

Université de Montréal

La stéatose hépatique et ses effets sur la régulation du métabolisme du cholestérol  
chez le rat

*Par*

Roxane St-Amand

École de kinésiologie et des sciences de l'activité physique, Faculté de Médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de maître  
en science de l'activité physique, option physiologie de l'exercice

Juillet 2020

© Roxane St-Amand, 2020



Université de Montréal

Unité académique : École de kinésiologie et des sciences de l'activité physique, Faculté de  
Médecine

---

*Ce mémoire intitulé*

**La stéatose hépatique et ses effets sur la régulation du métabolisme du cholestérol  
chez le rat**

*Présenté par*

**Roxane St-Amand**

*A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes*

**Daniel Gagnon**

Président-rapporteur

**Karine Couturier**

Membre du jury

**Jean-Marc Lavoie**

Directeur

**David H. St-Pierre**

Co-directeur



## Résumé

**Mise en contexte :** La présente étude a pour but de tester l'hypothèse selon laquelle l'accumulation excessive de lipides au foie perturbe le métabolisme du cholestérol. La stéatose hépatique perturberait ainsi principalement les voies métaboliques qui impliquent les récepteurs de LDL au foie.

**Méthodologie:** Des rats Wistar (n/groupe = 10) ont été soumis soit à une diète standard (SD), une diète enrichie en lipides (HFD : High Fat Diet) ou à une diète occidentale (WD : *Western Diet*) pour une durée de 2 ou 6 semaines. Au niveau de la composition des diètes, 60% de l'apport calorique de la diète enrichie en lipides provient des lipides tandis que la diète occidentale est composée à 40% de lipides et 35% de sucrose dont 17,5% de fructose.

**Résultats:** Comparativement aux animaux traités pendant 2 semaines, le poids des tissus adipeux était environ trois fois plus élevé (~ 20 vs 7 g) chez les animaux soumis à 6 semaines de diètes obésogènes. Une augmentation significative du gain de poids (~ 40g) a été observée uniquement après 6 semaines chez les groupes soumis à la HFD ou la WD ( $P < 0.01$ ). Comparativement aux animaux soumis à la diète conventionnelle, les niveaux de triglycérides (TG) hépatiques étaient significativement supérieurs chez les rats nourris avec la HFD et WD ( $P < 0.01$ ) et ce, indépendamment de la durée du traitement. Après deux semaines, des concentrations de TG hépatiques significativement plus élevées ( $P < 0.05$ ) ont été observés chez les animaux avec la WD comparativement à celles des rats avec la HFD. Des niveaux de cholestérol plasmatiques significativement plus élevés ( $P < 0.05$ ) ont été mesurés chez les animaux avec la WD par rapport à la SD et la HFD et ce indépendamment de la durée. Après 2 et 6 semaines de diètes, l'expression génique au foie de LDL-R, PCSK9 et SREBP2, qui sont impliqués dans la captation des LDL-cholestérol, a significativement diminué chez les animaux soumis à la WD comparativement à ceux nourris avec la diète SD ou HFD ( $P < 0.01$ ). De la même manière, des niveaux d'ARNm de LRP1 et ACAT2 significativement diminués ( $P < 0.01$ ) ont été mesurés chez les animaux nourris avec WD comparativement ceux du groupe SD. L'expression de l'HMGCoAR, l'enzyme limitante impliquée dans la régulation de la synthèse endogène de cholestérol, a été significativement

diminuée chez les animaux soumis à la WD comparativement à ceux traités avec la SD ou la HFD après 2 (P < 0.001) et 6 semaines (P < 0.05). Dû au fait que la diète soit enrichie en sucrose et conséquemment en fructose, la WD a fortement favorisé l'expression de ChREBP et ACC, deux régulateurs majeurs dans la voie de la lipogenèse *de novo*.

**Conclusion:** Ces résultats suggèrent que la diète de type occidentale augmenterait les niveaux de TG en favorisant simultanément la captation exogène de lipides ainsi que leur production endogène par l'activation de la lipogenèse *de novo*. L'altération de la voie de la captation du cholestérol par les LDL-R favoriserait une augmentation rapide des taux plasmatiques de cholestérol.

**Mots clefs:** Diète enrichie en fructose; LDL-R; PCSK9; Métabolisme du cholestérol hépatique

## Abstract

**Background:** The present study was designed to test the hypothesis that excessive fat accumulations impair cholesterol metabolism mainly through alterations in the LDL-receptor (LDL-R) pathway in liver.

**Method:** Rats were either submitted to standard (SD), high fat (HFD; 60% kcal) or western (WD; 40% fat + 35% sucrose (17.5% fructose)) diets for 2 or 6 weeks.

**Results:** Weight gain (~ 40g) was observed only following 6 weeks of the obesogenic diets ( $P < 0.01$ ). Compared to the 2-week treatment, obesogenic diets tripled fat pad weight (~ 20 vs 7 g) after 6 weeks. Hepatic triglyceride (TG) levels were greater in response to both the WD and HFD compared to the SD ( $P < 0.01$ ) at 2 and 6 weeks and their concentrations were greater ( $P < 0.05$ ) in WD than HFD at 2 weeks. Plasma cholesterol levels were higher ( $P < 0.05$ ) in animals submitted to WD compare to SD and HFD. After 2 and 6 weeks, liver expression of LDL-R, PCSK9 and SREBP2, involved in LDL-cholesterol uptake, was lower in animals submitted to WD than in others treated with HFD or SD ( $P < 0.01$ ). Similarly, LRP1 and ACAT2 mRNA levels were lower ( $P < 0.01$ ) among WD compared to SD-fed rats. Expression of the gene coding the main regulator of endogenous cholesterol synthesis, HMGCoAR was reduced in response to WD compared to SD and HFD at 2 ( $P < 0.001$ ) and 6 ( $P < 0.05$ ) weeks. Being enriched in fructose, the WD strongly promoted the expression of ChREBP and ACC, two key regulators of de novo lipogenesis.

**Conclusion:** These results show that the WD promptly increased TG levels in the liver by potentiating dietary fat storage and de novo lipogenesis. This effect impaired hepatic cholesterol uptake via the LDL-R axis and promoted a rapid increase in plasma cholesterol levels.

**Keywords:** fructose diet; LDL-R; PCSK9; liver cholesterol metabolism





# Table des matières

Résumé .....	5
Abstract .....	7
Table des matières .....	9
Liste des figures.....	13
Liste des sigles et abréviations .....	15
Remerciements .....	21
Introduction.....	23
Chapitre 1 – Voies de régulation du cholestérol.....	25
1.1 Aperçu global.....	25
1.2 Entrée exogène du cholestérol par les chylomicrons .....	26
1.2.1 Transport intestinal du cholestérol et biosynthèse des chylomicrons .....	26
1.2.2 Mécanismes de régulation liés à l’absorption et l’excrétion du cholestérol intestinal	29
1.2.3 Transport du cholestérol par les chylomicrons et mécanismes de régulation .....	29
1.3 Synthèse endogène du cholestérol hépatique .....	32
1.4 Lipoprotéine de très basse densité (VLDL).....	35
1.4.1 Biosynthèse des VLDL.....	35
1.4.2 Transport du cholestérol par les VLDL .....	35
1.4.3 Régulation hormonale, enzymatique et régulation par les apolipoprotéines de l’activité des VLDL .....	37
1.5 Captation du cholestérol au foie par les LDL .....	42
1.6 Captation du cholestérol au foie par les HDL.....	44
1.6.1 Biosynthèse et activité de transport des HDL .....	45

1.6.2 Mécanismes de régulation des HDL.....	47
1.6.3 Catabolisme et recyclage des HDL .....	48
1.7 Métabolisme du cholestérol par la voie entéro-hépto-biliaire.....	49
1.7.1 Les acides biliaires .....	49
1.7.2 Composition de la bile.....	54
1.7.3 Sécrétion via la vésicule biliaire .....	57
1.7.4 Transport des acides biliaires de l'intestin au foie.....	58
1.7.5 Mécanismes de régulation par les acides biliaires.....	64
1.7.6 Élimination secondaire des acides biliaires.....	65
Chapitre 2 – Stéatose hépatique.....	66
2.1 Description, terminologie, prévalence.....	66
2.2 Causes de la stéatose hépatique .....	66
2.2.1 La résistance à l'insuline.....	69
2.2.2 Suralimentation ou malnutrition .....	70
2.2.3 Obésité – Diabète.....	71
2.2.4 La sédentarité.....	72
2.3 Conséquences de la stéatose hépatique.....	72
2.3.1 Augmentation des facteurs de risque et complications .....	72
2.3.2 Altérations de l'action de la leptine par la stéatose hépatique .....	73
2.3.3 Altérations de l'action de l'adiponectine par la stéatose hépatique .....	75
2.3.4 Augmentation du stress oxydant et du stress du réticulum endoplasmique par la stéatose hépatique.....	77
2.3.5 Altérations du métabolisme du cholestérol.....	78

Chapitre 3 – Article: TWO WEEKS OF WESTERN DIET DISRUPTS LIVER MOLECULAR MARKERS OF CHOLESTEROL METABOLISM IN RAT.....	81
Abstract .....	82
Introduction.....	83
Materials and methods .....	84
Animals care and treatments .....	84
Diets.....	85
Biochemical analyses.....	86
Real-time polymerase chain reaction .....	86
Statistical analyses.....	87
Results .....	87
Anthropometric parameters and food intake.....	87
Liver and plasma triglycerides and cholesterol.....	88
Liver molecular markers.....	88
Discussion .....	89
Conclusion .....	94
References.....	95
Légendes.....	99
DECLARATIONS.....	100
Tables and figures .....	101
Chapitre 4 – Discussion générale et conclusion.....	107
4.1 Effets de la stéatose hépatique sur le métabolisme du cholestérol.....	108
4.2 Effet de la durée de la diète sur l’accumulation de lipides au foie.....	111
4.3 Différences entre les effets de la diète riche en lipides et de la diète Western.....	112

4.4 Limitations de l'étude.....	113
4.5 Conclusion .....	115
Références bibliographiques.....	116

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> – Transport du cholestérol alimentaire et biosynthèse des chylomicrons (Wang, 2007).....	28
<b>Figure 2.</b> – Échanges d’apolipoprotéines des VLDL et des chylomicrons en circulation (Fielding & Fielding, 2002).....	30
<b>Figure 3.</b> – Biosynthèse et régulation du cholestérol via la voie de l’HMGCoA réductase (Song et al., 2005).....	33
<b>Figure 4.</b> – Transfert des apolipoprotéines permettant la formation de résidus de VLDL. (Fielding & Fielding, 2002).....	36
<b>Figure 5.</b> – Voies de régulation des lipoprotéines par l’action de l’Apo CI (Fuior & Gafencu, 2019) Permission par la License Creative Commons .....	38
<b>Figure 6.</b> – Activité des isoformes ACC à l’adipocyte, le myocyte et l’hépatocytes. (Wakil & Abu-Elheiga, 2009) .....	40
<b>Figure 7.</b> – Synthèse des lipoprotéines à haute densité et transport du cholestérol des tissus périphériques vers le foie. (Rader et al., 2009).....	46
<b>Figure 8.</b> – Caractéristiques des ramifications du canal biliaire (Boyer, 2013).....	53
<b>Figure 9.</b> – Formation de micelles mixtes à partir de la membrane canaliculaire. <i>Modifié de</i> (Oude & Paulusma, 2007) .....	57
<b>Figure 10.</b> – Transporteurs des acides biliaires dans la voie entéro-hépto-biliaire (Dawson et al., 2010).....	60
<b>Figure 11.</b> – Mécanisme de régulation des acides biliaires par FXR et LXR. (Garruti et al., 2012) Permission par la License Creative Commons .....	62
<b>Figure 12.</b> – Interactions des différents systèmes et NAFLD (Byrne & Targher, 2015) Permission par la License Creative Commons .....	68
<b>Figure 13.</b> – Activités des adipokines sur la NAFLD (Polyzos et al., 2016) .....	76



## Liste des sigles et abréviations

**ABCA1** : ATP-binding cassette A-1

**ABCB1** : ATP-binding cassette B-1

**ABCB11** : ATP-binding cassette B-11

**ABCG1** : ATP-binding cassette G-1

**ABCG5** : ATP-binding cassette G-5

**ABCG8** : ATP-binding cassette G-8

**ACAT** : Acyl-Coenzyme A Cholestérol Acyltransférase

**AMPc** : Cyclic adenosine monophosphate

**Apo A-1** : Apolipoprotéine A-1

**Apo B-100** : Apolipoprotéine B-100

**Apo B-48** : Apolipoprotéine B-48

**Apo C-I** : Apolipoprotéine C-I

**Apo C-II** : Apolipoprotéine C-II

**Apo C-III** : Apolipoprotéine C-III

**Apo E** : Apolipoprotéine E

**AQP8** : Aquaporine 8

**AQP9** : Aquaporine 9

**AMPK** : AMP-activated protein kinase

**ASBT** : Apical sodium-bile acid transporter

**ASP** : Acylation-stimulating protein

**BAAT** : Bile acid coenzyme A: amino acid N-acyltransferase

**BSEP** : Bile salt export pump

**B-VLDL** : Beta Very low-density lipoprotein

**CD36** : Cluster of differentiation 36

**CETP** : Cholesterylester transfer protein

**ChREBP** : Carbohydrate responsive element binding protein

**CPT-1** : Carnitine/Palmitoyl-transferase 1

**CYP7- $\alpha$ 1** : Cytochrome P450 cholesterol 7 alpha hydrolase 1

**DGAT** : Diacylglycerol acyltransferase

**EL** : Lipase endothéliale

**FGFR4** : Fibroblast growth factor receptor-4

**FGF15/19** : Fibroblast growth factor 15/19

**FXR** : Farnesoid X receptor

**GAG** : Glycosaminoglycane

**GLP1**: Glucagon-like peptide 1

**GLUT-4** : Glucose transporter type 4

**GRP94** : Glucose-regulated protein 94

**HDL** : Lipoprotéine de haute densité

**HFD** : High fat diet

**HMGC $\alpha$ A** : Hydroxyméthylglutaryl Coenzyme A

**HMGC $\alpha$ AR** : Hydroxyméthylglutaryl Coenzyme A réductase

**IDL** : Intermediate density lipoprotein



**IL-6** : Interleukine 6

**IL-8** : Interleukine 8

**ILBP** : Ileal lipid binding protein

**LCAT** : Lécithine cholestérol acyltransférase

**LDL** : Lipoprotéine de basse densité

**LDLr** : Récepteurs aux lipoprotéines de basse densité

**LH** : Lipase hépatique

**LPL** : Lipoprotéine lipase

**LRP1** : Protéine 1 liée aux récepteurs de lipoprotéines de basse densité

**LXR** : Liver X factor

**MCP-1** : Monocyte chemoattractant protein 1

**MGAT** : Monoacylglycerol acyltransferase

**MRP2** : Multidrug resistance-associated protein 2

**MRP3** : Multidrug resistance-associated protein 3

**MRP4** : Multidrug resistance-associated protein 4

**MTTP** : Microsomal triglyceride transfer protein

**NAFLD** : Nonalcoholic fatty liver disease

**NASH** : Nonalcoholic steatohepatitis

**NPC1L1** : Niemann–Pick C1-like 1

**NTCP** : Na<sup>+</sup> taurocholate cotransporting peptide

**OST $\alpha/\beta$**  : Organic solute transporter alpha/beta

**PCSK9** : Proprotéine convertase subtilisine/kexine de type 9

**PI3K** : Phosphoinositide 3-kinase

**PKA** : Protéine kinase A

**PLTP** : Protéine de transfert des lipoprotéines

**Pré-βHDL** : Pré bêta lipoprotéine de haute densité

**RBP-4** : Retinol-binding protein 4

**RCPG** : Récepteur couplé à une protéine G

**RE** : Réticulum endoplasmique

**ROS** : Reactive oxygen species

**SCAP** : SREBP Cleavage-activating protein

**SD** : Standard Diet

**SIP-1** : Site 1 protéase

**SIP-2** : Site 2 protéase

**Sr-B1** : Scavenger receptor class B1

**SREBP1a** : Sterol regulatory element binding protein 1a

**SREBP1c** : Sterol regulatory element binding protein 1c

**SREBP2** : Sterol regulatory element binding protein 2

**SRE's** : Sterol regulatory element

**SS** : Stéatose simple non alcoolique

**T3** : triiodothyronine

**TGF-β** : Transforming growth factor b

**TIMP-1** : Tissue inhibitor of metalloproteinase 1

**TNF-α** : Tumor necrosis factor-alpha

**VLDL** : Lipoprotéine de très basse densité

**VLDLr** : Récepteur aux VLDL

**WD** : Western Diet



## Remerciements

C'est avec beaucoup d'enthousiasme et de satisfaction que je sou mets ce mémoire dans le cadre de ma maîtrise en sciences de l'activité physique à l'Université de Montréal. La finalité de ce projet conclut mes huit années d'études universitaires qui auront permis de cumuler les réussites d'un baccalauréat en biologie, d'un baccalauréat en kinésiologie et enfin d'une maîtrise en recherche. Plusieurs personnes sont à remercier pour m'avoir supporté et encadré dans ces deux dernières années. Je tiens d'abord à remercier Jean-Marc Lavoie qui m'a acceptée comme dernière étudiante de sa carrière. Son expérience comme directeur de recherche ainsi que son caractère positif et réaliste m'ont grandement apporté dans les différentes étapes de mon projet. Un grand merci également à David H. St-Pierre d'avoir accepté d'être mon co-directeur et de m'avoir permis d'acquérir de nouvelles compétences grâce aux diverses formations en laboratoire et en congrès. Grâce à ces deux mentors, je peux dire que je termine cette maîtrise avec un bagage de connaissances scientifiques et une meilleure autonomie pour la réalisation de mes futurs projets.

Je remercie mes collègues Samantha Quinn, Marie Payen et Guillaume Montpetit. Sans leur ponctualité, leur dévouement et leur amitié, je n'aurai pas réussi à réaliser ce projet avec autant d'efficacité et de plaisir. Leur collaboration m'a été d'une grande aide et je leur en suis reconnaissante.

Je remercie également mes parents qui sont d'un support à défier l'imagination. Toujours prêt à m'épauler dans mes bons et mauvais moments, ils m'apportent toujours une grande dose d'amour. Je remercie Oscar Tsui pour son amour et ses encouragements dans tout ce que j'entreprends. Enfin, je remercie mes amis qui, grâce à leur écoute, m'ont permis d'alléger mes problèmes et réduire mon stress. Ils sont toujours d'une aide précieuse quand il s'agit de m'aider dans les diverses situations de ma vie et je les remercie pour leur présence et leur amitié.



# Introduction

La NAFLD (nonalcoholic fatty liver disease) est un ensemble de pathologies qui se définit par une accumulation de lipides au foie sans qu'une consommation excessive d'alcool soit en cause (Sanchez et al., 2015). L'acronyme NAFLD rassemble ainsi un continuum de pathologies allant de la stéatose simple non-alcoolique (SS) au NASH (nonalcoholic steatohepatitis) (Polyzos et al., 2016). L'état de NASH peut par la suite conduire à la cirrhose et au carcinome hépatocellulaire (Vernon et al., 2011). La stéatose hépatique définit par une accumulation de lipides au foie, est associée à plusieurs facteurs de risque pour la santé tels qu'une alimentation riche en lipides et en fructose, l'obésité, la résistance à l'insuline et la sédentarité (Basaranoglu et al., 2010; Polyzos et al., 2016). Le concept de «multi-hits theory» soutient que la stéatose hépatique est causée d'abord par la résistance à l'insuline et l'accumulation de lipide, mais inclut aussi l'altération des adipokines et cytokines au niveau du tissu adipeux ainsi que la dérégulation des mécanismes des systèmes cardiaque et rénal (Byrne & Targher, 2015; Polyzos et al., 2009). Ces perturbations liées à la stéatose hépatique mènent à leur tour à une aggravation de l'inflammation, de la résistance à l'insuline, de la fibrose hépatique et une accumulation supplémentaire de lipides au foie (Polyzos et al., 2009). De plus, la stéatose hépatique provoque en soi des changements au niveau du métabolisme des lipides et du cholestérol (Arguello et al., 2015). Il a été récemment rapporté une association entre la stéatose hépatique et une augmentation du cholestérol plasmatique en lien avec une perturbation de plusieurs marqueurs (PCSK9, LRP-1, ABCG5 et HMGCoAR) du métabolisme du cholestérol au foie (Magri-Tomaz et al., 2018). Ces derniers jouent un rôle majeur dans la synthèse endogène de cholestérol, la régulation de la captation des LDL-C et l'élimination du cholestérol par le foie.

Mon sujet d'étude porte sur l'interaction entre le métabolisme des lipides et du cholestérol afin de déterminer l'impact possible de la stéatose hépatique sur les mécanismes de régulation du cholestérol dans le foie. Le présent mémoire contient une revue de littérature réalisée dans l'objectif de rassembler les concepts liés à ce projet de recherche. Afin de mieux comprendre les changements physiologiques obtenus lors des analyses des groupes expérimentaux, le chapitre 1 rassemble les informations concernant les voies métaboliques pertinentes au sujet d'étude. Ceci

inclut les voies de synthèse, de transport, de régulation et d'élimination du cholestérol. Les voies de synthèse et les mécanismes de régulation des différentes lipoprotéines incluant HDL, LDL, VLDL, ILD et les chylomicrons sont également expliquées. La pathologie NAFLD ainsi que les causes et conséquences de la stéatose hépatique sont abordées dans le chapitre 2.



# Chapitre 1 – Voies de régulation du cholestérol

De façon similaire à la glycémie, les niveaux sanguins de cholestérol sont régulés au moyen de plusieurs boucles de rétroaction incluant la synthèse de protéines spécialisées (ex. Hydroxyméthylglutaryl Coenzyme A réductase (HMGCoAR)), de l'activation de facteurs de transcription (ex. Sterol regulatory element binding protein 2 (SREPB2)) et de l'activation de certains gènes entraînant l'expression de molécules régulatrices (ex. Protéine convertase subtilisine/kexine de type 9 (PCSK9)) (Chen et al., 2019; Warden et al., 2019). À noter que la régulation est optimale dans le cas où l'organisme est en santé et ne souffre pas de stéatose hépatique ou d'autres désordres métaboliques. Ces mécanismes de régulation du cholestérol seront détaillés dans cette section ainsi que les autres voies cellulaires menant à la synthèse, au transport et à la dégradation du cholestérol.

## 1.1 Aperçu global

Plusieurs voies cellulaires sont impliquées dans l'augmentation des taux circulants de cholestérol. L'apport de cholestérol peut se faire de manière exogène via l'ingestion d'aliments impliquant la voie de la synthèse des chylomicrons. Cette voie est responsable de la formation des lipoprotéines qui permettent le transport du cholestérol alimentaire vers les tissus périphériques et le foie. L'apport peut également se faire de manière endogène, via la synthèse hépatique de nouvelles molécules de cholestérol. Il s'agit d'une voie importante qui permet de produire le cholestérol en cas où l'apport est insuffisant. C'est aussi une voie ciblée par les hypocholestérolémiantes tel que les statines en vue de contrôler l'excès de cholestérol plasmatique chez certains individus. À noter, toutes les cellules nucléées peuvent synthétiser du cholestérol à partir de leur réticulum endoplasmique (RE)(Luo et al., 2019). Ce qui est essentiel puisque le cholestérol fait partie intégrante des membranes cellulaires et permet leur bon fonctionnement. Toutefois, la production la plus importante de l'organisme se fait par les hépatocytes (Lavoie, 2016).

Le cholestérol et les triglycérides étant des molécules hydrophobes, ils doivent utiliser des lipoprotéines pour être transportés dans la circulation sanguine. Leur transport implique un

continuum de lipoprotéines qui se différencient entre autres par leur taille, leur contenu en apoprotéines et leur composition relative en protéines et lipides (D. E. Cohen, 2009b).

Dans le but de réduire le cholestérol présent en excès, son élimination définitive de l'organisme est réalisée par son excrétion intestinale dans les selles. À cette fin, plusieurs étapes sont nécessaires incluant la formation d'acides biliaires dans les hépatocytes, leur transport vers la vésicule biliaire, vers l'intestin puis leur excrétion via les selles. L'ensemble de ces éléments sont décrits plus en détails dans les sections suivantes.

## **1.2 Entrée exogène du cholestérol par les chylomicrons**

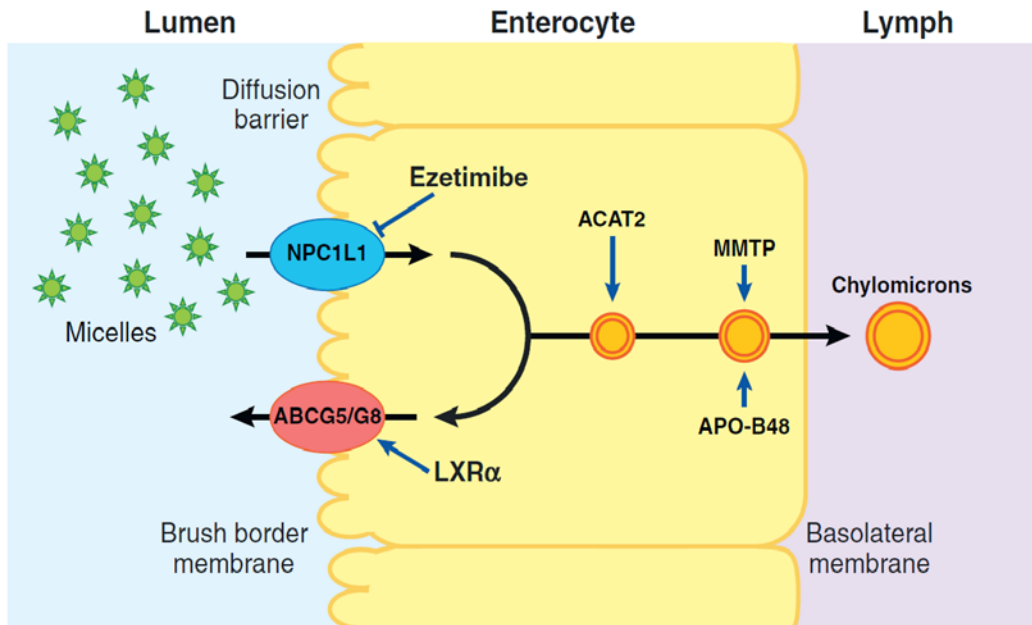
Il a été mentionné précédemment que l'apport en cholestérol pouvait provenir de l'organisme par des mécanismes endogènes ou par l'alimentation. Le cholestérol alimentaire correspond environ à 60% de l'apport en cholestérol et leur entrée dans l'organisme est assurée par la formation de chylomicrons intestinaux (Hui et al., 2008; Lee et al., 2001). Les chylomicrons sont un type de lipoprotéines qui ont pour fonction de transporter les lipides et le cholestérol alimentaire issu de l'absorption intestinale. Ils se distinguent par leur faible densité qui s'explique par une composition faible en protéines comparativement à leur composition en lipides et cholestérol. Ils sont également les seuls à contenir l'apolipoprotéine B-48 sur leur surface (D. E. Cohen, 2009b). Dans les prochaines lignes, la formation des chylomicrons, le transport du cholestérol alimentaire vers le foie et le métabolisme de ces lipoprotéines seront décrits.

### **1.2.1 Transport intestinal du cholestérol et biosynthèse des chylomicrons**

Les lipides alimentaires passent d'abord par les différentes composantes du tube digestif pour se rendre à l'intestin grêle. Comme il s'agit de molécules hydrophobes, celles-ci ne se solubilisent pas facilement avec le reste des composés présent dans la lumière intestinale. Les processus mécaniques du tube digestif participent à la réduction de la taille des amas lipidiques par un processus appelé émulsion des lipides. Les triglycérides, le cholestérol et les phospholipides alimentaires se rassemblent alors en gouttelettes lipidiques de tailles plus petites (Wang, 2007).

Les lipases dégradent les triacylglycérols alimentaires présents dans la lumière intestinale en monoacylglycérol et acides gras libres. Les produits de la digestion tel que les acides gras, les phospholipides et les molécules de cholestérol non estérifiés se rassemblent avec des acides biliaires sous formes de structures sphériques appelées micelles (aussi appelées micelles mixtes) (Chávez-Talavera et al., 2017). Ce type d'agrégat favorise l'internalisation du cholestérol à l'intérieur de la micelle, permettant ainsi au cholestérol et aux autres composantes hydrophobes de se retrouver à l'intérieur de la structure. Les phospholipides sont quant à eux disposés pour que leur tête polaire soit orientée vers l'extérieur de la micelle. Les micelles assurent ainsi le transport de leurs composantes à proximité de la membrane apicale des entérocytes (Wang, 2007).

Les composés lipidiques peuvent alors entrer à l'intérieur des entérocytes au moyen de transporteurs spécifiques principalement présents au niveau du jéjunum proximal. Le cholestérol, quant à lui, est libéré des micelles à la suite de la digestion des phospholipides et triglycérides. Il est alors majoritairement sous la forme de cholestérol libre et peut passer au travers de la membrane des entérocytes par diffusion passive (Wang, 2007). Néanmoins, son transport est également facilité au moyen de transporteurs transmembranaires tel que le Niemann–Pick C1-like 1 (NPC1L1) (Altmann, 2004)(voir *figure 1*). Dans la littérature, on observe cependant une certaine controverse sur ce point à savoir si NPC1L1 agit comme transporteur transmembranaire où s'il agit plutôt en tant que transporteur intracellulaire via CD36 et SR-B1 (Scavenger receptor class BI) afin d'amener le cholestérol à l'intérieur des entérocytes. Les transporteurs CD36 et SR-B1 se retrouvent également sur la membrane apicale des entérocytes (Hui et al., 2008). Les derniers travaux de Yu et *al.* soutiennent l'hypothèse que NPC1L1 est d'abord synthétisé de façon intracellulaire, puis subit une translocation vers la membrane en réponse à une activation stimulée par la présence de cholestérol (Yu et al., 2006).



**Figure 1.** – Transport du cholestérol alimentaire et biosynthèse des chylomicrons (Wang, 2007).

Une fois le cholestérol à l'intérieur de l'entérocyte, il peut alors être estérifié au moyen de l'enzyme *Acyl-CoA Cholesterol Acyltransferase* (ACAT) ou retourner dans la lumière de l'intestin par des transporteurs spécifiques de la membrane apicale (ABCG5, ABCG8). S'il est estérifié, il pourra alors entrer dans la biosynthèse des chylomicrons et ainsi être transporté en dehors de la cellule vers la lymphe. Environ 25% du cholestérol entrant dans la composition des chylomicrons provient de sources alimentaires. La majorité, près de 75% est recyclée à partir des acides biliaires utilisés pour l'émulsion des triglycérides alimentaires et des membranes cellulaires des entérocytes (Wang, 2007). Les triglycérides, quant à eux, sont resynthétisés à nouveau au moyen des enzymes *monoacylglycerol acyltransferase* (MGAT) et *diacylglycerol acyltransferase* (DGAT) (Mansbach & Siddiqi, 2010). Afin d'amorcer la formation du chylomicron, la cellule doit d'abord synthétiser des apolipoprotéines B-48. Ceux-ci sont formés dans les entérocytes au moyen d'un épissage alternatif du gène Apo B et de leur traduction par les ribosomes du réticulum endoplasmique. À noter, cet épissage est seulement possible dans les cellules intestinales et ne se produit donc pas dans les cellules hépatiques. C'est ce qui explique la différence entre les Apo B-100 des VLDLs synthétisés par le foie et l'Apo B-48 des chylomicrons. Pendant l'élongation de

l'apolipoprotéine, des triglycérides s'y ajoutent, permettant d'obtenir des apolipoprotéines associées à des lipides. Cet ajout s'effectue au moyen de l'enzyme *microsomal triglyceride transfer protein* (MTTP) et permet ainsi la maturation des chylomicrons naissants (Greevenbroek et al., 1998). Un Apo A-1 est également synthétisé dans l'entérocyte et vient s'ajouter à la structure du chylomicron naissant (Xiao et al., 2018). Ce complexe migre ensuite vers l'appareil de Golgi où des triglycérides supplémentaires viennent s'ajouter ainsi que des molécules de cholestérol estérifié. L'ensemble forme ce que l'on appelle des chylomicrons naissants (Fisher & Ginsberg, 2002).

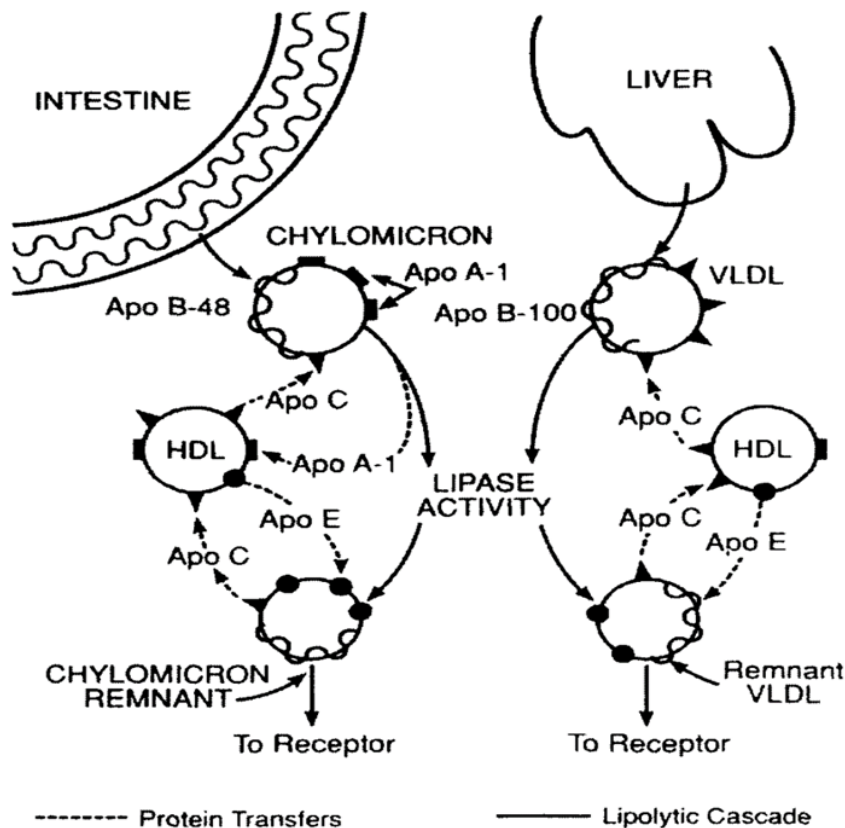
### **1.2.2 Mécanismes de régulation liés à l'absorption et l'excrétion du cholestérol intestinal**

Il existe plusieurs mécanismes qui permettent la régulation de l'absorption et de l'excrétion intestinale du cholestérol par les entérocytes. Le Liver X facteur (LXR) est un récepteur nucléaire impliqué dans la régulation de l'exportation du cholestérol des entérocytes vers la lumière de l'intestin (Figure 1). Ainsi, LXR cause favorise l'activation des transporteurs ABCG5/G8 en présence d'un niveau de cholestérol alimentaire élevé (Wang, 2007). Tel que mentionné précédemment, l'enzyme ACAT joue également un rôle de régulation puisque son niveau d'activité influence l'estérification du cholestérol libre dans la cellule intestinale. Toutefois, une baisse de son activité diminue l'absorption du cholestérol libre de la lumière intestinale vers l'entérocyte (Heider et al., 1983). Enfin, il est également possible de perturber les voies d'absorption et la formation des chylomicrons en inhibant les enzymes les affectant comme les lipases intestinales et la MTTP.

### **1.2.3 Transport du cholestérol par les chylomicrons et mécanismes de régulation**

Les nouveaux chylomicrons, une fois formés, traversent la membrane basale des entérocytes pour migrer à l'intérieur des vaisseaux lymphatiques de la région thoracique. Le transport des lipoprotéines vers la lymphe se fait par mécanisme d'exocytose via la membrane basale des

cellules intestinales (D. E. Cohen, 2009b). Les lipoprotéines se déplacent ensuite en circulation lymphatique jusqu'à ce qu'ils soient à proximité de la veine sous-clavière gauche où ils pourront migrer dans la circulation sanguine (Xiao et al., 2018). Une fois dans le plasma, les chylomicrons interagissent rapidement avec un HDL en échangeant leur Apo A-1 pour une apolipoprotéine de type CII (voir figure 2)(Fielding & Fielding, 2002).



**Figure 2.** – Échanges d'apolipoprotéines des VLDL et des chylomicrons en circulation (Fielding & Fielding, 2002).

Lorsque les chylomicrons passent au niveau des capillaires adjacents aux tissus adipeux ou musculaires, leur Apo CII agit comme cofacteur et permet leur liaison à la lipoprotéine lipase (LPL) de la membrane basale du tissu (adipeux ou musculaire) (Cooper, 1997). Sans l'apolipoprotéine CII, les chylomicrons ne peuvent acheminer leurs triglycérides aux tissus

périphériques et demeurent en circulation (Fielding & Fielding, 2002). La LPL est l'enzyme limitante dans la réaction d'hydrolyse qui permet le transfert des acides gras des triglycérides situés dans les lipoprotéines vers les tissus (Ma et al., 1994). Cette liaison permet d'activer la LPL attachée à la cellule endothéliale et celle-ci peut alors hydrolyser les triglycérides de la lipoprotéine pour les amener à l'intérieur de l'adipocyte ou du myocyte sous forme d'acide gras libre et de glycérol (Hultin et al., 1996). Ils seront ainsi captés par les cellules du tissu et éventuellement servir de substrat énergétique ou participer au stockage des réserves énergétiques (Mead et al., 2002). L'activité de la LPL est régulée en partie par l'état nutritionnel de l'organisme (Bergo et al., 1996). En période post-prandiale, l'organisme aura tendance à vouloir emmagasiner les lipides sous forme de réserve lipidique et l'expression de la LPL sera donc plus importante au niveau des adipocytes qu'au niveau des myocytes (Mead et al., 2002).

Le chylomicron peut avoir plusieurs types d'apolipoprotéines à sa surface. Certaines ont des actions opposées et c'est alors leur nombre présent sur la lipoprotéine qui détermine leur efficacité. Par exemple, les Apo CI et CIII diminuent l'efficacité de la LPL des tissus. Pour une même activité de la LPL, il faudra alors davantage d'Apo CII pour permettre l'action de la LPL sur le chylomicron (Larsson et al., 2013). L'apolipoprotéine CI peut, de la même manière que l'Apo CII, être acquise via un transfert par les HDL ou par les résidus de chylomicrons. L'Apo CI, lorsqu'intégrée aux chylomicrons, régule à la baisse la captation des résidus de chylomicrons par le foie en inhibant l'action de l'Apo E également présente à la surface de la lipoprotéine. Cela réduit la vitesse d'élimination des résidus de chylomicrons plasmatiques en inhibant la liaison de l'Apo E des chylomicrons avec des récepteurs au foie tel que LRP1 (Shachter, 2001). Elle ralentit également la vitesse de captation des résidus de VLDL par d'autres mécanismes qui seront approfondis dans la section *2.2.1 Synthèse des VLDL*.

L'apolipoprotéine CIII est également un élément régulateur de la lipolyse puisqu'il inhibe l'activité de la LPL des tissus. Son action empêche la liaison de la lipoprotéine à la matrice de glycosaminoglycane (GAG) qui est présente à la surface des cellules endothéliales. Les lipases se retrouvant à cet endroit ne peuvent alors plus effectuer leur action enzymatique sur les triglycérides des lipoprotéines. Cela a pour conséquence une baisse du taux de dégradation des lipides des chylomicrons et les gardent donc plus longtemps en circulation. L'Apo CIII inhibe aussi

l'activité de la lipase hépatique (LH) par le même procédé lorsque les résidus de chylomicrons arrivent dans les sinusoides hépatiques (Landis et al., 1987; Shachter, 2001).

L'action de la LPL contribue au catabolisme des triglycérides jusqu'à ce que le chylomicron perde environ la moitié de sa composition en triglycérides. Cette délipidation du chylomicron contribue à diminuer sa taille et augmenter ainsi sa concentration relative en cholestérol. Le chylomicron se dissocie par la suite de la LPL en échangeant son Apo CII pour un Apo E au moyen d'une interaction avec un HDL en circulation (Fielding & Fielding, 2002). Les chylomicrons deviennent alors des résidus de chylomicrons et continuent leur passage dans la circulation sanguine.

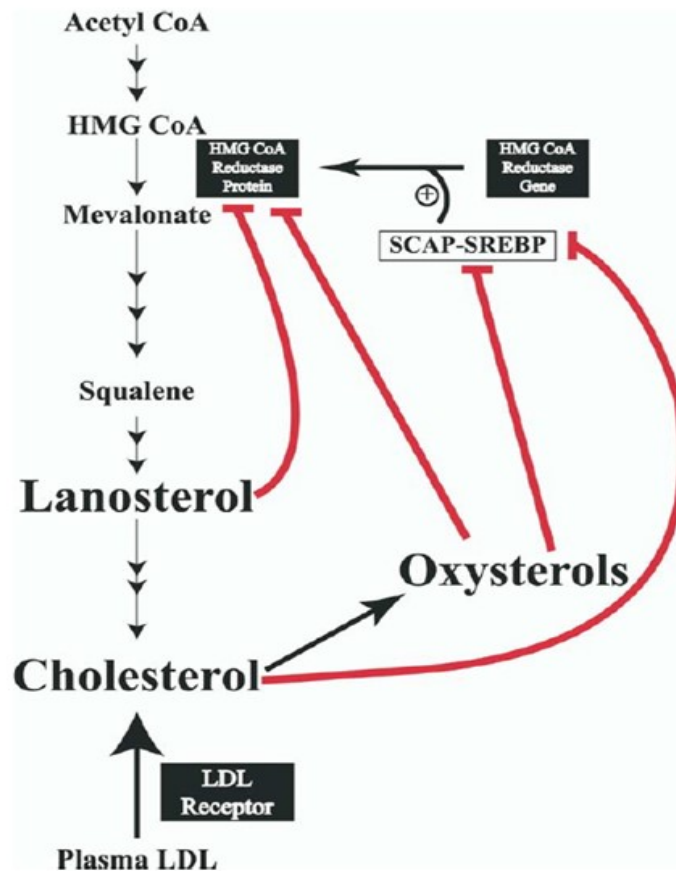
Arrivés au niveau des sinusoides hépatiques, les résidus de chylomicrons doivent d'abord traverser les cellules endothéliales du vaisseau pour se rendre dans l'espace de Disse. L'espace de Disse constitue la jonction entre les sinusoides et les cellules hépatiques (Häussinger & Kordes, 2019). Les résidus de chylomicrons doivent avoir au préalable réduit leur concentration en triglycérides et ainsi être de taille assez réduite pour passer entre les cellules endothéliales. Une fois à l'intérieur, les résidus de chylomicrons peuvent être captés par les hépatocytes en liant leur Apo E à un récepteur aux LDL, à un récepteur Sr-B1 ou encore à un récepteur LRP1 (Cooper, 1997; Fielding & Fielding, 2002). Chez l'humain, la concentration de LRP1 est fortement corrélée en fonction de la captation des résidus de chylomicrons par le foie, ce qui indique un rôle important pour ceux-ci dans le métabolisme de cette lipoprotéine (Frazier-Wood et al., 2013). La captation des résidus de chylomicrons par les hépatocytes entraîne leur dégradation résultant ainsi en leur élimination de la circulation sanguine.

### **1.3 Synthèse endogène du cholestérol hépatique**

Le cholestérol est une molécule complexe qui nécessite une multitude d'intermédiaires et d'enzymes pour sa biosynthèse. Initialement, la voie de synthèse débute avec la fusion de 2 molécules d'acétyl-CoA au moyen de l'enzyme thiolase (aussi appelé acétyl-coenzyme A acétyltransférase). La fusion de 2 acétyl-CoA (acétoacétyl-CoA) va mener à la production d'un HMGCoA (hydroxyméthylglutaryl Coenzyme A). Des réactions supplémentaires permettront



ensuite la formation d'un squalène. Ce dernier sera ensuite soumis à un processus de cyclisation qui mènera à la synthèse du noyau de la molécule de cholestérol : le perhydrocyclopentanophenanthrène. La formation du squalène dépend d'une enzyme importante : l'hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase (HMGCoAR). Il s'agit de l'enzyme limitante dans la voie de synthèse du cholestérol et d'un régulateur majeur du taux de cholestérol produit par l'organisme (Goldstein & Brown, 1990). Des réactions successives permettront la formation de l'intermédiaire lanostérol. C'est d'ailleurs grâce à cet intermédiaire que l'on évalue la cholestérolémie d'un patient afin de déterminer si l'hypercholestérolémie provient d'une source endogène ou exogène. Enfin, après 19 réactions subséquentes, on obtient notre molécule de cholestérol (Voir figure 3) (Lavoie, 2016).



**Figure 3.** – Biosynthèse et régulation du cholestérol via la voie de l'HMGCoA réductase (Song et al., 2005)

La régulation de la formation de cholestérol par les cellules hépatiques se fait à plusieurs niveaux, soit transcriptionnel et post-traductionnel. À court terme, l'activité de l'enzyme HMGCoAR dépend de sa déphosphorylation par une phosphatase A2 afin de remplir son rôle dans la synthèse de mévalonate, un intermédiaire dans la synthèse du cholestérol. L'inactivation de la phosphatase est régulée, de façon post-traductionnelle, par l'*AMP-activated protein kinase* (AMPK) (Gaussin et al., 1997). Le lanostérol, un intermédiaire de cette voie, agit comme régulateur en stimulant la dégradation de l'HMGCoAR. L'enzyme est alors ubiquitiné et dégradé par l'action du protéasome. Cela a pour effet de diminuer la synthèse de cholestérol. La molécule de cholestérol possède elle-même un effet régulateur, en agissant sur le facteur de transcription *sterol regulatory element binding protein 2* (SREBP-2) qui régule l'activité de synthèse mais ne possède pas d'effet sur la dégradation de l'HMGCoAR (Song et al., 2005).

Au niveau de la régulation transcriptionnel, SREBP-2 est un facteur de transcription agissant entre autres sur le promoteur du gène HMGCoAR, exerçant ainsi un impact important sur la synthèse de cholestérol. SREBP-2 fait partie d'une famille de facteurs de transcription (SREBP's) qui agissent sur l'expression des gènes régulant la synthèse de cholestérol et des récepteurs aux LDL. Ceux-ci ont en commun une même séquence promotrice (SRE's) pour laquelle ils ont une affinité. Cette famille de facteurs de transcription inclut 3 isoformes : SREBP-1a, SREBP-1c et SREBP-2. Ils diffèrent selon leur taux de synthèse dans les différents tissus, les gènes pour lesquels ils favorisent la transcription ainsi que les voies permettant leur activation dans la cellule (Foufelle et al., 2000). Dans le cas de SREBP-2, son activation débute par la formation d'un complexe avec *SREBP cleavage-activating protein* (SCAP) dans le réticulum endoplasmique. Le complexe migre ensuite vers l'appareil de Golgi où SREBP sera réduit en fragments par les enzymes site 1 protéase (SIP-1) et site 2 protéase (SIP-2) afin que ceux-ci puissent traverser la membrane nucléaire. Les fragments iront agir sur les séquences promotrices des gènes pour lesquels ils possèdent une affinité afin de mener à la transcription des gènes favorisant la synthèse de cholestérol et de récepteurs aux LDL (Brown & Goldstein, 1997).

## **1.4 Lipoprotéine de très basse densité (VLDL)**

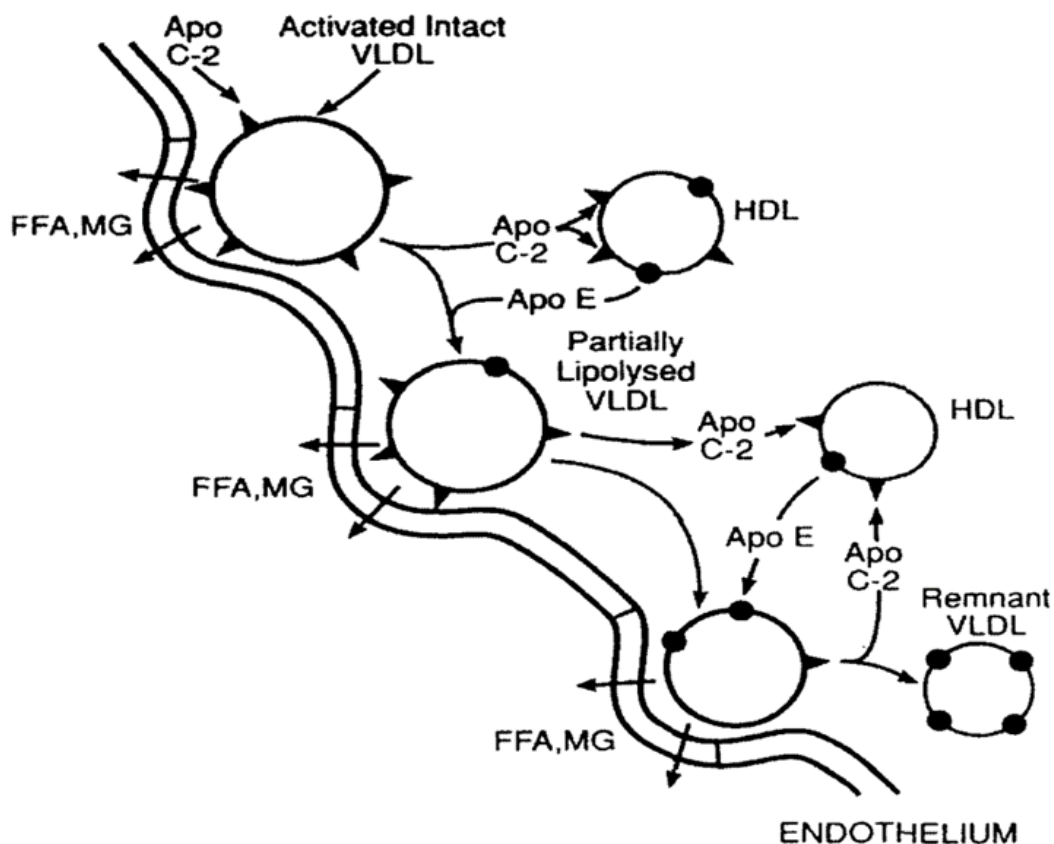
### **1.4.1 Biosynthèse des VLDL**

Les protéines de très basse densité (VLDL) sont un type de lipoprotéines synthétisées par les cellules du foie. Leur rôle principal consiste à transporter les triglycérides du foie vers les muscles où ils seront utilisés comme source énergétique ou vers les tissus adipeux où ils seront entreposés (D. E. Cohen, 2009b). La synthèse de VLDL débute par la traduction du gène Apo B afin de synthétiser l'apolipoprotéine B-100 au niveau du réticulum endoplasmique des hépatocytes. De manière analogue aux chylomicrons, le transporteur MTTP est également présent afin d'ajouter des triglycérides supplémentaires à l'Apo B-100 simultanément à la traduction. Des phospholipides s'ajoutent aussi à la structure afin que les triglycérides, étant hydrophobes, se retrouvent au centre de la lipoprotéine (Gibbons et al., 2004). Le VLDL en formation migre ensuite vers l'appareil de Golgi où il accumulera encore des triglycérides via l'activité de MTTP afin de compléter sa maturation. La synthèse du VLDL se termine par l'ajout de molécules de cholestérol estérifié dont les mécanismes enzymatiques restent encore à déterminer (Cohen, 2009a). Le VLDL peut alors être excrété hors de la cellule et entré dans la circulation afin de transporter les triglycérides du foie vers les tissus périphériques (Fielding & Fielding, 2002).

### **1.4.2 Transport du cholestérol par les VLDL**

À l'intérieur des vaisseaux sanguins, le VLDL interagit d'abord avec un HDL afin d'acquérir l'Apo CII, ce qui est essentiel au processus de transfert des triglycérides de la lipoprotéine vers les tissus. Au moyen de l'enzyme CETP, les VLDL échangent également des triglycérides avec les HDL ou LDL en circulation contre des molécules de cholestérol estérifié. Les VLDL diminuent ainsi déjà leur contenu en triglycérides (Schofield et al., 2016). L'Apo CII peut également être acquise dans le foie avant sa sortie en circulation. Le VLDL peut acquérir dès sa synthèse dans le foie l'Apo CI, CIII, E et CII (D. E. Cohen, 2009b). Dans le cas de l'Apo CII, cela permettra au VLDL d'activer la LPL des tissus une fois à proximité de ceux-ci. La LPL, de la même manière que pour les chylomicrons, agira pour dégrader les triglycérides du VLDL pour que les acides gras et le glycérol puissent être

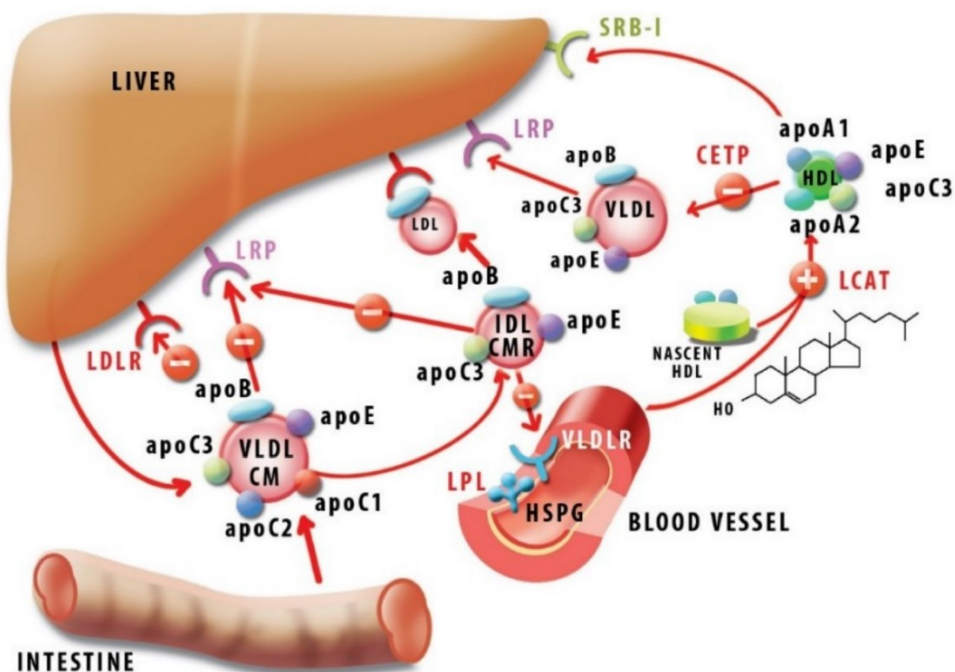
captés par les cellules. Une fois le VLDL appauvri en lipides (une perte d'environ 50%), celui-ci perd de son affinité avec la LPL (Fielding & Fielding, 2002). Environ la moitié des VLDL seront alors captés par le foie *via* les LDLr (récepteurs aux lipoprotéines de basse densité). Contrairement aux chylomicrons pour lesquels l'ensemble des résidus sont captés par le foie, l'acquisition de l'Apo B-100 au lieu de l'Apo B-48 chez les VLDL résulte en une réduction de la captation de ce type de lipoprotéine par le foie. Les VLDL qui ne seront pas internalisés subiront des hydrolyses supplémentaires de leurs triglycérides par le biais de la LH présente dans l'espace de Disse (D. E. Cohen, 2009b; Packard & Shepherd, 1997). Cette réduction supplémentaire de leur taille amène les VLDL à échanger leur Apo CII pour une Apo E en provenance de particules de HDL. Suite à cet échange, la lipoprotéine correspond à une lipoprotéine de densité intermédiaire (IDL), aussi appelé résidu de VLDL ou encore  $\beta$ -VLDL (Fielding & Fielding, 2002) (Voir figure 4).



**Figure 4.** – Transfert des apolipoprotéines permettant la formation de résidus de VLDL. (Fielding & Fielding, 2002)

### **1.4.3 Régulation hormonale, enzymatique et régulation par les apolipoprotéines de l'activité des VLDL**

L'Apo CI agit comme élément de régulation lorsqu'elle est présente sur les VLDL. De la même manière que pour les chylomicrons, l'Apo CI a pour effet de réduire la capacité de délipidation des VLDL en inhibant l'activité de la LPL. L'Apo CI empêche également la liaison des VLDL avec les récepteurs aux LDL, ceux des *VLDL* (VLDLr) et LRP1. Son effet repose sur son action inhibitrice de la liaison de l'Apo E à ces récepteurs (Gautier et al., 2000). Ainsi, sans la liaison de l'Apo E à un de ces récepteurs transmembranaires, les résidus de VLDL ne peuvent être captés par le foie et restent en circulation. Lorsque l'Apo CI est liée à un VLDL, elle cause une interaction avec l'Apo E qui empêche aussi la CETP d'effectuer son action. De la même manière, lorsque liée à un HDL, une partie de la structure de l'Apo CI se lie à l'Apo A-1, ce qui causerait une interaction qui empêcherait la liaison avec la CETP. D'après les résultats obtenus à partir d'échantillons plasmatiques de primates, ce serait l'interaction entre les apolipoprotéines qui causerait l'inhibition de l'activité de la CETP (Kushwaha et al., 1993). Cette inhibition réduirait la capacité des VLDL à capter le cholestérol estérifié des HDL en échange de triglycérides, ce qui influencerait l'activité des HDL qui est normalement prolongée par l'action de la CETP (Jong Miek C. et al., 1999). Ces résultats suggérant l'inhibition de la CETP par l'Apo CI ont par la suite été confirmés chez l'humain (Fuior & Gafencu, 2019). Les articles mentionnés ci-haut pour appuyer cette voie régulatrice réfèrent surtout à l'activité de l'Apo CI lorsque liée aux HDL. De plus, l'article de Gautier et al. mentionne que plus de 80% de l'Apo CI en circulation se retrouve liée aux HDL (Gautier et al., 2000), ce qui réduit son importance dans la régulation du métabolisme des VLDL. La figure 5 illustre les interactions de l'Apo CI avec les récepteurs au foie, la CETP ainsi qu'avec les autres apolipoprotéines.



**Figure 5.** – Voies de régulation des lipoprotéines par l’action de l’Apo CIII (Fuior & Gafencu, 2019)

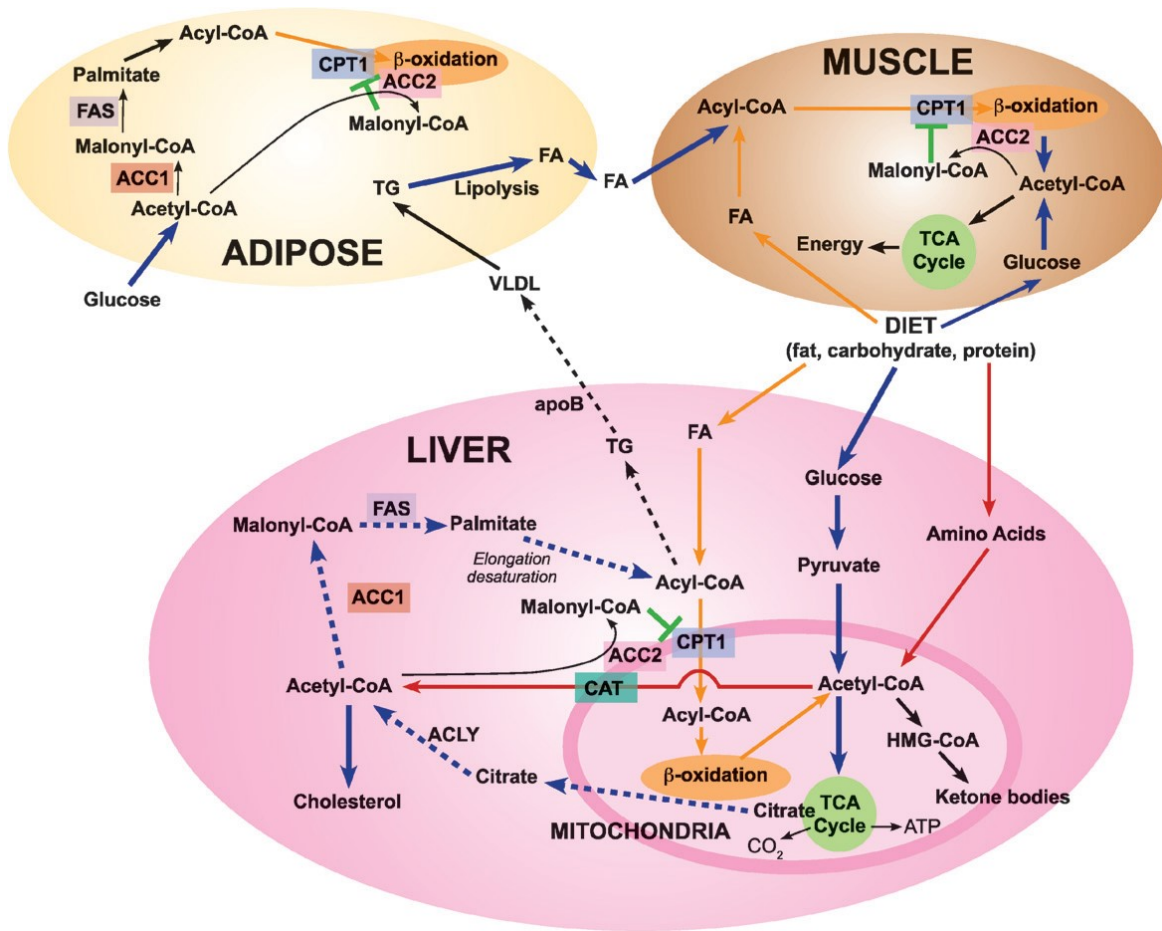
Permission par la License Creative Commons

L’Apo CIII, synthétisée par le foie et l’intestin, agit aussi comme régulateur des VLDL via différents mécanismes (Jong Miek C. et al., 1999). Comme pour son action sur les chylomicrons, sa présence sur le VLDL inhibe l’activité de la LPL issue des tissus musculaires et adipeux. Ce mécanisme est réversible puisque l’activité de la LPL est inhibée et non inactivée (Larsson et al., 2013). Cette inhibition de la LPL réduit la capacité de délipidation du VLDL et conséquemment la vitesse d’élimination de cette lipoprotéine de la circulation. La présence de l’Apo CIII inhibe également l’activité de la lipase hépatique, ce qui réduit la captation des triglycérides du VLDL par les cellules du foie (Cyr et al., 2016). Un article plus récent de Sundaram *et al.* décrit l’effet de l’Apo CIII *in vitro* sur des hépatocytes (Sundaram et al., 2010). Leurs résultats suggèrent que l’Apo CIII aurait également un effet sur la synthèse des VLDL et leur sécrétion du foie vers la circulation. En effet, la présence d’Apo CIII dans un milieu de culture riche en lipides favorise la synthèse de l’Apo B-100, une composante essentielle à la synthèse des VLDL. L’ajout d’Apo CIII dans ce milieu favorise également l’expression de l’ARNm de MTP, une protéine qui permet la maturation des VLDL en ajoutant des triglycérides à l’Apo B-100. Enfin, la sécrétion des VLDL est également stimulée par la présence de l’apolipoprotéine CIII.

FXR, un récepteur de la membrane nucléaire, est également un élément de régulation de la synthèse des VLDLs. L'activation de FXR se fait par sa liaison avec des acides biliaires, ce qui a un effet régulateur dans plusieurs voies cellulaires des hépatocytes. En ce qui concerne la régulation des VLDLs, FXR inhibe les facteurs de transcription SREBP1c (Sterol regulatory element binding protein 1c) et ChREBP (Carbohydrate responsive element binding protein), tous deux impliqués dans la lipogenèse *de novo* (Chávez-Talavera et al., 2017). Cette régulation a pour effet global de réduire le taux de triglycérides hépatiques, qui sont des composantes essentielles à la synthèse des VLDLs. Tel que mentionné dans la section sur la biosynthèse du cholestérol, SREBP1c fait partie d'une famille de facteurs de transcription (SREBP's) qui agissent au niveau des gènes régulant la synthèse de cholestérol et des récepteurs aux LDL (Foufelle et al., 2000). L'inhibition de SREBP1c a pour conséquence de diminuer le taux de triglycérides plasmatiques en réduisant l'expression des principaux gènes stimulant la lipogenèse *de novo* : les enzymes ACC (Acétyl-Coenzyme A carboxylase) et FAS (fatty acid synthase) (Lefebvre et al., 2009). La lipogenèse *de novo* est principalement effectuée dans le foie et le tissu adipeux. Son rôle consiste à synthétiser des acides gras à partir de sources de glucose. L'intermédiaire clé de cette voie est le malonyl-CoA et permet la formation éventuelle de triglycérides à partir des acides gras nouvellement formés (Ameer et al., 2014).

ACC est une enzyme qui possède 2 isoformes à l'intérieur des cellules hépatique : ACC1 et ACC2. ACC1 agit au niveau du cytosol comme enzyme limitante en permettant la synthèse de malonyl-CoA à partir d'acétyl-CoA. ACC2 est quant à elle présente sur la membrane mitochondriale et permet aussi la synthèse de malonyl-CoA (Voir figure 6). En revanche, cette synthèse de malonyl-CoA agit surtout comme élément inhibiteur de CPT-1 (carnitine/palmitoyl-transférase 1), un transporteur permettant le passage d'acyl-CoA (sous forme d'acyl-carnitine) de part et d'autre de la double membrane mitochondriale. L'inhibition de CPT-1 mène ainsi à une réduction de substrat (acyl-CoA) pour la  $\beta$ -oxydation, ce qui réduit l'utilisation des lipides comme source énergétique. La  $\beta$ -oxydation transforme les acyl-CoA en acétyl-CoA, l'intermédiaire clé permettant de produire de l'ATP à partir du cycle de Krebs et de la phosphorylation oxydative. L'inhibition des isoformes ACC (via sa phosphorylation par l'AMPK) crée ainsi une régulation favorisant la  $\beta$ -oxydation des lipides plutôt que la formation de nouveaux triglycérides. Les triglycérides étant essentiels à la

formation des VLDLs, cela inhibe leur synthèse et donc leur passage en circulation (Wakil & Abu-Elheiga, 2009).



**Figure 6.** – Activité des isoformes ACC à l’adipocyte, le myocyte et l’hépatocytes. (Wakil & Abu-Elheiga, 2009)

FAS est une enzyme régulatrice dans la lipogenèse *de novo* qui permet d’utiliser des résidus de malonyl-CoA pour former des acides gras. Son inhibition implique également une diminution de la synthèse des acides gras, ce qui régule négativement la synthèse des triglycérides et donc des VLDLs (Ranganathan et al., 2006). ChREBP, exprimé par le gène *MLXIPL*, est un facteur de transcription qui agit sur la séquence promotrice de plusieurs gènes liés au métabolisme du glucose (Yamashita et al., 2001). Son inhibition par FXR engendre une inhibition successive de l’expression des gènes codant pour les enzymes L-PK (liver pyruvate kinase) et FAS. L-PK est une enzyme de la glycolyse qui permet la formation d’acétyl-CoA via la production de pyruvate. Les



résidus d'acétyl-CoA ainsi formés par la mitochondrie se combinent à l'oxaloacétate pour former du citrate qui sera en mesure de traverser la membrane mitochondriale vers le cytosol. Le citrate peut ensuite servir à la formation de malonyl-CoA, ce qui favorisera ainsi la voie de la lipogenèse *de novo*. Sans l'enzyme L-PK, le taux de synthèse d'acétyl-CoA diminue, ce qui inhibe la capacité de ACC1 à produire du malonyl-CoA (Caron et al., 2013). L'inhibition de FAS ajoute à cette régulation négative en diminuant la capacité de la cellule à produire du palmitate. Lorsque le ChREBP est inhibé, malgré qu'il soit associé au métabolisme du glucose, il réduit ainsi la synthèse des acides gras par la réduction de son activité sur ces enzymes (Abdul-Wahed et al., 2017). L'ensemble de ces voies inhibitrices crée une régulation négative de la synthèse des triglycérides via la réduction de la voie de synthèse d'acides gras et de la voie de la lipogenèse *de novo*, menant ainsi à une réduction de la concentration des VLDLs dans la circulation sanguine. Tel que mentionné précédemment, SREBP1c fait partie d'une famille de facteurs de transcription (SREBP's) qui agissent au niveau des gènes régulant la synthèse de cholestérol et des récepteurs aux LDL (Foufelle et al., 2000). L'inhibition de SREBP1c a pour conséquence de diminuer le taux de triglycérides plasmatiques en modifiant l'expression des gènes liés à la lipogenèse (Lefebvre et al., 2009). L'ensemble de ces voies inhibitrices amène une réduction de la synthèse des VLDL et donc de leur concentration dans la circulation sanguine.

L'insuline agit également dans la régulation des VLDL par un effet direct sur la synthèse des VLDL naissants au foie. L'insuline se lie d'abord au récepteur transmembranaire couplé à une protéine G (RCPG) qui permet l'activation d'une voie de signalisation incluant l'intermédiaire phosphoinositide 3-kinase (PI3K) (Phung et al., 1997). La production de cet intermédiaire amène une réduction de l'expression génique de l'enzyme MTPP, qui est l'étape limitante dans la synthèse de nouveaux VLDL. L'action de l'insuline réduit ainsi l'activité de l'enzyme MTPP qui permet la lipidation de l'Apo B-100 dans le but de terminer la synthèse du VLDL. En cas de résistance à l'insuline, l'activité de PI3K favorise aussi la dégradation de l'Apo B-100, ce qui réduit sa sécrétion dans le plasma. L'inhibition de la production de VLDL dans les hépatocytes diminue leur taux en circulation. L'insuline produit aussi un effet indirect en favorisant l'activité de la LPL des tissus, ce qui améliore la délipidation des VLDL et réduit leur temps en circulation (Hirano, 2018).

En résumé, la voie des VLDL est régulée par l'état nutritionnel de l'organisme et des apolipoprotéines (CI, CII, CIII, E, B-100) qui la composent. La captation des résidus de VLDL dépend également de la disponibilité des récepteurs au foie tel que LDLr et LRP1 dû à leur liaison avec l'Apo E. Enfin, les lipases sont également à prendre en compte puisqu'elles contribuent à les transformer en résidus de VLDL, ce qui leur permet d'augmenter leur affinité avec les récepteurs du foie et ainsi être internalisés et dégradés. Une diminution de la synthèse des VLDLs liée à une perturbation de ces mécanismes de régulation réduirait le transport des lipides vers la périphérie, ce qui contribuerait potentiellement à une augmentation des triglycérides au foie (Ipsen et al., 2018).

## **1.5 Captation du cholestérol au foie par les LDL**

Les lipoprotéines de basse densité (LDL) correspondent à la classe de lipoprotéines de plus petite taille issue de nombreuses réactions d'hydrolyse des triglycérides des VLDL et IDL tout en conservant leur composition en cholestérol. Elles se distinguent par le fait qu'elles possèdent seulement une molécule d'Apo B-100, ce qui rend plus difficile leur captation par le foie (Fielding & Fielding, 2002). En effet, comparativement à l'Apo E, l'Apo B-100 possède une faible capacité de liaison avec les LDLr. Cette faible affinité explique en majeure partie pourquoi le temps en circulation des LDL est plus long que les autres types de lipoprotéines; et conséquemment qu'elles possèdent une demi-vie de 2 à 4 jours en circulation. Le LDLr est néanmoins le seul type de récepteur avec lequel l'Apo B-100 peut se lier dans le foie. Ceci complexifie d'ailleurs leur élimination de la circulation sanguine (Brown & Goldstein, 1986). Une fois lié aux LDLr du foie, les particules de LDL sont alors internalisées, leur structure est dégradée et leur cholestérol estérifié est disponible pour la synthèse de nouvelles particules de VLDL. Cet arrivage de cholestérol peut également servir à la synthèse d'acides biliaires; leur permettant ainsi d'éliminer le cholestérol en excès (Fielding & Fielding, 2002) (*Voir 2.2.2.1 Les acides biliaires*).

La présence de LDLr est ce qui permet aux particules de LDL d'être captées par le foie et ainsi d'être éliminées de la circulation. Le foie est d'ailleurs l'organe où est exprimé la majorité des LDLr, soit environ 70% (Niesen et al., 2008). Les mécanismes de régulation de ces récepteurs sont

donc très importants pour le métabolisme des LDL et la réduction du cholestérol plasmatique (Poirier et al., 2015). La *Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 9* (PCSK9) est une protéine exprimée par les cellules du foie et de l'intestin qui permet en partie la dégradation des LDLr (Warden et al., 2019). PCSK9 agit au niveau intracellulaire, mais peut également être exporté sous forme soluble dans le plasma. La présence de PCSK9 dans le plasma lui permet d'interagir avec les LDLr de d'autres types cellulaires tels que les macrophages, les gonades, le cortex des surrénales, les lymphocytes et les tissus musculaires lisses (Cohen, 2009). Au niveau du foie, PCSK9 peut se lier aux LDLr à partir du cytoplasme ou à partir du plasma (Poirier et al., 2015). PCSK9 agit comme une protéine chaperonne pour réduire les sites de liaison et d'activation des LDLr à la surface des cellules. Son rôle consiste à internaliser les LDLr des hépatocytes en les acheminant vers les lysosomes ou les protéasomes de la cellule où leur dégradation sera réalisée. Cette réduction des récepteurs à la surface contribue à diminuer la captation des particules de LDL, ce qui favorise une augmentation du taux de LDL en circulation. Dans le cas où PCSK9 est inhibé, les LDLr se retrouvent en plus grande quantité à la surface des hépatocytes et captent plus rapidement les LDL circulants (Warden et al., 2019). Cohen et *al.* ont effectué une étude sur l'effet de l'inactivation du gène PCSK9 sur la santé des vaisseaux. L'inactivation du gène comparativement à son état non modifié suggère une diminution de la prévalence des maladies cardiovasculaires athérogéniques de 88% en raison de la réduction de LDL plasmatique (Cohen, 2009a).

PCSK9 n'a pas d'effet sur l'expression génique des LDLr. En revanche, SREBP-2, un facteur de transcription régulant les gènes HMGCoAR et LDLr, contrôle également la transcription du gène PCSK9. Conséquemment, SREBP-2 favorise l'expression d'un gène stimulant simultanément la sécrétion de cholestérol *de novo* (HMGCoAR), sa captation par le foie (LDLr) et la dégradation de ce récepteur impliqué dans son transport hépatique (PCSK9). En effet, l'activité de SREBP-2 active à la fois la production de la protéine PCSK9, mais aussi celle des LDLr. Cette voie favorise donc à la fois la production de nouveaux LDLr, mais aussi l'inhibition et la dégradation de ces récepteurs par le biais de la production de la protéine PCSK9. Cette régulation à double sens s'explique potentiellement par le fait que la régulation post-traductionnelle effectuée par la protéine PCSK9 est plus rapide que celle effectuée sur l'expression génique par SREBP-2. Ceci impliquerait donc

deux niveaux de régulation sur le nombre de LDLr présents à la surface des hépatocytes (Maxwell & Breslow, 2004).

GRP94 est aussi un régulateur de PCSK9 qui inhibe l'action de la protéine PCSK9 en agissant au niveau du réticulum endoplasmique des hépatocytes. GRP94 se lie à PCSK9 dans le but d'empêcher l'interaction de PCSK9 avec les LDLr. En prévenant son inhibition et sa dégradation induite par PCSK9, les concentrations membranaires et l'activité biologique de LDLr sont ainsi augmentés. Il est important de noter que l'activité régulatrice de GRP94 sur PCSK9 n'implique ni la maturation ni la synthèse de la molécule. Le GPR94 se limite donc à réduire la modification post-traductionnelle (post-translationnelle) du PCSK9 sans influencer son activité ou sa régulation transcriptionnel. Sans la présence de GRP94, la quantité de LDLr à la surface des cellules est fortement diminuée et la concentration de cholestérol estérifié des LDL augmente de façon significative (Poirier et al., 2015).

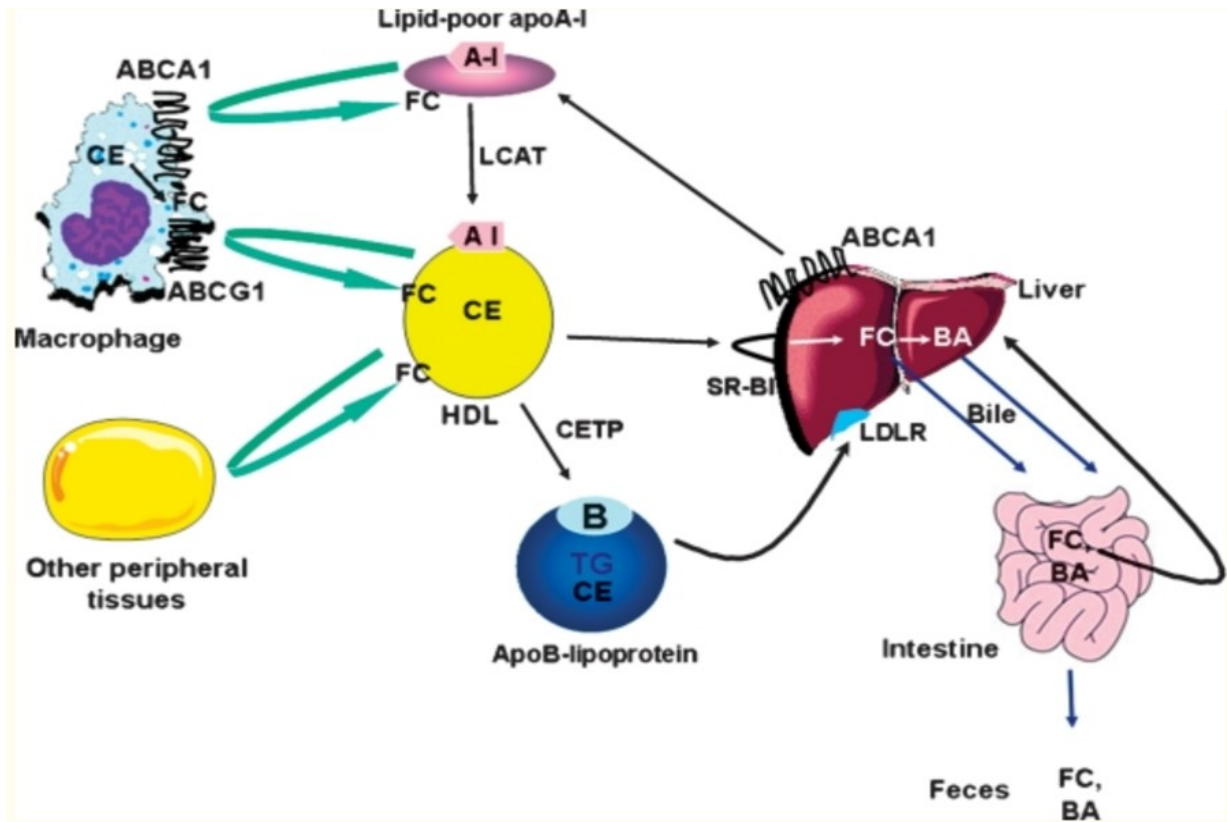
Annexin A2 est également un régulateur de PCSK9. Selon une étude effectuée *in vitro*, il s'agit d'une protéine endogène qui se lie à PCSK9 avant que celle-ci ne puisse se lier aux LDLr. Annexin A2 entre ainsi en compétition avec le récepteur pour le site de liaison, ce qui inhibe l'activité de PCSK9 sur les LDLr (Mayer et al., 2008). À ce jour, Annexin A2 et GRP94 sont les seuls régulateurs connus de PCSK9 (Poirier et al., 2015).

## **1.6 Captation du cholestérol au foie par les HDL**

Les lipoprotéines de haute densité (HDL) sont une des classes de lipoprotéines qui se définissent par leur composition plus importante en protéines (50%) relativement aux autres classes (Cohen, 2009a). Elles ont pour fonction de transporter le cholestérol en excès des tissus vers le foie où il pourra alors être recyclé ou éliminé par la voie des acides biliaires (Rader et al., 2009). Ce transport de cholestérol des tissus périphériques vers le foie est aussi appelé transport inverse du cholestérol (Hellerstein & Turner, 2014).

### 1.6.1 Biosynthèse et activité de transport des HDL

La production de particules de HDL débute dans les hépatocytes et les entérocytes par la synthèse de l'apolipoprotéine A-1 (Apo A-1 : qui est la composante principale de ce type de lipoprotéine). Elle constitue près de 70% de la structure des HDL et permet la captation du cholestérol estérifié à l'intérieur de la lipoprotéine (Zhou et al., 2015). L'Apo A-1 est produite par le foie, l'intestin grêle ou peut également être recyclée à partir de lipoprotéines préexistantes (Timmins et al., 2005). À l'intérieur de la cellule, des phospholipides peuvent s'ajouter à l'Apo A-1 avant que l'apolipoprotéine soit excrétée de la cellule par l'action du RE (Zhou et al., 2015). Une fois mise en circulation dans le plasma, l'enzyme PLTP (protéine de transfert des lipoprotéines) intervient afin d'ajouter des phospholipides supplémentaires provenant de d'autres lipoprotéines à l'Apo A-1. Cet ajout supplémentaire permet la formation de particules de HDL naissants (i.e. pré- $\beta$ HDL)(Lavoie, 2016). En circulation, ce type de particules de HDL, comprenant de faibles concentrations de lipides, peuvent se lier au transporteur transmembranaire ATP-binding cassette A1 (ABCA1) par le biais de la structure en double hélice de type alpha de l'Apo A-1 pour laquelle le récepteur possède une grande affinité (Luc, 2007; Zhou et al., 2015). L'ABCA1 est présent dans les membranes cellulaires de plusieurs types de tissus tels que le foie et les macrophages et permet de transférer du cholestérol libre en excès des cellules ou des phospholipides vers le pré-HDL (Zannis et al., 2006). La disponibilité de ce transporteur constitue par ailleurs le facteur limitant dans la voie de synthèse des HDL (Timmins et al., 2005). Selon Haghpassand et collègues, la participation des transporteurs ABCA1 des macrophages serait remis en question et ne serait donc pas parmi les tissus contribuant le plus à la synthèse des HDL (Haghpassand et al., 2001). Ceci aurait conséquemment un effet sur la capacité des macrophages de relarguer leurs molécules de cholestérol vers les particules pré-HDL. Les molécules de cholestérol internalisées par le pré-HDL peuvent alors être estérifiées par l'enzyme lécithine cholestérol acyltransférase (LCAT). L'action de la LCAT modifie également la configuration discoïdale du pré-HDL pour lui donner une forme sphérique (P. Segrest et al., 1999). Le HDL de forme sphérique, contenant des Apo A-1, des phospholipides et du cholestérol estérifié, devient alors un HDL mature (*Voir figure 7*).



**Figure 7.** – Synthèse des lipoprotéines à haute densité et transport du cholestérol des tissus périphériques vers le foie. (Rader et al., 2009)

Les HDL, synthétisés par le foie ou l'intestin, acquièrent donc leur maturité dans le plasma en transférant le cholestérol en excès des tissus au moyen du transporteur transmembranaire ABCA1. Ils peuvent également capter du cholestérol par les transporteurs ABCG1 des macrophages ou encore directement par les tissus périphériques sans qu'il y ait utilisation de récepteurs spécifiques (Cohen, 2009a). Le HDL chargé en cholestérol reste en circulation jusqu'à ce qu'il retourne au foie. La lipoprotéine peut alors être internalisée au moyen de son Apo E sur un LDLr ou encore via son Apo A-1 qui se lie à un transporteur de type Sr-B1. Dans ce dernier cas, seulement les molécules de cholestérol libre et de cholestérol estérifié sont captées par les cellules du foie et la lipoprotéine peut alors être recyclée pour former une nouvelle particule de HDL (pré-HDL) (Timmins et al., 2005). La lipase hépatique participe aussi à ce transfert en

hydrolysant les triglycérides des HDL et ceci augmente l'efficacité du transporteur Sr-B1 (Cohen, 2009a).

### **1.6.2 Mécanismes de régulation des HDL**

L'efficacité des HDL à capter l'excès de cholestérol des cellules de différents tissus est facilitée par l'action de l'enzyme CETP (*cholesterylester transfer protein*). Cet enzyme présente dans le plasma permet l'interaction entre les lipoprotéines de type HDL avec les LDL et VLDL en leur transférant des molécules de cholestérol estérifié. En échange, les lipoprotéines de type LDL et VLDL transfèrent vers le HDL des triglycérides (Lavoie, 2016). Ceci permet ainsi aux HDL de maintenir leur fonction en facilitant la captation de nouvelles molécules de cholestérol des différents tissus. L'activité de la CETP influence ainsi la régulation du taux de HDL en circulation et permet au cholestérol estérifié d'être internalisé par les cellules du foie via les LDL. Les études chez le lapin, chez qui les taux de CETP sont plus élevés que chez l'humain, ont révélé que cette voie indirecte permet à environ 70% du cholestérol estérifié capté par les HDL d'être transporté au foie (Barter et al., 2003). La voie directe est celle par laquelle les HDL se lient à SR-B1 afin de transporter le cholestérol au foie tout en conservant la structure du HDL dans le plasma (Timmins et al., 2005). Dans le cas où l'on observe une déficience en CETP, les taux de HDL sont augmentés (Inazu et al., 1990). Cela peut être bénéfique dans la mesure où un haut taux de HDL a pour conséquence un effet anti-athérosclérotique (Timmins et al., 2005). En ce qui concerne le risque de maladies cardiovasculaires, la taille et le nombre des particules de HDL a également son influence. En effet, plus les particules de HDL de petites tailles et le nombre de HDL total augmentent, plus le risque de mortalité lié aux maladies cardiovasculaires diminue (Duparc et al., 2020).

En résumé, la voie associée à la lipoprotéine de haute densité (HDL) débute par la synthèse de l'Apo A-1 au niveau des cellules du foie et de l'intestin. La lipoprotéine mature ensuite dans le plasma où elle y acquiert des phospholipides, des apolipoprotéines et du cholestérol. Ces molécules de cholestérol sont par ailleurs estérifiées par la LCAT qui permet aussi le changement de conformation de la lipoprotéine. À cette étape, le HDL devient mature et acquiert une forme sphérique. L'enzyme CETP permet de retarder la dégradation du HDL en déchargeant la

lipoprotéine de son cholestérol estérifié pour le transmettre au LDL ou VLDL en échange de triglycérides. L'activité de transport du cholestérol des HDL se termine lorsque celui-ci retourne au foie pour acheminer le cholestérol provenant des tissus périphériques *via* les récepteurs SR-B1. Les HDL appauvris en cholestérol peuvent alors capter de nouvelles molécules de cholestérol et ainsi prolonger leur activité en circulation. La lipoprotéine peut également être internalisée dans son ensemble au moyen des LDLr du foie, ce qui permet le recyclage des apolipoprotéines A-1.

### **1.6.3 Catabolisme et recyclage des HDL**

Une fois leur maturation complétée, les particules de HDL peuvent remplir leur rôle en transportant le cholestérol et les triglycérides vers le foie. Il a été mentionné précédemment que les récepteurs aux LDL et les récepteurs SR-B1 jouent un rôle essentiel dans la captation du cholestérol estérifié du HDL par les hépatocytes. Également, la protéine CETP permet par son activité de décharger les HDL en cholestérol et est donc un autre moyen de l'organisme d'obtenir des HDL appauvris en cholestérol. Par ailleurs, la lipase endothéliale (EL), une lipase synthétisée par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, joue un rôle important dans le plasma en hydrolysant les phospholipides des HDL. Cela a pour effet de réduire la taille des particules de HDL, ce qui leur permet de retrouver une structure plus semblable à celle des pré-HDL. Plus le taux de la EL est important, plus la concentration des HDL plasmatiques matures diminue. Quant à la lipase hépatique (HL), elle est exprimée dans les hépatocytes et joue un rôle dans le métabolisme des HDL en hydrolysant les triglycérides et les phospholipides (McCoy et al., 2002). Cette réduction cumulative en cholestérol, triglycérides et phospholipides amène le HDL à changer de structure pour revenir à sa configuration initiale de particule pré-HDL ou encore prendre la forme de l'apolipoprotéine A-1 appauvrie en lipides. Ces apolipoprotéines A-1 peuvent alors être recyclées pour former de nouveaux HDL en se liant aux transporteurs ABCA1. Elles peuvent également être filtrées par les glomérules des reins et être transportées dans le filtrat glomérulaire. Ces molécules qui sont de plus faibles poids moléculaires que les HDL matures, peuvent passer plus facilement la membrane de filtration glomérulaire et ainsi entrer à l'intérieur



des tubules proximales (Luc, 2007). Une fois dans le filtrat, elles se lient aux protéines cubiline et amnionless. Les Apo A-1, une fois liées à ces protéines, ne peuvent plus retourner dans la circulation sanguine et seront éliminées par les reins (Kozyraki et al., 1999).

## **1.7 Métabolisme du cholestérol par la voie entéro-hépto-biliaire**

Les concepts liés aux différentes lipoprotéines et aux mécanismes d'apport en cholestérol de l'organisme ont été abordés en détails dans les sections précédentes. Une fois que le cholestérol est présent dans les hépatocytes, que ce soit par voie endogène ou exogène, celui-ci peut servir à la synthèse d'acides biliaires. Les acides biliaires sont des molécules amphiphiles (i.e. amphipathiques) qui possèdent des propriétés détergentes. Ces composés sont d'abord synthétisés par le foie à partir de cholestérol, puis emmagasinés sous forme de bile dans la vésicule biliaire. À la suite de l'ingestion d'aliments riches en lipides, la bile est libérée dans l'intestin. L'action principale des acides biliaires consiste à solubiliser les lipides alimentaires dans l'intestin afin que ceux-ci puissent être absorbés par l'organisme. Les acides biliaires peuvent ensuite être recyclés en étant absorbés par les entérocytes et retourner au foie (Lefebvre et al., 2009). Les prochaines sections aborderont la voie de synthèse des acides biliaires, leur transport des hépatocytes à la vésicule biliaire, leur sécrétion sous forme de bile dans le duodénum, leurs différents mécanismes de régulation et leur excrétion *via* les selles.

### **1.7.1 Les acides biliaires**

La voie de synthèse des acides biliaires dit primaire est produite uniquement dans le foie et est initiée par une réaction d'hydroxylation d'une molécule de cholestérol par l'enzyme *cytochrome P450 cholestérol 7 alpha hydroxylase 1* (CYP7 $\alpha$ 1). Cette réaction s'effectue à l'intérieur du RE. CYP7 $\alpha$ 1 est l'enzyme limitante de cette voie de synthèse, ce qui fait de cette protéine un des principaux éléments de régulation dans la formation des acides biliaires. Il existe également une voie alternative qui permet la synthèse d'acides biliaires en utilisant l'enzyme *cytochrome P450 cholestérol 27 alpha hydroxylase* (CYP27 $\alpha$ ) et l'enzyme *cytochrome P450 cholestérol 7 bêta*

*hydroxylase* (CYP7 $\beta$ 1). CYP27 $\alpha$  est présente dans la mitochondrie de l'hépatocyte et permet la formation d'un premier intermédiaire; 5-cholesterol-3 $\beta$ ,27-diol. Le produit de la réaction migre ensuite à l'intérieur du RE où l'enzyme CYP7 $\beta$ 1 effectue la deuxième réaction. Les deux enzymes sont donc essentielles à la formation d'acides biliaires par la voie alternative. Cette voie, aussi appelée la voie acide, contribue minimalement à la synthèse d'acides biliaires comparativement à la voie utilisant CYP7 $\alpha$ 1 (Lefebvre et al., 2009). Il a été rapporté que la voie alternative utilisant CYP27 $\alpha$  contribue à environ 25% de la synthèse d'acides biliaires chez la souris (Schwarz et al., 2001). À titre comparatif, cette proportion chez l'humain serait inférieure à 9% (Duane & Javitt, 1999). Dans le cas où la voie classique est indisponible pour la synthèse d'acides biliaires, une étude chez la souris suggère que la voie alternative ne peut compenser pour l'absence de l'activité enzymatique de CYP7 $\alpha$ 1. La voie classique ne serait donc pas un facteur de régulation qui influencerait l'activité de la voie alternative chez toutes les espèces (Schwarz et al., 2001). Or, une étude conduite chez l'humain suggère plutôt que la voie alternative est régulée à la hausse en cas de réduction de l'enzyme Cyp7 $\alpha$ 1. Cette compensation enzymatique permettrait ainsi d'augmenter la production d'acides biliaires (Pullinger et al., 2002). Cette hausse de la voie alternative n'a cependant pas été observée dans une étude chez des sujets humains ayant une maladie chronique du foie et ce, malgré une réduction significative de la voie de synthèse utilisant CYP7 $\alpha$ 1 (Cirrhose biliaire primitive, hépatite C) (Crosignani et al., 2007).

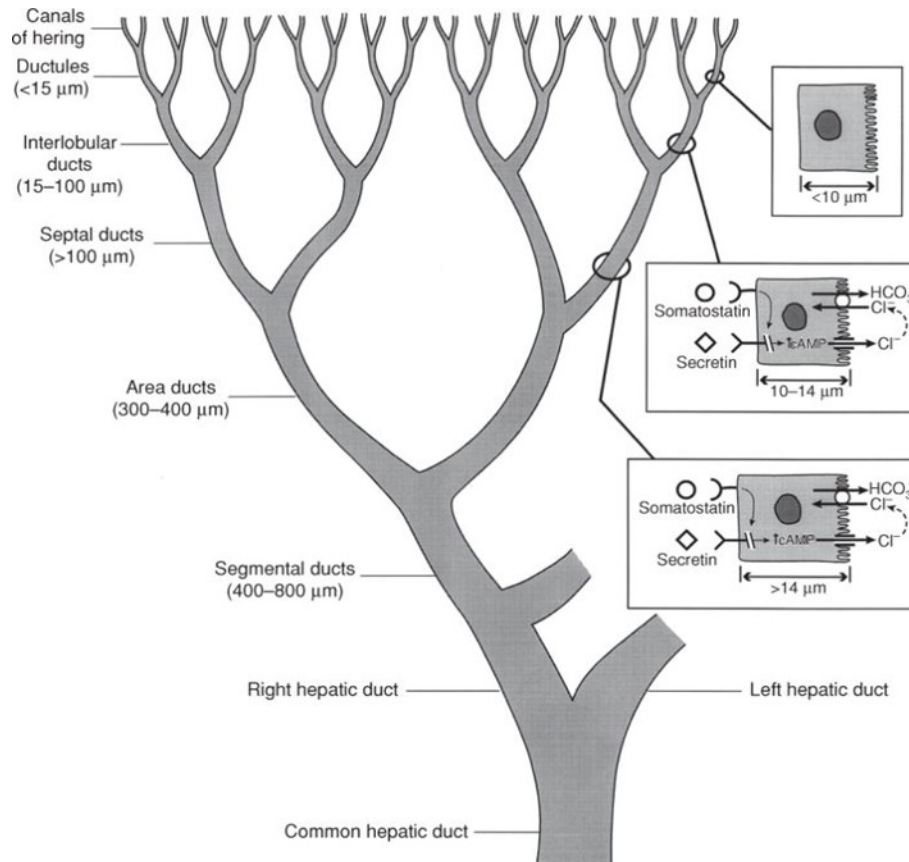
Dans la littérature, on fait la distinction entre les acides biliaires primaires et ceux qualifiés de secondaires. Les acides biliaires secondaires se différencient des acides biliaires primaires par leur interaction avec le microbiote intestinal. En effet, une fois libérés dans le tractus intestinal, une faible proportion des acides biliaires ne sont pas absorbés dans les différentes sections de l'intestin grêle et circulent jusqu'au côlon. Les acides biliaires peuvent alors y interagir avec le microbiote présent, permettant ainsi de modifier partiellement leur structure au moyen de réactions de déconjugaison et de déhydroxylation (Dawson et al., 2010). L'activité des bactéries intestinales sur les acides biliaires permet de créer une plus grande diversité d'acides biliaires dans l'organisme. Les principaux acides biliaires secondaires chez l'humain sont l'acide désoxycholique et l'acides lithocholique. Ils sont produits à partir des principaux acides biliaires primaires, soit l'acide cholique et l'acide chénodésoxycholique (Lefebvre et al., 2009).

Les acides biliaires synthétisés par le foie sont majoritairement l'acide cholique et l'acide chénodésoxycholique. Ils se conjuguent ensuite avec une taurine ou une glycine. Cet ajout d'acides aminés à leur structure a pour effet de diminuer leur niveau d'hydrophobicité. Le choix entre une taurine ou une glycine dépend de la disponibilité de ces acides aminés dans la cellule et de leur affinité pour l'enzyme effectuant la réaction. La taurine chez l'humain possède une plus grande affinité pour l'enzyme BAAT (bile acid coenzyme A: amino acid N-acyltransferase) qui effectue cette réaction de conjugaison (Lefebvre et al., 2009). En absence de l'activité de l'enzyme BAAT, les acides biliaires ne peuvent être conjugués et ne peuvent être transportés dans le canal biliaire. Dans ce dernier cas, certains auteurs suggèrent qu'une faible proportion seulement des acides biliaires non conjugués s'intègre à la bile formée tandis que la majorité diffuse de manière passive vers la circulation sanguine (Carlton et al., 2003). Le caractère amphiphile des acides biliaires non conjugués faciliterait ainsi leur passage à travers la membrane cellulaire sans la nécessité d'utiliser des transporteurs spécifiques. Leur transport dans le plasma y causerait ainsi une accumulation d'acides biliaires inhabituelle dans des conditions physiologiques normales. Ce mécanisme répondant à l'absence de l'enzyme BAAT pourrait être la cause de l'hypercholanémie familiale, qui se définit par une accumulation chronique d'acides biliaires plasmatiques (Carlton et al., 2003).

Une fois les acides biliaires conjugués, ils sont transportés hors des hépatocytes au moyen du transporteur BSEP (bile salt export pump) présent à la membrane apicale de la cellule, aussi appelée membrane canaliculaire. Il s'agit d'un transporteur appartenant à la famille « ATP-binding cassette » qui est exprimé par le gène *Abcb11* (Lefebvre et al., 2009). Le BSEP est synthétisé au niveau du RE puis migre vers l'appareil de Golgi. Il est ensuite transloqué à la membrane canaliculaire via un mécanisme qui nécessite l'utilisation de microtubules et de vésicules. Le transport de BSEP est régulé entre autres par l'action hormonale du glucagon ou de l'épinéphrine sur leur RCPG spécifique présent à la membrane basolatérale de l'hépatocyte (Anwer, 2004). Celui-ci active l'adénylate cyclase qui à son tour permet la production d'AMPc (adénosine monophosphate cyclique), un second messenger qui intervient dans plusieurs voies de régulation intracellulaire (Bunnett, 2014). Dans le cas de BSEP, l'AMPc va activer la protéine kinase A qui permettra l'afflux d'ions calcique ( $Ca^{2+}$ ) provenant des réserves intracellulaires et du milieu

extracellulaire. Le calcium agirait ensuite au niveau des vésicules permettant le transport de BSEP à la membrane canaliculaire. L'acide biliaire primaire conjugué taurocholate et l'AMPc activent quant à eux la voie de signalisation de la PI3K qui joue un rôle dans l'activation du transporteur BSEP et sa translocation à la membrane canaliculaire. Le rôle de la kinase PI3K au niveau de la translocation de BSEP semble néanmoins controversé. La translocation de BSEP serait plutôt régulée par la voie de l'AMPc indépendamment de l'activité de PI3K (Misra et al., 2003). Enfin, l'utilisation de microtubules pour le transport de BSEP de l'appareil de Golgi vers la membrane est mentionnée dans la littérature, mais les détails du mécanisme de transport restent à être élucidés (Anwer, 2004). Le transporteur MRP2 (multidrug resistance-associated protein 2) est aussi présent à la membrane canaliculaire et assure également le transport des acides biliaires dans les canalicules (Dawson et al., 2010).

Les membranes canaliculaires des hépatocytes où se trouvent les transporteurs BSEP et MRP2 forment des jonctions avec les ramifications du canal biliaire nommés canaux de Herring. Afin d'avoir accès à l'ensemble des cellules sécrétrices du foie, le canal biliaire doit se subdiviser en canaux plus petits afin de se lier à chacun des canaux de Herring des hépatocytes. Ainsi, plus le canal progresse de l'hépatocyte vers la vésicule biliaire, plus les ramifications diminuent et les canaux augmentent en diamètre. Cet arrangement mène à la formation d'un canal unique appelé canal biliaire commun (Benedetti' et al., 1996)(*Voir figure 8*). L'exportation hors de la cellule des acides biliaires favorise par ailleurs la sécrétion de d'autres constituants de la bile tel que de l'eau, des phospholipides et des molécules de cholestérol (Lefebvre et al., 2009).



**Figure 8.** – Caractéristiques des ramifications du canal biliaire (Boyer, 2013)

Il a été mentionné précédemment que la régulation des acides biliaires se fait entre autres par le taux de production d'AMPc, ce qui influence les niveaux de BSEP présents à la membrane canaliculaire. En plus de la régulation du transporteur BSEP, la synthèse d'acides biliaires est également régulée par l'action inhibitrice des acides biliaires. Les acides biliaires à l'intérieur des hépatocytes interagissent avec FXR (farnesoid X receptor), un récepteur nucléaire, qui à son tour inhibe l'expression et l'activité enzymatique de Cyp7 $\alpha$ 1, l'enzyme limitante de la voie de synthèse des acides biliaires (Pandak et al., 1994). De plus, FXR inhibe également la voie alternative de la synthèse des acides biliaires par son action sur les enzymes CYP8 $\beta$ 1 et CYP27 $\alpha$  (Marin et al., 2016). Ainsi, plus les acides biliaires sont présents en quantité importante dans les hépatocytes, plus ils activeront les récepteurs FXR, ce qui aura pour effet de réduire leur biosynthèse.

### 1.7.2 Composition de la bile

La bile est un liquide provenant des hépatocytes qui circule dans le canal biliaire, s'emmagine dans la vésicule biliaire et est libérée dans l'intestin en réponse à une régulation hormonale spécifique. L'activité de la bile permet l'émulsion et l'absorption des lipides ainsi que des vitamines liposolubles dans l'intestin. Les acides biliaires qui la composent sont synthétisés à partir de molécules de cholestérol, ce qui permet leur utilisation et leur élimination. C'est d'ailleurs le seul moyen d'éliminer significativement le cholestérol de l'organisme. La bile est composée majoritairement d'eau, d'acides biliaires, de cholestérol, de phospholipides et de bilirubine (Oude & Groen, 2002). Les mécanismes de synthèse, de sécrétion et de régulation des autres constituants de la bile, outre les acides biliaires, seront décrits dans les pages suivantes.

L'eau constituant la bile est transportée des hépatocytes vers le canal biliaire au moyen d'un mécanisme osmotique utilisant les jonctions serrées. En effet, le transport des acides biliaires et des autres constituants de la bile dans le canal biliaire cause une différence osmotique de part et d'autre des membranes des cellules, ce qui amène une certaine quantité d'eau à être transportée *via* les jonctions serrées hors des hépatocytes pour traverser vers le canal biliaire (Oude & Groen, 2002). En plus du mécanisme osmotique, des canaux spécialisés appelés aquaporines sont situés dans les membranes afin de faciliter le passage de molécules d'eau entre les cellules (Ra et al., 2011). Il en existe plusieurs, mais les aquaporines 8 et 9 sont celles qui présentent un intérêt particulier pour l'étude du transport d'eau vers le canal biliaire.

L'aquaporine 8 (AQP8) est présente dans la membrane interne des mitochondries des hépatocytes ainsi que dans les membranes canaliculaires. Ces aquaporines sont également présentes sous forme inactive à l'intérieur de vésicules intracellulaires. Activée par l'AMPc, l'AQP8 est transportée par vésicule et intégrée à la membrane canaliculaire. Sa présence augmente la perméabilité de la membrane et favorise le flux d'eau vers le canal biliaire (Calamita et al., 2005). Dans le cas où l'expression génique de l'AQP8 est diminuée, il en résulte une baisse de perméabilité de la membrane canaliculaire et chez l'humain, on observe une inhibition du transport de l'eau dans le canal biliaire (Ra et al., 2011). La présence des AQP8 à la membrane canaliculaire peut être régulée positivement par l'hormone glucagon. La molécule de glucagon agit en se liant à son récepteur spécifique, ce qui favorise une cascade cellulaire impliquant la

production d'AMPc et l'activation de la protéine kinase A et du second messenger PI3K (Gradilone et al., 2005). L'augmentation des niveaux d'AMPc affecte positivement le transport et le nombre de translocation des vésicules contenant les AQP8. De plus, il y a également une possibilité que cette voie stimulée par le glucagon affecte l'expression de l'AQP8 en diminuant son taux de dégradation. Le glucagon intervient ainsi non pas sur l'expression de gènes permettant la synthèse de l'AQP8, mais plutôt sur des gènes influençant son taux de dégradation. Le glucagon favorise ainsi par deux mécanismes le flux d'eau en augmentant le taux d'AQP8 à la membrane (Gradilone et al., 2003; Soria et al., 2009). L'hormone triiodothyronine (T3) joue également un rôle dans la régulation de l'AQP8 en agissant comme inhibiteur de la transcription du gène codant pour l'AQP8. En revanche, cette dernière étude a été conduite sur des mitochondries de rat isolées, ce qui ne nous donne pas d'information sur la régulation de l'AQP8 à la membrane caniculaire (Calamita et al., 2007).

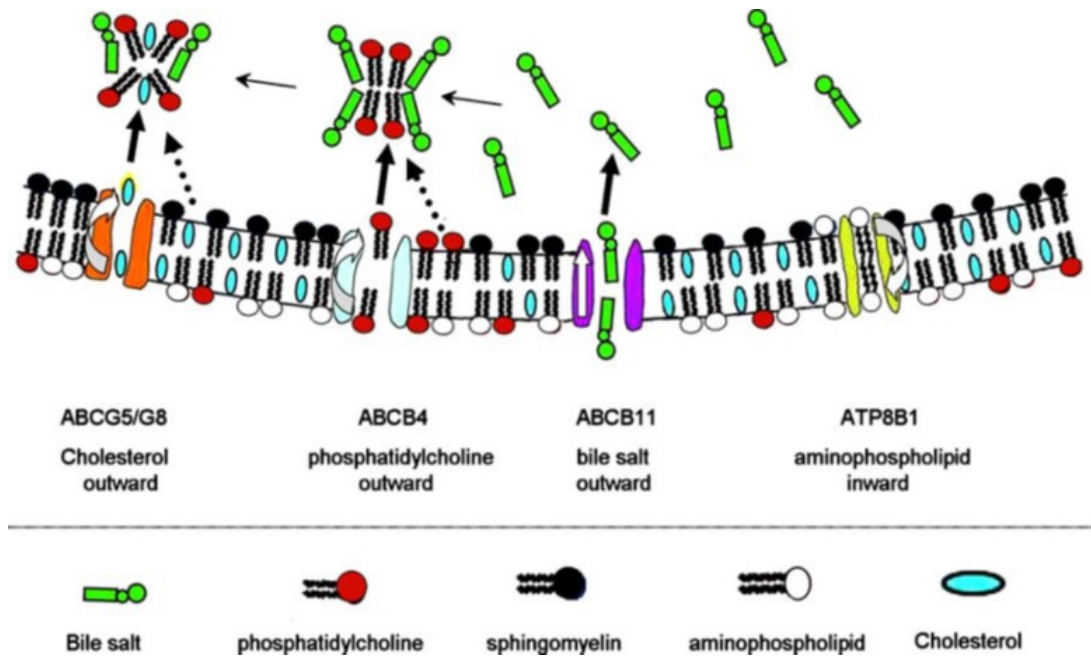
L'aquaporine 9 (AQP9) est quant à elle présente à la membrane plasmique des hépatocytes adjacente aux sinusoides (Elkjær et al., 2000). Elle permet le transport de l'eau, de petites molécules non chargées et de glycérol du plasma des sinusoides vers l'intérieur des hépatocytes. L'eau devient alors plus accessible pour l'AQP8 afin de promouvoir le flux d'eau vers le canal biliaire (Marinelli et al., 2003). De plus, la possibilité de capter plus de glycérol permet de favoriser la néoglucogenèse en cas de déficit énergétique de la cellule. Le glycérol peut ainsi servir de substrat à la synthèse de nouvelles molécules de glucose. La régulation de l'AQP9 dépend donc du statut nutritionnel. L'état à jeun de l'organisme entraîne une augmentation de la présence de l'AQP9 à la surface de la membrane sinusoidale, ce qui est cohérent puisqu'un état de jeûne favorise le processus de néoglucogenèse. Également, la réduction de la production d'insuline par les cellules bêta du pancréas cause une augmentation de l'expression des AQP9 des hépatocytes. L'aquaporine 9 est donc régulée négativement par la libération d'insuline dans la circulation sanguine (Carbrey et al., 2003). En bref, l'AQP9 est présente à la membrane sinusoidale de l'hépatocyte et permet aux molécules d'eau du plasma de rentrer plus facilement dans la cellule hépatique. Les molécules d'eau deviennent alors plus accessibles pour leur transport dans le conduit biliaire via l'AQP8.

Les molécules de cholestérol, en plus d'être utilisées pour la synthèse d'acides biliaires, sont aussi des constituants de la bile lorsque sécrétées sous forme libre (Dijkers & Tietge, 2010). Le cholestérol non estérifié peut ainsi traverser la membrane canaliculaire au moyen des transporteurs ABCG5/G8 (Oude & Groen, 2002). Le transporteur ABCG5/G8 consiste en 2 hémis-transporteurs synthétisés par les gènes *abcg5* et *abcg8*. Ils font également partie de la famille des transporteurs « ATP-binding cassette » et sont exprimés dans le foie et dans l'intestin. La synthèse des deux sous-unités, ABCG5 et ABCG8, est essentielle à leur fonctionnement puisque leur inter liaison est obligatoire à leur transport à la membrane. La présence des deux unités est nécessaire puisque leur liaison avec tout autre forme d'hémi-transporteur les rendrait biologiquement inactifs. Il s'agit donc d'un hétérodimère obligatoire dont la transcription des deux gènes est nécessaire pour exporter les stérols tel que le cholestérol ou les stérols végétaux hors de l'organisme (Graf et al., 2003). Le transporteur ABCG5/G8 est régulé principalement par la transcription des gènes *abcg5* et *abcg8* via le récepteur nucléaire LXR. Dans le cas où des molécules de cholestérol activent le LXR, celui-ci favorise l'expression de l'ARNm des hémis-transporteurs. Cela résulte en une augmentation des transporteurs ABCG5/G8 à la membrane canaliculaire, favorisant ainsi l'exportation des molécules de cholestérol libre dans la bile (Hazard & Patel, 2007). De plus, comme le cholestérol active le récepteur LXR, une alimentation riche en cholestérol a pour effet de favoriser son activation et donc l'activité des récepteurs ABCG5/G8 à la membrane canaliculaire (Repa et al., 2002).

Les phospholipides, constituants de la bile, proviennent des membranes cellulaires des hépatocytes. Ces phospholipides sont presque exclusivement des phosphatidylcholines qui se distinguent par l'ajout d'un groupement phosphate et d'une choline à leur tête polaire. Ces phospholipides sont transportés par le transporteur multidrug resistance 3 (MDR3) présent à la membrane canaliculaire et exprimés à partir du gène *Abcb4* (de Vree et al., 1998, p. 3; Oude & Groen, 2002). Plus précisément, il s'agit d'une translocation des phospholipides du côté interne de la membrane au côté externe. Cela permet à ces phospholipides d'être accessibles et de se lier aux acides biliaires qui ont été transportés dans la lumière du canal biliaire pour former des micelles mixtes (Voir figure 9). Le rôle principal des phospholipides dans la bile consiste à protéger



les cellules du canal biliaire contre les propriétés détergentes des acides biliaries (Oude & Paulusma, 2007).



**Figure 9.** – Formation de micelles mixtes à partir de la membrane canaliculaire. *Modifié de* (Oude & Paulusma, 2007)

D'autres transporteurs servant à la sécrétion de la bile tel que FIC1 (gène *Atp8b1*) et ABCB1 de même que la bilirubine ne seront pas abordés dans cette revue puisque non-spécifiques au mécanisme d'élimination du cholestérol. Pour la même raison, les enzymes, peptides, ions, cytokines, vitamines, hormones stéroïdiennes et phéromones liés à la production de la bile ne seront pas décrits dans le présent mémoire de maîtrise (Boyer, 2013). En bref, la bile est un liquide à la composition complexe qui remplit plusieurs fonctions dans l'organisme dont la principale est l'émulsion des lipides dans la lumière intestinale. Dans les prochaines lignes, les mécanismes de régulation de la sécrétion de la bile dans l'intestin seront décrits.

### 1.7.3 Sécrétion via la vésicule biliaire

Les constituants de la bile présents dans la vésicule biliaire sont directement sécrétés dans le duodénum *via* le canal biliaire (Boyer, 2013). La bile s'accumule dans la vésicule biliaire jusqu'à

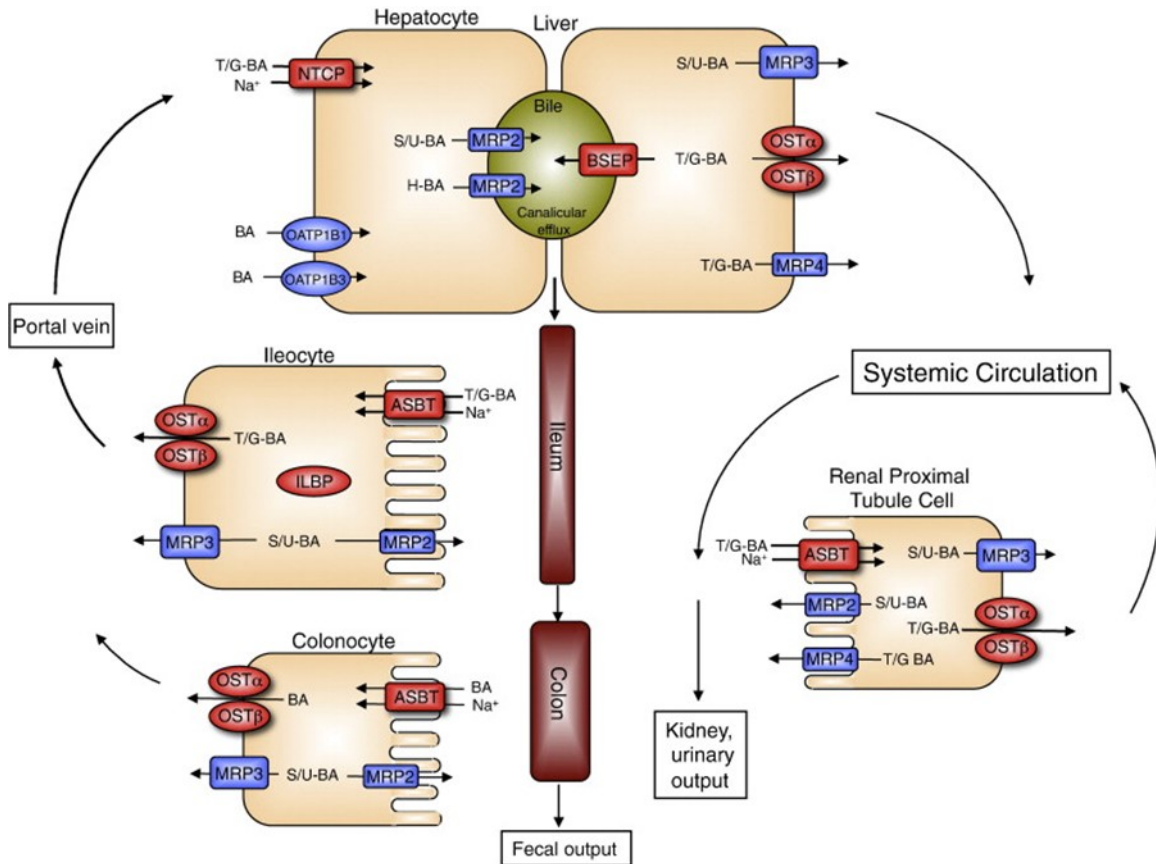
ce que les cellules musculaires de la paroi de la vésicule soient stimulées par la cholécystokinine (CCK), ce qui permet la sécrétion de la bile à l'intérieur du duodénum. La CCK est une hormone sécrétée par les cellules entéroendocrines du duodénum en réponse à l'absorption d'aliments contenant des lipides (Lefebvre et al., 2009). Le remplissage de la vésicule biliaire se fait par l'action des acides biliaires présents qui activent les récepteurs TGR5, ce qui provoque le relâchement des cellules musculaires de la paroi vésiculaire (Housset et al., 2016). TGR5 est un récepteur membranaire présent à la surface des cellules épithéliales de la vésicule biliaire. Lorsqu'activé par les acides biliaires, il engendre la mise en action de plusieurs cascades enzymatiques intracellulaires activées par la formation d'AMPc et l'activation de la protéine kinase A (PKA). Cette protéine kinase cause une hyperpolarisation au niveau des canaux potassiques des cellules musculaires de la paroi de la vésicule, ce qui a pour effet d'inhiber la contractilité de la vésicule biliaire (Bunnett, 2014). TGR5 permet ainsi d'ajuster le volume de la vésicule biliaire après un repas en fonction de la concentration d'acides biliaires présent dans le canal biliaire (Li et al., 2011). TGR5 est présent à la vésicule biliaire mais également dans plusieurs organes dont le pancréas, l'intestin, les poumons et la rate (Bunnett, 2014).

Ainsi, lorsque l'hormone CCK permet une stimulation suffisante des cellules musculaires lisses, la contraction de la vésicule biliaire permet à la bile d'être éjectée dans la seconde portion du canal biliaire, également appelé canal cholédoque. Le canal cholédoque assure ensuite la sécrétion de la bile dans l'intestin (Boyer, 2013). Une fois dans la lumière du duodénum, la bile entreprend son activité d'émulsion des lipides. Les acides biliaires de la bile forment des micelles mixtes en utilisant les triglycérides et le cholestérol alimentaires. Les micelles sont ensuite transloquées à proximité de la membrane basolatérale des entérocytes du jéjunum proximal où les composés lipidiques peuvent alors être absorbés. (*Voir section 2.1.2 Entré exogène du cholestérol par les chylomicrons*).

#### **1.7.4 Transport des acides biliaires de l'intestin au foie**

Les acides biliaires présents dans l'intestin migrent jusqu'à la portion distale de l'iléon où ils pourront être recyclés *via* leur internalisation par les transporteurs ASBT (apical sodium bile

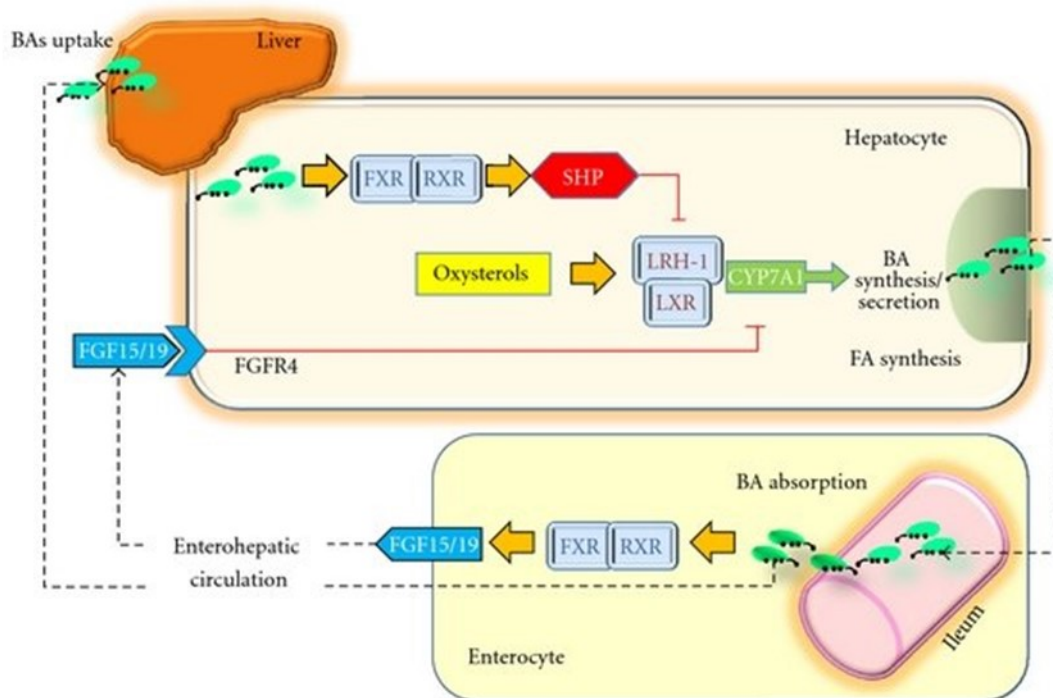
transporter). Il s'agit d'un co-transporteur présent à la surface de la membrane apicale utilisant les ions sodium pour transporter les acides biliaires conjugués et non conjugués à l'intérieur de l'entérocyte (Craddock et al., 1998)(Voir figure 10). À l'intérieur de la cellule, la protéine ILBP (Ileal lipid binding protein) se lie aux acides biliaires avec une grande affinité. Il s'agit d'une protéine exprimée à partir du gène *Fabp6* dont les mécanismes de régulation du transport des acides biliaires à la membrane basolatérale sont encore incertains. L'activité de ILBP est néanmoins essentielle à l'homéostasie de la circulation entérohépatique et spécifiquement au transport des acides biliaires à la membrane basolatérale des iléocytes (Praslickova et al., 2012). Les acides biliaires secondaires peuvent traverser à nouveau la membrane apicale au moyen des transporteurs MRP2, analogues à ceux présents à la membrane canaliculaire des hépatocytes, afin de retourner dans la lumière intestinale (Dawson et al., 2010).



**Figure 10.** – Transporteurs des acides biliaries dans la voie entéro-hépatobiliaire (Dawson et al., 2010)

Les acides biliaries traversent la membrane basolatérale des entérocytes pour rejoindre la circulation portale. Ce transport s'effectue par les transporteurs transmembranaires MRP3 (multidrug resistance-associated protein 3) et OST $\alpha/\beta$  (organic solute transporter  $\alpha/\beta$ ) (Oude & Groen, 2002; Zollner et al., 2006). MRP3 contribue minimalement par rapport à OST $\alpha/\beta$  à l'exportation des acides biliaries. Son rôle serait plus important en ce qui concerne les acides biliaries secondaires tel que ceux conjugués avec un sulfate ou un glucoronoïde (Dawson et al., 2010). OST $\alpha/\beta$  est un transporteur constitué de deux sous-unités qui sont présentes à la surface des membranes basolatérales des cellules intestinales, rénales et hépatiques. Il transporte les acides biliaries par mécanisme de diffusion facilitée (Ballatori et al., 2005). Dans le cas où les récepteurs OST $\alpha/\beta$  sont inhibés, il en résulte une diminution du transport des acides biliaries à la membrane basolatérale et une augmentation de leur concentration à l'intérieur de la cellule intestinale. Lorsque les acides biliaries s'y accumulent en quantité plus importante, ceux-ci ont la

capacité d'activer les récepteurs FXR, un type de récepteur nucléaire qui permet de réguler la synthèse des acides biliaires. FXR active à son tour le facteur de croissance FGF15/FGF19 (fibroblast growth factor 15) (Inagaki et al., 2005). On utilise FGF15 pour désigner le facteur de croissance chez le rat et FGF19 lorsque l'on désigne celui chez l'humain (Marin et al., 2016). FGF15/19 migre ensuite jusqu'au foie *via* la circulation sanguine portale où il se lie au récepteur FGFR4 (fibroblast growth factor receptor-4). Celui-ci diminue l'expression génique de Cyp7 $\alpha$ 1, l'enzyme clé de la synthèse des acides biliaires. Il en résulte donc une baisse de la synthèse hépatique d'acides biliaires en réponse à l'inhibition des transporteurs OST $\alpha$ / $\beta$  à la membrane basolatérale des iléocytes (Inagaki et al., 2005) (*Voir figure 11*). Or, si l'inhibition des transporteurs se fait plutôt à la membrane apicale, la concentration d'acides biliaires à l'intérieur de la cellule intestinale est diminuée, ce qui réduit l'activation de FXR et donc son action sur la synthèse d'acides biliaires (Dawson et al., 2010). En somme, une inhibition des transporteurs à la membrane apicale favorise la synthèse de nouveaux acides biliaires tandis qu'une inhibition des transporteurs à la membrane basolatérale l'inhibe. De plus, l'activation de FXR amène également une régulation positive sur l'expression des récepteurs OST $\alpha$ / $\beta$ . Cette régulation favorise ainsi le transport des acides biliaires hors de l'entérocyte afin de diminuer leur concentration intracellulaire (Zollner et al., 2006).



**Figure 11.** – Mécanisme de régulation des acides biliaires par FXR et LXR. (Garruti et al., 2012)

Permission par la License Creative Commons

Les acides biliaires sont donc acheminés par la veine porte jusqu'au foie. Les hépatocytes ont alors accès à nouveau aux acides biliaires et peuvent les capter au niveau des sinusoides hépatiques (Ridlon et al., 2006). Une grande proportion des acides biliaires traversent dès leur premier passage la membrane basolatérale de la cellule hépatique par le transporteur NTCP (Na<sup>+</sup> taurocholate cotransporting peptide) (Voir Figure 10). Il s'agit d'un co-transporteur présent uniquement à la surface des hépatocytes. Son rôle consiste à lier des ions sodium aux acides biliaires afin de transporter les acides biliaires présents dans la circulation *via* la veine porte pour qu'ils soient captés par le foie (Slijepcevic & van de Graaf, 2017). Il existe également un deuxième mécanisme par lequel les acides biliaires retournent au foie. Il s'agit des transporteurs de la famille OATP, soit OATP1B1 et OATP1B3. Ceux-ci se distinguent de NTCP par le fait qu'ils ne nécessitent pas d'ions sodium afin de transporter les acides biliaires à l'intérieur des hépatocytes.

Ils assurent essentiellement le transport des acides biliaires non conjugués, mais peuvent se lier à plusieurs autres substrats (Meier, 1995).

À l'intérieur des hépatocytes, les acides biliaires déjà conjugués peuvent retourner dans la vésicule biliaire via les mêmes transporteurs mentionnés précédemment, soit BSEP et MRP2. Les acides biliaires secondaires qui retournent au foie et qui ne sont pas conjugués subissent à nouveau une conjugaison par l'enzyme BAAT présente dans le peroxyosome. Ils pourront alors être transportés dans le canal biliaire, la conjugaison étant nécessaire à leur transport *via* les transporteurs de la membrane canaliculaire (Pellicoro et al., 2007). Ce transport des acides biliaires au foie termine la voie entéro-hépto-biliaire. Les acides biliaires qui sont transportés à nouveau à la vésicule biliaire feront ainsi partie de la bile en réserve en attendant le prochain apport de lipides alimentaires. À la membrane basolatérale des hépatocytes, les transporteurs MRP3, MRP4 et OST $\alpha/\beta$  peuvent être activés afin de transporter les acides biliaires dans la circulation sanguine. L'utilisation des transporteurs MRP3 se fait principalement en cas d'accumulation importante d'acides biliaires dans les hépatocytes, ce qui est possible en cas de pathologie inflammatoire comme la cholestase. MRP4 (multidrug resistance-associated protein 4), quant à lui, contribue de façon secondaire à l'exportation des acides biliaires dans le sang (Zollner et al., 2006).

Dans le cas où les acides biliaires ne sont pas absorbés par les entérocytes, ils poursuivent leur migration dans la lumière intestinale jusqu'à la région du côlon. À cette étape, les acides biliaires représentent environ 5% du réservoir d'acides biliaires présents dans l'intestin et sont disponibles pour interagir avec la flore bactérienne présente dans la lumière intestinale. Les bactéries y modifient les acides biliaires qui sont alors qualifiés de secondaires. Ces modifications consistent en plusieurs types de réactions enzymatiques incluant des réactions d'hydrolyse permettant la déconjugaison des acides biliaires. Les acides aminés ne sont alors plus liés aux acides biliaires. Les acides biliaires secondaires principalement de nature hydrophobe et ont la capacité de diffuser de manière passive à travers les membranes des colonocytes (Ridlon et al., 2006). Les transporteurs ASBT sont tout de même exprimés dans cette portion de l'intestin et transportent également les acides biliaires à l'intérieur des colonocytes. Les acides biliaires sont ensuite exportés dans la circulation sanguine par les transporteurs OST $\alpha/\beta$  et MRP3 conforme à ce qui se

produit au niveau de l'iléon. Les acides biliaires restant à l'intérieur du côlon sont excrétés dans les selles (Dawson et al., 2010). Seule cette excrétion permet à l'organisme d'éliminer définitivement une faible proportion des acides biliaires du réservoir (Lefebvre et al., 2009). Cette élimination permet le renouvellement des acides biliaires dans la circulation entéro-hépatobiliaire.

### **1.7.5 Mécanismes de régulation par les acides biliaires**

Les acides biliaires peuvent activer des mécanismes de régulation au niveau des entérocytes du côlon par leur liaison avec le récepteur TGR5 (Kawamata et al., 2003). Comme TGR5 est un récepteur transmembranaire appartenant à la famille des RCPG, son activation par les acides biliaires permet la phosphorylation d'une protéine G par l'utilisation de GTP. Il s'en suit une activation de l'adénylate cyclase, une enzyme responsable de la production du second messager : l'AMPc. L'AMPc active la protéine kinase A, ce qui active à son tour plusieurs voies de régulation (Bunnett, 2014). La kinase A régule positivement l'activité de GLP-1 (glucagon-like peptide 1), un peptide intestinal produit par les cellules intestinales de l'intestin qui stimule plusieurs réactions endocrines dont la sécrétion d'insuline par le pancréas (Harach et al., 2012; Pathak et al., 2017). Cette voie d'activation de TGR5 par les acides biliaires engendre plusieurs éléments de régulation post-traductionnelle qui joue un rôle dans l'inflammation, le métabolisme des glucides et la composition de la bile (Bunnett, 2014). La production d'acides biliaires a ainsi pour effet d'activer le récepteur TGR5, ce qui mène à plusieurs régulations dont l'augmentation de l'activité de GLP-1.

L'activation de kinases par TGR5 (activé par les acides biliaires) régule le transit intestinal en favorisant le péristaltisme du côlon. L'augmentation du péristaltisme au niveau du côlon favorise ainsi le transport des fluides dans la lumière intestinale et accélère le transport des matières fécales. Un mécanisme impliquant le système nerveux de l'intestin a été proposé, mais d'autres recherches sont nécessaires afin de préciser comment TGR5 favorise le péristaltisme du côlon (Alemi et al., 2013). L'activation de TGR5 est régulé en fonction de la concentration des acides



biliaires présents dans la cellule intestinale, ce qui est influencé par l'apport alimentaire (Marin et al., 2016).

### **1.7.6 Élimination secondaire des acides biliaires**

Dans l'éventualité où les acides biliaires présents dans la circulation sanguine ne réussissent pas à être captés au premier passage par les hépatocytes, ceux-ci sont alors liés à des molécules présentes dans le plasma, soit en majorité l'albumine et des lipoprotéines (Chávez-Talavera et al., 2017). Les acides biliaires qui ne sont pas captés par les hépatocytes peuvent se rendre au rein où ils seront filtrés par les glomérules. De manière plus détaillée, les acides biliaires se retrouveront dans le filtrat urinaire où ils pourront être captés par les cellules rénales. Les cellules du tubule proximal possèdent à la surface de leur membrane apicale des transporteurs ASBT qui pourront recycler une partie des acides biliaires en les internalisant. Une fois à l'intérieur des cellules rénales, les acides biliaires pourront retourner dans la circulation sanguine via les transporteurs OST $\alpha/\beta$  et MRP3, mais une faible proportion pourra également retourner dans le filtrat urinaire via les transporteurs MRP2 et MRP4 (Dawson et al., 2010). MRP2 et MRP4 se retrouvant ainsi à la membrane apicale des cellules des tubules proximaux (Zollner et al., 2006). Les acides biliaires qui demeurent dans le filtrat urinaire seront éventuellement éliminés dans l'urine. Ceci contribue très faiblement à l'élimination des acides biliaires puisque la majorité est retournée dans la circulation sanguine (Dawson et al., 2010).

## Chapitre 2 – Stéatose hépatique

### 2.1 Description, terminologie, prévalence

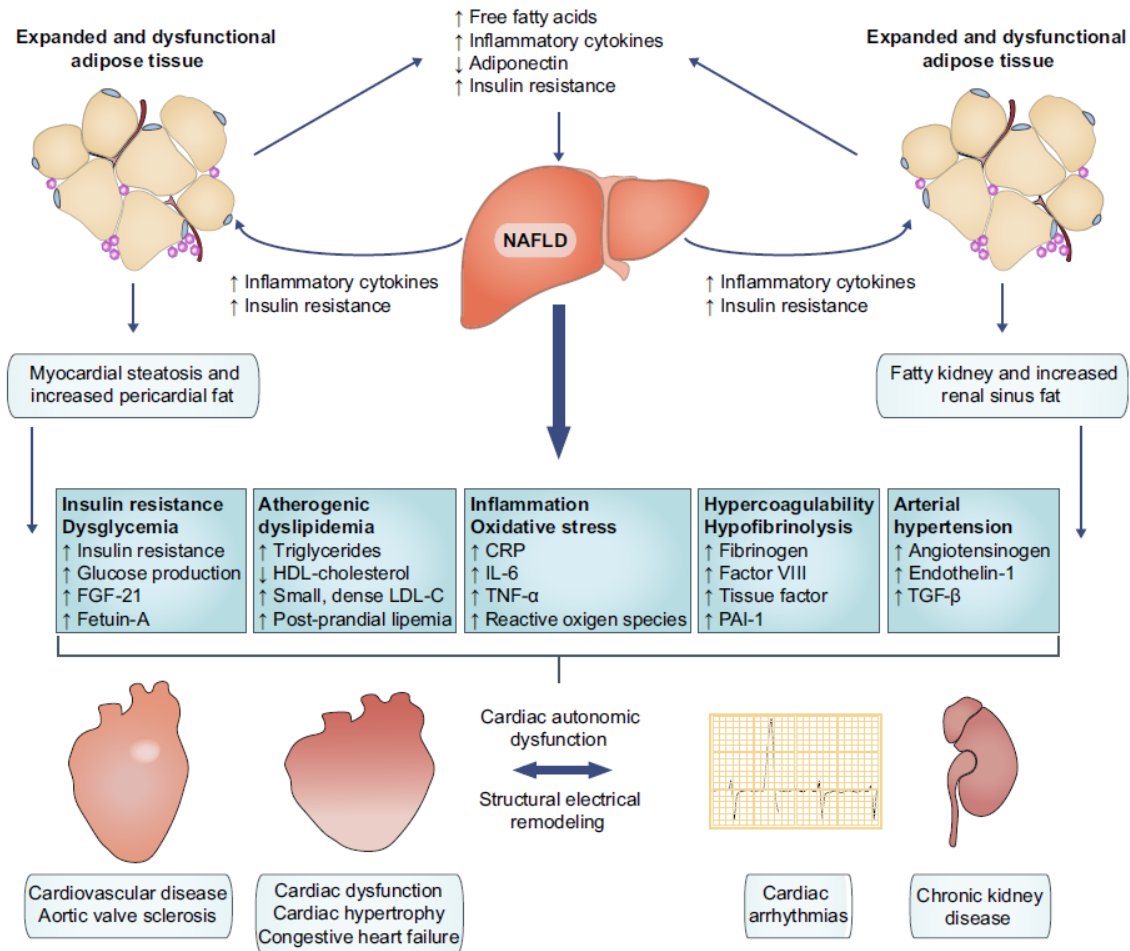
La NAFLD (nonalcoholic fatty liver disease) est un continuum de maladies caractérisé par une accumulation excessive de lipides dans le foie sans que cette accumulation soit attribuable à la consommation d'alcool (Sanches et al., 2015). L'acronyme NAFLD englobe un continuum de pathologies allant de la stéatose simple non-alcoolique (SS) au NASH (nonalcoholic stéatohepatitis) (Polyzos et al., 2016). Une minime accumulation ne correspond pas à un état de stéatose hépatique. Il faut que l'accumulation de lipides au foie corresponde à plus de 5% du poids de l'organe pour que le foie soit classifié comme stéatosé (Kleiner et al., 2005). La stéatose simple exclut la présence d'inflammation (Preiss & Sattar, 2008). Plus la maladie progresse, plus le foie accumule des lipides, mais également du tissu conjonctif, correspondant alors à un état de fibrose. Dans le cas du NASH, pour laquelle la prévalence chez les adultes est de 3%, le foie présente de l'inflammation et de la fibrose. Sa fonctionnalité est alors nettement détériorée (Basaranoglu et al., 2010). Par la suite, l'état peut s'aggraver pour devenir cirrhotique et ultimement conduire à une insuffisante hépatique.

NAFLD est ainsi un ensemble de maladies qui touche maintenant près de 30% des individus des pays occidentaux. On attribue entre autres cette prévalence au type d'alimentation, souvent riche en lipides, correspondant à une diète de type occidental « Western Diet » (de Meijer et al., 2010).

### 2.2 Causes de la stéatose hépatique

Afin d'expliquer les causes potentielles de la stéatose hépatique et de sa progression, la « Two Hits Theory » a été proposée. À l'origine, cette théorie n'a pas fait nécessairement la distinction entre une stéatose d'origine alcoolique ou non-alcoolique. Elle décrit la mise en place de la stéatose hépatique en deux phases. Initialement, la résistance à l'insuline mène à une altération des mécanismes cellulaires causant ainsi une accumulation ectopique de triglycérides au foie (Marchesini et al., 1999). La résistance à l'insuline inhiberait entre autres la  $\beta$ -oxydation des lipides, ce qui favoriserait également l'accumulation intrahépatique d'acides gras libres au foie.

La stéatose hépatique une fois amorcée, favoriserait à son tour une hausse du stress oxydatif. Le stress oxydatif serait présent en réponse à une augmentation des espèces réactives produites *via* la peroxydation des lipides. L'augmentation du stress oxydatif causerait alors la progression de la simple stéatose hépatique en NASH (Day & James, 1998). Depuis, une nouvelle approche visant à expliquer la cause de la stéatose hépatique considère plutôt le processus comme étant multifactoriel. Cette hypothèse, la « Multi-hits Theory », soutient que les causes sont non seulement liées à la résistance à l'insuline et à l'accumulation de lipides hépatiques, qui demeurent néanmoins la première étape, mais englobe aussi l'altération des adipokines et cytokines issus du tissu adipeux et de la dérégulation des mécanismes des systèmes cardiaque et rénal. La NAFLD touche ainsi non seulement le foie, mais également d'autres organes et leurs voies de régulation (Byrne & Targher, 2015; Polyzos et al., 2009). La *figure 1* ci-dessous présente un plan d'ensemble des interactions entre différents organes et la NAFLD.



**Figure 12.** – Interactions des différents systèmes et NAFLD (Byrne & Targher, 2015) Permission par la License Creative Commons

Plusieurs facteurs sont identifiés comme étant associés à l'accumulation de lipides au foie. La plupart sont liés au mode de vie de l'individu incluant le régime alimentaire, la résistance à l'insuline (Marchesini et al., 1999), le diabète de type 2, l'obésité et la sédentarité (Basaranoglu et al., 2010; Polyzos et al., 2016). La prévalence de NAFLD augmente également avec l'âge (Vernon et al., 2011). Les différents facteurs associés à la stéatose hépatique seront abordés plus en détails dans la section suivante.

### 2.2.1 La résistance à l'insuline

La résistance à l'insuline semble être un élément déclencheur primaire dans la stéatose hépatique. La résistance à l'insuline se définit comme étant une altération de la capacité des tissus périphériques à répondre à la signalisation des concentrations normales d'insuline en circulation. On dit que les tissus sont « résistants » puisque que les voies de signalisation intracellulaire du récepteur de l'insuline sont altérées. Ceci nécessite conséquemment davantage d'insuline pour obtenir une réponse optimale au stimulus et contrôler les niveaux plasmatiques de glucose. La résistance à l'insuline est trop souvent observée conjointement avec plusieurs types de désordres métaboliques tels que l'hypertension, l'hypertriglycéridémie, l'obésité viscérale et l'hyperglycémie. La résistance à l'insuline constitue un facteur de risque important pour le diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires (Polyzos et al., 2009, 2016). L'ensemble de ces pathologies correspondent par ailleurs à des conséquences liées à l'inactivité physique, un facteur associé à la stéatose hépatique (voir section 2.2.4. La sédentarité). Chez les patients ayant une accumulation de gras abdominal, la résistance à l'insuline est considérée comme la première cause menant à la stéatose hépatique (Basaranoglu et al., 2010). De plus, même en absence d'accumulation de gras abdominal, la résistance à l'insuline et l'hyperinsulinémie restent tout de même associées à la NAFLD. Une étude conduite chez des patients de poids normal atteint de NAFLD indique que la pathologie peut être associée à la résistance à l'insuline et à l'hyperinsulinémie et ce, indépendamment du facteur de l'obésité (Marchesini et al., 1999).

L'altération des voies de signalisation de l'insuline en cas de résistance à l'insuline est présente dans plusieurs types de cellules dont les hépatocytes et les cellules musculaires squelettiques. Au foie, l'augmentation des acides gras intracellulaires, l'augmentation du stress oxydatif et l'altération de la sécrétion des adipokines entraînent une augmentation de l'activité de plusieurs molécules (PKC, IKK- $\beta$ , JNK-1) qui favorisent la résistance à l'insuline de la cellule en inhibant la réponse intracellulaire de l'insuline. Cette inhibition provoque par la suite une augmentation de la fibrose et une modulation de plusieurs voies du métabolisme (glycogénèse, néoglucogénèse, lipogénèse *de novo*) favorisant ainsi l'accumulation de lipides dans la cellule tout en limitant la captation du glucose en circulation par le foie. (Polyzos et al., 2009). Dans le cas du muscle squelettique, la translocation des transporteurs de glucose GLUT-4 se fait par l'action de

l'insuline, mais également en réponse à la contraction musculaire lors de l'activité physique (Katz, 2007). La résistance à l'insuline entraîne une réduction de la translocation des récepteurs GLUT-4 vers la membrane, ce qui réduit la capacité de captation du glucose circulant. L'exercice physique en endurance peut agir comme mécanisme compensatoire en stimulant la captation de glucose par le muscle *via* une régulation positive de l'expression des GLUT-4, ce qui réduit l'effet négatif de la résistance à l'insuline (Henriksen, 2006). L'exercice aigu permet une adaptation rapide en augmentant la transcription des GLUT-4 immédiatement après l'exercice qui persiste jusqu'à 24 heures. L'exercice chronique permet une adaptation qui est maintenue en augmentant l'expression des GLUT-4. Néanmoins, les niveaux de GLUT-4 au muscle retournent à des valeurs basales lorsque l'individu cesse l'activité physique (Richter & Hargreaves, 2013).

### **2.2.2 Suralimentation ou malnutrition**

Il est souvent indiqué que la suralimentation, soit un apport excessif d'aliments au-delà des besoins nutritionnels est un facteur de risque majeur pour la NAFLD (Romero-Gómez et al., 2017). Or, selon une étude effectuée sur la souris C57B1/6J, un modèle où l'obésité est induite par l'alimentation, il s'agirait plutôt de la proportion des macronutriments de la diète et ce, indépendamment de l'apport calorique (de Meijer et al., 2010). Selon ces auteurs, la cause liée à la suralimentation serait donc plutôt l'apport en gras saturés. Dans un article de revue, Basaranoglu et ses collègues expliquent notamment qu'une consommation élevée de produits riches en lipides et en fructose est un facteur contributif à la NAFLD. On parle ici du fructose dérivé du sirop de maïs. (Basaranoglu et al., 2010). Cette dernière étude est donc en accord avec le concept de l'importance des macronutriments dans l'accumulation de lipides au foie.

La composition de l'alimentation influence grandement comment le métabolisme s'adapte (Romero-Gómez et al., 2017). La diète de type occidentale (*Western Diet* : WD), associée au type d'alimentation retrouvée en Amérique du nord, est définie par une composition importante en lipides (33%) et en sucrose (composé de 50% de fructose). De nombreuses études, comme déjà mentionné, ont conclu que ce type de diète favorisait la stéatose hépatique. Dans une étude récente utilisant des primates comme modèle, une comparaison entre la WD et la diète

méditerranéenne a permis d'observer leurs effets à long terme (Shively et al., 2019). La diète méditerranéenne est définie par un apport en lipides majoritairement composé d'acides gras monoinsaturés et polyinsaturés. Également, l'apport d'aliments transformés ou à haute teneur en sucre (ex. fructose) est minimisé (Romero-Gómez et al., 2017). À l'inverse de la WD, elle semble protéger contre le développement de NAFLD (Shively et al., 2019). Il s'agit par ailleurs de la diète recommandée comme traitement dans le but de réduire l'accumulation de lipides au foie (Romero-Gómez et al., 2017).

Outre l'apport nutritionnel riche en lipides, l'augmentation de la synthèse d'acides gras par le foie joue un rôle dans l'apparition d'une stéatose. Ce mécanisme nommé lipogenèse *de novo*, particulièrement stimulé par l'apport en fructose, lorsque associé avec un apport exogène important d'acides gras au foie, a pour conséquence l'apparition de la NAFLD (de Meijer et al., 2010). En bref, une alimentation riche en fructose et acides gras saturés comme c'est le cas pour la diète Western est un facteur de risque important du développement d'une stéatose hépatique.

### **2.2.3 Obésité – Diabète**

L'obésité est également fortement associée à la stéatose hépatique. Un gain de poids de 3-5 kg, indépendamment de l'indice de masse corporel initial, favorise le développement de la NAFLD chez l'humain (Zelber-Sagi et al., 2012). Chez les patients atteints de diabète de type 2, qui est aussi un facteur de risque de la NAFLD, on considère la NAFLD comme la principale conséquence de l'obésité. En effet, la prévalence de la stéatose hépatique augmente en corrélation avec l'index de masse corporelle. À des valeurs élevées de poids corporel comme c'est le cas avec l'obésité morbide, les chances de développer une stéatose hépatique augmente jusqu'à 90-95% (Basaranoglu et al., 2010; Preiss & Sattar, 2008). Dans le cas d'une obésité où l'accumulation de gras est de type androïde, soit une accumulation au niveau du tronc (Guglielmi & Sbraccia, 2018), la stéatose hépatique est attribuée majoritairement à la résistance à l'insuline (Basaranoglu et al., 2010). Malgré cette forte association, l'obésité en soi n'est pas nécessairement une condition *sine qua none*. Il est tout à fait possible de développer une NAFLD sans être en surpoids ou obèse (Byrne & Targher, 2015). La lipodystrophie, une maladie caractérisée par l'absence ou une faible

quantité de tissus adipeux, est également fortement associée à la résistance à l'insuline et la stéatose hépatique. Ainsi, ce n'est pas nécessairement l'excès de tissus adipeux, mais plutôt l'altération des mécanismes cellulaires liés à une quantité anormale de tissu adipeux. C'est le cas de l'adipokine leptine dont les concentrations fluctuent en cas de lipodystrophie ou d'obésité (Jornayvaz & Shulman, 2012).

#### **2.2.4 La sédentarité**

Afin de mieux aborder la sédentarité comme facteur de risque de la NAFLD, il est nécessaire de faire la distinction entre un comportement sédentaire et l'inactivité physique. Les comportements sédentaires réfèrent aux actions de l'individu sur une base quotidienne. Par exemple; le temps assis versus debout dans une journée, l'utilisation de la marche ou des transports en commun versus la voiture, l'utilisation des escaliers versus l'ascenseur. L'inactivité physique réfère quant à elle à une absence ou faible pratique d'activité physique sur une base régulière. Ainsi, une tendance aux comportements sédentaires importants favorise la NAFLD indépendamment du niveau d'activité physique de l'individu (Romero-Gómez et al., 2017). De plus, le risque de maladies métaboliques dépend non seulement du temps total accordé aux comportements sédentaires, mais aussi à la présence ou non de pauses actives durant ces activités. Ainsi, l'ajout de pauses durant les périodes inactives prolongées permet de réduire les effets négatifs des comportements sédentaires sur l'obésité et l'altération du métabolisme du glucose et des triglycérides (Healy et al., 2008).

### **2.3 Conséquences de la stéatose hépatique**

#### **2.3.1 Augmentation des facteurs de risque et complications**

La stéatose hépatique a pour conséquence d'augmenter le risque de plusieurs désordres qui ont été mentionnés précédemment tels que la dyslipidémie, le diabète de type 2, la résistance à l'insuline et la dysglycémie (Preiss & Sattar, 2008). Le facteur de risque est même deux fois plus important dans le cas du diabète de type 2. L'accumulation de lipides au foie est de plus associée à une augmentation du risque des maladies cardiovasculaires ou une maladie rénale chronique.



La stéatose pourrait même contribuer directement à ces pathologies en raison de l'altération des mécanismes de régulation du métabolisme des lipides et des lipoprotéines au foie (Byrne & Targher, 2015). Enfin, tel que mentionné à la section 2.1, la stéatose peut s'aggraver en menant à des stades plus sévères de la NAFLD par l'ajout d'inflammation, de fibrose et d'une accumulation aggravée de lipides dans le foie. La stéatose simple peut ainsi progresser en NASH puis en cirrhose (Lade et al., 2014). Ceux atteints de cirrhose sont à un risque augmenté de développer un carcinome hépatocellulaire, un type de cancer du foie (Vernon et al., 2011). À noter, le développement d'un carcinome hépatocellulaire est également un facteur de risque pour les patients atteints de NASH sans le développement de cirrhose (Ertle et al., 2011).

### **2.3.2 Altérations de l'action de la leptine par la stéatose hépatique**

La stéatose hépatique a des conséquences sur la régulation de la leptine et sa sécrétion à partir du tissu adipeux blanc. Ce tissu remplit davantage de fonctions que simplement emmagasiner l'excès des lipides. Il s'agit d'un organe endocrinien actif qui produit et sécrète des adipokines; des cytokines qui peuvent jouer un rôle de façon autocrine, paracrine ou endocrine (Ferris & Crowther, 2011; Polyzos et al., 2016).

La leptine est l'une des adipokines les plus abondamment recensées dans la littérature (Polyzos et al., 2016). Dans les conditions physiologiques normales, sa sécrétion dans la circulation permet d'inhiber la résistance à l'insuline et la stéatose hépatique. La leptine agit sur l'insuline en inhibant la transcription et la sécrétion de l'insuline des cellules bêta du pancréas, ce qui réduit les taux en circulation (Seufert et al., 1999). La leptine affecte aussi la sensibilité à l'insuline par l'entremise de mécanismes issus du système nerveux central (Coppari & Bjørnbæk, 2012). Au niveau des cellules hépatiques, la leptine agit en inhibant les mécanismes intracellulaires permettant la synthèse du glucose hépatique, la synthèse d'acide gras *via* la lipogenèse *de novo* et l'activation de l'oxydation des acides gras (Cohen et al., 1998). De plus, l'activité de la leptine favorise la fibrose et l'inflammation du foie, deux éléments qui sont néfastes mais qui sont bien régulés chez un individu en santé. En cas de stéatose hépatique, la leptine agit comme mécanisme

compensatoire en augmentant son taux de sécrétion, ce qui a pour but de réduire la résistance à l'insuline et la stéatose hépatique.

Avec la progression de la pathologie, les mécanismes compensatoires de régulation deviennent insuffisants et ne parviennent plus à contrôler ni la résistance à l'insuline ni l'accumulation de lipides au foie. Comme la leptine agit également au niveau de la régulation de la fibrose et de l'inflammation, la hausse de la leptine en circulation cause des effets néfastes qui aggrave la NAFLD. La pathologie progresse ainsi vers le stade de NASH (Polyzos et al., 2015). En cas d'obésité, un facteur associé à la stéatose hépatique, la quantité de leptine en circulation augmente proportionnellement avec la quantité de tissus adipeux, ce qui contribue également à l'état de fibrose et d'inflammation du foie (Considine et al., 1996). Cette détérioration serait associée à l'augmentation de gras viscéral et sous-cutané (Ferris & Crowther, 2011). La leptine peut se lier à des récepteurs (Ob-Rb) qui sont présents à la surface des cellules stellaires et de Kupffer (Saxena & Anania, 2015). Les conséquences de la dérégulation de la leptine sur ces types cellulaires seront abordées dans les paragraphes suivants.

La leptine est sécrétée par les adipocytes et régule l'activation des cellulaires stellaires. De plus, la leptine est également sécrétée par les cellules stellaires lorsqu'elles sont dans un état activé. La leptine agit ainsi sur les cellules stellaires de manière endocrine et autocrine (Saxena & Anania, 2015). Les cellules stellaires sont un type cellulaire présent dans l'espace de Disse à proximité des sinusoides hépatiques. Dans le cas d'un foie sain, les cellules stellaires sont dans un état de repos et leur principale fonction consiste à emmagasiner la vitamine A absorbée par l'organisme. Elles ne produisent alors pas de leptine. En cas de stéatose hépatique, les cellules stellaires prennent une forme dite «activée», ce qui signifie qu'elles modifient leur phénotype cellulaire pour devenir des cellules semblables aux myofibroblastes (Saxena & Anania, 2015). Elles sont entre autres activées par les cytokines proinflammatoires TNF- $\alpha$  et MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) produites par les cellules de Kupffer, un type cellulaire présent dans la région des sinusoides hépatiques (Liu et al., 2010). Les cellules stellaires peuvent alors passer au stade de perpétuation où elles synthétisent et sécrètent du collagène fibrillaire, une composante majeure de la matrice extracellulaire. Cet ajout de tissu conjonctif au foie favorise ainsi la fibrose hépatique, ce qui contribue à la progression de la maladie vers le stade NASH. De plus, les cellules stellaires activées

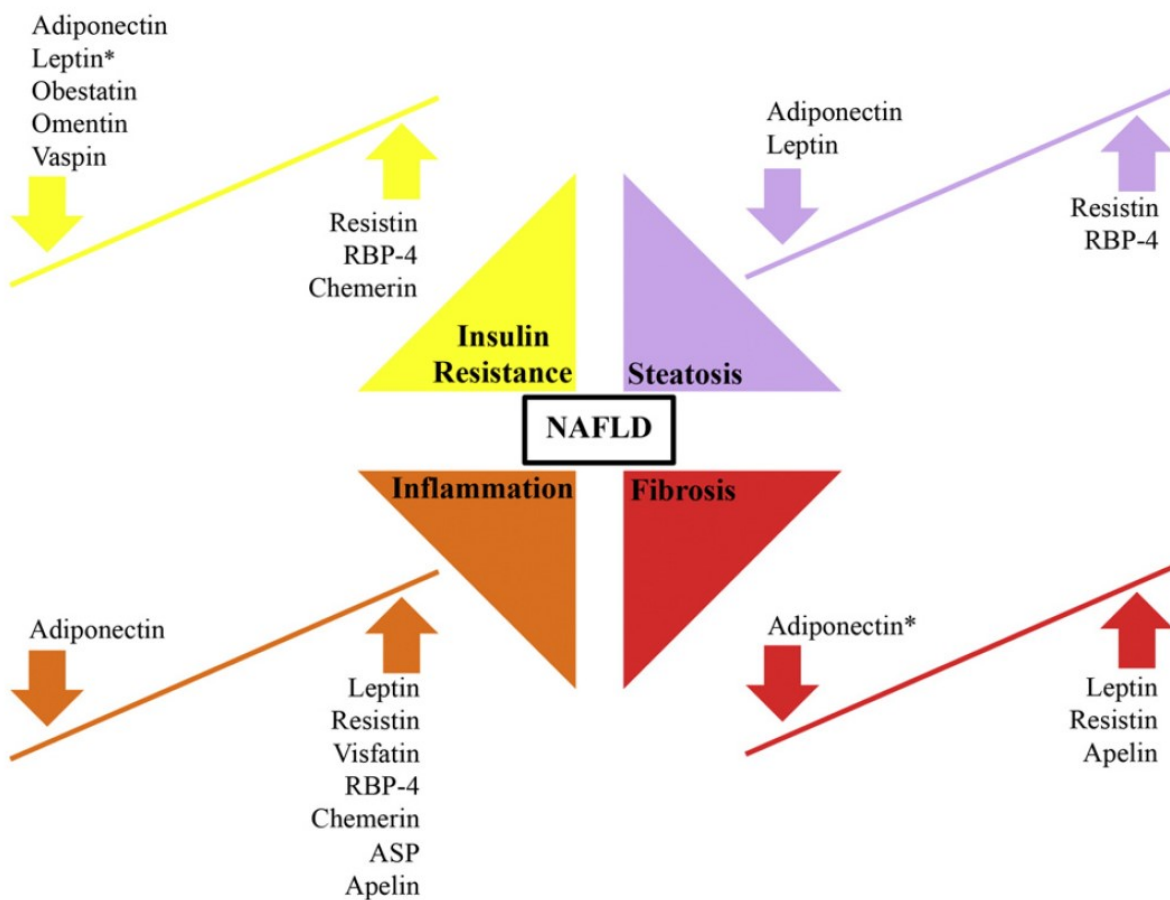
produisent la glycoprotéine TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase 1) qui inhibe le processus d'élimination du tissu conjonctif, voie qui réduirait normalement la fibrose au foie (Saxena & Anania, 2015).

En somme, la régulation exercée par la leptine est altérée en présence de stéatose hépatique. La stéatose hépatique cause une hausse de la sécrétion de la leptine dans les adipocytes afin de réduire la stéatose hépatique et la résistance à l'insuline. Malgré tout, cela a pour effet d'augmenter l'inflammation et la fibrose hépatique. De plus, la leptine stimule l'activation des cellules stellaires ce qui provoque une accumulation de la matrice extracellulaire tout en réduisant les mécanismes d'élimination. Ces modulations des voies de régulation favorisent ainsi le développement de la fibrose au foie.

### **2.3.3 Altérations de l'action de l'adiponectine par la stéatose hépatique**

L'adiponectine est une adipokine produite principalement par les cellules adipeuses dont la synthèse est altérée par la stéatose hépatique. Dans les conditions physiologiques normales, l'adiponectine réduit le potentiel de stéatose hépatique en agissant sur plusieurs voies du métabolisme des lipides et du glucose des hépatocytes. Son activité inhibe les voies de la lipogenèse *de novo*, l'apport d'acides gras libres au foie, la production de glucose *via* la néoglucogenèse et favorise la voie de la bêta-oxydation. Ces effets de régulation sur le métabolisme amènent une réduction des triglycérides hépatiques, ce qui favorise également la sensibilité à l'insuline, un facteur qui tend à diminuer avec la stéatose hépatique (Polyzos et al., 2009; Yamauchi et al., 2007). L'adiponectine est également anti-inflammatoire par son action sur les cellules Kupffer et en favorisant la production de l'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire. L'activité de l'adiponectine réduit la synthèse de TNF-alpha et IL-6, qui sont des cytokines proinflammatoires produites par le tissu adipeux (Polyzos et al., 2016). L'adiponectine amène une réduction du potentiel de fibrose par son action sur les cellules stellaires. Lorsque les cellules stellaires sont activées, elles présentent à leur surface des récepteurs spécifiques à l'adiponectine (majoritairement AdipoR2) sur lesquels l'adiponectine se lie afin d'inhiber les voies menant à la production de collagène 1 et la prolifération cellulaire (Alzahrani et al., 2018). Son activité sur ces

mécanismes permet ainsi de réguler à la baisse la fibrose hépatique et s'oppose à l'action de la leptine (Handy et al., 2011). Les effets de l'adiponectine et des autres adipokines sont résumés à la figure 13. En cas de NAFLD, la sécrétion de l'adiponectine est diminuée lorsque la maladie progresse au stade de NASH ou encore avec une augmentation de la masse adipeuse. Ses actions bénéfiques sur le foie sont alors réduites (Arita et al., 1999). La sécrétion de l'adiponectine est augmentée à nouveau lorsque la pathologie devient plus sévère, soit en cas de cirrhose du foie. L'évolution de la régulation de cette adiponectine suit ainsi un parcours non linéaire dont les mécanismes de régulation ne sont pas encore établis (Nahon et al., 2010).



**Figure 13.** – Activités des adipokines sur la NAFLD (Polyzos et al., 2016)

La résistine, TNF- $\alpha$ , Visfatine, RBP-4 (Retinol-binding protein 4), chimérine, ASP (acylation-stimulating protein) et apeline sont également des adipokines produites par les adipocytes qui jouent un rôle dans la régulation de NAFLD. Par contre, elles ont été moins étudiées et malgré qu'elles aient un impact sur la progression de la stéatose hépatique, elles ne seront pas abordées dans cette revue (Polyzos et al., 2016).

### **2.3.4 Augmentation du stress oxydant et du stress du réticulum endoplasmique par la stéatose hépatique**

L'accumulation de triglycérides au foie cause des dysfonctions mitochondriales qui mène à un excès d'espèces réactives dans la cellule (Ipsen et al., 2018). Les espèces réactives incluent l'anion superoxyde, le radical hydroxyle et le peroxyde d'hydrogène. En temps normal, la quantité d'espèces réactives est contrôlée par des enzymes incluant la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase et la catalase. Les antioxydants, présent dans l'alimentation, sont également des molécules pouvant servir à neutraliser les radicaux libres. Les enzymes mentionnées précédemment et les antioxydant permettent ainsi de neutraliser les espèces réactives produites par la chaîne de transport d'électron mitochondriale, ce qui les empêchent d'oxyder d'autres composantes de la cellule incluant les protéines, les lipides, les phospholipides membranaires, le cholestérol ou encore les acides nucléiques. Les conséquences de l'oxydation de ces molécules peut conduire à des mutations génétiques, altérer l'équilibre de la membrane cellulaire ou encore affecter l'activité enzymatique des protéines. Dans le cas où la cellule est inefficace à éliminer suffisamment rapidement les protéines oxydées des cellules hépatiques, il a alors une accumulation de ces espèces réactives et par conséquent une augmentation du stress oxydant (Gardès-Albert et al., 2003).

Le stress du RE se définit par une accumulation de protéine mal replié au niveau du RE, l'organelle servant à la synthèse protéique. Cette accumulation est attribuée à un déséquilibre entre les mécanismes visant à éliminer ce type de protéine et leur taux de synthèse dans la cellule. En situation contrôlée, des protéines chaperonnes assurent le bon repliement ou l'élimination de ces protéines. En cas de stéatose hépatique, ces protéines chaperonnes sont insuffisantes et

l'accumulation de ces protéines dans le réticulum endoplasmique engendre le stress du réticulum endoplasmique (Garlatti & Barouki, 2002; Zhang et al., 2014). La réponse UPR (unfolded protein response) permet normalement de rétablir l'équilibre dans le réticulum endoplasmique en produisant par exemple davantage de protéines chaperonnes. Si la réponse de la cellule au stress du réticulum endoplasmique est insuffisante, cette situation conduit à l'apoptose cellulaire. De plus, l'activation de cette réponse est associée à une augmentation de dommages cellulaires, de l'inflammation et de la stéatose hépatique, ce qui favorise la progression de la stéatose hépatique (Zhang et al., 2014). Cette augmentation des protéines mal repliées amplifie le désordre en augmentant la production d'espèces réactives dans la cellule (Arguello et al., 2015).

### **2.3.5 Altérations du métabolisme du cholestérol**

Les mécanismes menant à l'apparition d'une stéatose hépatique et de ses conséquences sont encore peu compris dans la littérature (Basaranoglu et al., 2010), d'où l'importance d'améliorer notre compréhension de la façon dont les voies de régulation du cholestérol et des lipides sont altérées en présence d'accumulation de lipides au foie. La NAFLD, maladie chronique et dégénérative du foie, est associée à une altération du transport intracellulaire, de la biosynthèse et de l'élimination du cholestérol (Arguello et al., 2015). Il est reconnu que l'état de stéatose hépatique est associé à des désordres métaboliques et à l'augmentation de cholestérol plasmatique. Or, une relation causale n'a pas encore été établie entre la stéatose hépatique et les troubles du métabolisme du cholestérol. Notre équipe a récemment réalisé une étude où les effets de seulement 2 semaines de diète enrichie en lipides (HFD) sur le métabolisme du cholestérol ont été évalués chez de jeunes rats Wistar. Les résultats de l'étude suggèrent que l'état de stéatose du foie en réponse à une diète riche en lipides amène une altération de l'expression génique de plusieurs marqueurs de la régulation du cholestérol et ce, après seulement deux semaines de diète HFD. Parmi ces marqueurs génétiques, on constate une augmentation significative de LRP-1, PCSK9 et ABCG5. À l'inverse, l'expression de HMGCoA réductase, une enzyme limitante dans la voie de synthèse du cholestérol, était réduite en réponse à l'accumulation de lipides au foie (Magri-Tomaz et al., 2018). D'autres études sont néanmoins

nécessaires afin de mieux cibler les intermédiaires responsables de la perturbation des voies métaboliques du cholestérol hépatique.

Dans le foie, en plus de l'accumulation excessive de lipides, une hausse des niveaux de cholestérol libre est également observés en présence de NAFLD. L'accumulation de cholestérol libre au foie est par ailleurs corrélée avec l'activation des cellules stellaires et Kupffer, ce qui favorise la fibrose et l'inflammation (Arguello et al., 2015). Cette accumulation serait également présente à l'intérieur des cellules stellaires et Kupffer, ce qui suggère que la perturbation des voies de signalisation de la cellule se ferait au niveau intracellulaire (Teratani et al., 2012). Dans le cas des cellules Kupffer, leur activation favoriserait la sécrétion de plusieurs cytokines pro-inflammatoires tels que IL-6, IL-8 et TNF- $\alpha$ . De plus, cela favoriserait aussi la sécrétion de TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ), un facteur favorisant l'activation des cellules stellaires. Les cellulaires stellaires, tel que mentionné précédemment, deviennent alors dans un état activé et favorise l'accumulation de matériel extracellulaire menant à la fibrose. Enfin, les cellules stellaires qui contiennent une accumulation de cholestérol libre sont plus sensibles à TGF- $\beta$ , ce qui favorise également leur activation (Arguello et al., 2015).

Tel que mentionné précédemment, les conséquences de la stéatose hépatique sur le métabolisme du cholestérol sont encore peu compris dans la littérature. Dans le but d'approfondir ces connaissances sur les perturbations du métabolisme du cholestérol en présence de stéatose hépatique, des mesures des marqueurs clés au foie et dans le plasma ont été mesurés dans notre étude. Notre hypothèse première consiste ainsi à définir les changements dans l'expression génique de marqueurs clés des voies métaboliques du cholestérol. Comme il a déjà observé que certains de ces changements sont observables après 2 semaines, il a été inclut dans notre méthodologie des groupes de 2 semaines et voir si ces changements persistent après 6 semaines. Enfin, l'altération des marqueurs clés des voies métaboliques du cholestérol diffère potentiellement selon que la stéatose hépatique est induite par une diète riches en lipides ou en lipides et sucrose de type occidentale. Le prochain chapitre présente l'article découlant de ce projet d'étude dans lequel nous avons testé ses hypothèses.





# **Chapitre 3 – Article: TWO WEEKS OF WESTERN DIET DISRUPTS LIVER MOLECULAR MARKERS OF CHOLESTEROL METABOLISM IN RAT**

R. St-Amand<sup>1</sup>, E.T. Ngo Sock<sup>1</sup>, S. Quinn<sup>2</sup>, J.-M. Lavoie<sup>1</sup> and D.H. St-Pierre<sup>2</sup>

1- École de Kinésiologie et des Sciences de l'Activité Physique, Faculté de Médecine,  
Université de Montréal,

2- Department of Exercise Sciences, Université du Québec à Montréal, Québec, Canada

*Short title:* Western diet and hepatic cholesterol metabolism

Cet article est maintenant sous presse dans la revue

Lipids in Health and Disease 2020

## Abstract

**Background:** The present study was designed to test the hypothesis that in the liver, excessive fat accumulation impairs cholesterol metabolism mainly by altering the low-density lipoprotein-receptor (LDL-R) pathway.

**Method:** Young male Wistar rats were fed standard (SD), high fat (HFD; 60% kcal) or Western (WD; 40% fat + 35% sucrose (17.5% fructose)) diets for 2 or 6 weeks.

**Results:** Weight gain (~ 40g) was observed only following 6 weeks of the obesogenic diets ( $P < 0.01$ ). Compared to the 2-week treatment, obesogenic diets tripled fat pad weight (~ 20 vs 7 g) after 6 weeks. Hepatic triglyceride (TG) levels were greater in response to both the WD and HFD compared to the SD ( $P < 0.01$ ) at 2 and 6 weeks and their concentrations were greater ( $P < 0.05$ ) in WD than HFD at 2 weeks. Plasma total cholesterol levels were higher ( $P < 0.05$ ) in animals submitted to WD. After 2 and 6 weeks, liver expression of LDL-R, proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) and sterol regulatory element binding protein 2 (SREBP2), involved in LDL-cholesterol uptake, was lower in animals submitted to WD than in others treated with HFD or SD ( $P < 0.01$ ). Similarly, low-density lipoprotein-receptor-related protein 1 (LRP1) and acyl-CoA cholesterol acyltransferase-2 (ACAT-2) mRNA levels were lower ( $P < 0.01$ ) among WD compared to SD-fed rats. Expression of the gene coding for the main regulator of endogenous cholesterol synthesis, 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase (HMGCoAR) was reduced in response to WD compared to SD and HFD at 2 ( $P < 0.001$ ) and 6 ( $P < 0.05$ ) weeks. Being enriched in fructose, the WD strongly promoted the expression of carbohydrate-response element binding protein (ChREBP) and acetyl-CoA carboxylase (ACC), two key regulators of *de novo* lipogenesis.

**Conclusion:** These results show that the WD promptly increased TG levels in the liver by potentiating fat storage. This impaired the pathway of hepatic cholesterol uptake *via* the LDL-R axis, promoting a rapid increase in plasma total cholesterol levels. These results indicate that liver fat content is a factor involved in the regulation of plasma cholesterol.

**Key words:** western diet; plasma cholesterol; lipogenesis; hepatic steatosis; liver cholesterol metabolism; low-density lipoprotein-receptor; proprotein convertase subtilisin/kexin 9

## Introduction

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), also referred to as hepatic steatosis is characterized by excessive fat accumulation (5 to 10% of liver weight) in absence of significant alcohol consumption (1). This state is associated with several clinical and pathological manifestations. NAFLD is considered a risk factor for diabetes and cardiovascular diseases (CVD) independently of other usual risk factors (2, 3). Hepatic steatosis by itself is also associated with a proatherogenic lipid profile and production of proinflammatory markers (4, 5). Some authors (6) have even claimed that with regards to body fat accumulation, hepatocytes are likely the first cell types to display metabolic impairments.

The association between liver fat accumulation, CVD, and a proatherogenic lipid profile is well substantiated in the literature. However, the critical impact of hepatic cholesterol metabolism linking these health conditions remains largely overlooked. The liver is the master regulator of several biological pathways involved in the control of cholesterol metabolism. These include cholesterol synthesis, uptake from chylomicron remnants, re-uptake from LDL and high-density lipoproteins (HDL) as well as the release of cholesterol under very-low density lipoproteins (VLDL), and biliary acids production. All of these pathways have a major influence on the regulation of plasma cholesterol levels and the subsequent proatherogenic profile associated with fat accumulation in the liver.

The association between hepatic steatosis and cholesterol metabolism is most often viewed as how cholesterol metabolism dysregulation contributes to NAFLD in animal models (7). However, it was also proposed that NAFLD impairs cholesterol metabolism in humans (8). Long-term studies do not provide any clear indication that fat accumulation in the liver is at the origin of alterations in cholesterol metabolism. On the other hand, several molecular markers of cholesterol metabolism in the liver were disturbed by a short-term exposure (2 weeks) to HFD in young rats (9). These results support the concept that excessive accumulation of fat in the liver may contribute to increased circulating cholesterol levels (9). A short-term 2-week HFD was used in that study because it has been shown to result in a rapid fat accumulation in the liver. This excessive accumulation of fat in the liver was previously shown to precede both the occurrence

of significant changes in weight gain and the development of systemic metabolic complications classically observed in response to longer exposure to obesogenic diets (10, 11).

The notion that disturbances in lipid metabolism in the liver play a crucial role in the etiology of plasma hypercholesterolemia is supported by the knowledge that TG and cholesterol metabolic pathways are closely interrelated in this organ. Cholesterol and fatty acid synthesis both use acetyl-CoA as biochemical starting material, and the reducing equivalent NADPH as a source of energy for their synthesis. Therefore, there is potential competition between fatty acid synthesis stored as TG and cholesterol synthesis in the liver. This raises the possibility that *de novo* lipogenesis resulting in liver fat accumulation may impair hepatic cholesterol metabolism. This hypothesis was recently supported by Ichigo and colleagues (12) who reported that in comparison to a high glucose (65%) diet, exposure to a high fructose (65%) diet for 12 days increased ACAT-2 (enzyme acyl-CoA acyl transferase 2: involved in cholesterol esterification) while decreasing ATP-binding cassette protein G5 (ABCG5) and ABCG8 (dimeric proteins involved in the exportation of cholesterol from the liver to bile ducts) gene expression in the liver. In the present study, we tested the hypothesis that a short-term exposure (2 weeks) to two obesogenic diets; a HFD known to rapidly increase fat accumulation in the liver and a WD (40% fat and 35% sucrose (17.5% fructose)) known to stimulate *de novo* lipogenesis disrupts molecular pathways of cholesterol metabolism in the liver. Among the different pathways of cholesterol metabolism, the important receptor LDL-R involved in cholesterol uptake of LDL particles in plasma was investigated along with its posttranscriptional regulator PCSK9 and their transcription factor SREBP2.

## **Materials and methods**

### **Animals care and treatments**

Four-week old male Wistar rats (Charles River, St-Constant, Québec, Canada) weighing 190 to 200 g, were housed individually and had *ad libitum* access to food and tap water after they were received in our laboratory. Their environment was controlled in terms of light (12 h light-dark cycling starting at 06:00 AM), humidity, and room temperature (20-23°C). After a 3-day

acclimatisation period, rats were randomly submitted either to a SD chow diet, a 60% HFD, or a WD (40% fat-35% sucrose) diet for 2 or 6 weeks for a total of 6 experimental groups (n = 10/group). Food intake and body weight were measured every 2 and 3 days, respectively. The protocol was approved by the *Comité Institutionnel de Protection des Animaux* (CIPA; 1218-956-1219) of UQAM and developed in agreement with the Canadian Council on Animal Care's rules (CCAC-CCPA).

At the end of their respective nutritional treatments, rats were euthanized between 09:00 and 11:00 AM after a 3-h fast. Immediately after complete anaesthesia by inhalation of isoflurane (3% induction and 1.5% maintenance) blood samples were drawn from the heart and collected in tubes containing 0.5 ml EDTA. The blood was centrifuged (1,500 RPM for 10 min), and the plasma was collected to measure TG, cholesterol, and PCSK9. The abdominal cavity was opened, and the median lobe of the liver was freeze-clamped, removed and used for TG, cholesterol and gene expression of several key markers of cholesterol metabolism. The mesenteric, retroperitoneal, epididymal, and subcutaneous (sc) fat deposits were, thereafter, rapidly excised and weighed. The mesenteric fat pad consisted of adipose tissue surrounding the gastrointestinal tract from the gastroesophageal sphincter to the end of the rectum with special care taken in distinguishing and removing pancreatic cells. The epididymal fat pad included adipose tissue surrounding the ureters and bladder. The retroperitoneal fat pad represented the distinct deposit behind each kidney, along the lumbar muscles. For sc fat deposit measurement, a rectangular piece of skin was taken on the right side of each animal from the median line of the abdomen to the spine and the right hip to the first rib (13). All tissue and plasma samples were stored at -78°C until analyses.

## **Diets**

The energy content (% kcal) of the SD (14) was 13% lipids, 65.6% carbohydrates and 21.4 % proteins (Charles River Rodent Diet 5075, Cargill Animal Nutrition, MN, USA). It had a gross energy value of 3970 kcal/kg and a physiological fuel value of 2885 kcal/kg. Its macronutrient composition (g/100g) was 55.2% carbohydrates (38% glucose derived from corn starch:100% glucose); 13% neutral detergent fiber and 4.1% acid detergent fiber derived from wheat middling and wheat); 4.5% lipids (poultry fat) and 18% proteins (dehulled soybean meal, fish meal and

whey). The HFD and the WD were obtained from Research Diets (NJ, USA). The HFD consisted of 60% fat, 20% CHO and 20% protein (kcal) while the WD consisted of 40% lipid, 43% CHO (35% sucrose), and 17% protein (kcal). The caloric equivalent of 2.89, 5.21 and 4.67 kcal/g for the SD, HFD, and WD, respectively was used to report food intake in kcal. Details of the HFD and WD are presented in Table 1.

## **Biochemical analyses**

Hepatic TG and cholesterol levels were determined using approximately 100 mg of tissue. Overnight 2:1 chloroform/methanol solution was used to extract lipids. Following centrifugation, nitrogen flux was used to dried up the lower phase and resuspended with Floch and Thesit solution (20%). Quantification of total cholesterol and TG from the liver and plasma was performed using Cholesterol E kits (Wako Diagnostics, Mountain View, CA, USA) and a TG assay (Randox Laboratories Ltd., Crumlin, UK). Plasma PCSK9 concentrations were measured using Mouse/Rat PCSK9 ELISA kits from CircuLex (Cat# CY-8078).

## **Real-time polymerase chain reaction**

Quick-frozen tissue samples of liver were powdered with a cold pestle and mortar, and ~100 mg was used for the isolation of RNA. Total RNA was extracted using RNeasy Micro (Qiagen). RNA integrity was validated using a Bioanalyzer 2100 (Agilent). Total RNA was treated with DNase and reverse transcribed using the Maxima First Strand cDNA synthesis kit with ds DNase (Thermo Fisher Scientific). A BioDrop spectrophotometer was used to determine RNA concentrations, and the ratio of absorbance at 260 and 280 nm was used to assess purity. RNA integrity was evaluated by visualization of intact 18S and 28S RNA bands following agarose gel electrophoresis. SuperScript VILO Master Mix (Invitrogen) was used to synthesize cDNA with 1 µg of RNA per 20 µL reaction.

Real-time qPCR reactions were performed in triplicate using 384-well plates in the QuantStudio6 system (Life Technologies) with SYBR Select Master Mix kit (Applied Biosystems). Reaction conditions consisted of 2 µL of a 1:10 cDNA dilution and 0.3 µM primers in a final volume of 10 µL. The following cycling protocol was used: 2 minutes at 50°C, 2 minutes at 95°C, followed by 40 cycles of 15 seconds at 95°C, 15 seconds at 58°C, and 1 minute at 72°C. The reaction's specificity

was verified by melting curve analysis. Negative controls (RT) and no template controls (NTC) were included in the PCR runs. Reference genes were identified by testing 10 different genes (picked from literature) and running TaqMan Array Rat Endogenous Control Plates (Applied Biosystems) on all samples. The 3 reference (housekeeping) genes with the best gene expression stability measure (Expression Suite, Applied Biosystems) were selected for normalization: Hprt, Actb, and Gapdh. Primers used (Table 2) were designed using Primer-BLAST (NCBI). Whenever possible, intron-spanning primers were selected to avoid amplification of genomic DNA. A standard curve obtained by scalar dilution of a cDNA pool was generated to verify PCR efficiency. The triplicate average values of cycle threshold (Ct) were used for quantification, and target genes were determined by  $2\Delta\Delta C_t$  calculation method. Results are presented as Arbitrary Units (AU; also reported as Fold Change or Relative Expression in the literature).

## **Statistical analyses**

All data are expressed as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Statistical comparisons were performed using a two-way analysis of variance (ANOVA) for non-repeated measures, using diet and time as main effects. Fisher's post-hoc test was used in the event of a significant ( $P < 0.05$ ) F ratio.

## **Results**

### **Anthropometric parameters and food intake**

Body weight was similar for all dietary groups at the beginning of the experimental period (Table 3). Body weight was not statistically modified by the obesogenic diets after 2 weeks of treatment. However, it was significantly higher ( $P < 0.01$ ) at 6 weeks. Hence, body weight was greater ( $P < 0.01$ ) in rats fed with the HFD and WD than those submitted to the SD. Average food intake in g/d was lower ( $P < 0.01$ ) in rats fed the HFD and WD as compared to rats fed the SD. Food intake in g/d was also lower ( $P < 0.05$ ) in rats fed the HFD as compared to rats fed the WD (Table 3). When food intake was calculated in kcal/d, animals treated with the HFD and WD displayed higher values ( $P < 0.001$ ) than those fed with the SD. The sum of the 3 visceral fat pad weights as well as

the subcutaneous fat deposit were significantly ( $P < 0.05$ ) higher in rats fed the HFD and WD compared to rats fed the SD after 2 ( $P < 0.05$ ) and 6 weeks ( $P < 0.001$ ; Table 3). HFD and WD resulted in similar body fat accumulations.

### **Liver and plasma triglycerides and cholesterol**

Liver TG accumulation was significantly higher ( $P < 0.001$ ) in rats fed both the HFD and the WD after 2 as well as after 6 weeks (Fig 1a). Liver TG levels were even slightly higher ( $P < 0.05$ ) in WD than in HFD-fed animals after the 2-week feeding period. Liver TG levels were higher ( $P < 0.01$ ) after 6 weeks than after 2 weeks in the SD-fed group. On the other hand, HFD and WD did not affect plasma TG levels after 2 weeks of feeding but resulted in a slight and significant ( $P < 0.05$ ) decrease after 6 weeks of feeding (Fig. 1b).

Although some tendencies ( $P < 0.1$ ) can be observed, liver cholesterol concentrations were not changed significantly ( $P > 0.05$ ) by the diets with the exception of the group of animals fed the WD for 6 weeks that showed significantly ( $P < 0.01$ ) higher levels compared to SD and HFD fed rats (Fig 1c). On the other hand, plasma total cholesterol levels were higher ( $P < 0.05$ ) in WD compared to SD and HFD fed animals after 2 and 6 weeks (Fig. 1d). No significant difference in plasma total cholesterol levels was found between rats fed the SD and the HFD. Overall, plasma total cholesterol levels were higher ( $P < 0.05$ ) with the longer diet duration (Fig. 1d).

### **Liver molecular markers**

As presented in Fig 2a, rats submitted to the WD for 2 weeks depicted lower LDL-R gene expression levels as compared to SD ( $P < 0.05$ ) and HFD ( $P < 0.05$ ) animals. LDL-R mRNA levels were also lower ( $P < 0.05$ ) in rats fed the WD compared to those fed the SD after 6 weeks. The same pattern of response was observed for the transcription factor SREBP2 ( $P < 0.001$ ) that regulates both LDL-R and PCSK9 (Fig. 2b). Similarly, PCSK9 mRNA expression was lower ( $P < 0.01$ ) in rats fed the WD as compared to animals fed the SD and HFD after 2 and 6 weeks (Fig. 2c). This pattern of response was similar for plasma PCSK9 concentrations after 2 weeks, while WD-fed animals depicted lower levels as compared to HFD-fed rats after 6 weeks (Fig. 2d). The transcription of LRP-1, a member of the LDL-R gene family, was also significantly ( $P < 0.05$ ) lower after 2 and 6 weeks in animals submitted to the WD in comparison to animals fed the SD (Fig. 2e).



Gene expression of ACAT-2 was also lower ( $P < 0.05$ ) following 2 and 6 weeks of WD compared to SD, where the 6-week treatment showed even lower levels than the 2-week treatment (Fig. 2f).

Transcripts of HMGCoAR, the main enzyme of cholesterol synthesis, were decreased ( $P < 0.001$ ) after 2 weeks in rats fed the HFD and the WD while after 6 weeks lower levels ( $P < 0.05$ ) were found only in rats fed the WD (Fig. 3a). Animals fed the SD depicted a lower level of gene expression for HMGCoAR after 6 weeks in comparison to the one observed after 2 weeks. Gene expression of SR-B1, the transporter responsible for the exchange of cholesterol from HDL particles to the liver, was significantly ( $P < 0.001$ ) higher in HFD-fed rats compared to SD- and WD-fed animals in both feeding durations (Fig. 3b). A small but significant ( $P < 0.05$ ) effect of overall diet duration was also found with higher values observed after 6 weeks. Gene expressions of ABCG5 and ABCG8 were significantly ( $P < 0.01$ ) higher among rats fed the HFD in comparison to those submitted to 2 and 6 weeks of the other diets (Fig. 3c,d). Gene expression of ACC, an important enzyme regulating the first steps of *de novo* lipogenesis, was higher in rats fed the WD compared to rats fed the two other diets for 2 weeks (Fig. 3e). After 6 weeks of treatment, ACC transcription was also higher ( $P < 0.001$ ) in rats fed the WD than in those treated with the HFD. ACC mRNA levels were also lower ( $P < 0.001$ ) in HFD- than in SD-fed rats after 2 and 6 weeks. Gene transcription of ChREBP, the transcription factor involved in regulating mediators of *de novo* lipogenesis, was highly stimulated ( $P < 0.01$ ) among rats fed the WD compared to those treated with the other dietary regimen for 2 weeks (Fig 3f). This response was not observed after 6 weeks of treatment.

## Discussion

The main finding of the present study is that animals fed a WD (high fat + high sucrose) for only 2 weeks depicted lower gene expression of several key markers of liver cholesterol metabolism including LDL-R, PCSK9, SREBP2, and HMGCoAR compared to animals fed a SD or a HFD. The same response was also observed for PCSK9 measured in plasma. These findings were not observed when rats were fed the HFD. The 2-week WD also resulted in higher plasma total cholesterol levels. The HFD and even more so the WD promptly (2 weeks) induced excessive TG accumulation

in the liver. These results indicate that the WD, which does not contain higher levels of cholesterol, disturbs the mechanisms involved in the regulation of cholesterol metabolism in the liver. The current results indicate that the enrichment in sucrose (50% glucose and 50% fructose) and fat of the WD promptly and potently promoted TG accumulation in the liver. Hence, this effect may be put forward as the element responsible for the alterations observed in the regulation of cholesterol metabolism. From a clinical perspective, these results suggest that high plasma cholesterol levels may be linked to lipid metabolism in the liver.

The first observation of the present study is that short-term (2 weeks) exposure to either a HFD (60% fat) or a WD (40% fat + 35% sucrose (17.5 % fructose)) induced important increases in the liver TG levels and this effect remained stable after 6 weeks of treatment. An early accumulation of lipids in the liver in response to high-fat feeding has been previously observed (11, 15, 16). This response has been interpreted as if the liver was acting as a buffer to protect the other organs from a potentially deleterious surge of lipids (11, 17). Accordingly, plasma TG levels were not changed after 2 weeks of HFD or WD. An additional finding of the present study is that liver TG accumulation after 2 weeks was even higher in the WD than in the HFD. Fructose contained in the WD is a strong inducer of hepatic lipogenic enzymes (18). Therefore, the present increases in gene expression of ACC and ChREBP measured in the liver of animals submitted to 2 weeks of WD support the assumption that *de novo* lipogenesis is associated with the excessive accumulation of fat in this organ.

In addition to resulting in a rapid increase in liver TG accumulation, the short 2-week period of feeding applied in the present study has the advantage of preceding significant increases in body weight gain and the systemic development of metabolic complications associated with longer exposure to obesogenic diets. In support of this, the body weight observed among animals fed the HFD and WD was similar to the body weight observed among rats fed the SD diet after 2 weeks. Body weight was approximately 50 g higher among the animals fed the obesogenic diets after 6 weeks. Moreover, the sum of abdominal and subcutaneous fat accumulation was approximately 3 times higher after 6 weeks of the obesogenic diets than it was after only 2 weeks (7 vs 20 g), all while liver TG levels were similar after 2 and 6 weeks. The present results support the validity of selecting such an experimental design where animals are submitted to 2 weeks of

obesogenic diets. This is reinforced by the fact that despite no change in body weight was detected, hepatic lipid metabolism was strongly altered by the HFD and WD. For this reason, the present discussion is centered on results derived from the 2-week feeding condition.

Using this experimental design, the present study aimed to gather evidence for the existence of an association between a rapid increase in liver TG among rats submitted to short-term (2 weeks) obesogenic diets and disturbances in gene expression of key regulators of cholesterol metabolism in the liver. The main finding of the present study was that feeding animals with a WD for both 2 and 6 weeks resulted in a decrease in gene expression of three important and related markers of liver cholesterol metabolism: LDL-R, PCSK9, and the transcription factor SREBP2. The combined action of these 3 molecules regulates transport of highly atherogenic LDL particles. With approximately 70% of its expression carried out in the liver, it is clear that LDL-R is crucial for the clearance of LDL-cholesterol particles from circulation (19). Therefore, the increase in plasma total cholesterol observed in rats fed a WD for 2 or 6 weeks could be the result of the decrease in gene expression LDL-R in the liver. While the present data strongly support the physiological relevance of this mechanism; the importance of other pathways involved in the regulation of circulating cholesterol levels will also require further attention in future studies.

Our results also showed that the levels of mRNA and plasma PCSK9 (a protease that down-regulates LDL-R protein expression (20, 21, 22)) are reduced at 2 and 6 weeks after WD feeding. This could have normally contributed to promoting the clearance of plasma cholesterol by increasing LDL-R protein levels. However, because of the decrease in upstream gene expression of SREBP2, a transcription factor that regulates the expression of both LDL-R and PCSK9 (23, 24), the reduction in PCSK9 levels did not positively affect the expression of LDL-R. Consequently, plasma total cholesterol remained high in rats fed the WD at 2 and 6 weeks. Similarly, gene expression of LRP1, responsible for the removal of circulating lipoprotein remnants enriched in cholesterol (25), was reduced in rats fed the WD, thus potentially contributing to the increased plasma cholesterol levels. In addition, cholesterol transport from HDL to the liver is carried out through its interaction with receptor SR-B1 (26) whose gene expression remained unchanged by the WD while being modulated by the HFD. All of these responses may have contributed to the

decrease in cholesterol uptake by the liver and, in turn, promoted its increased concentration in the circulation.

Along with LDL-R and PCSK9, the expression of HMGCoAR, the key marker of cholesterol synthesis in the liver, is regulated by the transcription factor SREBP2 (23, 24). Accordingly, SREBP2 and HMGCoAR mRNA levels were highly reduced in rats fed the WD. At the same time, mRNA expression of ACAT-2, which is involved in cholesterol esterification was reduced in rats fed the WD compared to rats submitted to the HFD. Taken together, these results support the hypothesis that in the liver, a short-term WD promptly yields a large increase in the TG content and, in turn, impairs pathways involved in regulation of cholesterol metabolism.

If liver cholesterol uptake from the circulation is reduced under the present WD, the next question is what can trigger this response? The accumulation of cholesterol in the liver may be an important factor inducing the reduction in gene expression of key markers of the LDL-R pathway and, in turn, the increase in plasma cholesterol levels (23). Liver cholesterol concentrations show a tendency ( $P < 0.1$ ) to be higher after 2 weeks of both the HFD and WD, a tendency that became highly significant for the WD after 6 weeks. In this regard, it is noticeable that gene expression of HMGCoAR was lowered in rats fed the HFD and even more so in rats fed the WD for 2 weeks. This response may have been stimulated by a transient rise of cholesterol levels in the liver. In addition, the low mRNA levels of ABCG5/G8 transporters (responsible for the exportation of cholesterol in the bile ducts) in rats fed the WD might have contributed to transient higher liver cholesterol levels in these animals. However, this association does not hold for the HFD-fed animals since ABCG5/G8 mRNA levels were increased in these groups of rats. It is likely that other mechanisms such as fecal excretion of biliary acids (27) or increased synthesis and secretion of VLDL are involved

Other important questions that emerge from the present results are what factors alter the expression of key metabolic markers of hepatic cholesterol homeostasis in response to 2 weeks of WD, and why does the response in animals submitted to the HFD not reach the same extent? It must be taken into account that after 2 weeks, hepatic TG levels were higher in WD- than in HFD- fed rats, and this might have interfered with cholesterol metabolism. It is also possible that

the different fat composition of the two diets might have played a role. A key element of the WD diet is its content of fructose. Fructose has been reported to increase protein levels of all *de novo* lipogenesis enzymes during its conversion into triglycerides (28, 29). The WD-induced lipogenesis necessitates the synthesis of malonyl-CoA, which is not the case for dietary fat. Malonyl-CoA is a potent inhibitor of mitochondrial oxidation (30). By doing so, increased malonyl-CoA levels may have indirectly contributed to the higher level of liver fat accumulation in animals submitted to the WD. A second interaction between fructose and cholesterol metabolism is that lipogenesis and cholesterol synthesis pathways both use acetyl CoA as a molecular precursor and both use the reducing equivalent NADPH as a sole source of energy. Although other factors may be involved, this may have contributed to the lower gene expression of HMGCoAR found in rats treated with the WD compared to rats fed the HFD for 2 weeks. In one of the rare studies evoking the potential link between fructose and hepatic cholesterol metabolism, Ichigo et al (12) reported a decrease in ABCG5/G8 gene expression in rats submitted to 12 days of high fructose compared to rats fed a high glucose diet. Although comparisons between this study and ours remain difficult, these authors did hypothesize that a fructose diet might affect genes involved in regulation of cholesterol metabolism.

Although the precise mechanism linking liver fat accumulation to the disruption of liver cholesterol metabolism is beyond the scope of the present study, our results clearly indicate that a short-term WD disturbs hepatic cholesterol metabolism while promoting a rapid increase in total cholesterol circulating levels. Results derived from previous reports show that cholesterol homeostasis in the liver may be perturbed by activities of other metabolic pathways. For instance, Kemper et al (31) reported that the ingestion of an ester of *B*-hydroxybutyrate in rats promoted an increase in LDL-R and SREBP2 protein levels. More recently, Rana et al (32) reported that the cell surface protease-activated receptor PAR2 is a factor linking gene expression of several markers of cholesterol metabolism (i.e. LDL-R, SR-B1) to increased TG levels in the liver. This effect could potentially be mediated through the action of the *de novo* lipogenesis pathway. On a long-term basis, fructose has been highly associated with the development of liver steatosis in humans (33). Several pathways modulating hepatic cholesterol metabolism are dysregulated in response to NAFLD (7). Hence, the difficulty in determining the direct association between liver fat

accumulation and impairments in hepatic cholesterol homeostasis is increased by the knowledge that NAFLD is also associated with several metabolic disorders (i.e. inflammation and insulin resistance, *etc.*), which, in turn, alter cholesterol metabolism in the liver.

Although protein levels were not measured in the present study, mRNA levels of several key markers of the LDL-R pathway display the same pattern of responses. This supports the interpretation that the 2-week WD used as a model of isolated hepatic steatosis most likely leads to a rapid increase in circulating cholesterol levels. It is currently accepted that fructose enrichments of WD are promoting *de novo* lipogenesis in the liver. Furthermore, the present data indicate that this excessive accumulation of lipids may also interfere with the regulation of cholesterol metabolism in the liver.

## **Conclusion**

From a clinical point of view, the present findings suggest that liver fat accumulation, by disrupting the proper regulation of cholesterol pathways in the liver, contributes to an increase in plasma cholesterol levels. Further investigations should clarify the mechanisms linking fat accumulation in the liver to cholesterol pathways.

## References

- 1) Bruce KD, Byrne CD. The metabolic syndrome: common origins of a multifactorial disorder. *Postgrad Med J.* 2009;85: 614-621.
- 2) Chitturi S, Farrell GC. Fatty liver now, diabetes and heart attack later? The liver as a barometer of metabolic health. *Journal of Gastroenterology and Hepatology.* 2007;22: 967-969.
- 3) Alkhoury N, Tamini TAR, Yerian I, Lopez R, Zein NN, Feldstein AE. The inflamed liver and atherosclerosis: a link between histologic severity of nonalcoholic fatty liver disease and increased cardiovascular risk. *Dig Dis Sci.* 2010;55: 2644-2650.
- 4) Cali AM, Zern TL, Taksali SE, de Oliveira AM, Dufour S, Otvos JD, et al. Intrahepatic fat accumulation and alterations in lipoprotein composition in obese adolescents: a perfect proatherogenic state. *Diabetes Care.* 2007;30: 3093-3098.
- 5) Wieckowska A, Papouchado BG, Lopez R, Zein NN, Feldstein AE. Increased hepatic and circulation interleukin-6 level in human nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol.* 2008;103: 1372-1379.
- 6) Tarantino G, Pizza G, Colao A, Pasanisi F, Conca P, Colicchio P, et al. Hepatic steatosis in overweight/obese females new screening method for those at risk. *World J Gastroenterol.* 2009;15: 5693-5699.
- 7) Arguello G, Balboa E, Arrese M, Zanlungo A. Recent insights on the role of cholesterol in non-alcoholic fatty liver disease. *Biochem Biophys Acta.* 2015;185: 1765-1778.
- 8) Min H-K, Kapoor A, Fuchs M, Mirshahi F, Zhou H, Maher J, et al. Increased hepatic synthesis and dysregulation of cholesterol metabolism is associated with the severity of non-alcoholic fatty liver disease. *Cell Metab.* 2012;15: 665-674.
- 9) Magri-Tomaz L, Melbouci L, Mercier J, Ou Y, Auclair N, Lira FS, et al. Two weeks of high-fat feeding disturb lipid and cholesterol molecular markers. *Cell Biochem Funct.* 2018;36: 387-393.

- 10) Paquette A, Shinoda M, Rabasa Lhoret R, Prid'homme D, Lavoie JM. Time course of liver lipid infiltration in ovariectomized rats: impact of a high-fat diet. *Maturitas*. 2007;58: 182-190.
- 11) Gauthier MS, Favier R, Lavoie JM. Time course of the development of non-alcoholic hepatic steatosis in response to high-fat diet-induced obesity in rats. *Br J Nutr*. 2006;95: 273-281.
- 12) Ichigo Y, Takeshita A, Hibino M, Nakagawa T, Hayakawa T, Patel D, et al. High-fructose diet-induced hypertriglyceridemia is associated with enhanced hepatic expression of ACAT2 in rats. *Physiol Res*. 2019;68: 1021-1026.
- 13) Krotkiewski M, Bjorntorp P. The effect of progesterone and of insulin administration on regional adipose tissue cellularity in the rat. *Acta Physiol Scand*. 1976;96: 122-127.
- 14) Andrich DE, Melbouci L, Ou Y, Leduc-Gaudet J-P, Chabot F, Lalonde et al. Altered feeding behaviors and adiposity precede observable weight gain in young rats submitted to a short-term high-fat diet. *J Nutr Metab*. 2018;doi: 10.1155/2018/1498150.
- 15) Kraegen EW, Clark PW, Jenkins AB, Daley EA, Chisholm DJ, Storlien LH. Development of muscle insulin resistance after liver insulin resistance in high-fat fed rats. *Diabetes*. 1991;40: 1397-1403.
- 16) Samuel VT, Liu Z-X, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, et al. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem*. 2004;279: 32345-32353.
- 17) Westerbacka J, Lammi K, Hakkinen AM, Rissanen A, Salminen I, Aro A, et al. Dietary fat content modifies liver fat in overweight non-diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90: 2804-2809.
- 18) Flowers MT, Ntambi JM. "Stearoyl-CoA desaturase and its relation to high-carbohydrate diets and obesity". *Biochem Biophys Acta*. 2009;1791: 85-91.
- 19) Niesen M, Bedi M, Lopez D. Diabetes alters LDL receptor and PCSK9 expression in rat liver. *Arch Biochem Biophys*. 2008;470: 111-115.



- 20) Seidah NG, Benjannet S, Wickham L, Marcinkiewicz J, Jasmin SB, Stifani S. et al. The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100: 928-933.
- 21) Cunningham D, Danley DE, Geoghegan KF, Griffor MC, Hawkins JL, Subashi TA, et al. Structural and biophysical studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia. *Nat Struct Mol Biol*. 2007;14: 413-419.
- 22) Roubtsova A, Munkonda MN, Awan Z, Marcinkiewicz J, Chamberland A, Lazure C, et al. Circulating proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) regulates VLDLR protein and triglyceride accumulation in visceral adipose tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31: 785-791.
- 23) Dubuc G, Chamberland A, Wassef H, Davignon J, Seidah NG, Bernier L, et al. Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the protein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24: 1454-1450.
- 24) Smith JR, Osborne TF, Goldstein JL, Brown MS. Identification of nucleotides responsible for enhancer activity of sterol regulatory element in low density lipoprotein receptor gene. *J Biol Chem*. 1990;265: 2306-2310.
- 25) Rohlmann A, Gotthardt M, Hammer RE, Herz J. Inducible inactivation of hepatic LRP gene by cre-mediated recombination confirms role of LRP in clearance of chylomicron remnants. *J Clin Investig*. 1998;101: 689-695.
- 26) Silver DL, Jiang XC, Arai T, Bruce C, Tall AR. Receptors and lipid transfer proteins in HDL metabolism. *Ann NY Acad Sci*. 2000;902: 103-111.
- 27) Zhao Y, Liu J, Hao W, Zhu H, Liang N, He Z, et al. Structure-specific effects of short-chain fatty acids on plasma cholesterol concentration in male syrian hamsters. *J Agric Food Chem*. 2017;65:10984-10992.
- 28) Softic S, Cohen DE, Kahn CR. Role of dietary fructose and hepatic *de novo* lipogenesis in fatty liver disease. *Dig Dis Sci*. 2016;61: 1282-1293.

- 29) Janevski M, Ratnayake S, Siljanovski S, McGlynn MA, Cameron-Smith D, Lewandowski P. Fructose containing sugars modulate mRNA of lipogenic genes ACC and FAS and protein levels of transcription factors ChREBP and SREBP1c with no effect on body weight or liver fat. *Food Funct.* 2012;3: 141-149.
- 30) Foster DW. Malonyl-CoA: the regulator of fatty acid synthesis and oxidation. *J Clin Invest.* 2012;122: 1958-1959.
- 31) Kemper MF, Srivastava S, Todd King M, Clarke K, Veech RL, RJ Pawlosky RJ. An ester of B-hydroxybutyrate regulates cholesterol biosynthesis in rats and a cholesterol biomarker in humans. *Lipids.* 2015;50: 1185-1193.
- 32) Rana R, Shearer AM, Fletcher EK, Nguyen N, Guha S, Cox DH, et al. PAR2 controls cholesterol homeostasis and lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease. *Mol Metab.* 2019;29: 99-113.
- 33) Basaranoglu M, Basaranoglu G, Sabuncu T, Sentürk H. Fructose as a key player in the development of fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2013;19: 1166-1172.

## Légendes

**Fig. 1.** Liver and plasma triglyceride (TG) and total cholesterol (TC) concentrations in rats (n = 8-10) fed a standard (SD), high fat (HFD), or a western (WD) diet for two and six weeks. \* Significantly (P < 0.05) different from SD; \*\*\* P < 0.001; □ significantly (P < 0.05) different from HFD; □□ P < 0.01; □□□ P < 0.001; † significantly (P < 0.05) different from the two-week values, respectively; †† P < 0.01.

**Fig. 2.** Hepatic gene expression of low-density lipoprotein receptor (LDL-R), proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9), low-density lipoprotein-receptor-related protein 1 (LRP-1), sterol regulatory element binding protein 2 (SREBP2), acyl-CoA cholesterol acyltransferase-2 (ACAT-2), and plasma PCSK9 concentrations in rats (n = 9-10) fed a standard (SD), high fat (HFD), or a western (WD) diet for two and six weeks.

\* Significantly (P < 0.05) different from SD; \*\*\* P < 0.001; □ significantly (P < 0.05) different from HFD; □□ P < 0.01; □□□ P < 0.001; † significantly (P < 0.05) different from the two-week values, respectively.

**Fig. 3.** Hepatic gene expression of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase (HMGCoAR), scavenger receptor class B member 1 (SR-B1), ATP-binding cassette protein G5 (ABCG5), ATP-binding cassette protein G8 (ABCG8), acetyl-CoA carboxylase (ACC), and carbohydrate-response element binding protein (ChREBP) in rats (n = 7-10) fed a standard (SD), high fat (HFD), or a western (WD) diet for two and six weeks.

\* Significantly (P < 0.05) different from SD; \*\* P < 0.01; \*\*\* P < 0.001; □ significantly (P < 0.05) different from HFD; □□□ P < 0.001; † significantly (P < 0.05) different from the two-week values, respectively; †† P < 0.01; ††† P < 0.001.

## **DECLARATIONS**

### **Ethical Approval**

All experiments were approved by the *Comité Institutionnel de Protection des Animaux* (CIPA) of Université du Québec à Montréal (UQAM).

### **Consent for publication**

All authors consent to publish the present results.

### **Availability of data and material**

All data and biological material will be available if needed

### **Competing interests**

The authors declare that they have no conflict of interest.

### **Funding**

This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC; DSP: 06481 and JML: 7594).

### **Author's contributions**

This work was performed at Université du Québec à Montréal (UQAM). RSA (conception, design, acquisition of data), ENS and SQ (acquisition of data) JML and DSP (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.

### **Acknowledgements**

This project was funded by NSERC Discovery Grants (DSP: 06481 and JML: 7594). RSA and SQ were respectively supported by NSERC and Canadian Institutes of Health Research (CIHR) scholarships.

## Tables and figures

**Table 1: Description of the diets**

Ingredients (g)	High Fat diet	Western diet
	D12492	D12079B
Casein, Lactic, 30 Mesh	200	195
Methionine, DL	0	3
Cystine, L	3	0
Sucrose, Fine Granulated	72.8	350
Startch, Corn	0	50
Lodex 10	125	100
Solka Floc, FCC200 (Fiber)	50	50
Butter, Anhydrous	0	200
Corn oil	0	10
Lard	245	0
Soybean Oil, USP	25	0
S10026B (Mineral)	50	0
S10001A (Mineral)	0	17.5
Calcium Phosphate, Dibasic (Mineral)	0	17.5
Calcium Carbonate, Light, USP (Mineral)	0	4
Choline Bitartrate (Vitamin)	2	2
V10001C (Vitamin)	1	1
Ethoxyquin (Anti-oxydant)	0	0.04
Cholesterol, NF	0	1.5
Dye, Blue FD&C #1	0.05	0

**Table 2: Oligonucleotide primers used for quantitative real-time polymerase chain reaction**

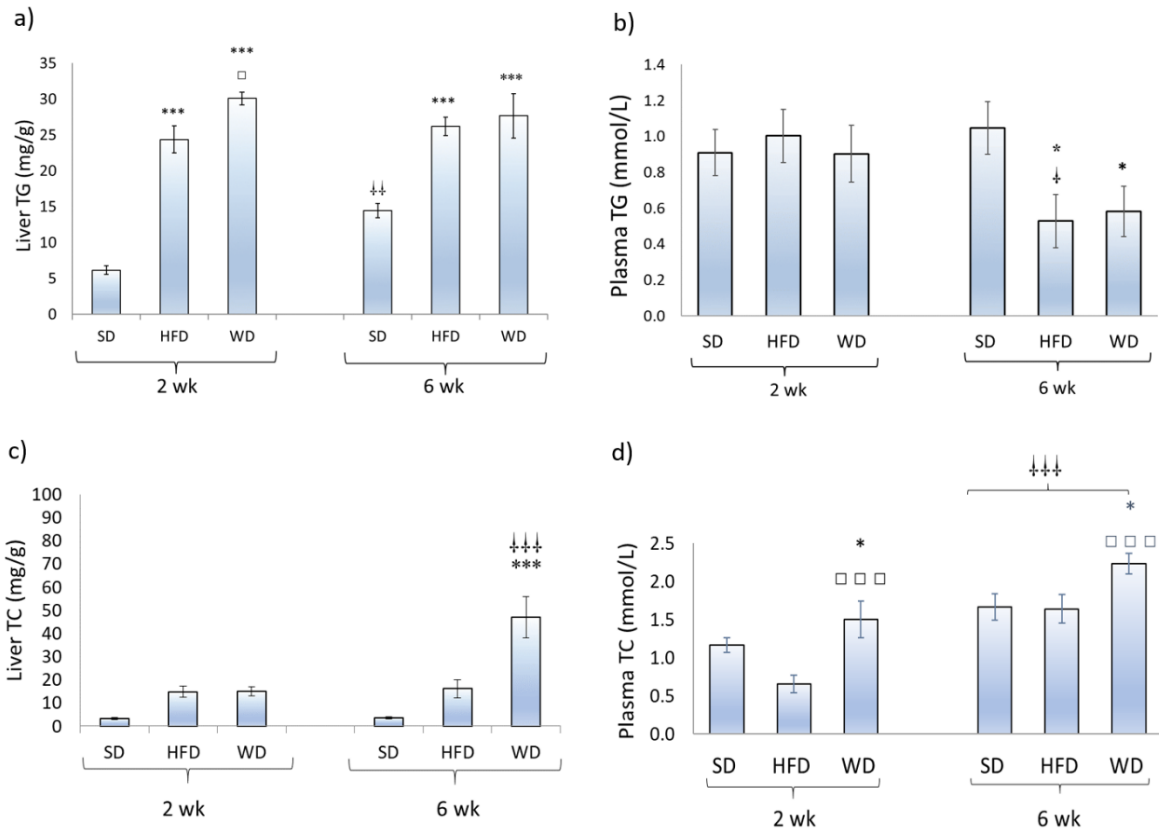
<i>Gene name</i> <i>NCBI</i>	Alias	Oligo FWD	Oligo REV	Sonde  UPL
<i>Abcg5</i>	ABCG5	cggagagttggtgttctgtg	caccgatgtcaagtccatgt	82
<i>Abcg8</i>	ABCG8	cagatgctggctatcataggg	ctgatttcatcttgccacca	13
<i>Acat2</i>	ACAT-2	agaagtccttcagagagccaaa	cactggcttgtcgagtagga	50
<i>Acaca</i>	ACC	acagagatggggctgatgtc	gatcccatggcaatctg	4
<i>Actb</i>	Actb (control)	cccgcgagtacaaccttct	cgatcatcatggcgaact	17
<i>Mlxipl</i>	ChREBP	aatcccagcccctacacc	ctgggaggagccaatgtg	10
<i>Gapdh</i>	Gapdh (control)	ccctcaagattgtcagcaatg	agttgtcatggatgaccttgg	73
<i>Hmgcr</i>	HMGCoAR	caaccttctacctcagcaagc	acagtgccacacacaattcg	80
<i>Hprt</i>	Hprt (control)	gaccggttctgtcatgtcg	acctggttcatcatcactaatcac	95
<i>Ldlr</i>	LDL-R	tgctactggccaaggacat	ctgggtggtcggtagctg	16
<i>Lrp1</i>	LRP-1	aatcgagggaagatgacac	ccagtctgtccagtacatccac	81
<i>Pcsk9</i>	PCSK9	ccagtgtccacgcttctct	gatgccatgctccttgattt	1
<i>Scarb1</i>	SR-B1	ggtgcccattattaccaac	gcgagcccttttactacca	71
<i>Sreb2</i>	SREBP2	gtgcagacagtcgctacacc	aatctgaggctgaaccagga	62

**Table 3: Anthropometric parameters and food intake**

	2 weeks			6 weeks		
	SD	HFD	WD	SD	HFD	WD
Initial bodyweight (g)	200 ± 3	199 ± 4	198 ± 3	199 ± 3	194 ± 3	192 ± 3
Final bodyweight (g)	343 ± 4	348 ± 6	339 ± 6	509 ± 7 <sup>+++</sup>	549 ± 17 <sup>+++**</sup>	556 ± 13 <sup>+++**</sup>
Food intake (g/day)	28.5 ± 0.6	20.9 ± 0.3 <sup>****</sup>	24.3 ± 0.3 <sup>****□□□</sup>	31.2 ± 0.6 <sup>+++</sup>	21.9 ± 0.4 <sup>+++***</sup>	26.2 ± 0.6 <sup>+++***□□□</sup>
Food intake (kcal/day)	82 ± 2	109 ± 1 <sup>***</sup>	113 ± 2 <sup>***□</sup>	90 ± 1 <sup>+++</sup>	114 ± 2 <sup>***+++</sup>	123 ± 3 <sup>+++*□</sup>
Abdominal fat pad weight (g)	11.7 ± 0.7	17.6 ± 1.0 <sup>*</sup>	18.2 ± 1.0 <sup>*</sup>	33.2 ± 1.7 <sup>+++</sup>	48.6 ± 2.5 <sup>+++***</sup>	52.1 ± 3.0 <sup>+++***</sup>
Subcutaneous fat pad weight (g)	1.7 ± 0.2	2.6 ± 0.2 <sup>**</sup>	2.8 ± 0.4 <sup>***</sup>	4.9 ± 0.3 <sup>+++</sup>	7.2 ± 0.6 <sup>+++**</sup>	7.9 ± 0.9 <sup>+++***</sup>

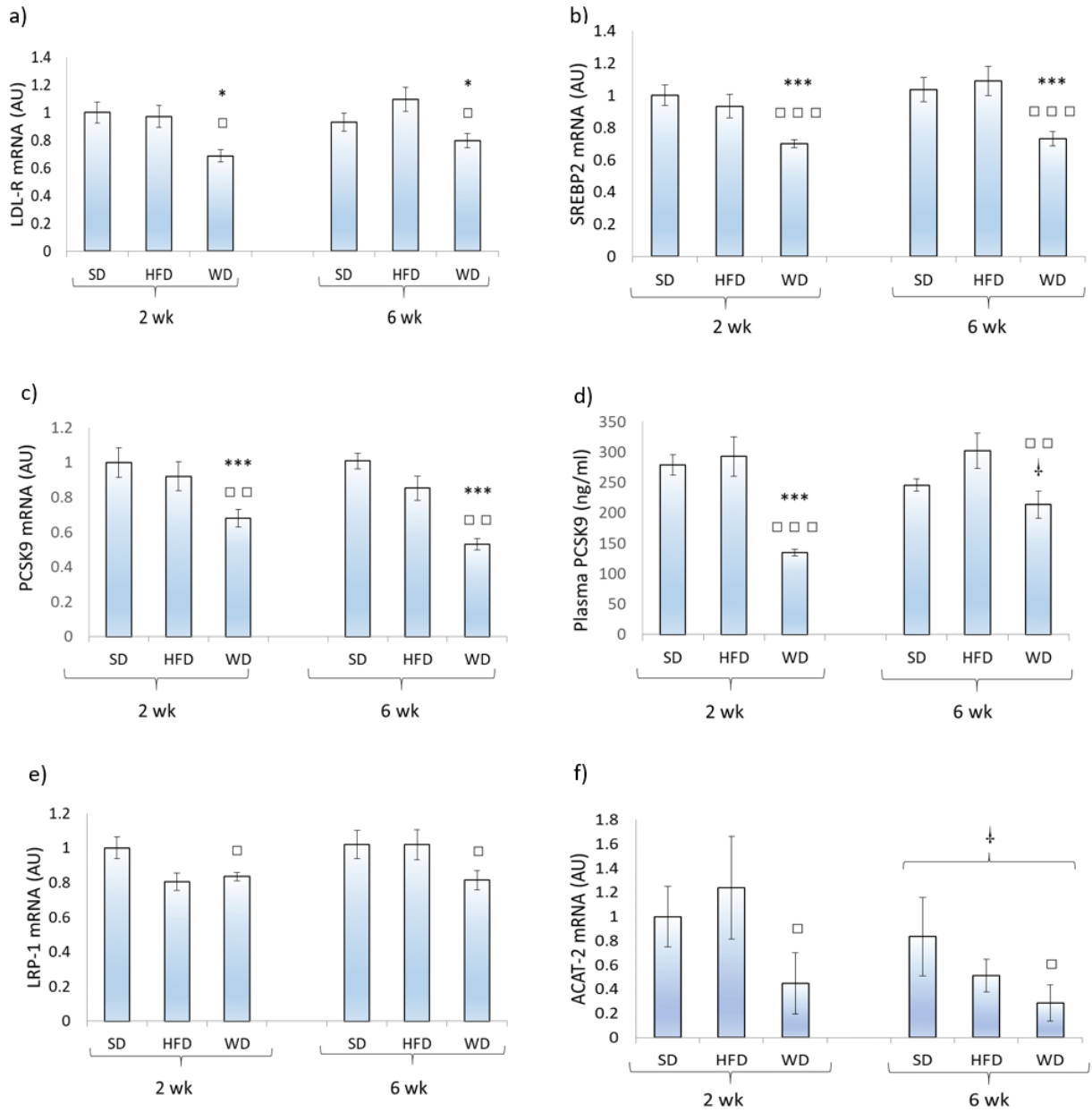
Values are mean ± SEM with 8-10 rats per group: SD: standard diet; HFD: high fat diet; WD: western diet. \* Significantly (P < 0.05) different from SD; \*\* P < 0.01; \*\*\* P < 0.001; □ significantly (P < 0.05) different from HFD; □□ P < 0.001; □□□ significantly (P < 0.001) different from the two-week values, respectively.

**Figure 1**

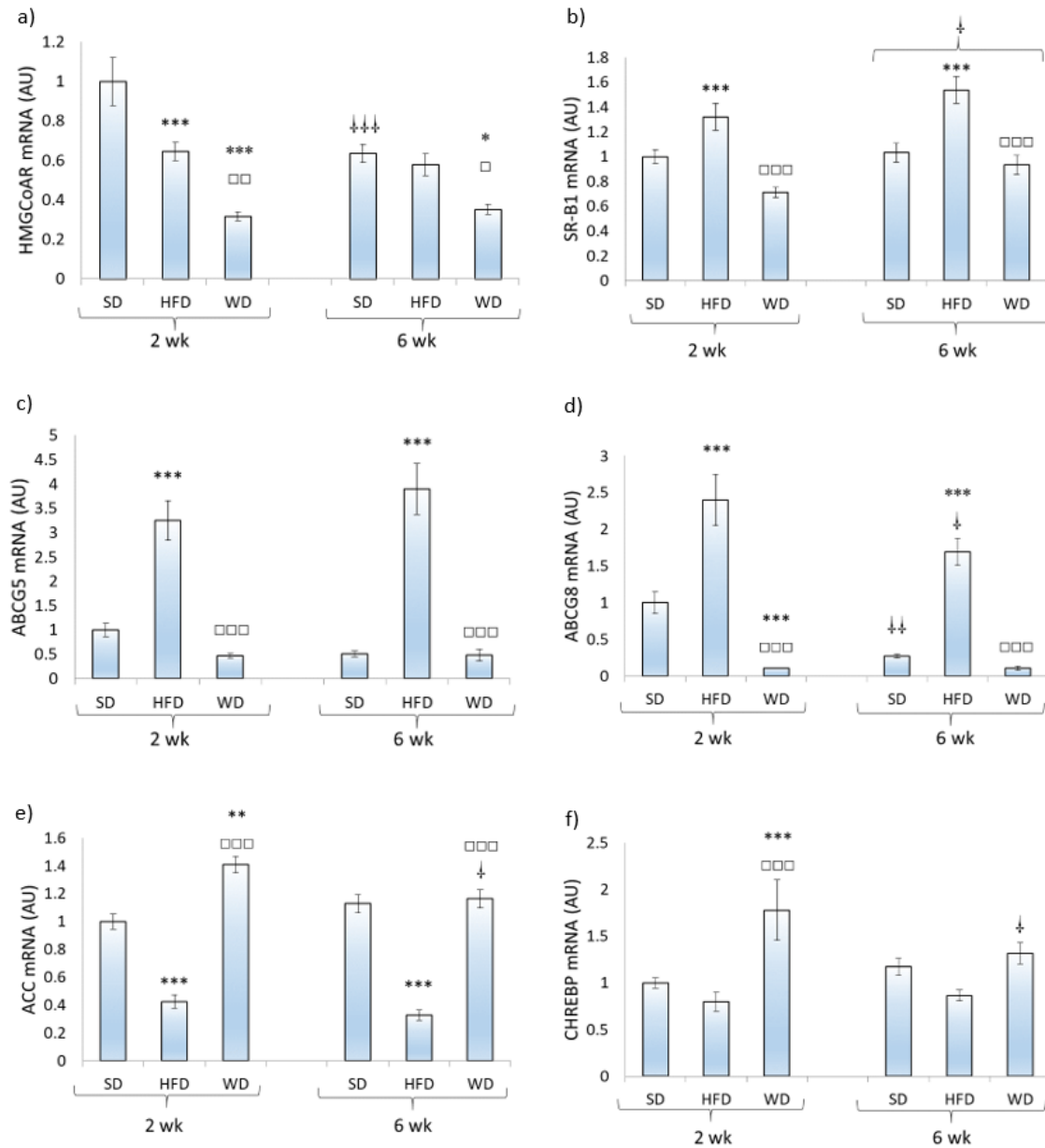




**Figure 2**



**Figure 3**



## Chapitre 4 – Discussion générale et conclusion

Ce projet d'étude a pour objectif d'améliorer notre compréhension des mécanismes de régulation du métabolisme du cholestérol au foie et de comment ceux-ci sont altérés en cas de stéatose hépatique induite par une diète riche en lipides ou une diète riche en lipides et en sucrose (composé de 50% de fructose). Ainsi, notre question de recherche consiste à savoir si, quand et comment l'accumulation de lipides au foie engendre des changements dans la régulation du métabolisme du cholestérol. Notre hypothèse première est que l'état de stéatose hépatique altère l'expression génique de marqueurs clés des voies métaboliques du cholestérol. Ces changements sont observables suite à une alimentation obésogène de courte durée (2 semaines) qui perdurent après 6 semaines. Enfin, ces changements sont potentiellement différents selon que la stéatose hépatique est induite par une diète enrichie en lipides (HFD : 60% lipides) ou en lipides et sucrose de type occidentale (WD : 40% lipides, 17.5% fructose).

Nos résultats suggèrent que les effets de l'ajout de fructose à la diète perturbent grandement les marqueurs du métabolisme du cholestérol au foie et ce, suite à seulement 2 semaines de traitement. Ces perturbations observées concernent en majeure partie une réduction dans l'expression génique des LDL-R au foie et seraient attribuées à une augmentation des triglycérides dans le foie provenant de l'alimentation et de la voie de la lipogenèse *de novo*. Ces altérations dans l'expression génique des régulateurs du cholestérol au foie favoriseraient une augmentation des valeurs de cholestérol plasmatique par une réduction de la captation de cholestérol par les LDL-R. De plus, une diminution de l'expression des marqueurs du métabolisme du cholestérol a été observée avec la WD comparativement à une HFD et ce, même si les deux diètes induisaient une stéatose hépatique.

Ce chapitre présente l'analyse des résultats du projet d'étude et des principales interprétations. Une attention spéciale sera portée à la WD en raison des changements plus importants observés. Enfin, une section concernant les limitations de ce projet permettra de mettre en lumière certains des éléments qui sont à améliorer en vue de projets futurs.

## 4.1 Effets de la stéatose hépatique sur le métabolisme du cholestérol

Le présent projet de maîtrise avait pour but de tester l'hypothèse selon laquelle l'accumulation en excès de lipides au foie perturbe le métabolisme du cholestérol. Afin de tester cette hypothèse, la présence d'une accumulation de lipides au foie a d'abord été mesurée. Ainsi, une hausse significative des triglycérides hépatiques chez les groupes avec diètes riches en lipides ou Western, a été observée après 2 et 6 semaines de traitement. Chez ces groupes, en plus de développer une stéatose hépatique, le métabolisme du cholestérol au foie a été perturbée de plusieurs façons. L'observation principale de ce projet de maîtrise est que les animaux soumis à une WD durant 2 semaines ont une réduction de l'expression génique de plusieurs marqueurs du métabolisme du cholestérol au foie. Les ARNm du LDLr, PCSK9, SREBP2 et HMGCoAR sont réduits comparativement à la diète standard ou la HFD. De même, les résultats révèlent une réduction de la présence de la protéine PCSK9 dans le plasma. Ceci indique que l'ARNm de PCSK9 est régulée à la baisse, mais également que les niveaux de la protéine PCSK9 sont plus faibles.

PCSK9 est une protéine qui régule les LDLr en agissant comme protéine chaperonne, ce qui favorise l'internalisation et l'élimination des LDLr présents à la surface des hépatocytes (Warden et al., 2019). Nos résultats indiquent que les niveaux d'ARNm de PCSK9 au foie et de la protéine PCSK9 dans le plasma sont réduites après 2 et 6 semaines de WD. Ceci aurait dû normalement contribuer à augmenter la captation du cholestérol plasmatique en réduisant la dégradation des LDL-R. Néanmoins, en raison de la diminution additionnelle de l'expression génique de SREBP2, un facteur de transcription qui régule l'expression de LDLr et PCSK9 (Maxwell & Breslow, 2004), l'inhibition de l'expression de PCSK9 n'a possiblement pas favorisée la présence des LDLr à la surface des hépatocytes. En conséquence, la concentration de cholestérol plasmatique est augmentée chez les rats nourris avec la WD après 2 et 6 semaines. L'expression de LRP1, un récepteur responsable de la captation des résidus de chylomicrons et VLDL circulants (Gautier et al., 2000; Shachter, 2001), est également réduite lorsque les rats sont nourris avec la diète Western, ce qui contribue potentiellement à l'augmentation des niveaux de cholestérol plasmatique. De plus, l'expression de SR-B1, un transporteur au foie qui permet l'internalisation du cholestérol des HDL (Timmins et al., 2005), est également réduite avec la WD. L'ensemble de ces altérations stimulées par la WD peuvent avoir contribué à la diminution de la captation du

cholestérol par le foie, ce qui a favorisé l'augmentation du cholestérol en circulation. En résumé, le transport de cholestérol via les HDL, le transport du cholestérol par les résidus de chylomicrons et de VLDLs ainsi que le transport des LDL-cholestérol sont toutes des voies importantes du métabolisme du cholestérol qui sont potentiellement affectées par la WD .

La diminution de l'expression des gènes codant pour les LDL-R, PCSK9 et SREBP2 engendre une réduction de leurs effets sur la régulation du transport des LDL-cholestérol. Comme LDLr sont présents majoritairement (70%) au foie, il est évident que le foie joue un rôle primordial dans la captation des particules de LDL en circulation (Niesen et al., 2008). L'augmentation plasmatique de cholestérol observée chez les groupes nourris avec la WD (indépendamment de la durée) pourrait ainsi être liée à la diminution de l'expression des LDLr.

HMGCAR, l'enzyme limitante de la synthèse endogène de cholestérol, est entre autres régulée positivement par le facteur de transcription SREBP2 (Goldstein & Brown, 1990; Song et al., 2005). Comme HMGCAR et SREBP2 démontrent tous deux une réduction de leur expression génique dans les groupes nourris avec la WD, cela peut suggérer que la voie de synthèse de cholestérol est inhibée dans le foie. De plus, l'ACAT-2, une enzyme impliquée dans l'estérification du cholestérol (Ichigo et al., 2019), est également inhibée par la WD comparativement à la diète conventionnelle. Ces résultats en lien avec la voie de synthèse du cholestérol soutiennent notre hypothèse selon laquelle une WD, même si consommée pendant une courte durée, augmente significativement les niveaux de TG dans le foie; ce qui perturbe les voies du métabolisme du cholestérol dont la voie de synthèse endogène de cholestérol.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que la WD, malgré qu'elle ne contienne pas un apport important en cholestérol alimentaire (0.15% de la composition de la diète), altère les mécanismes de régulation du cholestérol dans le foie. La composition élevée en fructose (17,5%) et lipides (40%) de la diète mène rapidement à une augmentation importante des triglycérides hépatiques, ce qui pourrait causer l'altération des mécanismes de régulation du cholestérol dans le foie. D'un point de vue clinique, ces résultats suggèrent qu'une hausse du cholestérol plasmatique pourrait également être lié au métabolisme des lipides au foie.

Les concentrations plasmatiques de cholestérol augmentent avec la WD comparativement à ceux des animaux soumis à la diète conventionnelle et la HFD après 2 et 6 semaines. Plusieurs de nos résultats suggèrent que cette hausse de cholestérol plasmatique est attribuable à une réduction de la captation du cholestérol par le foie. L'accumulation de triglycérides au foie est possiblement un des facteurs qui induit la réduction de l'expression génique des marqueurs dans la voie des LDLr. Tel que mentionné précédemment, la stéatose hépatique pourrait engendrer l'altération de l'expression des gènes tel que LDLr, PCSK9 et SREBP2, qui pourrait conséquemment réduire le nombre de LDLr à la surface des hépatocytes. Avec une activité plus faible des LDLr, la captation du cholestérol plasmatique par le foie serait donc réduite, ce qui favorise l'accumulation en circulation.

L'expression de l'enzyme HMGCoAR, enzyme limitante dans la synthèse de cholestérol endogène (Goldstein & Brown, 1990), est réduite significativement après 2 et 6 semaines. Il y a même une réduction significative chez les animaux nourris avec la WD comparativement aux niveaux mesurés chez les rats soumis à la HFD. De plus, malgré que la voie de synthèse de cholestérol est potentiellement inhibée par la réduction de l'expression de l'HMGCoAr dans le foie, les concentrations de cholestérol hépatique tendent vers une augmentation en réponse à la WD. Le cholestérol en soi est un régulateur de l'expression de l'HMGCoAR par son action inhibitrice sur l'activité de SREBP2 (Song et al., 2005). Une hausse transitoire du cholestérol hépatique pourrait expliquer la réduction de l'expression de HMGCoAR. Cette hausse transitoire pourrait par ailleurs être expliquée par la réduction de l'expression génique des transporteurs ABCG5/G8 observée suite au traitement avec la WD. L'activité de ces transporteurs consiste à relocaliser le cholestérol non estérifié du foie vers le canal biliaire où il pourra servir de constituants à la bile et potentiellement être éliminé de l'organisme (Oude & Groen, 2002). Conséquemment, une réduction de la concentration de ces transporteurs pourrait induire une diminution de l'élimination du cholestérol hépatique, ce qui favoriserait en retour l'accumulation du cholestérol dans les hépatocytes. Il a déjà été rapporté que la consommation de fructose, comme c'est le cas avec la WD, augmente le cholestérol hépatique en réduisant l'expression des transporteurs ABCG5/G8 (Ichigo et al., 2019).

L'accumulation de triglycérides hépatiques après 2 semaines est significativement plus importante avec la WD (40% lipides) que la HFD (60% lipides). Le fructose présent dans la WD semble ainsi jouer un rôle dans cette accumulation de lipides dans le foie. Le fructose induirait ces effets en favorisant l'expression d'enzymes de la voie de la lipogenèse *de novo* (Flowers & Ntambi, 2009). Chez les animaux soumis à 2 semaines de WD, nous avons observé une augmentation significative de l'expression d'ACC et de ChREBP, deux enzymes importantes dans la régulation de la lipogenèse *de novo* (Abdul-Wahed et al., 2017; Wakil & Abu-Elheiga, 2009). Ces mesures suggèrent que la WD, en plus de favoriser l'accumulation de lipides provenant de la diète, promeut l'accumulation de lipides dans le foie via la voie de la lipogenèse *de novo*, ce qui altère possiblement le métabolisme du cholestérol au foie.

## **4.2 Effet de la durée de la diète sur l'accumulation de lipides au foie**

La présente étude a pour but de confirmer l'observation selon laquelle une durée courte de 2 semaines de diète obésogène peut causer une accumulation rapide de lipides dans le foie. On suppose ainsi que les effets après 2 semaines permettent d'observer des changements rapides dans le métabolisme hépatique du cholestérol tout en limitant les effets perturbateurs des autres systèmes de l'animal. L'ajout de groupes de 6 semaines a permis d'observer que les changements du métabolisme du cholestérol perduraient dans le temps.

Il a été observé que la HFD (60% lipides) ou WD (40% lipides, 17.5% fructose) induit une augmentation des triglycérides dans le foie équivalente après 2 et 6 semaines. Une étude a précédemment fait état d'une augmentation des triglycérides hépatiques en réponse à une diète riche en lipides de courte durée (Magri-Tomaz et al., 2018). L'une des interprétations retenues est que le foie agit comme « tampon » face à cet apport important de triglycérides (Gauthier et al., 2006). L'action de captation de l'excès de lipides par le foie crée ainsi un effet de protection en limitant l'accumulation de triglycérides dans le plasma, ce qui réduirait les effets sur les organes en périphérie. Dans notre étude, on observe par ailleurs aucun changement significatif dans les niveaux de triglycérides plasmatiques après 2 semaines, que ce soit la WD ou HFD.

En plus de permettre une rapide accumulation de triglycérides dans le foie, la courte durée de l'étude a permis de minimiser les effets métaboliques d'une diète obésogène tel que le gain de tissus adipeux. Le poids corporel des animaux après 2 semaines ne présentait pas de différence significative entre les diètes. Par contre, après 6 semaines, les rats nourris à la HFD ou WD étaient plus lourds d'environ 50g comparativement à ceux nourris avec la diète conventionnelle. De plus, la somme des dépôts adipeux abdominaux et sous-cutanés était approximativement 3 fois plus importante après 6 semaines (20g) que celle obtenue après 2 semaines (7g) de traitement. Malgré ces différences de composition corporelle en raison d'un effet de durée, les niveaux de triglycérides au foie étaient similaires pour les 2 diètes après 2 et 6 semaines. Ces éléments appuient la valeur scientifique de notre modèle expérimental d'une durée de 2 semaines dans le but de réduire les effets métaboliques généraux et d'isoler les effets dus à l'accumulation de lipides dans le foie.

### **4.3 Différences entre les effets de la diète riche en lipides et de la diète Western**

Une des hypothèses de cette étude est que l'accumulation en excès de lipides au foie perturbe le métabolisme du cholestérol différemment selon si la stéatose hépatique est induite par une diète riche en lipides ou une diète Western. La principale observation est que les rats soumis à une WD durant seulement 2 semaines ont eu une réduction de l'expression génique de plusieurs marqueurs du métabolisme du cholestérol dans le foie. En effet, chez les animaux soumis à la WD, l'expression de LDLr, PCSK9, SREBP2 et HMGCoAR est réduite comparativement à celle des animaux nourris avec la HFD et la diète conventionnelle. Ainsi, malgré que l'on observe une stéatose hépatique en réponse aux deux diètes, les marqueurs du métabolisme du cholestérol au foie sont affectés différemment.

Une différence majeure entre les deux diètes obésogènes est le contenu en fructose de la WD. Le fructose a été rapporté pour stimuler la synthèse de l'ensemble des enzymes de la voie de la lipogenèse *de novo* (Janevski et al., 2012; Softic et al., 2016). Dans le but de créer de nouveaux



triglycérides par cette voie, il est nécessaire de faire la synthèse de malonyl-CoA, un intermédiaire clé dans la lipogenèse *de novo*. Avec la HFD, la synthèse de malonyl-CoA n'est pas nécessaire augmentée puisque l'accumulation de lipides au foie provient en théorie majoritairement de l'apport alimentaire. Comme le malonyl-coA est un inhibiteur important de l'oxydation mitochondriale (Foster, 2012), l'augmentation des niveaux de malonyl-CoA avec la WD peut indirectement contribuer à une augmentation plus importante de l'accumulation de lipides dans le foie. De plus, le métabolisme du fructose et celui du cholestérol utilisent tous deux des acétyl-CoA comme précurseur de la synthèse de triglycérides et de cholestérol respectivement. Malgré que d'autres gènes sont possiblement impliqués, cette interaction entre ces deux métabolismes pourrait expliquer la réduction de l'expression de l'enzyme HMGCoAR avec la WD par rapport à la HFD après une durée de 2 semaines.

Les résultats indiquent en plus une différence entre les deux diètes en ce qui concerne l'expression des transporteurs ABCG5/G8. Ces transporteurs sont présents à la membrane canaliculaire et permettent l'exportation du cholestérol estérifié vers le canal biliaire où il pourra par la suite être éliminé dans les selles (Oude & Groen, 2002). La HFD favorise l'expression des transporteurs ABCG5/G8 alors que l'effet inverse est observé en réponse à la WD. Ceci suggère que l'apport en fructose, qui différencie la WD de la HFD, inhibe la voie d'élimination du cholestérol hépatique en réduisant l'expression des transporteurs ABCG5/G8. Cette inhibition pourrait être l'une des causes favorisant l'augmentation du cholestérol hépatique observée chez les animaux après 6 semaines de WD.

#### **4.4 Limitations de l'étude**

Notre projet a permis de répondre à notre question de recherche première à savoir si la stéatose hépatique altère les mécanismes de régulation du cholestérol au foie. Toutefois, notre réponse n'est pas complète et certains éléments pourraient être améliorés ou approfondis afin d'avoir une vision d'ensemble de la problématique.

D'abord, comme la stéatose hépatique est un processus qui affecte plusieurs systèmes (Byrne & Targher, 2015), nous supposons que notre modèle expérimental de courte durée restreint les effets dans le foie. Notre modèle nous permettait d'induire une stéatose rapidement et de limiter par exemple l'augmentation de tissus adipeux. Comme l'excès de tissus adipeux amène souvent une altération des adipokines et affecte la progression de la stéatose hépatique (Polyzos et al., 2016), une augmentation non significative entre les diètes a permis de réduire son impact sur le foie. Notre modèle est intégratif, toutefois, il n'est pas parfait et comme il ne s'agit pas de cellules isolées, il est fort probable que d'autres organes aient affectés les mécanismes de régulation du cholestérol dans le foie.

Nous ne pouvons pas non plus ignorer l'impact possible d'une HFD ou WD sur la sécrétion pancréatique d'insuline. Afin de s'assurer d'avoir réduit les impacts en périphérie, d'autres analyses éventuelles seraient nécessaires dans le but de vérifier l'efficacité d'une durée courte de 2 semaines. Dans cette optique, des mesures de la glycémie des sujets seraient également à retenir. Le métabolisme du glucose étant intimement lié à celui des lipides et du cholestérol, ces analyses seraient complémentaires à notre projet d'étude et permettraient d'avoir une meilleure vue d'ensemble des altérations ou non causées par les diètes riches en lipides et Western. La résistance à l'insuline étant souvent nommé comme cause primaire dans la formation de stéatose au foie (Byrne & Targher, 2015; Marchesini et al., 1999), il s'agirait d'une piste à approfondir. Aussi, malgré que la composition en protéine des diètes soit semblable, le fait que les rats appartenant au groupe HFD et WD aient une prise alimentaire plus faible par rapport à ceux de la diète contrôle crée une différence dans l'apport protéique. Certaines études dont celle de Dharavath et ses collègues indique également des altérations du métabolisme des lipides et du cholestérol lorsque les rats sont soumis à des diètes riches en lipides et pauvres en protéine (Dharavath et al., 2019). Je pense que pour de prochaines études, il serait pertinent de modifier les apports protéiques des diètes riches en lipides et/ou en fructose afin de limiter l'effet de l'apport protéique sur nos résultats.

## 4.5 Conclusion

Ce projet d'étude a permis de mieux comprendre les altérations du métabolisme du cholestérol au foie en cas de stéatose hépatique induite par une diète enrichie en lipides ou en lipides et en sucrose. Nous avons confirmé que des changements d'expression génique de plusieurs marqueurs du métabolisme du cholestérol dans le foie sont détectés après seulement 2 semaines de WD. Ainsi, LDLr, PCSK9, SREBP2 et HMGCoAR sont tous des régulateurs importants dans les voies du métabolisme du cholestérol et leur expression est altérée en présence de WD. De plus, une diminution de l'expression des marqueurs du métabolisme du cholestérol a été observée avec la diète Western comparativement à la diète riche en lipides et ce, même si les deux diètes induisaient une stéatose hépatique. L'augmentation de la synthèse des enzymes de la voie de la lipogenèse *de novo* induite par le fructose de la diète Western pourrait en partie expliquer les différences obtenues entre les deux diètes obésogènes. Le métabolisme du glucose, l'inflammation et la résistance à l'insuline sont des éléments qui seront à privilégier dans les recherches futures afin de mieux cibler les effets du foie dans la stéatose hépatique. De plus, le microbiote intestinale est également un paramètre à inclure dans les prochaines études en raison de son influence sur la production d'acides biliaires secondaires tel que mentionné dans la revue de littérature. Dans ce projet, l'activité physique aurait également pu être utilisée afin de déterminer si les altérations de la diète Western sont atténuées par l'exercice. Il n'a malheureusement pas été possible d'utiliser l'activité physique dans ce projet, mais certaines études suggèrent déjà la pratique de sport d'endurance comme traitement de la NAFLD (Henriksen, 2006). En tant que kinésiologue, je me questionne à savoir si les impacts d'une diète Western peuvent être atténués par l'exercice. Plus précisément, il serait intéressant de mesurer si les recommandations en activité physique (150 min/semaine) influencent l'altération des mécanismes de régulation des lipides au foie en cas d'apport important de lipides et de fructose (Tremblay et al., 2011).

## Références bibliographiques

- Abdul-Wahed, A., Guilmeau, S., & Postic, C. (2017). Sweet Sixteenth for ChREBP: Established Roles and Future Goals. *Cell Metabolism*, 26(2), 324–341. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.07.004>
- Alemi, F., Poole, D. P., Chiu, J., Schoonjans, K., Cattaruzza, F., Grider, J. R., Bunnett, N. W., & Corvera, C. U. (2013). The Receptor TGR5 Mediates the Prokinetic Actions of Intestinal Bile Acids and Is Required for Normal Defecation in Mice. *Gastroenterology*, 144(1), 145–154. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.09.055>
- Altmann, S. W. (2004). Niemann-Pick C1 Like 1 Protein Is Critical for Intestinal Cholesterol Absorption. *Science*, 303(5661), 1201–1204. <https://doi.org/10.1126/science.1093131>
- Alzahrani, B., Iseli, T., Ramezani-Moghadam, M., Ho, V., Wankell, M., Sun, E. J., Qiao, L., George, J., & Hebbard, L. W. (2018). The role of AdipoR1 and AdipoR2 in liver fibrosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1864(3), 700–708. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.12.012>
- Ameer, F., Scanduzzi, L., Hasnain, S., Kalbacher, H., & Zaidi, N. (2014). De novo lipogenesis in health and disease. *METABOLISM CLINICAL AND EXPERIMENTAL*, 8.
- Anwer, M. S. (2004). Cellular regulation of hepatic bile acid transport in health and cholestasis. *Hepatology*, 39(3), 581–590. <https://doi.org/10.1002/hep.20090>
- Arguello, G., Balboa, E., Arrese, M., & Zanlungo, S. (2015). Recent insights on the role of cholesterol in non-alcoholic fatty liver disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1852(9), 1765–1778. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.05.015>

- Arita, Y., Kihara, S., Ouchi, N., Takahashi, M., Maeda, K., Miyagawa, J., Hotta, K., Shimomura, I., Nakamura, T., Miyaoka, K., Kuriyama, H., Nishida, M., Yamashita, S., Okubo, K., Matsubara, K., Muraguchi, M., Ohmoto, Y., Funahashi, T., & Matsuzawa, Y. (1999). Paradoxical Decrease of an Adipose-Specific Protein, Adiponectin, in Obesity. *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS*, 257(1), 5.
- Ballatori, N., Christian, W. V., Lee, J. Y., Dawson, P. A., Soroka, C. J., Boyer, J. L., Madejczyk, M. S., & Li, N. (2005). OST $\alpha$ -OST $\beta$ : A major basolateral bile acid and steroid transporter in human intestinal, renal, and biliary epithelia. *Hepatology*, 42(6), 1270–1279. <https://doi.org/10.1002/hep.20961>
- Barter, Brewer H. Bryan, Chapman M. John, Hennekens Charles H., Rader Daniel J., & Tall Alan R. (2003). Cholesteryl Ester Transfer Protein. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(2), 160–167. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000054658.91146.64>
- Basaranoglu, M., Kayacetin, S., Yilmaz, N., Kayacetin, E., Tarcin, O., & Sonsuz, A. (2010). Understanding mechanisms of the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 16(18), 2223–2226. <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i18.2223>
- Benedetti', A., Bassotti', C., Rapine', K., Marucci', L., & Jezequel, A. M. (1996). *A morphometric study of the epithelium lining the rat intrahepatic biliary tree*. 8.
- Bergo, M., Olivecrona, G., & Olivecrona, T. (1996). Diurnal rhythms and effects of fasting and refeeding on rat adipose tissue lipoprotein lipase. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 271(6), E1092–E1097. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1996.271.6.E1092>

- Boyer, J. L. (2013). Bile Formation and Secretion. *Comprehensive Physiology*, 3(3), 1035–1078.  
<https://doi.org/10.1002/cphy.c120027>
- Brown, & Goldstein. (1997). The SREBP Pathway: Regulation of Cholesterol Metabolism by Proteolysis of a Membrane-Bound Transcription Factor. *Cell*, 89(3), 331–340.  
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80213-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80213-5)
- Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, 232(4746), 34–47. <https://doi.org/10.1126/science.3513311>
- Bunnett, N. W. (2014). Neuro-humoral signalling by bile acids and the TGR5 receptor in the gastrointestinal tract. *The Journal of Physiology*, 592(Pt 14), 2943–2950.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.271155>
- Byrne, C. D., & Targher, G. (2015). NAFLD: A multisystem disease. *Journal of Hepatology*, 62(1 Suppl), S47-64. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.12.012>
- Calamita, G., Ferri, D., Gena, P., Liquori, G. E., Cavalier, A., Thomas, D., & Svelto, M. (2005). The Inner Mitochondrial Membrane Has Aquaporin-8 Water Channels and Is Highly Permeable to Water. *Journal of Biological Chemistry*, 280(17), 17149–17153.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.C400595200>
- Calamita, G., Moreno, M., Ferri, D., Silvestri, E., Roberti, P., Schiavo, L., Gena, P., Svelto, M., & Goglia, F. (2007). Triiodothyronine modulates the expression of aquaporin-8 in rat liver mitochondria. *Journal of Endocrinology*, 11.
- Carbrey, J. M., Gorelick-Feldman, D. A., Kozono, D., Praetorius, J., Nielsen, S., & Agre, P. (2003). Aquaglyceroporin AQP9: Solute permeation and metabolic control of expression in liver.

*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(5), 2945–2950. <https://doi.org/10.1073/pnas.0437994100>

Carlton, V. E. H., Harris, B. Z., Puffenberger, E. G., Batta, A. K., Knisely, A. S., Robinson, D. L., Strauss, K. A., Shneider, B. L., Lim, W. A., Salen, G., Morton, D. H., & Bull, L. N. (2003). Complex inheritance of familial hypercholanemia with associated mutations in TJP2 and BAAT. *Nature Genetics*, 34(1), 91–96. <https://doi.org/10.1038/ng1147>

Caron, S., Huaman Samanez, C., Dehondt, H., Ploton, M., Briand, O., Lien, F., Dorchies, E., Dumont, J., Postic, C., Cariou, B., Lefebvre, P., & Staels, B. (2013). Farnesoid X Receptor Inhibits the Transcriptional Activity of Carbohydrate Response Element Binding Protein in Human Hepatocytes. *Molecular and Cellular Biology*, 33(11), 2202–2211. <https://doi.org/10.1128/MCB.01004-12>

Chávez-Talavera, O., Tailleux, A., Lefebvre, P., & Staels, B. (2017). Bile Acid Control of Metabolism and Inflammation in Obesity, Type 2 Diabetes, Dyslipidemia, and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*, 152(7), 1679-1694.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.01.055>

Chen, L., Mei-Yan Ma, Ming Sun, Lu-Yi Jiang, Zhao, X.-T., Xian-Xiu Fang, Man Lam, S., Guang-Hou Shui, Jie Luo, Xiong-Jie Shi, & Bao-Liang Song. (2019). *Endogenous sterol intermediates of the mevalonate pathway regulate HMG-CoA reductase degradation and SREBP-2 processing*. 40. <https://doi.org/10.1194/jlr.RA119000201>

Cohen. (2009a). *The liver: Biology and pathobiology* (5. ed., 1. impr). Wiley-Blackwell.

Cohen, D. E. (2009b). Lipoprotein Metabolism and Cholesterol Balance. In *The Liver* (pp. 271–285). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470747919.ch19>

- Cohen, S. M., Werrmann, J. G., & Tota, M. R. (1998). <sup>13</sup>C NMR study of the effects of leptin treatment on kinetics of hepatic intermediary metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(13), 7385–7390.
- Considine, R. V., Kriauciunas, A., Ohannesian, J. P., & Bauer, T. L. (1996). Serum Immunoreactive-Leptin Concentrations in Normal-Weight and Obese Humans. *THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE*, *334*(5), 4.
- Cooper, A. D. (1997). Hepatic uptake of chylomicron remnants. *Journal of Lipid Research*, *38*(11), 2173–2192.
- Coppari, R., & Bjørnbæk, C. (2012). The Potential of Leptin for Treating Diabetes and Its Mechanism of Action. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *11*(9), 692–708.  
<https://doi.org/10.1038/nrd3757>
- Craddock, A. L., Love, M. W., Daniel, R. W., Kirby, L. C., Walters, H. C., Wong, M. H., & Dawson, P. A. (1998). *Expression and transport properties of the human ileal and renal sodium-dependent bile acid transporter*. 13.
- Crosignani, A., Del Puppo, M., Longo, M., De Fabiani, E., Caruso, D., Zuin, M., Podda, M., Javitt, N. B., & Kienle, M. G. (2007). Changes in classic and alternative pathways of bile acid synthesis in chronic liver disease. *Clinica Chimica Acta*, *382*(1), 82–88.  
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2007.03.025>
- Cyr, Y., Wassef, H., Bissonnette, S., Lamantia, V., Davignon, J., & Faraj, M. (2016). WAT apoC-I secretion: Role in delayed chylomicron clearance in vivo and ex vivo in WAT in obese subjects. *Journal of Lipid Research*, *57*(6), 1074–1085.  
<https://doi.org/10.1194/jlr.P064170>



- Dawson, P. A., Hubbert, M. L., & Rao, A. (2010). Getting the mOST from OST: Role of organic solute transporter, OST $\alpha$ -OST $\beta$ , in bile acid and steroid metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1801(9), 994–1004. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2010.06.002>
- Day, C. P., & James, O. F. W. (1998). Steatohepatitis: A tale of two “hits”? *Gastroenterology*, 114(4), 842–845. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(98\)70599-2](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(98)70599-2)
- de Meijer, V. E., Le, H. D., Meisel, J. A., Sharif, M. R. A., Pan, A., Nosé, V., & Puder, M. (2010). Dietary fat intake promotes the development of hepatic steatosis independently from excess caloric consumption in a murine model. *Metabolism*, 59(8), 1092–1105. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2009.11.006>
- de Vree, J. M. L., Jacquemin, E., Sturm, E., Cresteil, D., Bosma, P. J., Aten, J., Deleuze, J.-F., Desrochers, M., Burdelski, M., Bernard, O., Elferink, R. P. J. O., & Hadchouel, M. (1998). Mutations in the MDR3 gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(1), 282–287.
- Dharavath, R. N., Arora, S., Bishnoi, M., Kondepudi, K. K., & Chopra, K. (2019). High fat-low protein diet induces metabolic alterations and cognitive dysfunction in female rats. *Metabolic Brain Disease*, 34(6), 1531–1546. <https://doi.org/10.1007/s11011-019-00459-4>
- Dijkers, A., & Tietge, U. J. (2010). Biliary cholesterol secretion: More than a simple ABC. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 16(47), 5936–5945. <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i47.5936>

- Duane, W. C., & Javitt, N. B. (1999). 27-Hydroxycholesterol: Production rates in normal human subjects. *Journal of Lipid Research*, *40*(7), 1194–1199.
- Duparc, T., Ruidavets, J.-B., Genoux, A., Ingueneau, C., Najib, S., Ferrières, J., Perret, B., & Martinez, L. O. (2020). Serum level of HDL particles are independently associated with long-term prognosis in patients with coronary artery disease: The GENES study. *Scientific Reports*, *10*(1), 8138. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65100-2>
- Elkjær, M.-L., Vajda, Z., Nejsum, L. N., Kwon, T.-H., Jensen, U. B., Amiry-Moghaddam, M., Frøkiær, J., & Nielsen, S. (2000). Immunolocalization of AQP9 in Liver, Epididymis, Testis, Spleen, and Brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *276*(3), 1118–1128. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3505>
- Ertle, J., Dechene, A., Sowa, J.-P., Penndorf, V., Herzer, K., Kaiser, G., Schlaak, J. F., Gerken, G., Syn, W.-K., & Canbay, A. (2011). Non-alcoholic fatty liver disease progresses to hepatocellular carcinoma in the absence of apparent cirrhosis. *Int. J. Cancer*, *8*.
- Ferris, W., & Crowther, N. (2011). Once fat was fat and that was that: Our changing perspectives on adipose tissue. *Cardiovascular Journal of Africa*, *22*(3), 147–154. <https://doi.org/10.5830/CVJA-2010-083>
- Fielding, P. E., & Fielding, C. J. (2002). *Dynamics of lipoprotein transport in the human circulatory system*. 26.
- Fisher, E. A., & Ginsberg, H. N. (2002). Complexity in the Secretory Pathway: The Assembly and Secretion of Apolipoprotein B-containing Lipoproteins. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(20), 17377–17380. <https://doi.org/10.1074/jbc.R100068200>

- Flowers, M. T., & Ntambi, J. M. (2009). Stearoyl-CoA Desaturase and its Relation to High-Carbohydrate Diets and Obesity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1791(2), 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2008.12.011>
- Foster, D. W. (2012). Malonyl-CoA: The regulator of fatty acid synthesis and oxidation. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(6), 1958–1959. <https://doi.org/10.1172/JCI63967>
- Foufelle, F., Ferré, P., & Foretz, M. (2000). SREBP-1c: Un médiateur des effets transcriptionnels de l'insuline dans le foie. *M/S. Médecine sciences [revue papier, ISSN : 0767-0974]*, 2000, Vol. 16, N° 4; p.559-61. <https://doi.org/10.4267/10608/1691>
- Frazier-Wood, A. C., Kabagambe, E. K., Wojczynski, M. K., Borecki, I. B., Tiwari, H. K., Smith, C. E., Ordovas, J. M., & Arnett, D. K. (2013). The Association Between LRP-1 Variants and Chylomicron Uptake After a High Fat Meal. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases : NMCD*, 23(11). <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2012.12.007>
- Fuor, E. V., & Gafencu, A. V. (2019). Apolipoprotein C1: Its Pleiotropic Effects in Lipid Metabolism and Beyond. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23). <https://doi.org/10.3390/ijms20235939>
- Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., & Abedinzadeh, Z. (2003). *Espèces réactives de l'oxygène*. 6.
- Garlatti, M., & Barouki, R. (2002). *Le stress du réticulum endoplasmique: Adaptation et toxicité*. 18, 10.
- Garruti, G., Wang, H. H., Bonfrate, L., & de Bari, O. (2012). A Pleiotropic Role for the Orphan Nuclear Receptor Small Heterodimer Partner in Lipid Homeostasis and Metabolic Pathways. *Journal of Lipids*, 23.

- Gaussin, V., Skarlas, P., Ching, Y. P., Hardie, D. G., & Hue, L. (1997). Distinct type-2A protein phosphatases activate HMGCoA reductase and acetyl-CoA carboxylase in liver. *FEBS Letters*, *413*(1), 115–118. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00890-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00890-9)
- Gauthier, M.-S., Favier, R., & Lavoie, J.-M. (2006). Time course of the development of non-alcoholic hepatic steatosis in response to high-fat diet-induced obesity in rats. *The British Journal of Nutrition*, *95*(2), 273–281. <https://doi.org/10.1079/bjn20051635>
- Gautier, T., Masson, D., Barros, J.-P. P. de, Athias, A., Gambert, P., Aunis, D., Metz-Boutigue, M.-H., & Lagrost, L. (2000). Human Apolipoprotein C-I Accounts for the Ability of Plasma High Density Lipoproteins to Inhibit the Cholesteryl Ester Transfer Protein Activity. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(48), 37504–37509. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007210200>
- Gibbons, G. F., Wiggins, D., Brown, A.-M., & Hebbachi, A.-M. (2004). Synthesis and function of hepatic very-low-density lipoprotein. *Biochemical Society Transactions*, *32*(Pt 1), 59–64. <https://doi.org/10.1042/bst0320059>
- Goldstein, & Brown. (1990). *Regulation of the mavalonate pathway*.
- Gradilone, S. A., Carreras, F. I., Lehmann, G. L., & Marinelli, R. A. (2005). Phosphoinositide 3-kinase is involved in the glucagon-induced translocation of aquaporin-8 to hepatocyte plasma membrane. *Biology of the Cell*, *97*(11), 831–836. <https://doi.org/10.1042/BC20040115>
- Gradilone, S. A., García, F., Huebert, R. C., Tietz, P. S., Larocca, M. C., Kierbel, A., Carreras, F. I., LaRusso, N. F., & Marinelli, R. A. (2003). Glucagon induces the plasma membrane insertion of functional aquaporin-8 water channels in isolated rat hepatocytes. *Hepatology*, *37*(6), 1435–1441. <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50241>

- Graf, G. A., Yu, L., Li, W.-P., Gerard, R., Tuma, P. L., Cohen, J. C., & Hobbs, H. H. (2003). ABCG5 and ABCG8 Are Obligate Heterodimers for Protein Trafficking and Biliary Cholesterol Excretion. *Journal of Biological Chemistry*, 278(48), 48275–48282. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310223200>
- Greevenbroek, M. M. J. van, Robertus-Teunissen, M. G., Erkelens, D. W., & Bruin, T. W. A. de. (1998). Participation of the microsomal triglyceride transfer protein in lipoprotein assembly in Caco-2 cells: Interaction with saturated and unsaturated dietary fatty acids. *Journal of Lipid Research*, 39(1), 173–185.
- Guglielmi, V., & Sbraccia, P. (2018). Obesity phenotypes: Depot-differences in adipose tissue and their clinical implications. *Eating and Weight Disorders - Studies on Anorexia, Bulimia and Obesity*, 23(1), 3–14. <https://doi.org/10.1007/s40519-017-0467-9>
- Haghighpassand, M., Bourassa, P. A., Francone, O. L., & Aiello, R. J. (2001). Monocyte/macrophage expression of ABCA1 has minimal contribution to plasma HDL levels. *The Journal of Clinical Investigation*, 108(9), 1315–1320. <https://doi.org/10.1172/JCI12810>
- Handy, J. A., Fu, P. P., Kumar, P., Mells, J. E., Sharma, S., Saxena, N. K., & Anania, F. A. (2011). Adiponectin inhibits leptin signaling via multiple mechanisms to exert protective effects against hepatic fibrosis. *The Biochemical Journal*, 440(3), 385–395. <https://doi.org/10.1042/BJ20102148>
- Harach, T., Pols, T. W. H., Nomura, M., Maida, A., Watanabe, M., Auwerx, J., & Schoonjans, K. (2012). TGR5 potentiates GLP-1 secretion in response to anionic exchange resins. *Scientific Reports*, 2. <https://doi.org/10.1038/srep00430>

- Häussinger, D., & Kordes, C. (2019). Space of Disse: A stem cell niche in the liver. *Biological Chemistry*, 401(1), 81–95. <https://doi.org/10.1515/hsz-2019-0283>
- Hazard, S. E., & Patel, S. B. (2007). Sterolins ABCG5 and ABCG8: Regulators of whole body dietary sterols. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, 453(5), 745–752. <https://doi.org/10.1007/s00424-005-0040-7>
- Healy, G. N., Dunstan, D. W., Salmon, J., Cerin, E., Shaw, J. E., Zimmet, P. Z., & Owen, N. (2008). Breaks in Sedentary Time: Beneficial associations with metabolic risk. *Diabetes Care*, 31(4), 661–666. <https://doi.org/10.2337/dc07-2046>
- Heider, J. G., Pickens, C. E., & Kelly, L. A. (1983). Role of acyl CoA:cholesterol acyltransferase in cholesterol absorption and its inhibition by 57-118 in the rabbit. *Journal of Lipid Research*, 24(9), 1127–1134.
- Hellerstein, M., & Turner, S. (2014). Reverse cholesterol transport fluxes: *Current Opinion in Lipidology*, 25(1), 40–47. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000050>
- Henriksen, E. J. (2006). *Exercise training and the antioxidant  $\alpha$ -lipoic acid in the treatment of insulin resistance and type 2 diabetes*. 10.
- Hirano, T. (2018). Pathophysiology of Diabetic Dyslipidemia. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 25(9), 771–782. <https://doi.org/10.5551/jat.RV17023>
- Housset, C., Chrétien, Y., Debray, D., & Chignard, N. (2016). Functions of the Gallbladder. *Comprehensive Physiology*, 6, 29.
- Hui, D. Y., Labonté, E. D., & Howles, P. N. (2008). Development and Physiological Regulation of Intestinal Lipid Absorption. III. Intestinal transporters and cholesterol absorption.

*American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 294(4), G839–G843.

<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00061.2008>

Hultin, M., Savonen, R., & Olivecrona, T. (1996). Chylomicron metabolism in rats: Lipolysis, recirculation of triglyceride-derived fatty acids in plasma FFA, and fate of core lipids as analyzed by compartmental modelling. *Journal of Lipid Research*, 37(5), 1022–1036.

Ichigo, Y., Takeshita, A., Hibino, M., Nakagawa, T., Hayakawa, T., Patel, D., Field, C. J., & Shimada, M. (2019). High-fructose diet-induced hypertriglyceridemia is associated with enhanced hepatic expression of ACAT2 in rats. *Physiological Research*.

Inagaki, T., Choi, M., Moschetta, A., Peng, L., Cummins, C. L., McDonald, J. G., Luo, G., Jones, S. A., Goodwin, B., Richardson, J. A., Gerard, R. D., Repa, J. J., Mangelsdorf, D. J., & Kliewer, S. A. (2005). Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metabolism*, 2(4), 217–225.  
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.09.001>

Inazu, A., Brown, M. L., Hesler, C. B., Agellon, L. B., Koizumi, J., Takata, K., Maruhama, Y., Mabuchi, H., & Tall, A. R. (1990). *Increased High-Density Lipoprotein Levels Caused by a Common Cholesteryl-Ester Transfer Protein Gene Mutation* | *NEJM*.  
[https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJM199011013231803?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3Dwww.ncbi.nlm.nih.gov](https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJM199011013231803?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dwww.ncbi.nlm.nih.gov)

Ipsen, D. H., Lykkesfeldt, J., & Tveden-Nyborg, P. (2018). Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(18), 3313–3327. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2860-6>

- Janevski, M., Ratnayake, S., Siljanovski, S., McGlynn, M. A., Cameron-Smith, D., & Lewandowski, P. (2012). Fructose containing sugars modulate mRNA of lipogenic genes ACC and FAS and protein levels of transcription factors ChREBP and SREBP1c with no effect on body weight or liver fat. *Food & Function*, 3(2), 141–149. <https://doi.org/10.1039/C1FO10111K>
- Jong Miek C., Hofker Marten H., & Havekes Louis M. (1999). Role of ApoCs in Lipoprotein Metabolism. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 19(3), 472–484. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.19.3.472>
- Jornayvaz, F. R., & Shulman, G. I. (2012). Diacylglycerol Activation of Protein Kinase C $\epsilon$  and Hepatic Insulin Resistance. *Cell Metabolism*, 15(5), 574–584. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.03.005>
- Katz, A. (2007). Modulation of glucose transport in skeletal muscle by reactive oxygen species. *Journal of Applied Physiology*, 102(4), 1671–1676. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01066.2006>
- Kawamata, Y., Fujii, R., Hosoya, M., Harada, M., Yoshida, H., Miwa, M., Fukusumi, S., Habata, Y., Itoh, T., Shintani, Y., Hinuma, S., Fujisawa, Y., & Fujino, M. (2003). A G Protein-coupled Receptor Responsive to Bile Acids. *Journal of Biological Chemistry*, 278(11), 9435–9440. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209706200>
- Kleiner, D. E., Brunt, E. M., Natta, M. V., Behling, C., Contos, M. J., Cummings, O. W., Ferrell, L. D., Liu, Y.-C., Torbenson, M. S., Unalp-Arida, A., Yeh, M., McCullough, A. J., & Sanyal, A. J. (2005). Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 41(6), 1313–1321. <https://doi.org/10.1002/hep.20701>



- Kozyraki, R., Fyfe, J., Kristiansen, M., Gerdes, C., Jacobsen, C., Cui, S., Christensen, E. I., Aminoff, M., de la Chapelle, A., Krahe, R., Verroust, P. J., & Moestrup, S. K. (1999). The intrinsic factor–vitamin B12 receptor, cubilin, is a high-affinity apolipoprotein A-I receptor facilitating endocytosis of high-density lipoprotein. *Nature Medicine*, *5*(6), 656–661. <https://doi.org/10.1038/9504>
- Kushwaha, R. S., Hasan, S. Q., McGill, H. C., Getz, G. S., Dunham, R. G., & Kanda, P. (1993). Characterization of cholesteryl ester transfer protein inhibitor from plasma of baboons (*Papio sp.*). *Journal of Lipid Research*, *34*(8), 1285–1297.
- Lade, A., Noon, L. A., & Friedman, S. L. (2014). Contributions of metabolic dysregulation and inflammation to nonalcoholic steatohepatitis, hepatic fibrosis, and cancer. *Current Opinion in Oncology*, *26*(1), 100–107. <https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000042>
- Landis, B. A., Rotolo, F. S., Meyers, W. C., Clark, A. B., & Quarfordt, S. H. (1987). *Influence of apolipoprotein E on soluble and heparin-immobilized hepatic lipase*. 6.
- Larsson, M., Vorrjö, E., Talmud, P., Lookene, A., & Olivecrona, G. (2013). Apolipoproteins C-I and C-III Inhibit Lipoprotein Lipase Activity by Displacement of the Enzyme from Lipid Droplets. *The Journal of Biological Chemistry*, *288*(47), 33997–34008. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.495366>
- Lavoie, J.-M. (2016). Dynamics of hepatic and intestinal cholesterol and bile acid pathways: The impact of the animal model of estrogen deficiency and exercise training. *World Journal of Hepatology*, *8*(23), 961–975. <https://doi.org/10.4254/wjh.v8.i23.961>
- Lee, M.-H., Lu, K., Hazard, S., Yu, H., Shulenin, S., Hidaka, H., Kojima, H., Allikmets, R., Sakuma, N., Pegoraro, R., Srivastava, A. K., Salen, G., Dean, M., & Patel, S. B. (2001). Identification of a

- gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption. *Nature Genetics*, 27(1), 79–83. <https://doi.org/10.1038/83799>
- Lefebvre, P., Cariou, B., Lien, F., Kuipers, F., & Staels, B. (2009). Role of Bile Acids and Bile Acid Receptors in Metabolic Regulation. *Physiological Reviews*, 89(1), 147–191. <https://doi.org/10.1152/physrev.00010.2008>
- Li, T., Holmstrom, S. R., Kir, S., Umetani, M., Schmidt, D. R., Kliewer, S. A., & Mangelsdorf, D. J. (2011). The G Protein-Coupled Bile Acid Receptor, TGR5, Stimulates Gallbladder Filling. *Molecular Endocrinology*, 25(6), 1066–1071. <https://doi.org/10.1210/me.2010-0460>
- Liu, C., Tao, Q., Sun, M., Wu, J. Z., Yang, W., Jian, P., Peng, J., Hu, Y., Liu, C., & Liu, P. (2010). Kupffer cells are associated with apoptosis, inflammation and fibrotic effects in hepatic fibrosis in rats. *Laboratory Investigation*, 90(12), 1805–1816. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2010.123>
- Luc, G. (2007). Métabolisme des lipoprotéines de haute densité – Metabolism of high-density lipoproteins. *Métabolismes Hormones Diabètes et Nutrition*, 5.
- Luo, J., Jiang, L.-Y., Yang, H., & Song, B.-L. (2019). Intracellular Cholesterol Transport by Sterol Transfer Proteins at Membrane Contact Sites. *Trends in Biochemical Sciences*, 44(3), 273–292. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.10.001>
- Ma, Y., Ooi, T. C., Liu, M. S., Zhang, H., McPherson, R., Edwards, A. L., Forsythe, I. J., Frohlich, J., Brunzell, J. D., & Hayden, M. R. (1994). High frequency of mutations in the human lipoprotein lipase gene in pregnancy-induced chylomicronemia: Possible association with apolipoprotein E2 isoform. *Journal of Lipid Research*, 35(6), 1066–1075.

- Magri-Tomaz, L., Melbouci, L., Mercier, J., Ou, Y., Auclair, N., Lira, F. S., Lavoie, J.-M., & St-Pierre, D. H. (2018). Two weeks of high-fat feeding disturb lipid and cholesterol molecular markers. *Cell Biochemistry and Function*, 36(7), 387–393. <https://doi.org/10.1002/cbf.3358>
- Mansbach, C. M., & Siddiqi, S. A. (2010). The Biogenesis of Chylomicrons. *Annual Review of Physiology*, 72, 315–333. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135801>
- Marchesini, G., Brizi, M., Morselli-Labate, A. M., Bianchi, G., Bugianesi, E., McCullough, A. J., Forlani, G., & Melchionda, N. (1999). *Association of Nonalcoholic Fatty Liver Disease with Insulin Resistance*. 6.
- Marin, J. J. G., Macias, R. I. R., Briz, O., Banales, J. M., & Monte, M. J. (2016). Bile Acids in Physiology, Pathology and Pharmacology. *Bile Acids in Health and Disease*, 26.
- Marinelli, R. A., Tietz, P. S., Caride, A. J., Huang, B. Q., & LaRusso, N. F. (2003). *Water Transporting Properties of Hepatocyte Basolateral and Canalicular Plasma Membrane Domains*. 7.
- Maxwell, K. N., & Breslow, J. L. (2004). Adenoviral-mediated expression of Pcsk9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(18), 7100–7105. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402133101>
- Mayer, G., Poirier, S., & Seidah, N. G. (2008). Annexin A2 Is a C-terminal PCSK9-binding Protein That Regulates Endogenous Low Density Lipoprotein Receptor Levels. *Journal of Biological Chemistry*, 283(46), 31791–31801. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805971200>

- McCoy, M. G., Sun, G.-S., Marchadier, D., Maugeais, C., Glick, J. M., & Rader, D. J. (2002). Characterization of the lipolytic activity of endothelial lipase. *Journal of Lipid Research*, *43*(6), 921–929.
- Mead, J., Irvine, S., & Ramji, D. (2002). Lipoprotein lipase: Structure, function, regulation, and role in disease. *Journal of Molecular Medicine*, *80*(12), 753–769.  
<https://doi.org/10.1007/s00109-002-0384-9>
- Meier, P. J. (1995). Molecular mechanisms of hepatic bile salt transport from sinusoidal blood into bile. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, *269*(6), G801–G812. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1995.269.6.G801>
- Misra, S., Varticovski, L., & Arias, I. M. (2003). Mechanisms by which cAMP increases bile acid secretion in rat liver and canalicular membrane vesicles. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, *285*(2), G316–G324.  
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00048.2003>
- Nahon, S., Pariente, A., Pauwels, A., & Boruchowicz, A. (2010). *Nonlinear Distribution of Adiponectin in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease Limits Its Use in Linear Regression Analysis. 2.*
- Niesen, M., Bedi, M., & Lopez, D. (2008). Diabetes alters LDL receptor and PCSK9 expression in rat liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *470*(2), 111–115.  
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.11.009>
- Oude, E., & Groen, A. K. (2002). Genetic defects in hepatobiliary transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1586*(2), 129–145.  
[https://doi.org/10.1016/S0925-4439\(01\)00103-X](https://doi.org/10.1016/S0925-4439(01)00103-X)

- Oude, E., & Paulusma, C. C. (2007). Function and pathophysiological importance of ABCB4 (MDR3 P-glycoprotein). *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 453(5), 601–610. <https://doi.org/10.1007/s00424-006-0062-9>
- P. Segrest, J., K. Jones, M., E. Klon, A., J. Sheldahl, C., Hellinger, M., De Loof, H., & C. Harvey, S. (1999). A Detailed Molecular Belt Model for Apolipoprotein A-I in Discoidal High Density Lipoprotein. <http://www.jbc.org/content/274/45/31755.long>
- Packard, & Shepherd. (1997). Lipoprotein Heterogeneity and Apolipoprotein B Metabolism. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 17(12), 3542–3556. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.17.12.3542>
- Pandak, W. M., Vlahcevic, Z. R., Heuman, D. M., Redford, K. S., Chiang, J. Y. L., & Hylemon, P. B. (1994). Effects of different bile salts on steady-state mRNA levels and transcriptional activity of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase. *Hepatology*, 19(4), 941–947. <https://doi.org/10.1002/hep.1840190421>
- Pathak, P., Liu, H., Boehme, S., Xie, C., Krausz, K. W., Gonzalez, F., & Chiang, J. Y. L. (2017). Farnesoid X receptor induces Takeda G-protein receptor 5 cross-talk to regulate bile acid synthesis and hepatic metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 292(26), 11055–11069. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.784322>
- Pellicoro, A., Heuvel, F. A. J. van den, Geuken, M., Moshage, H., Jansen, P. L. M., & Faber, K. N. (2007). Human and rat bile acid–CoA:amino acid N-acyltransferase are liver-specific peroxisomal enzymes: Implications for intracellular bile salt transport. *Hepatology*, 45(2), 340–348. <https://doi.org/10.1002/hep.21528>

- Phung, T. L., Roncone, A., Jensen, K. L. de M., Sparks, C. E., & Sparks, J. D. (1997). Phosphoinositide 3-Kinase Activity Is Necessary for Insulin-dependent Inhibition of Apolipoprotein B Secretion by Rat Hepatocytes and Localizes to the Endoplasmic Reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 272(49), 30693–30702. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.49.30693>
- Poirier, S., Mamarbachi, M., Chen, W.-T., Lee, A. S., & Mayer, G. (2015). GRP94 Regulates Circulating Cholesterol Levels through Blockade of PCSK9-Induced LDLR Degradation. *Cell Reports*, 13(10), 2064–2071. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.11.006>
- Polyzos, S. A., Kountouras, J., & Mantzoros, C. S. (2015). Leptin in nonalcoholic fatty liver disease: A narrative review. *Metabolism*, 64(1), 60–78. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.10.012>
- Polyzos, S. A., Kountouras, J., & Mantzoros, C. S. (2016). Adipokines in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism*, 65(8), 1062–1079. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.11.006>
- Polyzos, S. A., Kountouras, J., & Zavos, C. (2009). *Nonalcoholic Fatty Liver Disease: The Pathogenetic Roles of Insulin Resistance and Adipocytokines*. 16.
- Praslickova, D., Torchia, E. C., Sugiyama, M. G., Magrane, E. J., Zwicker, B. L., Kolodzieyski, L., & Agellon, L. B. (2012). The ileal lipid binding protein is required for efficient absorption and transport of bile acids in the distal portion of the murine small intestine. *PloS One*, 7(12), e50810. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050810>
- Preiss, D., & Sattar, N. (2008). Non-alcoholic fatty liver disease: An overview of prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment considerations. *Clinical Science*, 115(5), 141–150. <https://doi.org/10.1042/CS20070402>

- Pullinger, C. R., Eng, C., Salen, G., Shefer, S., Batta, A. K., Erickson, S. K., Verhagen, A., Rivera, C. R., Mulvihill, S. J., Malloy, M. J., & Kane, J. P. (2002). Human cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (CYP7A1) deficiency has a hypercholesterolemic phenotype. *The Journal of Clinical Investigation*, *110*(1), 109–117. <https://doi.org/10.1172/JCI15387>
- Ra, M., Gl, L., Lr, S., & Mj, M. (2011). Hepatocyte aquaporins in bile formation and cholestasis. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, *16*, 2642–2652. <https://doi.org/10.2741/3877>
- Rader, D. J., Alexander, E. T., Weibel, G. L., Billheimer, J., & Rothblat, G. H. (2009). The role of reverse cholesterol transport in animals and humans and relationship to atherosclerosis. *Journal of Lipid Research*, *50*(Suppl), S189–S194. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800088-JLR200>
- Ranganathan, G., Unal, R., Pokrovskaya, I., Yao-Borengasser, A., Phanavanh, B., Lecka-Czernik, B., Rasouli, N., & Kern, P. A. (2006). The lipogenic enzymes DGAT1, FAS, and LPL in adipose tissue: Effects of obesity, insulin resistance, and TZD treatment. *Journal of Lipid Research*, *47*(11), 2444–2450. <https://doi.org/10.1194/jlr.M600248-JLR200>
- Repa, J. J., Berge, K. E., Pomajzl, C., Richardson, J. A., Hobbs, H., & Mangelsdorf, D. J. (2002). Regulation of ATP-binding Cassette Sterol Transporters ABCG5 and ABCG8 by the Liver X Receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Journal of Biological Chemistry*, *277*(21), 18793–18800. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109927200>
- Richter, E. A., & Hargreaves, M. (2013). Exercise, GLUT4, and Skeletal Muscle Glucose Uptake. *Physiol Rev*, *93*, 25.

- Ridlon, J. M., Kang, D.-J., & Hylemon, P. B. (2006). Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *Journal of Lipid Research*, *47*(2), 241–259. <https://doi.org/10.1194/jlr.R500013-JLR200>
- Romero-Gómez, M., Zelber-Sagi, S., & Trenell, M. (2017). Treatment of NAFLD with diet, physical activity and exercise. *Journal of Hepatology*, *67*(4), 829–846. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.05.016>
- Sanches, S. C. L., Ramalho, L. N. Z., Augusto, M. J., da Silva, D. M., & Ramalho, F. S. (2015). Nonalcoholic Steatohepatitis: A Search for Factual Animal Models. *BioMed Research International*, *2015*. <https://doi.org/10.1155/2015/574832>
- Saxena, N. K., & Anania, F. A. (2015). Adipocytokines and Hepatic Fibrosis. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, *26*(3), 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.01.002>
- Schofield, J. D., Liu, Y., Rao-Balakrishna, P., Malik, R. A., & Soran, H. (2016). Diabetes Dyslipidemia. *Diabetes Therapy*, *7*(2), 203–219. <https://doi.org/10.1007/s13300-016-0167-x>
- Schwarz, M., Russell, D. W., Dietschy, J. M., & Turley, S. D. (2001). Alternate pathways of bile acid synthesis in the cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase knockout mouse are not upregulated by either cholesterol or cholestyramine feeding. *Journal of Lipid Research*, *42*(10), 1594–1603.
- Seufert, J., Kieffer, T. J., & Habener, J. F. (1999). Leptin inhibits insulin gene transcription and reverses hyperinsulinemia in leptin-deficient ob/ob mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(2), 674–679.
- Shachter, N. S. (2001). Apolipoproteins C-I and C-III as important modulators of lipoprotein metabolism: *Current Opinion in Lipidology*, *12*(3), 297–304. <https://doi.org/10.1097/00041433-200106000-00009>



- Shively, C. A., Appt, S. E., Vitolins, M. Z., Uberseder, B., Michalson, K. T., Silverstein-Metzler, M. G., & Register, T. C. (2019). Mediterranean versus Western Diet Effects on Caloric Intake, Obesity, Metabolism, and Hepatosteatois in Nonhuman Primates. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 27(5), 777–784. <https://doi.org/10.1002/oby.22436>
- Slijepcevic, D., & van de Graaf, S. F. J. (2017). Bile Acid Uptake Transporters as Targets for Therapy. *Digestive Diseases (Basel, Switzerland)*, 35(3), 251–258. <https://doi.org/10.1159/000450983>
- Softic, S., Cohen, D. E., & Kahn, C. R. (2016). Role of Dietary Fructose and Hepatic De Novo Lipogenesis in Fatty Liver Disease. *Digestive Diseases and Sciences*, 61(5), 1282–1293. <https://doi.org/10.1007/s10620-016-4054-0>
- Song, B.-L., Javitt, N. B., & DeBose-Boyd, R. A. (2005). Insig-mediated degradation of HMG CoA reductase stimulated by lanosterol, an intermediate in the synthesis of cholesterol. *Cell Metabolism*, 1(3), 179–189. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.01.001>
- Soria, L. R., Gradilone, S. A., & Larocca, M. C. (2009). *Glucagon induces the gene expression of aquaporin-8 but not that of aquaporin-9 water channels in the rat hepatocyte*. 296, 9.
- Sundaram, M., Zhong, S., Khalil, M. B., Links, P. H., Zhao, Y., Iqbal, J., Hussain, M. M., Parks, R. J., Wang, Y., & Yao, Z. (2010). Expression of apolipoprotein C-III in McA-RH7777 cells enhances VLDL assembly and secretion under lipid-rich conditions. *Journal of Lipid Research*, 51(1), 150–161. <https://doi.org/10.1194/jlr.M900346-JLR200>
- Teratani, T., Tomita, K., Suzuki, T., Oshikawa, T., Yokoyama, H., Shimamura, K., Tominaga, S., Hiroi, S., Irie, R., Okada, Y., Kurihara, C., Ebinuma, H., Saito, H., Hokari, R., Sugiyama, K., Kanai, T., Miura, S., & Hibi, T. (2012). A High-Cholesterol Diet Exacerbates Liver Fibrosis in Mice

- via Accumulation of Free Cholesterol in Hepatic Stellate Cells. *Gastroenterology*, 142(1), 152-164.e10. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.09.049>
- Timmins, J. M., Lee, J.-Y., Boudyguina, E., Kluckman, K. D., Brunham, L. R., Mulya, A., Gebre, A. K., Coutinho, J. M., Colvin, P. L., Smith, T. L., Hayden, M. R., Maeda, N., & Parks, J. S. (2005). Targeted inactivation of hepatic Abca1 causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of apoA-I. *Journal of Clinical Investigation*, 115(5), 1333–1342. <https://doi.org/10.1172/JCI200523915>
- Tremblay, M. S., Warburton, D. E. R., Janssen, I., Paterson, D. H., Latimer, A. E., Rhodes, R. E., Kho, M. E., Hicks, A., LeBlanc, A. G., Zehr, L., Murumets, K., & Duggan, M. (2011). New Canadian Physical Activity Guidelines. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 36(1), 36–46. <https://doi.org/10.1139/H11-009>
- Vernon, G., Baranova, A., & Younossi, Z. M. (2011). Systematic review: The epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 34(3), 274–285. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2011.04724.x>
- Wakil, S. J., & Abu-Elheiga, L. A. (2009). Fatty acid metabolism: Target for metabolic syndrome. *Journal of Lipid Research*, 50(Suppl), S138–S143. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800079-JLR200>
- Wang, D. Q.-H. (2007). Regulation of Intestinal Cholesterol Absorption. *Annual Review of Physiology*, 69(1), 221–248. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.031905.160725>

- Warden, B. A., Fazio, S., & Shapiro, M. D. (2019). The PCSK9 revolution: Current status, controversies, and future directions. *Trends in Cardiovascular Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2019.05.007>
- Xiao, C., Stahel, P., & Lewis, G. F. (2018). Regulation of Chylomicron Secretion: Focus on Post-Assembly Mechanisms. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 7(3), 487–501. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2018.10.015>
- Yamashita, H., Takenoshita, M., Sakurai, M., Bruick, R. K., Henzel, W. J., Shillinglaw, W., Arnot, D., & Uyeda, K. (2001). A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(16), 9116–9121. <https://doi.org/10.1073/pnas.161284298>
- Yamauchi, T., Nio, Y., Maki, T., Kobayashi, M., Takazawa, T., Iwabu, M., Okada-Iwabu, M., Kawamoto, S., Kubota, N., Kubota, T., Ito, Y., Kamon, J., Tsuchida, A., Kumagai, K., Kozono, H., Hada, Y., Ogata, H., Tokuyama, K., Tsunoda, M., ... Kadowaki, T. (2007). Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nature Medicine*, 13(3), 332–339. <https://doi.org/10.1038/nm1557>
- Yu, L., Bharadwaj, S., Brown, J. M., Ma, Y., Du, W., Davis, M. A., Michaely, P., Liu, P., Willingham, M. C., & Rudel, L. L. (2006). Cholesterol-regulated Translocation of NPC1L1 to the Cell Surface Facilitates Free Cholesterol Uptake. *Journal of Biological Chemistry*, 281(10), 6616–6624. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511123200>
- Zannis, V. I., Chroni, A., & Krieger, M. (2006). *Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL*. - PubMed—NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16501936>

- Zelber-Sagi, S., Lotan, R., Shlomai, A., Webb, M., Harrari, G., Buch, A., Nitzan Kaluski, D., Halpern, Z., & Oren, R. (2012). Predictors for incidence and remission of NAFLD in the general population during a seven-year prospective follow-up. *Journal of Hepatology*, *56*(5), 1145–1151. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.12.011>
- Zhang, X.-Q., Xu, C.-F., Yu, C.-H., Chen, W.-X., & Li, Y.-M. (2014). Role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, *20*(7), 1768–1776. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i7.1768>
- Zhou, L., Li, C., Gao, L., & Wang, A. (2015). High-density lipoprotein synthesis and metabolism (Review). *Molecular Medicine Reports*, *12*(3), 4015–4021. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3930>
- Zollner, G., Wagner, M., Moustafa, T., Fickert, P., Silbert, D., Gumhold, J., Fuchsbichler, A., Halilbasic, E., Denk, H., Marschall, H.-U., & Trauner, M. (2006). Coordinated induction of bile acid detoxification and alternative elimination in mice: Role of FXR-regulated organic solute transporter- $\alpha/\beta$  in the adaptive response to bile acids. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, *290*(5), G923–G932. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00490.2005>

