damage resembling NASH*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e64721.
209. Kong, B., et al., *Farnesoid X receptor deficiency induces nonalcoholic steatohepatitis in low-density lipoprotein receptor-knockout mice fed a high-fat diet*. J Pharmacol Exp Ther, 2009. **328**(1): p. 116-22.
210. Cipriani, S., et al., *FXR activation reverses insulin resistance and lipid abnormalities and protects against liver steatosis in Zucker (fa/fa) obese rats*. J Lipid Res, 2010. **51**(4): p. 771-84.
211. Mudaliar, S., et al., *Efficacy and Safety of the Farnesoid X Receptor Agonist Obeticholic Acid in Patients With Type 2 Diabetes and Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. Gastroenterology, 2013.
212. Villablanca, A.C., et al., *17beta-estradiol prevents early-stage atherosclerosis in estrogen receptor-alpha deficient female mice*. Journal of cardiovascular translational research, 2009. **2**(3): p. 289-99.
213. Kato, M., et al., *The mechanism of the cholesterol-lowering effect of water-insoluble fish protein in ovariectomised rats*. The British journal of nutrition, 2009. **102**(6): p. 816-24.
214. Babin, P.J. and G.F. Gibbons, *The evolution of plasma cholesterol: direct utility or a "spandrel" of hepatic lipid metabolism?* Prog Lipid Res, 2009. **48**(2): p. 73-91.

215. Suzuki, A. and M.F. Abdelmalek, *Nonalcoholic fatty liver disease in women*. *Womens Health (Lond Engl)*, 2009. **5**(2): p. 191-203.
216. Duan, L.P., et al., *Role of intestinal sterol transporters Abcg5, Abcg8, and Npc1l1 in cholesterol absorption in mice: gender and age effects*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006. **290**(2): p. G269-76.
217. Hollander, D. and D. Morgan, *Increase in cholesterol intestinal absorption with aging in the rat*. *Exp Gerontol*, 1979. **14**(4): p. 201-4.
218. Turley, S.D., et al., *Gender-related differences in bile acid and sterol metabolism in outbred CD-1 mice fed low- and high-cholesterol diets*. *Hepatology*, 1998. **28**(4): p. 1088-94.
219. Uchida, K., et al., *Age-related changes in cholesterol and bile acid metabolism in rats*. *J Lipid Res*, 1978. **19**(5): p. 544-52.
220. Wang, D.Q., *Aging per se is an independent risk factor for cholesterol gallstone formation in gallstone susceptible mice*. *J Lipid Res*, 2002. **43**(11): p. 1950-9.
221. Romero-Aleshire, M.J., et al., *Loss of ovarian function in the VCD mouse-model of menopause leads to insulin resistance and a rapid progression into the metabolic syndrome*. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 2009. **297**(3): p. R587-92.
222. Kim, J.Y., et al., *Parenteral 17beta-estradiol decreases fasting blood glucose levels in non-obese mice with short-term ovariectomy*. *Life sciences*, 2010. **87**(11-12): p. 358-66.
223. Qin, B., et al., *Tumor necrosis factor-alpha induces intestinal insulin resistance and stimulates the overproduction of intestinal apolipoprotein B48-containing lipoproteins*. *Diabetes*, 2007. **56**(2): p. 450-61.
224. Levy, E., et al., *Overproduction of intestinal lipoprotein containing apolipoprotein B-48 in Psammomys obesus: impact of dietary n-3 fatty acids*. *Diabetologia*, 2006. **49**(8): p. 1937-45.
225. Federico, L.M., et al., *Intestinal insulin resistance and aberrant production of apolipoprotein B48 lipoproteins in an animal model of insulin resistance and metabolic dyslipidemia: evidence for activation of protein tyrosine phosphatase-1B, extracellular signal-related kinase, and sterol regulatory element-binding protein-1c in the fructose-fed hamster intestine*. *Diabetes*, 2006. **55**(5): p. 1316-26.
226. Leung, N., et al., *Rosiglitazone improves intestinal lipoprotein overproduction in the fat-fed Syrian Golden hamster, an animal model of nutritionally-induced insulin resistance*. *Atherosclerosis*, 2004. **174**(2): p. 235-41.
227. van Beek, A.P., et al., *Menopause is associated with reduced protection from postprandial lipemia*. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 1999. **19**(11): p. 2737-41.
228. Kushwaha, R.S., et al., *Effects of estrogen and progesterone on plasma lipoproteins and experimental atherosclerosis in the baboon (Papio sp.)*. *Arterioscler Thromb*, 1991. **11**(1): p. 23-31.
229. Srivastava, R.A., et al., *Estrogen up-regulates apolipoprotein E (ApoE) gene expression by increasing ApoE mRNA in the translating pool via the estrogen receptor alpha-mediated pathway*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(52): p. 33360-6.

230. van Beek, A.P., et al., *Menopause is associated with reduced protection from postprandial lipemia*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. **19**(11): p. 2737-41.
231. Nabeno, Y., et al., *Influence of aging and menopause on postprandial lipoprotein responses in healthy adult women*. *J Atheroscler Thromb*, 2007. **14**(3): p. 142-50.
232. Rajaratnam, R.A., H. Gylling, and T.A. Miettinen, *Impaired postprandial clearance of squalene and apolipoprotein B-48 in post-menopausal women with coronary artery disease*. *Clin Sci (Lond)*, 1999. **97**(2): p. 183-92.
233. Weintraub, M., et al., *Hormone replacement therapy enhances postprandial lipid metabolism in postmenopausal women*. *Metabolism*, 1999. **48**(9): p. 1193-6.
234. Srivastava, R.A., D. Baumann, and G. Schonfeld, *In vivo regulation of low-density lipoprotein receptors by estrogen differs at the post-transcriptional level in rat and mouse*. *Eur J Biochem*, 1993. **216**(2): p. 527-38.
235. Ulloa, N., et al., *Sequential estrogen-progestin replacement therapy in healthy postmenopausal women: effects on cholesterol efflux capacity and key proteins regulating high-density lipoprotein levels*. *Metabolism: clinical and experimental*, 2002. **51**(11): p. 1410-7.
236. Lucas, E.A., et al., *Flaxseed but not flaxseed oil prevented the rise in serum cholesterol due to ovariectomy in the Golden Syrian hamsters*. *Journal of medicinal food*, 2011. **14**(3): p. 261-7.
237. Pallottini, V., et al., *Mechanisms underlying the impaired regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in aged rat liver*. *Mechanisms of ageing and development*, 2004. **125**(9): p. 633-9.
238. Trapani, L., F. Violo, and V. Pallottini, *Hypercholesterolemia and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase regulation in aged female rats*. *Experimental gerontology*, 2010. **45**(2): p. 119-28.
239. De Marinis, E., et al., *Sex differences in hepatic regulation of cholesterol homeostasis*. *The Journal of endocrinology*, 2008. **198**(3): p. 635-43.
240. Lemieux, C., et al., *Hypolipidemic action of the SERM acolbifene is associated with decreased liver MTP and increased SR-BI and LDL receptors*. *J Lipid Res*, 2005. **46**(6): p. 1285-94.
241. Cote, I., et al., *Liver fat accumulation may be dissociated from adiposity gain in ovariectomized rats*. *Climacteric*, 2012. **15**(6): p. 594-601.
242. Walsh, B.W. and F.M. Sacks, *Effects of low dose oral contraceptives on very low density and low density lipoprotein metabolism*. *J Clin Invest*, 1993. **91**(5): p. 2126-32.
243. Walsh, B.W., et al., *Effects of postmenopausal estrogen replacement on the concentrations and metabolism of plasma lipoproteins*. *N Engl J Med*, 1991. **325**(17): p. 1196-204.
244. Lerner, D.J. and W.B. Kannel, *Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes: a 26-year follow-up of the Framingham population*. *Am Heart J*, 1986. **111**(2): p. 383-90.
245. Rice, B.H., et al., *Ruminant-produced trans-fatty acids raise plasma HDL particle concentrations in intact and ovariectomized female Hartley guinea pigs*. *J Nutr*, 2012. **142**(9): p. 1679-83.

246. Saberivand, A., et al., *The effects of Cannabis sativa L. seed (hempseed) in the ovariectomized rat model of menopause.* Methods Find Exp Clin Pharmacol, 2010. **32**(7): p. 467-73.
247. Hafiane, A. and J. Genest, *HDL, Atherosclerosis, and Emerging Therapies.* Cholesterol, 2013. **2013**: p. 891403.
248. Collins, P., *HDL-C in post-menopausal women: An important therapeutic target.* Int J Cardiol, 2008. **124**(3): p. 275-82.
249. Badeau, R.M., et al., *Human macrophage cholesterol efflux potential is enhanced by HDL-associated 17beta-estradiol fatty acyl esters.* J Steroid Biochem Mol Biol, 2009. **116**(1-2): p. 44-9.
250. Napolitano, M., et al., *17beta-estradiol enhances the flux of cholesterol through the cholesteryl ester cycle in human macrophages.* Biosci Rep, 2001. **21**(5): p. 637-52.
251. Liang, X., et al., *17beta-estradiol suppresses the macrophage foam cell formation associated with SOCS3.* Horm Metab Res, 2013. **45**(6): p. 423-9.
252. Badeau, R.M., et al., *The impact of gender and serum estradiol levels on HDL-mediated reverse cholesterol transport.* Eur J Clin Invest, 2013. **43**(4): p. 317-23.
253. Persson, L., et al., *Endogenous estrogens lower plasma PCSK9 and LDL cholesterol but not Lp(a) or bile acid synthesis in women.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(3): p. 810-4.
254. Badeau, R.M., et al., *High-density lipoprotein-associated 17beta-estradiol fatty acyl ester uptake by Fu5AH hepatoma cells: implications of the roles of scavenger receptor class B, type I and the low-density lipoprotein receptor.* Biochim Biophys Acta, 2007. **1771**(10): p. 1329-34.
255. Hockerstedt, A., M. Jauhiainen, and M.J. Tikkanen, *Lecithin/cholesterol acyltransferase induces estradiol esterification in high-density lipoprotein, increasing its antioxidant potential.* J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(10): p. 5088-93.
256. Windler, E.E., et al., *The estradiol-stimulated lipoprotein receptor of rat liver. A binding site that membrane mediates the uptake of rat lipoproteins containing apoproteins B and E.* J Biol Chem, 1980. **255**(21): p. 10464-71.
257. Czerny, B., et al., *Effect of 4-hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione (formestane) on the bile secretion and metabolism of 4-(14)C-cholesterol to bile acids.* Pharmacol Rep, 2005. **57**(6): p. 896-900.
258. Czerny, B., et al., *The effect of retinoic acid receptor agonist acitretin on the production of bile and concentrations of some serum components in ovariectomized rats.* Menopause, 2011. **18**(2): p. 213-8.
259. Czerny, B., et al., *Effect of tibolone on turnover of cholesterol to bile acids in ovariectomized rats.* Menopause, 2005. **12**(5): p. 609-12.
260. Serougne, C., et al., *Catabolism of HDL1 cholesteryl ester in the rat. Effect of ethinyl estradiol treatment.* C R Acad Sci III, 1999. **322**(7): p. 591-6.
261. Wang, H.H., et al., *New insights into the molecular mechanisms underlying effects of estrogen on cholesterol gallstone formation.* Biochim Biophys Acta, 2009. **1791**(11): p. 1037-47.

262. Gumucio, J.J. and V.D. Valdivieso, *Studies on the mechanism of the ethynylestradiol impairment of bile flow and bile salt excretion in the rat.* Gastroenterology, 1971. **61**(3): p. 339-44.
263. Jacquemin, E., et al., *Ursodeoxycholic acid improves ethinyl estradiol-induced cholestasis in the rat.* Eur J Clin Invest, 1993. **23**(12): p. 794-802.
264. Crocenzi, F.A., et al., *Beneficial effects of silymarin on estrogen-induced cholestasis in the rat: a study in vivo and in isolated hepatocyte couplets.* Hepatology, 2001. **34**(2): p. 329-39.
265. Yamamoto, Y., et al., *Estrogen receptor alpha mediates 17alpha-ethynylestradiol causing hepatotoxicity.* J Biol Chem, 2006. **281**(24): p. 16625-31.
266. Kishida, T., et al., *Increase of bile acids synthesis and excretion caused by taurine administration prevents the ovariectomy-induced increase in cholesterol concentrations in the serum low-density lipoprotein fraction of Wistar rats.* J Nutr Biochem, 2003. **14**(1): p. 7-16.
267. Colvin, P.L., Jr., et al., *Sex steroids increase cholesterol 7alpha-hydroxylase mRNA in nonhuman primates.* Metabolism, 1998. **47**(4): p. 391-5.
268. Zhang, L., et al., *Hypocholesterolemic effect of capsaicinoids by increased bile acids excretion in ovariectomized rats.* Mol Nutr Food Res, 2013. **57**(6): p. 1080-8.
269. Journe, F., et al., *Farnesol, a mevalonate pathway intermediate, stimulates MCF-7 breast cancer cell growth through farnesoid-X-receptor-mediated estrogen receptor activation.* Breast Cancer Res Treat, 2008. **107**(1): p. 49-61.
270. Aleksunes, L.M., et al., *Repression of hepatobiliary transporters and differential regulation of classic and alternative bile acid pathways in mice during pregnancy.* Toxicol Sci, 2012. **130**(2): p. 257-68.
271. Lai, K., D.C. Harnish, and M.J. Evans, *Estrogen receptor alpha regulates expression of the orphan receptor small heterodimer partner.* J Biol Chem, 2003. **278**(38): p. 36418-29.
272. Boulias, K., et al., *Regulation of hepatic metabolic pathways by the orphan nuclear receptor SHP.* EMBO J, 2005. **24**(14): p. 2624-33.
273. Zhang, L., et al., *The hypocholesterolemic effect of capsaicinoids in ovariectomized rats fed with a cholesterol-free diet was mediated by inhibition of hepatic cholesterol synthesis.* Food Funct, 2013. **4**(5): p. 738-44.
274. Geier, A., et al., *Regulation of basolateral organic anion transporters in ethinylestradiol-induced cholestasis in the rat.* Biochim Biophys Acta, 2003. **1609**(1): p. 87-94.
275. Czerny, B., et al., *Effect of tamoxifen, raloxifen and tibolon on bile components in ovariectomized rats.* Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2005. **119**(2): p. 194-7.
276. Gauthier, M.S., et al., *Concurrent exercise prevents high-fat-diet-induced macrovesicular hepatic steatosis.* J Appl Physiol, 2003. **94**(6): p. 2127-34.
277. Lee, I.M. and P.J. Skerrett, *Physical activity and all-cause mortality: what is the dose-response relation? Med Sci Sports Exerc, 2001. 33(6 Suppl): p. S459-71; discussion S493-4.*

278. Kohl, H.W., 3rd, *Physical activity and cardiovascular disease: evidence for a dose response*. Med Sci Sports Exerc, 2001. **33**(6 Suppl): p. S472-83; discussion S493-4.
279. Durstine, J.L., et al., *Lipids, lipoproteins, and exercise*. J Cardiopulm Rehabil, 2002. **22**(6): p. 385-98.
280. Halverstadt, A., et al., *Endurance exercise training raises high-density lipoprotein cholesterol and lowers small low-density lipoprotein and very low-density lipoprotein independent of body fat phenotypes in older men and women*. Metabolism, 2007. **56**(4): p. 444-50.
281. Kodama, S., et al., *Effect of aerobic exercise training on serum levels of high-density lipoprotein cholesterol: a meta-analysis*. Arch Intern Med, 2007. **167**(10): p. 999-1008.
282. Couillard, C., et al., *Effects of endurance exercise training on plasma HDL cholesterol levels depend on levels of triglycerides: evidence from men of the Health, Risk Factors, Exercise Training and Genetics (HERITAGE) Family Study*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001. **21**(7): p. 1226-32.
283. Meissner, M., et al., *Exercise enhances whole-body cholesterol turnover in mice*. Med Sci Sports Exerc, 2010. **42**(8): p. 1460-8.
284. Chan, D.C., et al., *Plasma markers of cholesterol homeostasis and apolipoprotein B-100 kinetics in the metabolic syndrome*. Obes Res, 2003. **11**(4): p. 591-6.
285. Gylling, H. and T.A. Miettinen, *Cholesterol absorption, synthesis, and LDL metabolism in NIDDM*. Diabetes Care, 1997. **20**(1): p. 90-5.
286. Miettinen, T.A., R.S. Tilvis, and Y.A. Kesaniemi, *Serum plant sterols and cholesterol precursors reflect cholesterol absorption and synthesis in volunteers of a randomly selected male population*. Am J Epidemiol, 1990. **131**(1): p. 20-31.
287. Wilund, K.R., et al., *Effects of endurance exercise training on markers of cholesterol absorption and synthesis*. Physiol Res, 2009. **58**(4): p. 545-52.
288. Barrett, L.A., et al., *Effects of intermittent games activity on postprandial lipemia in young adults*. Med Sci Sports Exerc, 2006. **38**(7): p. 1282-7.
289. Gill, J.M., et al., *Effects of prior moderate exercise on postprandial metabolism and vascular function in lean and centrally obese men*. J Am Coll Cardiol, 2004. **44**(12): p. 2375-82.
290. Katsanos, C.S. and R.J. Moffatt, *Acute effects of premeal versus postmeal exercise on postprandial hypertriglyceridemia*. Clin J Sport Med, 2004. **14**(1): p. 33-9.
291. Kolifa, M., A. Petridou, and V. Mougios, *Effect of prior exercise on lipemia after a meal of moderate fat content*. Eur J Clin Nutr, 2004. **58**(10): p. 1327-35.
292. Miyashita, M., S.F. Burns, and D.J. Stensel, *Exercise and postprandial lipemia: effect of continuous compared with intermittent activity patterns*. Am J Clin Nutr, 2006. **83**(1): p. 24-9.
293. Mc Clean, C.M., et al., *The effect of acute aerobic exercise on pulse wave velocity and oxidative stress following postprandial hypertriglyceridemia in healthy men*. Eur J Appl Physiol, 2007. **100**(2): p. 225-34.

294. Ferreira, A.P., et al., *The effect of aerobic exercise intensity on attenuation of postprandial lipemia is dependent on apolipoprotein E genotype*. *Atherosclerosis*, 2013. **229**(1): p. 139-44.
295. Bloomer, R.J. and K. Fisher-Wellman, *The role of exercise in minimizing postprandial oxidative stress in cigarette smokers*. *Nicotine Tob Res*, 2009. **11**(1): p. 3-11.
296. Kantor, M.A., et al., *Exercise acutely increases high density lipoprotein-cholesterol and lipoprotein lipase activity in trained and untrained men*. *Metabolism*, 1987. **36**(2): p. 188-92.
297. Varady, K.A., et al., *Plant sterols and endurance training combine to favorably alter plasma lipid profiles in previously sedentary hypercholesterolemic adults after 8 wk*. *Am J Clin Nutr*, 2004. **80**(5): p. 1159-66.
298. Chapados, N.A., et al., *Effects of exercise training on hepatic microsomal triglyceride transfer protein content in rats*. *Horm Metab Res*, 2009. **41**(4): p. 287-93.
299. Rector, R.S., et al., *Daily exercise increases hepatic fatty acid oxidation and prevents steatosis in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008. **294**(3): p. G619-26.
300. Yasari, S., et al., *Exercise training decreases hepatic SCD-1 gene expression and protein content in rats*. *Mol Cell Biochem*, 2010. **335**(1-2): p. 291-9.
301. Thompson, P.D., et al., *The acute versus the chronic response to exercise*. *Med Sci Sports Exerc*, 2001. **33**(6 Suppl): p. S438-45; discussion S452-3.
302. Seip, R.L., et al., *Exercise training decreases plasma cholesteryl ester transfer protein*. *Arterioscler Thromb*, 1993. **13**(9): p. 1359-67.
303. Shinkai, H., *Cholesteryl ester transfer-protein modulator and inhibitors and their potential for the treatment of cardiovascular diseases*. *Vasc Health Risk Manag*, 2012. **8**: p. 323-31.
304. Campbell, S.C., R.J. Moffatt, and M.R. Kushnick, *Continuous and intermittent walking alters HDL(2)-C and LCATa*. *Atherosclerosis*, 2011. **218**(2): p. 524-9.
305. Thompson, P.D., *What do muscles have to do with lipoproteins?* *Circulation*, 1990. **81**(4): p. 1428-30.
306. Patsch, J.R., et al., *High density lipoprotein2. Relationship of the plasma levels of this lipoprotein species to its composition, to the magnitude of postprandial lipemia, and to the activities of lipoprotein lipase and hepatic lipase*. *J Clin Invest*, 1987. **80**(2): p. 341-7.
307. Gupta, A.K., et al., *Increased reverse cholesterol transport in athletes*. *Metabolism*, 1993. **42**(6): p. 684-90.
308. Meissner, M., et al., *Voluntary exercise increases cholesterol efflux but not macrophage reverse cholesterol transport in vivo in mice*. *Nutr Metab (Lond)*, 2010. **7**: p. 54.
309. Duncan, G.E., et al., *Exercise training, without weight loss, increases insulin sensitivity and postheparin plasma lipase activity in previously sedentary adults*. *Diabetes Care*, 2003. **26**(3): p. 557-62.

310. Wei, C., et al., *Exercise might favor reverse cholesterol transport and lipoprotein clearance: potential mechanism for its anti-atherosclerotic effects*. *Biochim Biophys Acta*, 2005. **1723**(1-3): p. 124-7.
311. Wilund, K.R., et al., *Endurance exercise training reduces gallstone development in mice*. *J Appl Physiol*, 2008. **104**(3): p. 761-5.
312. da Silva, J.L., et al., *Resistance training changes LDL metabolism in normolipidemic subjects: a study with a nanoemulsion mimetic of LDL*. *Atherosclerosis*, 2011. **219**(2): p. 532-7.
313. Ficker, E.S., et al., *Exercise training accelerates the removal from plasma of LDL-like nanoemulsion in moderately hypercholesterolemic subjects*. *Atherosclerosis*, 2010. **212**(1): p. 230-6.
314. Meissner, M., et al., *Voluntary wheel running increases bile acid as well as cholesterol excretion and decreases atherosclerosis in hypercholesterolemic mice*. *Atherosclerosis*, 2011. **218**(2): p. 323-9.
315. Tsopanakis, C., D. Kotsarellis, and A. Tsopanakis, *Plasma lecithin: cholesterol acyltransferase activity in elite athletes from selected sports*. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 1988. **58**(3): p. 262-5.
316. Lopez, A., et al., *Effect of exercise and physical fitness on serum lipids and lipoproteins*. *Atherosclerosis*, 1974. **20**(1): p. 1-9.
317. Cedernaes, J., et al., *Adipose tissue stearoyl-CoA desaturase 1 index is increased and linoleic acid is decreased in obesity-prone rats fed a high-fat diet*. *Lipids Health Dis*, 2013. **12**: p. 2.
318. Hu, C.C., K. Qing, and Y. Chen, *Diet-induced changes in stearoyl-CoA desaturase 1 expression in obesity-prone and -resistant mice*. *Obes Res*, 2004. **12**(8): p. 1264-70.
319. Kainuma, M., et al., *Cholesterol-fed rabbit as a unique model of nonalcoholic, nonobese, non-insulin-resistant fatty liver disease with characteristic fibrosis*. *J Gastroenterol*, 2006. **41**(10): p. 971-80.
320. Preiss, D. and N. Sattar, *Statins and the risk of new-onset diabetes: a review of recent evidence*. *Curr Opin Lipidol*, 2011. **22**(6): p. 460-6.
321. Cote, I., et al., *An atherogenic diet decreases liver FXR gene expression and causes severe hepatic steatosis and hepatic cholesterol accumulation: effect of endurance training*. *Eur J Nutr*, 2012.
322. Pighon, A., et al., *Substituting food restriction by resistance training prevents liver and body fat regain in ovariectomized rats*. *Climacteric*, 2009. **12**(2): p. 153-64.
323. Simha, V. and A. Garg, *Lipodystrophy: lessons in lipid and energy metabolism*. *Curr Opin Lipidol*, 2006. **17**(2): p. 162-9.
324. Rudling, M., P. Parini, and B. Angelin, *Growth hormone and bile acid synthesis. Key role for the activity of hepatic microsomal cholesterol 7 α -hydroxylase in the rat*. *The Journal of clinical investigation*, 1997. **99**(9): p. 2239-45.
325. Andersen, J.M. and J.M. Dietschy, *Relative importance of high and low density lipoproteins in the regulation of cholesterol synthesis in the adrenal gland, ovary, and testis of the rat*. *J Biol Chem*, 1978. **253**(24): p. 9024-32.

326. Lassman, M.E., et al., *A rapid method for cross-species quantitation of apolipoproteins A1, B48 and B100 in plasma by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2012. **26**(2): p. 101-8.
327. Riwanto, M. and U. Landmesser, *High-density lipoproteins and Endothelial Functions: Mechanistic Insights and Alterations in Cardiovascular Disease*. J Lipid Res, 2013.
328. Schmucker, D.L., *Aging and the liver: an update*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 1998. **53**(5): p. B315-20.
329. Wang, H.H., N.H. Afdhal, and D.Q. Wang, *Overexpression of estrogen receptor alpha increases hepatic cholesterogenesis, leading to biliary hypersecretion in mice*. J Lipid Res, 2006. **47**(4): p. 778-86.
330. Grundy, S.M. and M.A. Denke, *Dietary influences on serum lipids and lipoproteins*. J Lipid Res, 1990. **31**(7): p. 1149-72.
331. McNamara, D.J., *Effects of fat-modified diets on cholesterol and lipoprotein metabolism*. Annu Rev Nutr, 1987. **7**: p. 273-90.
332. de Wit, N., et al., *Saturated fat stimulates obesity and hepatic steatosis and affects gut microbiota composition by an enhanced overflow of dietary fat to the distal intestine*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2012. **303**(5): p. G589-99.
333. Sonne, D.P., et al., *Postprandial gut hormone responses and glucose metabolism in cholecystectomized patients*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2013. **304**(4): p. G413-9.
334. Ali, R.B., R.A. Cahill, and R.G. Watson, *Weight gain after laparoscopic cholecystectomy*. Ir J Med Sci, 2004. **173**(1): p. 9-12.
335. Amigo, L., et al., *Cholecystectomy increases hepatic triglyceride content and very-low-density lipoproteins production in mice*. Liver Int, 2011. **31**(1): p. 52-64.
336. Lefebvre, P., et al., *Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation*. Physiol Rev, 2009. **89**(1): p. 147-91.
337. Matsubara, T., F. Li, and F.J. Gonzalez, *FXR signaling in the enterohepatic system*. Mol Cell Endocrinol, 2013. **368**(1-2): p. 17-29.
338. Potthoff, M.J., S.A. Kliewer, and D.J. Mangelsdorf, *Endocrine fibroblast growth factors 15/19 and 21: from feast to famine*. Genes Dev, 2012. **26**(4): p. 312-24.
339. Eren, F., et al., *Preliminary evidence of a reduced serum level of fibroblast growth factor 19 in patients with biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease*. Clin Biochem, 2012. **45**(9): p. 655-8.
340. Lin, E.C., M.L. Fernandez, and D.J. McNamara, *Dietary fat type and cholesterol quantity interact to affect cholesterol metabolism in guinea pigs*. J Nutr, 1992. **122**(10): p. 2019-29.
341. Wouters, K., et al., *Dietary cholesterol, rather than liver steatosis, leads to hepatic inflammation in hyperlipidemic mouse models of nonalcoholic steatohepatitis*. Hepatology, 2008. **48**(2): p. 474-86.
342. Asrih, M. and F.R. Jornayvaz, *Inflammation as a potential link between nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance*. J Endocrinol, 2013. **218**(3): p. R25-36.