

Page d'identification du jury

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Identification des loci génétiques associés à la stéatose
hépatique chez la souche murine C58/J sous diète
hyperlipidique**

Présenté par :

Ben Necib Jallouli Akram

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Ferland Guylaine	président rapporteur
Dr. Bouchard Guylaine	directeur de recherche
Dr. Gavino Victor	membre du jury



QU

145

U58

2005

V. 006

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Résumé

Introduction : Les changements alimentaires (apport calorique élevé, diète riche en gras, malnutrition) des dernières décennies s'associent à l'émergence endémique du syndrome métabolique, qui, au niveau hépatique, se démarque par une augmentation de la prévalence de la stéatose.

La stéatose hépatique est définie par une accumulation des lipides particulièrement des triglycérides (TG) au sein des hépatocytes. Il s'agit aujourd'hui d'une anomalie très fréquente avec une prévalence de 10 à 20% de la population générale. Des études à long terme démontrent que la progression de l'anomalie vers des complications hépatiques plus sévères comme la stéatohépatite est possible. Des études préliminaires du Dr. Bouchard et ses collaborateurs ont permis d'identifier que la souche murine C58/J démontre une forte susceptibilité à la stéatose hépatique lorsque soumise à une diète riche en cholestérol et en lipides saturés. Ces résultats ont montré également que la souche Lp/J soumise aux mêmes conditions ne répond pas de la même manière (moins sensible à la stéatose hépatique). Le but de ce travail est d'utiliser ces modèles (C58/J et Lp/J) pour identifier des loci génétiques (QTL) responsables de la susceptibilité à la stéatose hépatique.

Méthodologie : 357 descendants (génération filiale F2) du croisement entre les lignées C58/J et Lp/J ont été à 10 semaines soumis à une diète contenant 1% de cholestérol, 15% de lipides saturés et 0.5% d'acide cholique pour 8 semaines.

Le phénotype a été déterminé par des dosages biochimiques. Le génotype a été identifié par amplification PCR de 107 marqueurs microsatellites distribués sur le génome. L'identification des QTL a été effectuée avec le programme «Map Manager».

Résultats : Nos analyses sur les souches parentales confirment une accumulation de 37 fois des TG hépatiques chez la souche C58/J sous diète hyperlipidique versus diète de base. La souche Lp/J montre également une accumulation des TG hépatiques, toutefois cette augmentation est largement inférieure à celle de la souche C58/J. Les descendants F2, tel qu'attendu, montrent une large variation des TG hépatiques avec une répartition très hétérogène. Les analyses (QTL) ont permis d'identifier un locus statistiquement lié à la stéatose hépatique sur le chromosome 11. Dans cette région, nous avons identifié un

gène candidat *Pemt*, gène dont l'inactivation a antérieurement été associé au développement d'une stéatose hépatique chez la souris.

Conclusions : Ce travail nous a permis d'identifier une région du génome porteuse d'un polymorphisme responsable de la susceptibilité à la stéatose hépatique chez la souche C58/J, région dans laquelle nous avons déjà identifié un gène candidat.

Ces travaux constituent donc un fondement pour l'identification et la compréhension d'une base moléculaire de la stéatose hépatique, qui nous permettra de mieux comprendre pourquoi certains individus sont beaucoup plus susceptibles au développement de la stéatose hépatique en présence d'une diète à haute teneur en lipides et cholestérol.

Mots clés : Stéatose hépatique, triglycérides hépatiques, diète hyperlipidique, QTL, chromosome 11, *Pemt*.

Table des matières

Page titre	I
Page d'identification du jury	II
Résumé	III
Table des matières	V
Liste de tableaux	VII
Liste des figure	VIII
Liste des abréviations	X
Remerciements	XIII
1. INTRODUCTION	1
1.1 Le foie	1
1.2 Métabolisme hépatique des acides gras	3
1.2.1 Définition des acides gras	3
1.2.2 Capture hépatique des acides gras	5
1.2.3 Biosynthèse hépatique des acides gras	6
1.2.4 β -oxydation des acides gras dans le foie	8
1.2.5 Synthèse des triglycérides	8
1.2.6 Synthèse des phospholipides	9
1.4.2.1 Voie de Kennedy	11
1.4.2.2 Voie de Méthylation	12
1.2.7 Relargage hépatique des triglycérides.....	14
1.3 La stéatose hépatique	17
1.3.1 Définition et prévalence.....	17
1.3.2 Importance clinique et évolution de la stéatose hépatique.....	17
1.3.3 Diagnostic clinique	18
1.4 Causes possibles de la stéatose hépatique	19

1.4.1 Causes génétiques.....	19
1.4.2 Causes nutritionnelles	19
1.4.3 Interactions gènes-environnement	21
1.5 Mécanismes associés à la stéatose hépatique	22
1.5.1 Augmentation de la capture hépatique des acides gras	22
1.5.2 Augmentation de la lipogénèse.....	23
1.5.3 Diminution de l'oxydation des acides gras.....	23
1.5.4 Trouble de relaragage des TG hépatiques	24
1.6 Traitement de la stéatose hépatique	25
2. PROBLÉMATIQUE	26
2.1 Objectif de l'étude	26
2.2 Objectifs spécifiques	26
3. STRATÉGIE EXPÉRIMENTALE ET PRINCIPE DU QTL	28
4. MÉTHODOLOGIE	29
5. RÉSULTATS	33
6. DISCUSSION	48
7. MÉCANISME PROPOSÉ	55
8. CONCLUSIONS	57
9. RÉFÉRENCES	58

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux acides gras nutritionnels.....	4
--	---

Liste des figures

Figure 1 : Lobule hépatique.....	2
Figure 2 : Capture hépatique des lipides.....	6
Figure 3 : Réactions de synthèse des acides gras.....	7
Figure 4 : Synthèse des triglycérides à partir du glycérol-3-phosphate.....	9
Figure 5 : Composition chimique de la phosphatidyléthanolamine et de la phosphatidylcholine	10
Figure 6 : Formation des phosphatidylcholines selon la voie de Kennedy.....	11
Figure 7 : Formation des phosphatidylcholines selon la voie de méthylation.....	13
Figure 8 : Relargage des TG hépatiques.....	14
Figure 9 : Métabolisme hépatique des acides gras.....	16
Figure 10 : Arbre génétique de la colonie F2 C58LP.....	28
Figure 11 : Distribution de 107 marqueurs microsatellites sur le génome chez la colonie F2 (C58/J X Lp/J).....	32
Figure 12 : Triglycérides hépatiques chez les souches parentales C58/J et Lp/J sous diète de base et diète hyperlipidique.....	33
Figure 13 : Poids hépatiques et ratio PF/PC chez les souches parentales C58/J et Lp/J sous diète de base et diète hyperlipidique.....	35
Figure 14 : Paramètres sériques des souches parentales C58/J et Lp/J sous diète de base et diète hyperlipidique.....	37
Figure 15 : Paramètres hépatiques chez les souches parentales C58/J, Lp/J et les générations F1 C58LP et LPC58.....	39
Figure 16 : Paramètres sériques chez les souches parentales C58/J, Lp/J et les générations F1 C58LP et LPC58.....	41
Figure 17 : Distribution des triglycérides hépatiques chez la colonie F2 C58LP.....	42
Figure 18 : Loci génétiques associés aux triglycérides hépatiques sur le génome.....	43
Figure 19 : QTL associé aux triglycérides hépatiques dans le chromosome 11.....	43
Figure 20 : Distribution des phospholipides biliaires chez la colonie F2 C58LP.....	45

Figure 21 : Loci génétiques associés aux phospholipides biliaires sur le génome.....	45
Figure 22 : QTL associé aux phospholipides biliaires dans le chromosome 11.....	46
Figure 23 : Homocystéine sérique chez la souche C58/J sous diète de base et diète hyperlipidique.....	47
Figure 24 : Mécanisme proposé chez le modèle C58/J sous diète hyperlipidique.....	56

Liste des abréviations

- ABL** : Abétalipoprotéïnémie
- ACP** : Protéine porteuse de groupement acyle
- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- ADP** : Adénosine diphosphate
- AdoHcy** : Adénosine homocystéine
- AdoMet** : Adénosine méthionine
- ALT** : Alanine aminotransférase
- Apo** : Apolipoprotéine
- AST** : Aspartate aminotransférase
- ATP** : Adénosine triphosphate
- BADH** : Bétaïne aldéhyde dihydrogénase
- BHMT** : Bétaïne homocystéine méthyltransférase
- CDH** : Choline dihydrogénase
- CDP** : Cytidine diphosphocholine
- cm** : Centimètre
- cM** : Centimorgan
- CTP** : Cytidine triphosphate
- DB** : Diète de base
- DG** : Diglycéride
- DH** : Diète hyperlipidique
- F** : Femelle
- FABP** : «Fatty acid binding protein»
- g** : Gramme
- GFPT** : «Glutamine fructose-6-phosphate amidotransférase»
- HDL** : «High Density lipoprotein»
- IDL** : Lipoprotéine à densité intermédiaire
- IMC** : Indice de masse corporelle
- Kg** : Kilogramme

LDL : Lipoprotéine à densité faible

LPL : Lipoprotéine lipase

M : Mâle

MAT : Méthionine adénosyltransférase

mg : Milligramme

mM : Millimolaire

MPA : Acide 3-mercaptopropionique

MTP : Protéine de transfert microsomale

N : Nombre total

NADPH : Nicotiamide adénine dinucléotide phosphate hydrogénase

NADP : Nicotiamide adénine dinucléotide phosphate

NHANES III : «National Health and Nutrition Evaluation Survey III»

nm : Nanomètre

P : Phosphate

PO₄ : Acide phosphorique

pb : Paire de base

PPi : Pyrophosphate

PC : Phosphatidylcholine

Pco : Poids corporel

PF : Poids du foie

PCR: «Polymerase chain reaction»

PE : Phosphatidyléthanolamine

PEMT : Phosphatidyléthanolamine N-méthyltransférase

PL : Phospholipide

QTL : «Quantitatif trait loci»

REI : Réticulum endoplasmique lisse

REr : Réticulum endoplasmique rugueux

RPM : Rotation par minute

TG : Triglycéride

UI : Unité internationale

VLDL : «Very low density lipoprotein»

β : Béta

%: Pourcentage

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier ma directrice de Maîtrise, Dre. Bouchard Guylaine pour son soutien académique, moral ainsi que pour ses nombreux conseils. Sous sa supervision, j'ai pu approfondir mes connaissances théoriques et pratiques et ainsi développer mon sens critique. Je lui suis également très reconnaissant pour m'avoir fait confiance et m'avoir pris sous sa gouverne.

Je voudrais également remercier mes collègues de laboratoire avec qui j'ai eu l'honneur de travailler : Stéphanie Casavant (M.Sc.), Majorie Martel et Mélanie Bouchard (stagiaire de recherche).

J'aimerais remercier tous les gens du département de Gastroenterologie-Nutrition ainsi que tout le personnel du Centre de Recherche de l'Hôpital Sainte Justine.

Finalement, j'aimerais remercier mes parents : Hacine et Souad Ben Necib Jallouli, mes frères : Jamil et Zied Ben Necib Jallouli, ma sœur Jalila, mes grands parents : Mohamed Hanifa, Wrida, mes amis et toute ma famille qui ont toujours été là pour moi. Ils m'ont toujours supporté et encouragé. Je leur dédie donc ce mémoire du fond du cœur.

Merci à vous tous

1. INTRODUCTION

1.1 Le foie

Le foie est annexé au tube digestif avec lequel il entretient des échanges fonctionnels. Il s'agit de l'organe du corps qui assure le plus grand nombre de transformations chimiques. Il intervient dans la détoxification des médicaments, dans le stockage des vitamines A et B12, dans la sécrétion biliaire, et enfin dans le métabolisme des lipides, glucides et protéines (1).

Les fonctions du foie sont assurées par les cellules épithéliales (hépatocytes et cellules ductulaires) et les cellules mésenchymateuses (cellules étoiles, cellules de Kupffer, fibroblastes et cellules endothéliales). Toutefois, il convient de mentionner que les hépatocytes, cellules-cibles de notre étude, représentent plus de 70 % de la population cellulaire totale (2). Elles forment des travées cellulaires autour de la veine centrale de chaque lobule hépatique (figure 1). Certaines de leurs faces sont accolées aux parois endothéliales des sinusoides. Celles-ci étant très perméables, elles permettent aux substances présentes dans le sang de pénétrer à l'intérieur des cellules hépatiques où elles pourront être mobilisées. Les autres faces des hépatocytes sont accolées aux hépatocytes adjacentes pour former un minuscule conduit, appelé canalicule biliaire, dans lequel la bile est sécrétée. De plus, Les canalicules biliaires s'anastomosent en canaux biliaires, et ces derniers fusionnent afin de constituer le canal hépatique (3, 4). De plus, il est important de souligner que les hépatocytes ont une implication majeure dans le métabolisme des lipides via le catabolisme des acides gras (production d'énergie par le cycle de Krebs) et leur synthèse. Pour notre étude, nous nous concentrerons sur le métabolisme hépatique des acides gras.

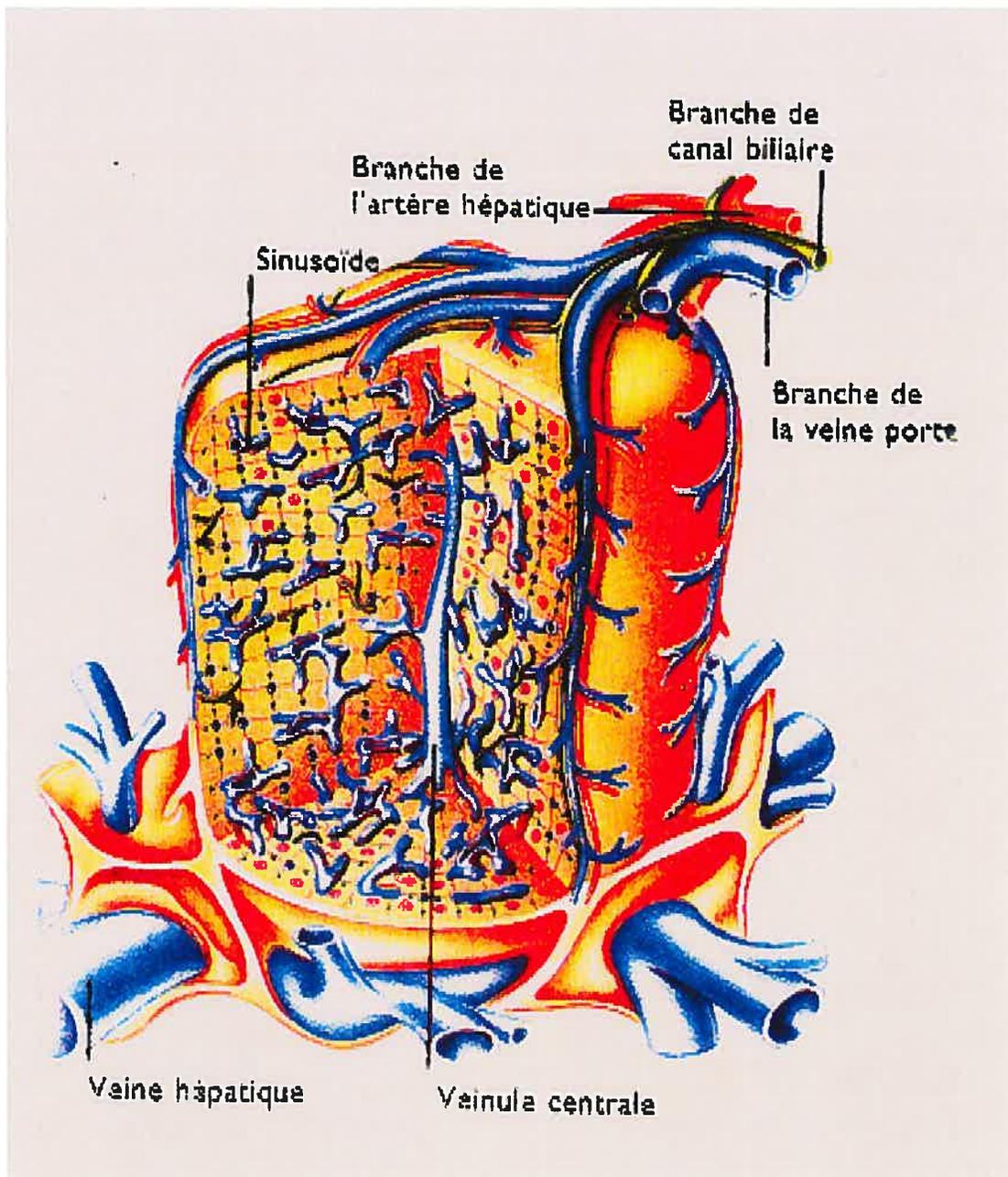


Figure 1 : Lobule hépatique
(Adaptée de Whitfield (5))

1.2 Métabolisme hépatique des acides gras

1.2.1 Définition des acides gras

Un acide gras est une chaîne d'atomes de carbone et d'hydrogène possédant à son extrémité un groupement carboxylique (-COOH). Cette chaîne peut être saturée (absence de double liaison) ou insaturée (présence d'une ou plusieurs doubles liaisons). Sa longueur peut varier de 2 à 30 atomes de carbone, mais les acides gras alimentaires les plus communs en comportent de 12 à 22. On peut par ailleurs les classer selon la longueur de leur chaîne : les acides gras à chaînes courtes (2 à 4 carbones), à chaînes moyennes (5 à 12 carbones) et à chaînes longues (> 12 carbones) (6).

Les acides gras forment une source d'énergie importante pour l'organisme. Leur synthèse a lieu essentiellement dans les tissus adipeux, mais également dans les poumons, l'intestin, le cerveau et le foie (7, 8). Toutefois, certains acides gras ne peuvent pas être synthétisés et doivent être fournis par l'alimentation. Ils sont nommés acides gras essentiels.

Le tableau 1 résume les principaux acides gras issus de l'alimentation.

Tableau 1 : Principaux acides gras nutritionnels.

Notation # carbones	Nom	Saturation	Principales sources
2 :0	Acétique	Saturé	Fermentation glucidique
3 :0	Propionique		Gras laitier
4 :0	Butyrique		Huile de noix coco
10 :0	Caprique		Huile de noix de coco et de palme
12 :0	Laurique		Huile de noix de coco, de palme et de noix
14 :0	Myristique		Toutes les graisses animales et végétales
16 :0	Palmitique		
18 :0	Stéarique		
18 :1n-9	Oléique	Monoinsaturé	Toutes les graisses naturelles
18 :2n-6 (Oméga 6)	Linoléique	Polyinsaturé	Huile de maïs, arachide, coton, soya
18 :3n-3 (Oméga 3)	Alpha-linoléique		Huile de canola, noix, soya
20 :4n-6 (Oméga 6)	Arachidonique		Gras animal, huile d'arachide
20 :5n-3 (Oméga 3)	Eicosapentaénoïque		Maquereau, hareng, esturgeon
22 :6n-3 (Oméga 3)	Docosahexaénoïque		Huile de poisson

Les caractères gras identifient les acides gras essentiels.

(Adapté par Freeland et Peckham (7) et de Murray *et coll.* (8))

Les acides gras à chaînes courtes sont directement absorbés dans le sang, alors que les acides gras à longues chaînes devront emprunter la voie lymphatique (6). Au niveau hépatique, plusieurs voies métaboliques permettent la régulation des acides gras.

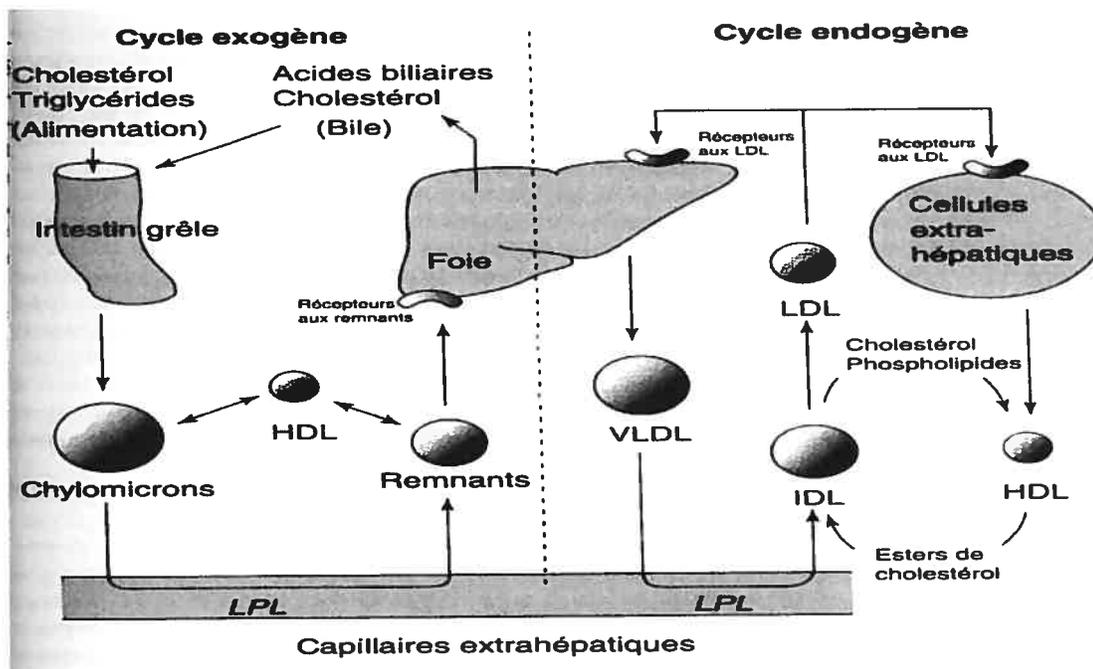
1.2.2 Capture hépatique des acides gras

Après un apport alimentaire riche en gras, les cellules de la bordure en brosse intestinale synthétisent des triglycérides (TG) à partir des acides gras et du glucose présents dans l'intestin. Ces TG sont emmagasinés dans un complexe lipido-protéique, nommé chylomicron, composé de faibles quantités de cholestérol et de phospholipides. Les apolipoprotéines (Apo) B-48, A-I, A-II et A-IV sont nécessaires à l'élaboration des chylomicrons. Ces derniers prélèvent aussi l'Apo C, l'Apo E et le cholestérol ester à partir des HDL (lipoprotéines à densité élevée) (9).

Les chylomicrons passent ensuite dans la circulation sanguine et dans le plasma. Les TG qu'ils contiennent sont dégradés par une enzyme appelée lipoprotéine lipase (LPL) dans le but de former des fragments plus petits nommés remnants. Ces derniers sont à leur tour dégradés à l'intérieur des cellules hépatiques après capture par des récepteurs spécifiques afin de libérer les acides gras. L'Apo E que les chylomicrons extraient des HDL est essentielle car elle constitue le ligand reconnu par le récepteur situé sur la membrane plasmique hépatique (figure 2) (10).

Quant aux acides gras d'origine endogène, ils sont captés par le foie après une série de transformations des VLDL (lipoprotéines à densité très faible) dont la composition est riche en TG (11).

La dégradation intravasculaire des VLDL (hydrolyse des TG, perte de fragments de surface et enrichissement en ester de cholestérol) est tout à fait similaire à celle des chylomicrons. La particule résiduelle obtenue sous l'action des LPL est appelée remnant de VLDL, ou LDL (lipoprotéine à densité faible). Par la suite, les LDL peuvent être captées par des récepteurs spécifiques au niveau de la membrane plasmique hépatique. Les acides gras contenus dans les LDL sont alors libérés dans le tissu hépatique (12).



IDL : Lipoprotéine à densité intermédiaire

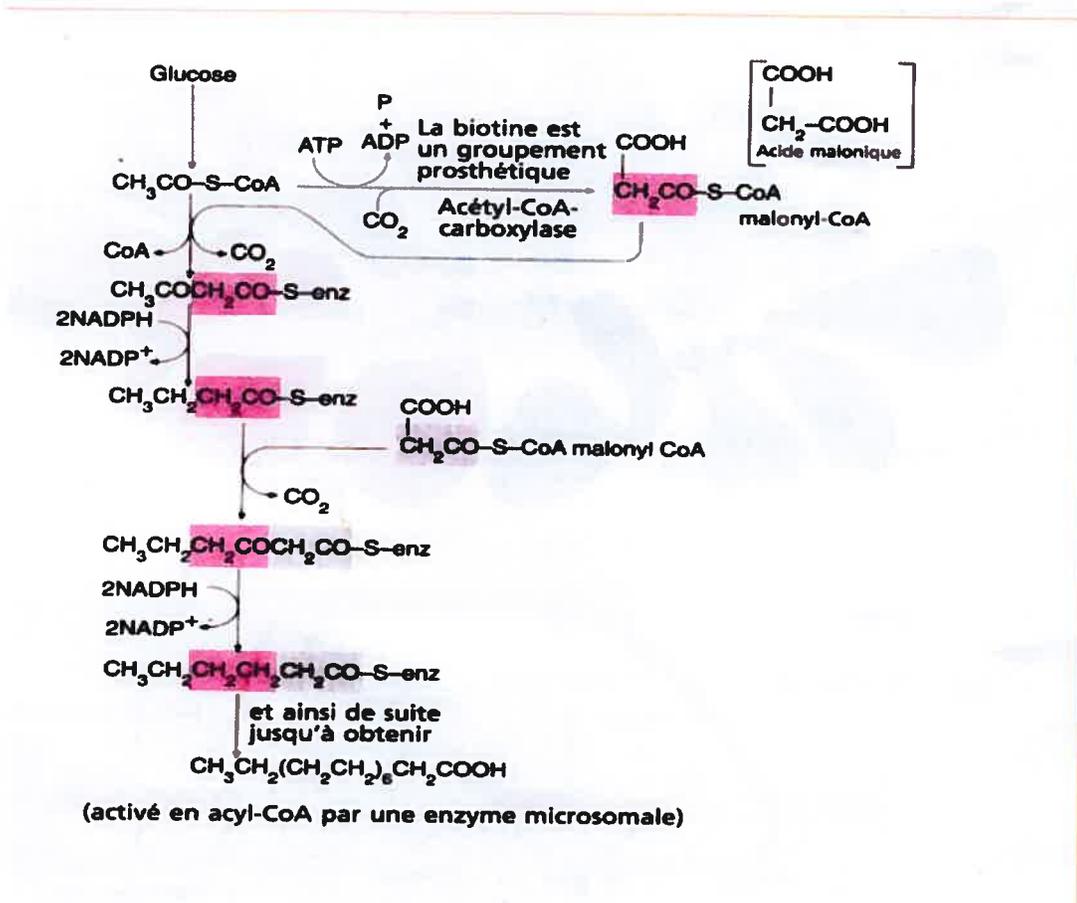
Figure 2 : Capture hépatique des lipides

(Adapté par Calandra et coll. (9))

1.2.3 Biosynthèse hépatique des acides gras

La biosynthèse des acides gras dans le foie est entièrement cytosolique (12). Elle est initiée par l'addition successive d'unités de deux atomes de carbone dérivant de l'acétyl-CoA. La première de ces unités dicarbonées provient directement de l'acétyl-CoA. Le radical acétyle est par la suite transféré de l'atome de soufre de coenzyme A vers l'atome de soufre d'un résidu cystéine de l'acide gras synthase, d'où la formation d'un complexe acétyl-enzyme (7). Chez les animaux, le système assurant la synthèse des acides gras fait intervenir un polypeptide particulier appelé protéine porteuse de groupement acyle (ACP) comportant une entité pantéthéine similaire à celle présente dans le coenzyme A. La pantéthéine est liée par l'intermédiaire d'un groupement phosphate à un résidu sérine de l'ACP (8). Au cours de la synthèse des acides gras, le radical malonyle du malonyl-CoA est transféré vers le soufre de cette pantéthéine, le radical acétyle dérivé de l'acétyl-CoA étant fixé sur une cystéine voisine. Ainsi placés

côte-à-côte, le radical acétyle et le groupement méthylène du radical malonyle peuvent se combiner. Il se forme alors un radical β -1acétoacyle comportant quatre atomes de carbone et qui est encore lié à l'ACP. Le radical tétracarboné est ensuite transféré vers le résidu cystéine de l'ACP, et un autre malonyl-CoA peut venir se fixer sur le soufre de la pantéthéine de l'ACP. Ces réactions d'additions successives continuent de la sorte tant que la synthèse de l'acide gras n'est pas terminée (13).



ATP : Adénosine triphosphate

ADP : Adénosine diphosphate

NADPH : Nicotiamide adénine dinucléotide phosphate hydrogénase

NADP : Nicotiamide adénine dinucléotide phosphate

P : Phosphate

Figure 3 : Réactions de synthèse des acides gras

(Adapté de Campbell et Smith (13))

1.2.4 β -oxydation des acides gras dans le foie

La biosynthèse des acides gras n'est pas simplement l'inverse de leur oxydation. Les deux processus sont entièrement différents et chacun prend place dans un compartiment séparé de la cellule (14). L'oxydation des acides gras se produit principalement dans les mitochondries et les péroxisomes.

À la première étape, l'acide gras est activé par la formation d'un dérivé du coenzyme A (acyl-CoA) obtenu à partir de l'ATP. Après désaturation de la liaison entre les deux carbones alpha et bêta, le carbone bêta subit une oxydation. Il en résulte la formation d'une molécule d'acétyl-CoA et d'un acide gras dont la chaîne contient au moins deux atomes de carbone. Grâce à l'action de la β -cétotliolase, cet acide gras est activé et peut poursuivre le cycle oxydatif. Par ailleurs, les fragments bicarbonés (acétyl-CoA) provenant de la β -oxydation peuvent alors entrer dans le cycle de Krebs pour y être complètement oxydés, ou bien se condenser pour former des cétones. Notons que la production des corps cétoniques est minime dans des conditions normales (15, 16, 17).

1.2.5 Synthèse des triglycérides

Chez l'humain, 95 % des TG sont emmagasinés sous forme de réserve. Leur synthèse peut s'effectuer selon deux voies métaboliques distinctes dans le foie. La première est la voie du monoacylglycérol par laquelle le β -monoglycéride est acylé en diglycéride (DG) sous l'action de l'enzyme monoacylglycérol acyltransférase, puis subit une acylation en TG sous l'action de la diacylglycérol acyltransférase (16).

La deuxième voie de synthèse des TG est appelée la voie de l'alpha glycérophosphate. Elle implique tout d'abord l'acylation du glycérol-3-phosphate sous l'action de l'enzyme glycérophosphate acyltransférase afin de former l'acide phosphatidique. Ce dernier est hydrolysé en DG en présence de la phosphatidate phosphohydrolase, puis le DG est converti en TG (12, 13). (Voir figure 4)

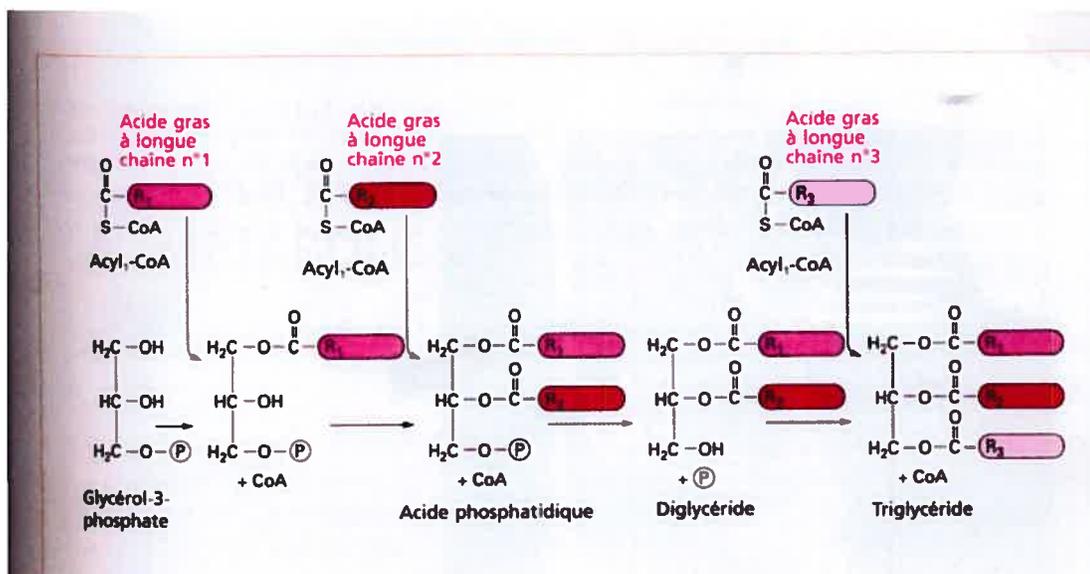


Figure 4 : Synthèse des triglycérides à partir du glycérol-3-phosphate
(Adapté de Campbell et Smith (13))

1.2.6 Synthèse des phospholipides

Contrairement aux TG, peu de phospholipides (PL) sont convertis en réserves (18). Leur biosynthèse commence par des réactions au cours desquelles deux molécules d'acide gras activé sous forme d'acyl-CoA estérifient une molécule de glycérol-3-phosphate pour former un acide phosphatidique. Ce processus est similaire à celui permettant la synthèse des TG.

Les principaux phospholipides retrouvés dans les membranes sont des phosphoglycérides. Ils sont constitués de deux molécules d'acide gras estérifiant le premier et le deuxième hydroxyle du glycérol, alors que le troisième hydroxyle forme une liaison ester avec l'acide phosphorique et un alcool. Les différents phosphoglycérides sont nommés selon le type d'alcool contenu dans leur tête polaire (figure 5). Les phosphoglycérides les plus abondants se retrouvent sous forme de phosphatidyléthanolamine (PE) et de phosphatidylcholine (PC), qui contiennent respectivement de l'éthanolamine et de la choline dans leur tête polaire. Chacun d'entre eux peut contenir différentes combinaisons d'acides gras (7, 8, 12).

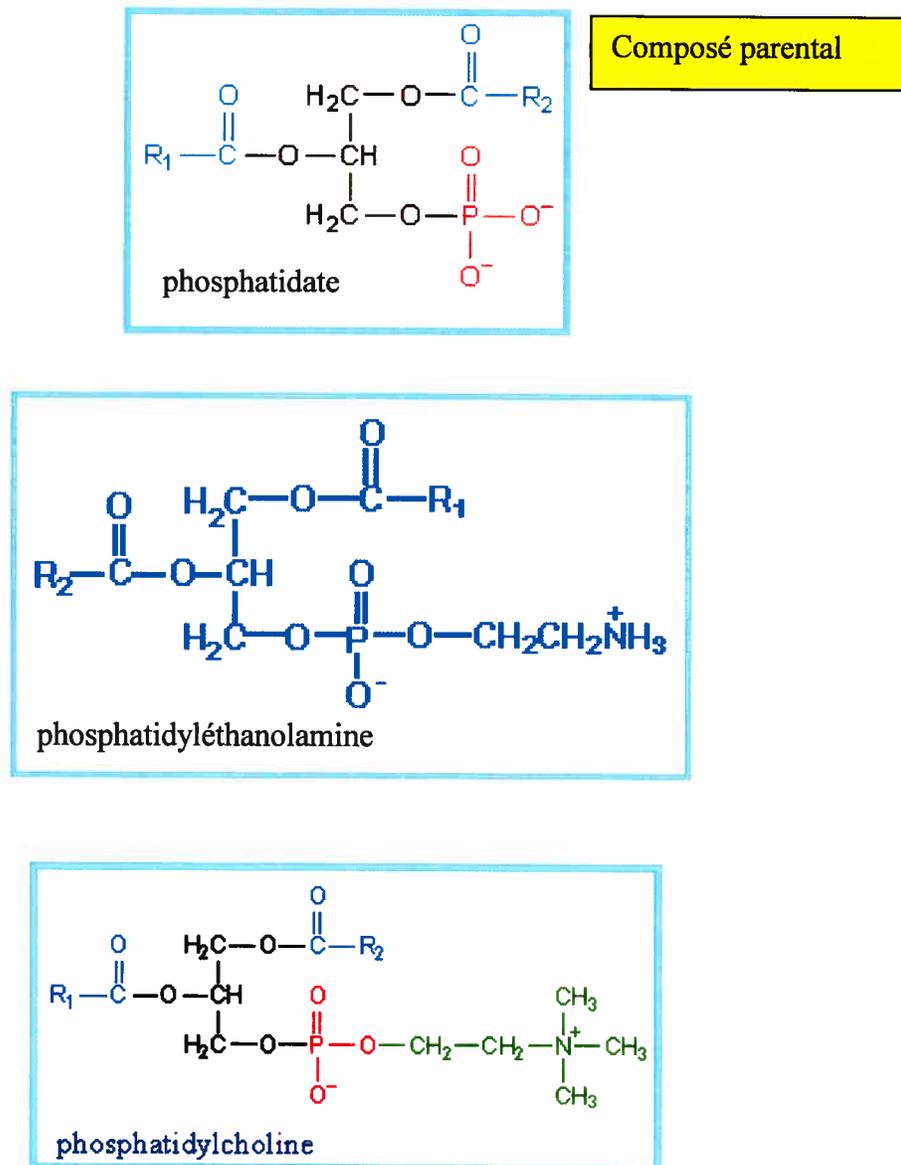


Figure 5 : Composition chimique de la phosphatidyléthanolamine et de la phosphatidylcholine.

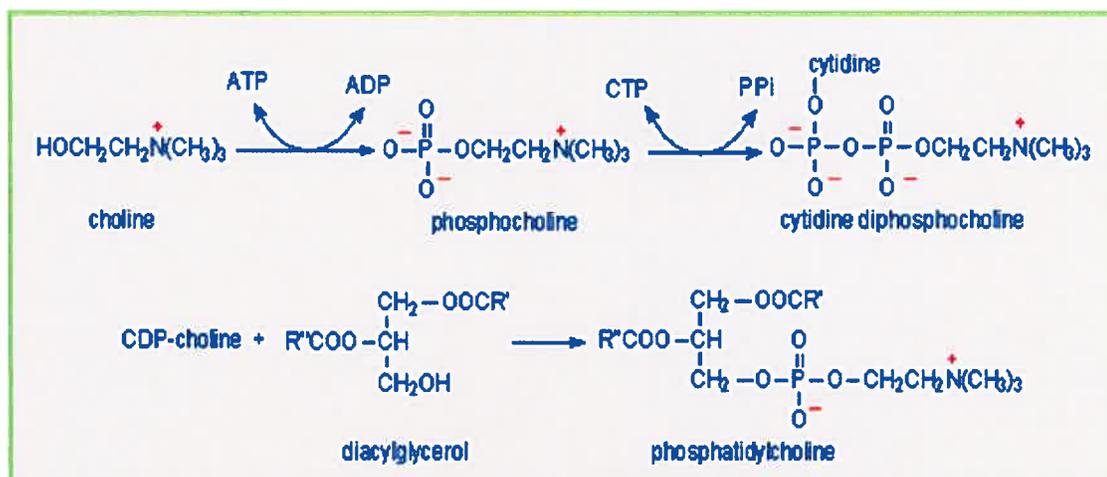
(Adapté de Murray *et coll.* (8))

La PC fait partie de la famille des PL. Elle contribue au maintien de l'intégrité des membranes entourant la cellule et joue un rôle essentiel dans le bon fonctionnement de l'organisme (8). Par ailleurs, la PC est un composant majeur de la bile et joue un rôle dans le métabolisme des acides gras (12). Au niveau hépatique, la synthèse des PC est assuré par deux voies métaboliques : la voie de Kennedy et la voie de méthylation.

1.2.6.1 Voie de Kennedy

Eugène Kennedy a défini la voie majeure de synthèse des phosphatidylcholines dans le foie puisque plus de 70 % des PC totales sont synthétisées par cette voie.

Comme le montre la figure 6, la première source des PC est la choline qui se transforme initialement en choline active pour réagir avec l'ATP et ainsi former des dérivés monophosphorylés nommés phosphocholines. Ces derniers ont recours à la cytidine triphosphate (CTP) comme catalyseur afin de se transformer en cytidine diphosphocholine (CDP). Enfin, un second composé chimique, le diacylglycérol, interagit avec la CDP pour former la phosphatidylcholine (19, 20, 21).



PPi : Pyrophosphate

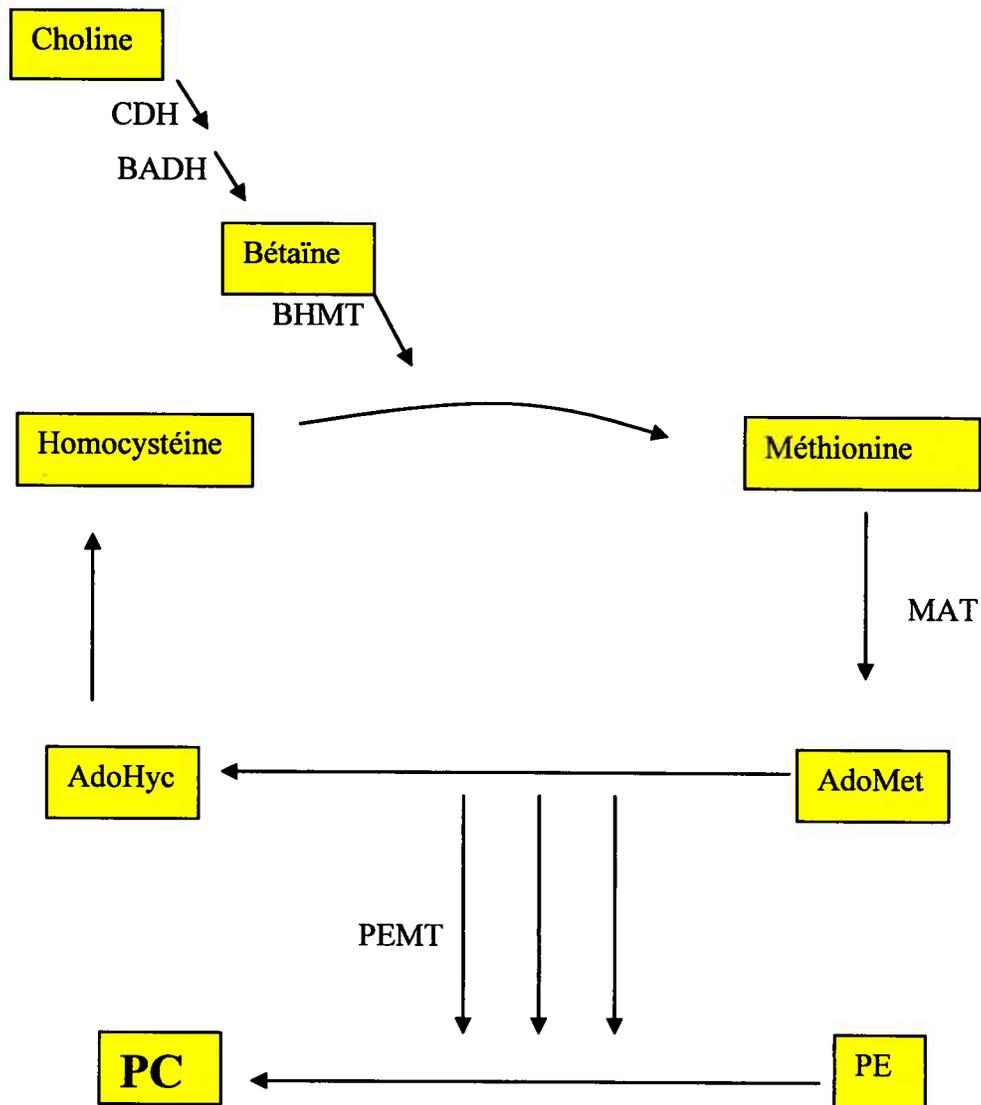
Figure 6 : Formation des phosphatidylcholines selon la voie de Kennedy.

(Adapté de Kennedy (19))

1.2.6.2 Voie de méthylation

La bétaine, issue de l'oxydation de la choline, est un donneur de groupements méthyles et aide à former la méthionine à partir de l'homocystéine. De ce fait, la méthionine constitue la plus importante source de groupements méthyles.

Comme le montre la figure 7, la méthionine se liera à l'adénosine pour former le complexe S-adonésinéméthionine (AdoMet) qui est donneur de trois groupements méthyliques à la PE. Des travaux sur la méthylation des PE ont permis de découvrir une enzyme permettant de catalyser la réaction. Il s'agit de la phosphatidyléthanolamine N-méthyltransférase (PEMT) (22, 23, 24). Enfin, la méthylation des PE aboutit à la formation des PC et des adénosinehomocystéines (AdoHcy). Ainsi, le cycle se reproduit par la formation de l'homocystéine à partir des AdoHcy.



CDH : Choline dihydrogénase

BADH : Bétaïne aldéhyde dihydrogénase

MAT : Méthionine adénosyltransférase

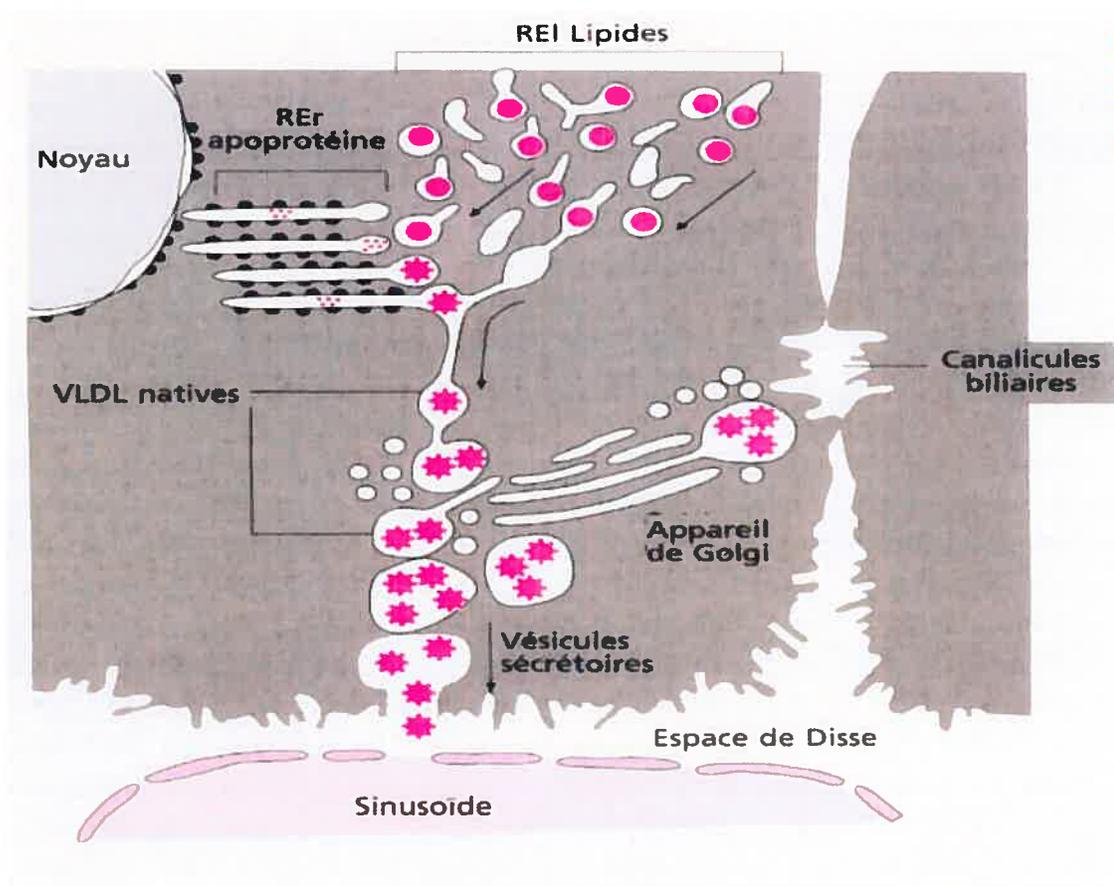
BHMT : Bétaïne homocystéine méthyltransférase

Figure 7 : Formation des phosphatidylcholines selon la voie de méthylation.

(Adapté par Neale et Vance (23))

1.2.7 Relargage hépatique des triglycérides

De grandes quantités de TG sont synthétisées par le foie en période digestive; ils sont ensuite partiellement exportés afin d'être captés et mis en réserve dans le tissu adipeux (25). Une fois produit, les TG passent dans l'appareil de Golgi où ils s'associent avec du cholestérol, des phospholipides et des apoprotéines (Apo B-100 et Apo C) pour constituer les VLDL. Comme le montre la figure 8, le relargage des TG hépatiques s'effectue par bourgeonnement des vésicules au niveau de la membrane de l'appareil de Golgi, puis expulsion des VLDL-TG (26).



REL : Réticulum endoplasmique lisse

RER : Réticulum endoplasmique rugueux

Figure 8 : Relargage des TG hépatiques

(Adapté de Campbell et Smith (13))

Dans les sections précédentes, nous avons décrit séparément les différentes voies métaboliques des acides gras dans le foie et nous avons identifié que le foie joue un rôle prépondérant au niveau de la régulation de la synthèse, de l'oxydation, de l'estérification des acides gras, mais aussi dans le contrôle de capture et du relargage de ces derniers (figure 9). Il en ressort qu'une régulation complexe des acides gras doit être effectuée au niveau hépatique afin de maintenir un équilibre physiologique (27).

En revanche, une perturbation des voies métaboliques des acides gras dans le foie, suite à un stress alimentaire par exemple, peut avoir de graves conséquences telles que la stéatose hépatique.

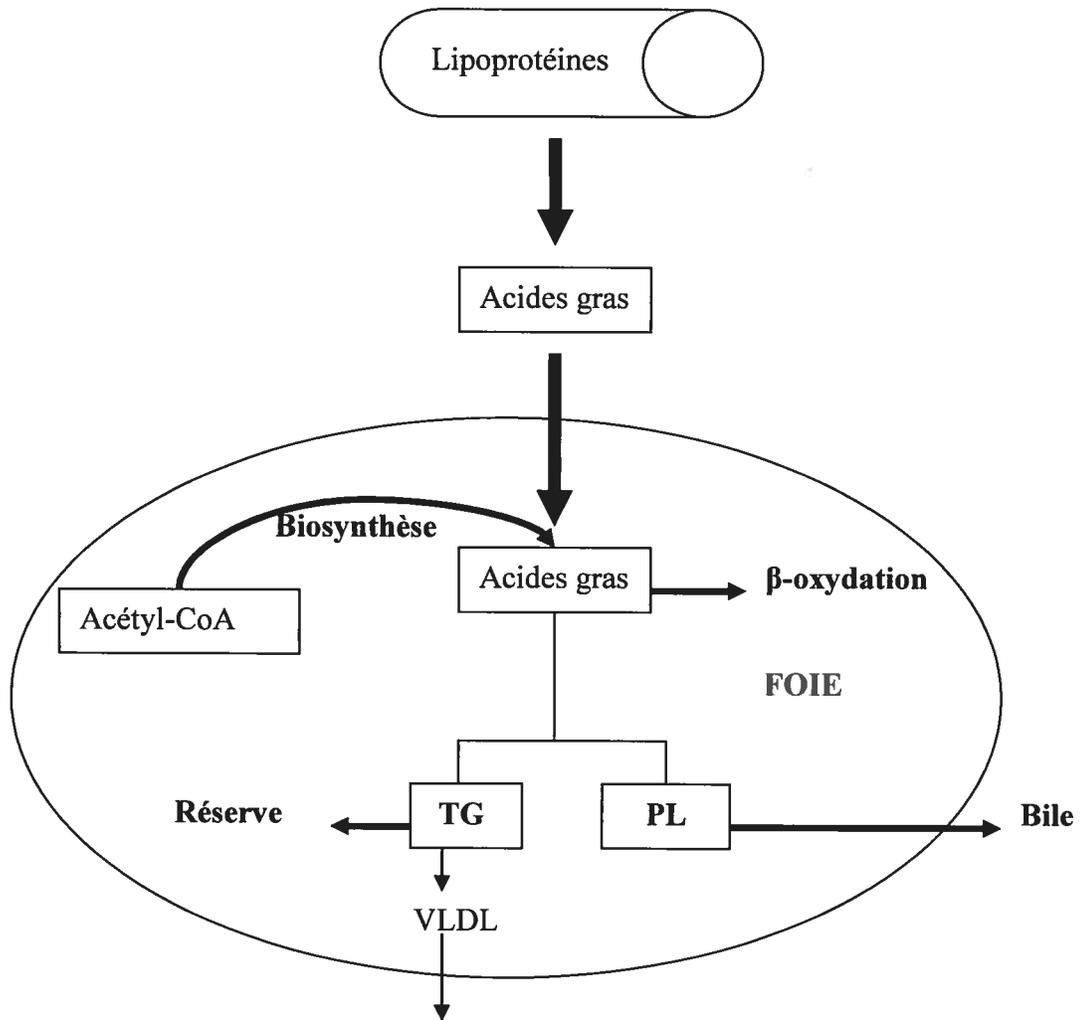


Figure 9 : Régulation hépatique des acides gras

1.3 La stéatose hépatique

1.3.1 Définition et prévalence

La stéatose hépatique est définie par une accumulation de lipides, principalement des TG, dans les hépatocytes (28). Plus du quart des adultes des pays industrialisés ont une accumulation excessive de gras dans le foie. Le «National Health and Nutrition Evaluation Survey III» (NHANES III) a effectué une étude récente sur des individus représentatifs de la population aux États-Unis. Les résultats ont montré que 10 à 24 % de la population en question était atteinte de stéatose hépatique (29). D'autres pays comme le Canada, l'Italie et le Japon montrent des prévalences semblables à celles observées aux États-Unis. Les pays en voie de développement sont également concernés par cette pathologie. Au Ghana, la plupart des enfants qui souffrent du syndrome de Kwashiorkor (malnutrition protéique et calorique aigue) manifestent une stéatose hépatique (30). Il s'agit donc d'une anomalie très fréquente dans le monde qui se répand aujourd'hui aussi vite que le diabète de type 2 et l'obésité.

1.3.2 Importance clinique et évolution de la stéatose hépatique

On a longtemps cru que la stéatose hépatique était une anomalie témoignant d'un désordre, parfois discret et négligeable, de la physiologie normale du foie, en particulier chez les patients dont les aminotransférases sériques (AST et ALT) sont normales. À présent, il existe plusieurs controverses autour de son importance clinique. En effet, Diehl (31) considère qu'elle est un facteur de risque prépondérant dans le développement de plusieurs maladies graves.

À ce titre, Diehl met en avant les travaux de Ohata *et coll.* (32) qui établissent que la stéatose hépatique est un facteur de risque important dans le développement de carcinomes hépatocellulaires chez des patients infectés par le virus de l'hépatite C.

De plus, des études cliniques ont démontré que la stéatose hépatique était associée à des caractéristiques du syndrome métabolique telles que l'obésité, la résistance à l'insuline, l'hypertension ou l'hyperlipidémie, qui sont elles-mêmes des causes

majeures de morbidité et de mortalité (33). Conséquemment, Diehl (31) suggère que la stéatose hépatique est un élément important du syndrome métabolique. L'augmentation de la résistance à l'insuline chez des patients développant la stéatose hépatique constitue un exemple qui confirme l'association de la stéatose hépatique avec le syndrome métabolique (34).

Toujours dans le même ordre d'idées, des études de Day (35) ont permis d'expliquer l'évolution de la stéatose hépatique selon un modèle nommé «two hits». Selon ce modèle, la stéatohépatite, une maladie hépatique de grave conséquence, est associée dans un premier temps au développement de la stéatose hépatique. À cette étape, le tissu hépatique est plus vulnérable à une deuxième série d'évènements (résistance à l'insuline, augmentation du stress oxydatifs, ...) ce qui induit le développement de la stéatohépatite. À partir de ces études, il apparaît alors toute l'importance de traiter directement la stéatose hépatique. Ceci permet d'une part d'assurer la prévention contre le développement des caractéristiques du syndrome métabolique, et d'autre part d'empêcher sa progression vers des lésions hépatiques plus graves (34).

1.3.3 Diagnostic clinique

Il est possible d'après la seule palpation de suspecter la stéatose hépatique : le volume du foie augmente de façon homogène, il est en fonction de l'importance de la surcharge stéatosique. Le foie grossit considérablement dans la quasi-totalité des cas jusqu'à devenir parfois énorme (36).

Le diagnostic de la stéatose hépatique peut aussi s'effectuer plus précisément par échographie abdominale puisqu'elle permet de confirmer la présence de graisse dans le foie via l'existence d'une hyperéchogénicité du foie. La biopsie du foie (études histologiques), ou encore le dosage des TG hépatiques, demeurent toutefois les tests les plus précis pour établir l'importance de la stéatose. Ils permettent en effet de chiffrer l'importance de la pathologie (types macro ou microvésicules) et d'identifier la présence de lésions hépatiques associées (37).

1.4 Causes possibles de la stéatose hépatique

1.4.1 Causes génétiques

Certaines maladies génétiques rares associées au métabolisme lipidique peuvent contribuer à développer une stéatose hépatique. Une des plus connue est l'abétalipoprotéïnémie (ABL) (38). Il s'agit en effet, d'une maladie autosomique récessive dont les parents transmetteurs sont totalement asymptomatiques (39).

Les patients abétalipoprotéïnémiques souffrent d'une malabsorption des lipides due à une déficience génétique au niveau d'une protéine de transfert microsomale (MTP) localisée dans la lumière des microsomes isolés du foie et de l'intestin (40). Cette dernière est nécessaire à l'assemblage et la formation des VLDL et des chylomicrons dans le foie et dans l'intestin. Conséquemment, une interférence dans l'exportation des TG provoque dans la plupart des cas une stéatose dans les hépatocytes, mais également dans les entérocytes.

Des études menées sur 271 patients diabétiques (diabète de type 2) et atteints de différents degrés de stéatose hépatique ont révélé un polymorphisme génétique au niveau de l'allèle 493 G/T du gène MTP (41). Une mutation de ce gène est alors associée à une diminution de la synthèse des VLDL et par conséquent, à une inhibition de l'exportation des TG hépatiques.

1.4.2 Causes nutritionnelles

Chez l'humain, il a été démontré qu'un apport calorique trop élevé, une alimentation très riche en graisse, une malnutrition et un déséquilibre alimentaire sont les principales causes du développement de la stéatose hépatique (36). En effet, les études de Bennion et Grundy (42) menées sur des patients hypercaloriques ont montré la présence d'une stéatose hépatique dans 70 % des cas.

Afin de mieux comprendre l'influence de la nutrition sur le développement de la stéatose hépatique, les chercheurs ont réalisé que le travail sur des animaux permettait de mieux appréhender les stéatoses nutritionnelles. En outre, les travaux de Buettner R.

et coll. (43) effectués sur des rats soumis à un régime hypercalorique et riche en gras (15 %) ont montré une augmentation significative du poids et des TG hépatiques, alors que les rats soumis à une diète de base (7 % de lipides) avaient des caractéristiques hépatologiques normales.

Dans le même ordre d'idées, des travaux ont cherché à associer la stéatose hépatique à un régime alimentaire riche en hydrates de carbone. Sadanobou et coll. (44) ont étudié sur des rats mâles Wistar l'effet d'une diète riche en sucrose (31 % des calories) sur l'accumulation des gras dans le foie. Les résultats ont montré une accumulation des TG hépatiques six fois supérieure chez les rats soumis à une diète riche en sucrose comparativement au groupe témoin soumis à une diète normale. De plus, les études de Bacon et coll. (45) ont cherché à comparer chez le rat l'effet de plusieurs doses de sucrose, allant de 20 à 50 % de la diète, sur le développement de la stéatose hépatique. Les résultats ont révélé que seules les diètes contenant 25 à 50 % de sucrose permettent d'augmenter significativement la concentration des TG hépatiques, alors que les diètes contenant seulement 20 % de sucrose n'ont aucune influence significative. L'ensemble de ces études démontre qu'un excès de glucides peut aussi directement contribuer au développement de la stéatose hépatique. De même, il a aussi été prouvé que la déficience en certains micronutriments pouvaient être à l'origine des stéatoses hépatiques d'origine nutritionnelle (36). Artom (46) a entrepris des recherches dans le but d'évaluer le rôle de la choline dans le métabolisme des lipides. Pour ce faire, il a étudié le taux d'oxydation des acides gras à longue chaîne dans le tissu hépatique grâce à un marquage au carbone 14. Au cours de ces expériences, il a constaté que le taux d'oxydation des acides gras diminuait dans le tissu hépatique des rats ayant une déficience en choline et dont l'alimentation était pauvre en protéines. En revanche, l'addition de choline dans la ration alimentaire des animaux ramenait à la normale le taux d'oxydation des acides gras dans le tissu hépatique et diminuait significativement l'accumulation des TG dans le foie. Cependant, l'addition *in vitro* de la choline à la préparation hépatique n'avait aucun effet. La choline n'agissait donc pas comme catalyseur direct.

1.4.3 Interaction gène-environnement

Les études antérieures ont montré que les causes nutritionnelles et génétiques induisant la stéatose hépatique sont très nombreuses. Toutefois, les réponses (développement de la stéatose hépatique) à ces causes sont très variables. En partant de ces observations il a été démontré que l'interaction des gènes et de l'environnement joue un rôle prépondérant dans le développement de la stéatose hépatique. En effet, des stimuli environnementaux peuvent déclencher des réponses génétiques pour amorcer ou supprimer le phénotype pathologique (47). Dans de nombreux cas, des voies de signalisation discrètes sont déclenchées, ce qui permet ainsi aux individus de s'adapter à de nouveaux stimuli environnementaux. La découverte des gènes et des voies qui agissent comme modificateurs génétiques des réponses adaptatives aux nouveaux stimuli environnementaux pourrait nous aider à mieux comprendre la pathologie. Ainsi, des études ont été réalisées afin de mettre en évidence les interactions entre les gènes et l'environnement (régime alimentaire) dans le développement de la stéatose hépatique. Nous en décrivons l'exemple suivant :

Afin de clairement établir la réponse à une diète hyperlipidique en fonction du génome, des études antérieures de mon laboratoire d'accueil (Bouchard *et coll.* observations non publiés) ont comparé la réponse à une diète hyperlipidique chez 43 souches consanguines. Les facteurs environnementaux (composition de la diète, durée de traitement, température de la pièce, ...) étaient identiques pour toutes les souches au cours de ces études, ce qui permettait d'établir directement le rôle du génome dans la réponse à la diète. Le développement de la stéatose hépatique a été suivi par un score histologique qui varie entre "0" et "4". Ce score qualitatif reflète donc le degré de développement de la stéatose hépatique chez la souche concernée. Ces études ont montré que la répartition du score histologique chez les 43 souches consanguines établie que la réponse à la diète hyperlipidique est très différente entre les diverses souches. En effet certaines souches, telle la souche C58/J sont très sensibles au développement d'une stéatose hépatique (score = 4) alors que d'autres souches, telle la

souche Lp/J sont plutôt plus résistantes à ce phénotype. Nous concluons donc que le génome joue un rôle majeur dans la réponse à la diète hyperlipidique.

1.5 Mécanismes associés à la stéatose hépatique

L'accumulation normale des TG dans le foie résulte d'un équilibre métabolique entre la synthèse et l'utilisation des TG hépatiques (36). Une multitude de lésions et de facteurs sont susceptibles de causer une perturbation de ces voies métaboliques.

1.5.1 Augmentation de la capture hépatique des acides gras

Une augmentation de l'absorption intestinale de graisses ou encore une mobilisation des acides gras du tissu adipeux pourrait induire une augmentation de la capture hépatique des acides gras (10). Ils favoriseraient l'accumulation des TG dans le foie et le développement de la stéatose hépatique.

Une étude menée sur des rats Wistar ayant subi un stress alimentaire (régime riche en gras) a montré une activité élevée des LPL associée à une augmentation des acides gras libres dans le plasma et à une accumulation des TG dans le foie. Ces découvertes confirment le rôle prépondérant des LPL dans la transformation des surfaces membranaires des chylomicrons et dans la libération des acides gras dans le plasma. La disponibilité des acides gras est alors accrue, ce qui favorise leur capture par le foie (48). Dans une démarche similaire, il a été démontré que les Apo E sont également impliquées dans l'augmentation de la capture hépatique des acides gras. En effet, une surexpression des Apo E provoquerait un accroissement de la capture des acides gras dans le foie, stimulant ainsi le stockage des TG. Cette hypothèse a déjà été validée lors des études de Quartford *et coll.* (49) qui ont incorporé des Apo E humaines dans des émulsions de TG hépatiques de rats. Ils ont alors observé une augmentation des TG hépatiques après une heure de perfusion. De même, la morphologie micro et macroscopique révélait la présence d'une stéatose hépatique.

1.5.2 Augmentation de la lipogenèse

Chez les mammifères, la synthèse des TG dans le foie à partir des glucides peut être stimulée par une alimentation riche en hydrates de carbone (45). C'est par ce biais que l'organisme s'adapte à une ingestion excessive de glucides car la capacité de stockage de glycogène dans le corps est très limitée. Il a été démontré que la lipogenèse hépatique est accrue chez des rats soumis à une diète riche en glucides (50). En effet, la faible présence de TG synthétisés dans le sang accompagnée d'une augmentation de la lipogenèse hépatique seraient susceptibles d'avoir de multiples conséquences telles que la stéatose hépatique.

Des travaux ont été réalisés sur des souris soumises à une diète riche en hydrates de carbone. L'augmentation de l'activité des enzymes de la lipogenèse dans le foie (acétylCoA-carboxylase, acide gras synthétase, glucose-6-phosphate-déshydrogénase) suggère un potentiel de lipogenèse très élevé (51).

À partir de ces études, il est possible de déduire que l'élévation de la vitesse de synthèse des TG trouve son origine dans les événements suivants : augmentation de la disponibilité et de la capture hépatique des glucides, activation des enzymes de la lipogenèse, augmentation de la biosynthèse des acides gras et par la suite des TG hépatiques.

1.5.3 Diminution de l'oxydation des acides gras

Plusieurs recherches ont montré qu'en cas de stéatose hépatique il se produisait une diminution de l'oxydation des acides gras. Par conséquent, la transformation des acides gras en TG est plus importante, provoquant une accumulation de ces derniers dans le tissu hépatique (52). Afin de mieux comprendre l'interaction de la stéatose hépatique avec le stress oxydatif, des inhibiteurs du cycle oxydatif comme l'acide 3-mercaptopropionique (MPA) ont été administrés pendant 225 minutes à des rats. Ceux-ci ont alors présenté une accumulation des TG hépatiques plus importante que les rats n'ayant pas reçu de MPA. En effet, il a été démontré que le MPA inhibait l'action d'une enzyme (Acyl CoA déshydrogénase) essentielle dans l'oxydation des acides gras

(53). Or, ce phénomène est fondamental afin d'éviter l'accumulation des TG hépatiques. En revanche, il est important de mentionner que certaines études suggèrent que l'oxydation excessive des acides gras pourrait induire des lésions hépatiques telles que la stéatose. Une régulation du stress oxydatif des acides gras est alors primordiale pour prévenir le développement de la stéatose hépatique (36).

1.5.4 Trouble de relargage des TG hépatiques

Chez le rat, la sécrétion dans le plasma de TG incorporés dans une molécule de lipoprotéines (VLDL) paraît être la voie principale de l'utilisation des TG hépatiques (54). De nombreux travaux sur des souris *Pemt*^{-/-} ont démontré que le blocage de la sécrétion des TG hépatiques dans le plasma était responsable des stéatoses induites par un régime hyperlipidique (55, 56). L'une des caractéristiques commune à ce groupe de stéatose est que l'accumulation des TG dans le foie est accompagnée d'une décroissance de la concentration plasmique des TG et des lipoprotéines. Différentes techniques (foie perfusé, acide gras marqué) ont démontré que c'était bien par une inhibition de la sécrétion dans le plasma que les TG s'accumulaient dans le foie (57). Ce défaut de sécrétion des TG est causé essentiellement par un trouble de la synthèse ou de la sécrétion des lipoprotéines ou bien par la combinaison des deux. Il existe en effet dans ces circonstances, une chute de la concentration des lipoprotéines plasmatiques qui précède et accompagne la constitution de la stéatose.

Le mécanisme intime de ces anomalies des lipoprotéines pourrait impliquer l'un de ces quatre processus :

- anomalie de synthèse des TG ou d'une fraction lipidique des lipoprotéines.
- anomalie de synthèse de la fraction protéique des lipoprotéines.
- diminution de la disponibilité des constituants de la molécule lipoprotéique.
- trouble de la sécrétion des lipoprotéines plasmatiques.

En cas de stéatose due à un déficit en choline, ce trouble pourrait être dû à un déficit de synthèse de la fraction phospholipidique de la molécule (57).

En se référant à nos connaissances actuelles du métabolisme des TG hépatiques, il est possible de résumer les mécanismes fondamentaux impliqués dans la stéatose hépatique en trois points :

- 1) la vitesse de synthèse des TG est normale, mais il y a un blocage de leur utilisation.
- 2) la vitesse de synthèse des TG est augmentée sans trouble de leur utilisation.
- 3) il se produit à la fois une augmentation de la synthèse des TG et un défaut de leur utilisation.

1.6 Traitement de la stéatose hépatique

Jusqu'à présent, on ne connaît pas de traitement universel efficace contre la stéatose hépatique. Etant donné que les causes de la pathologie sont multiples, il est très difficile de se faire une idée claire sur un traitement unique à la stéatose hépatique. En effet, chaque patient est traité selon le cas.

Ainsi, pour les causes nutritionnelles, les cliniciens recommandent aux patients de suivre un régime alimentaire équilibré qui respecte les directives générales d'une bonne nutrition selon la pyramide du guide alimentaire. La diète doit être faible en gras et avoir un apport élevé en glucides et suffisamment de protéines. Ceci permet d'une part de réduire l'apport de gras au foie, et d'autre part de favoriser la formation des lipoprotéines (36,9).

2. PROBLÉMATIQUE

Les voies métaboliques de développement de la stéatose hépatique ont fait l'objet de nombreuses études génétiques et nutritionnelles. Toutefois, les causes de la variabilité du développement de la pathologie selon les patients sont encore peu connues. En effet, une question demeure : pour quelle raison la stéatose hépatique apparaît-elle chez certains patients en présence d'une diète riche en lipides, alors que d'autres individus sont moins susceptibles à la même diète ?

Afin d'éclairer les aspects problématiques de cette pathologie, il nous a semblé pertinent de travailler avec des souches consanguines susceptibles à la diète hyperlipidique telles que la souche C58/J, et avec des souches moins susceptibles telles que la souche Lp/J (précédemment identifiés).

Nous proposons donc de mener une recherche des loci génétiques (QTL) en vue d'identifier une base moléculaire et de mettre en évidence la raison pour laquelle la souche C58/J est prédisposée à la stéatose hépatique en présence d'une diète hyperlipidique.

2.1 Objectif de l'étude

Identifier des loci génétiques associés à la stéatose hépatique chez la souche murine C58/J sous diète hyperlipidique.

2.2 Objectifs spécifiques

1. Confirmer biochimiquement les observations histologiques antérieures selon lesquelles il existe une différence importante dans la réponse (développement de la stéatose hépatique) à une diète hyperlipidique entre les souches C58/J et Lp/J.
2. Définir la variation de réponse à la diète hyperlipidique chez les souches parentales C58/J et Lp/J par le biais de l'analyse de paramètres anthropométriques, hépatiques et sériques associés à la stéatose hépatique.

3. Déterminer si la réponse à la diète hyperlipidique chez les descendants F1 C58LP et LPC58 est influencée par le genre des souches parentales.
4. Établir la distribution des TG hépatiques chez la génération F2 C58LP et identifier le ou les QTL correspondants à ce phénotype.
5. Identifier le gène candidat le plus intéressant dans la région du QTL et justification par des arguments physiologiques préliminaires.

3. STRATÉGIE EXPÉRIMENTALE ET PRINCIPE DU QTL

L'identification d'une région chromosomique associée à un phénotype donné définit un QTL. Lors de notre étude, nous allons nous intéresser aux phénotypes associés à la stéatose hépatique.

Les QTL peuvent être identifiés à la seule condition que les phénotypes en question soient représentés dans une colonie présentant une répartition hétérogène (58). Pour ce faire, nous avons croisé deux souches parentales dont la sensibilité à la stéatose hépatique est différente (sensible et résistante) dans le but de produire une génération F2 caractérisée par un bagage génétique mixte. Ceci ramène à la variabilité phénotypique (figure 10).

Le phénotypage effectué, nous avons procédé au génotypage du génome de chaque descendant F2. En effet, grâce aux progrès de la biologie moléculaire, plusieurs marqueurs microsatellites sont maintenant disponibles et peuvent être distribués de façon égale sur l'ensemble du génome. Ces marqueurs sont polymorphiques et permettent de distinguer l'origine parentale de l'allèle d'un locus (59). Ainsi, le déséquilibre de liaison entre le génotype et le phénotype permettra de définir le QTL dans un chromosome.

Une analyse statistique de tous les chromosomes permettra d'identifier le ou les QTL significatifs.

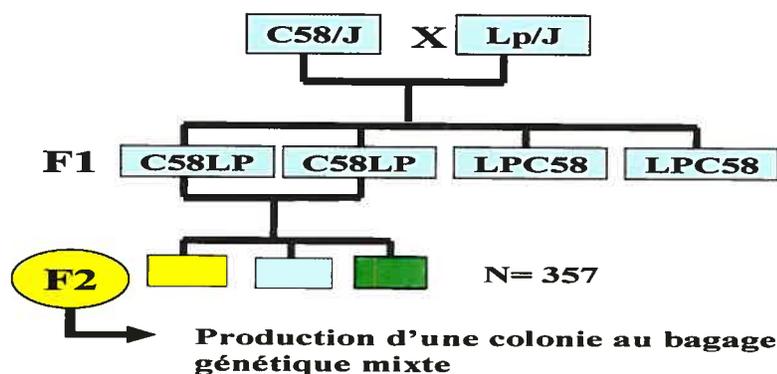


Figure 10 : Arbre génétique de la colonie F2 C58LP

4. MÉTHODOLOGIE

4.1 Souris et diètes

Les souris parentales consanguines C58/J et Lp/J sont issues du laboratoire Jackson, alors que les descendants des générations F1 et F2 proviennent du laboratoire du Dre. Beverly Paigen, notre collaboratrice.

À l'âge de trois semaines, les souris femelles et les souris mâles ont été séparées. Leur sevrage effectué, elles ont été soumises à une diète de base (Teklad Global : 18 % Protein Rodent Diet). À l'âge de 10 semaines, les souches parentales ont été séparées en deux groupes. Le premier a été maintenu sous diète de base alors que le deuxième, tout comme les descendants F1 et F2, a été soumis à une diète hyperlipidique composée de 15 % de lipides saturés, de 1 % de cholestérol, de 0,5 % d'acide cholique, de 50 % de sucrose, de 20 % de caséine, et de certaines vitamines et minéraux essentiels. De plus, l'apport en eau était illimité. Le cycle de la lumière était de 14 heures de jour et de 10 heures de nuit, et la température ambiante de la salle était contrôlée à 22°C. À l'âge de 18 semaines, toutes les souris ont été sacrifiées.

4.2 Paramètres anthropométriques

La veille du sacrifice, les souris ont été pesées et la distance entre le museau et l'anus a été mesurée. Ceci a permis de calculer l'indice de masse corporelle (IMC) dont la formule est la suivante : $IMC = \text{Poids (g)} / (\text{Taille (cm)})^2$.

4.3 Protocole du sacrifice

À 7 h 00 du matin, les souris ont été mises à jeûn pour une période de 4 heures, puis anesthésiées par injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique dosé à 50 mg/kg (MTC Pharmaceuticals Cambridge, Ontario).

Par la suite, les souris ont subi une laparotomie afin que l'on puisse procéder à un prélèvement sanguin par ponction aortique. Le sérum ainsi obtenu après centrifugation du sang à 13 000 RPM pendant 15 minutes, a été conservé à -20°C. La vésicule biliaire a été extraite après ligature du canal cystique et la bile qu'elle contenait a été conservée à -20°C. Enfin, le foie a été rapidement prélevé, pesé et divisé en fragments qui ont été plongés dans l'azote et congelés à -80°C.

4.4 Dosages sériques

Les dosages sériques des TG, du cholestérol total, du HDL-cholestérol, des aminotransférases (AST et ALT) et du glucose ont été effectués par le laboratoire de biologie médicale de l'hôpital Sainte-Justine (Synchron clinical system Lx20, Beckman), alors que l'homocystéine a été dosée par le laboratoire du Dr. Yves Théoret (Automated immunoassay analyser IMX, Abott).

4.5 Dosages hépatiques des triglycérides

Le contenu des lipides hépatiques a été extrait d'un homogénat de 10 % selon la méthode Folch (60). Les TG hépatiques ont été dosés en utilisant les réactifs et les normes du kit TG-GPO-PAP de Roch Diagnostic Corp (Indianapolis, USA). En bref, le principe de ce dosage repose sur les travaux de Wahlefeld qui fait appel à l'hydrolyse rapide et complète des TG en glycérol. Ces derniers se transforment en glycérol 3 phosphate, puis en dihydroxyacétone (phosphate associé à une formation d'eau oxygénée) sous l'effet de l'oxydation. Le réactif TG ou tampon «chloro 4 phénol» réagit avec l'eau oxygénée et forme une coloration rouge dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de TG présente dans l'échantillon. Celle-ci s'exprime sous la forme d'une densité optique et se mesure à l'aide d'un spectrophotomètre dont la longueur d'onde est de 500 nm.

4.6 Dosages biliaires des phospholipides

Le dosage des PL biliaires a été effectué par une stagiaire de recherche de notre laboratoire. Le principe du dosage effectué repose sur les travaux de Bartlett (61) qui fait appel à l'hydrolyse des PL en acide phosphorique (PO₄).

Le réactif utilisé pour ces dosages est le «Fiske-subbarow» de la compagnie Sigma. Ce dernier forme une coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de PO₄ présente dans l'échantillon. Celle-ci s'exprime sous la forme d'une densité optique et se mesure à l'aide d'un spectrophotomètre dont la longueur d'onde est de 830 nm.

4.7 Génotypage

L'ADN génomique a été préparé à partir de queue de souris (1cm) suite à une extraction de phénol chloroforme (60). Par la suite, le génotype individuel des 357 souris a été établi grâce à l'amplification PCR de 107 marqueurs microsatellites choisis pour être polymorphiques entre les C58/J et les Lp/J. Les fragments amplifiés ont été visualisés par le biais d'une électrophorèse sur gel d'agarose de 4,5 %. La figure 11 présente la liste et la distribution des marqueurs microsatellites obtenus sur le génome de la colonie F2 C58LP. Il est important de souligner que le génotypage a été entièrement effectué par nos collègues du laboratoire Jackson.

4.8 Analyses et statistiques

Nous avons analysé les données phénotypiques par la méthode de l'analyse de la variance à une voie afin de déterminer l'effet de la diète sur les souches parentales et de comparer les souches parentales à la génération F1 soumises à une diète hyperlipidique. Le test appliqué est celui de Tukey pour lequel une valeur de $p < 0.05$ sera considérée comme statistiquement significative. Pour présenter la distribution phénotypique des TG et des PL biliaires sur la colonie F2 C58LP, nous avons utilisé le logiciel Excel.

L'identification des loci génétiques a été effectuée par nos collègues du laboratoire Jackson. La significativité du QTL est évaluée par le calcul du ratio de probabilité selon l'équation suivante : la probabilité d'observer une liaison entre le génotype et le phénotype divisée par la probabilité de ne pas observer une liaison entre le génotype et le phénotype (donc par chance).

Le «lod score» est calculé en multipliant le ratio de probabilité par \log_{10} . Si le «lod score» est égale à 3 ceci représente un ratio de 1000/1 en faveur de cette de liaison (avec un risque de 1/1000 que ce résultat soit du hasard). Nous avons proposé, tel que proposé par Lander (62), un QTL statistiquement significative si le «lod score» > 3.3 .

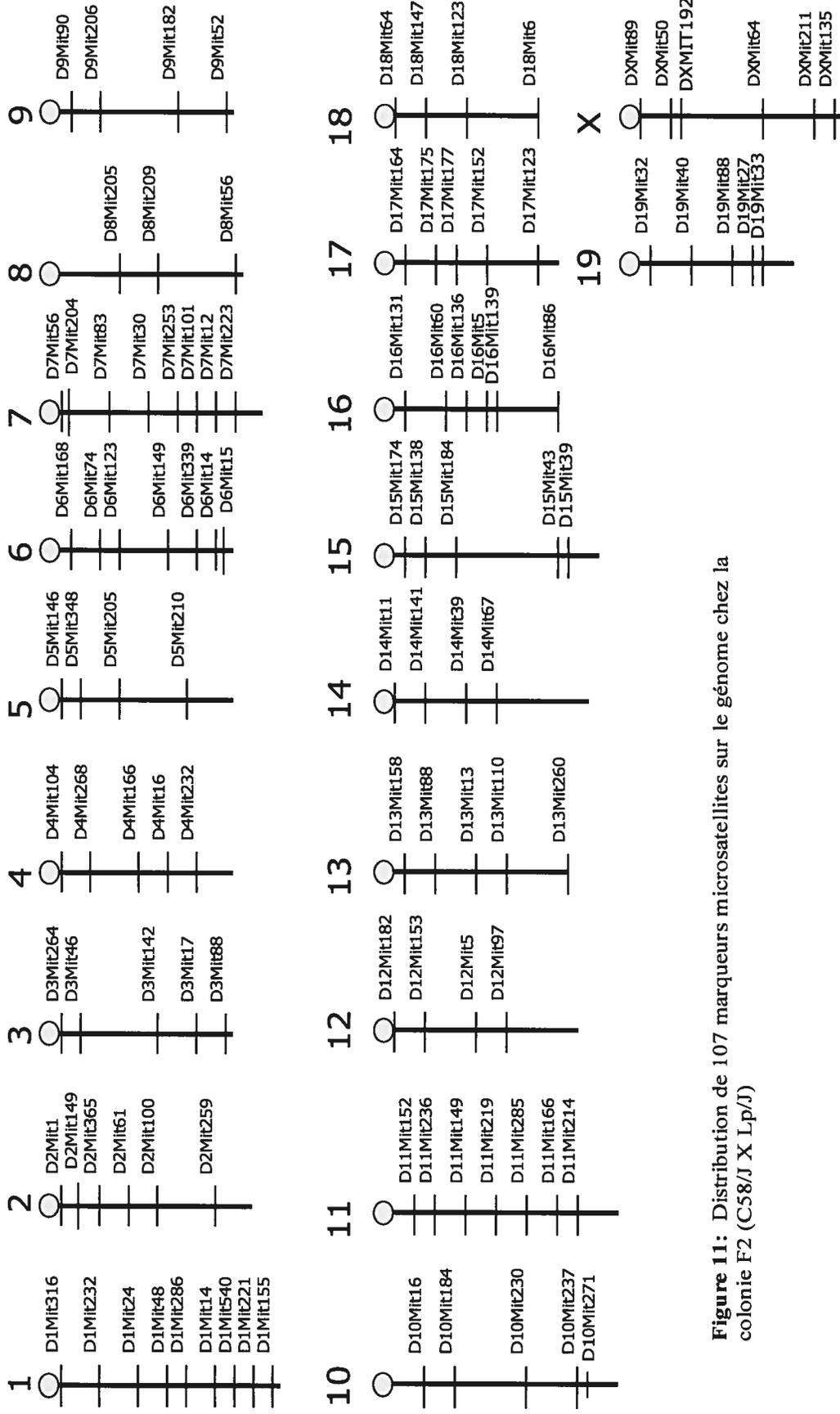


Figure 11: Distribution de 107 marqueurs microsatellites sur le génome chez la colonie F2 (C58/J X Lp/J)

5. RÉSULTATS

5.1 Diagnostic de la stéatose hépatique chez les souches parentales C58/J et Lp/J

En condition basale, les TG hépatiques des deux souches C58/J et Lp/J sont similaires (figure 12).

Suite à l'administration de la diète hyperlipidique, une augmentation importante et hautement significative de la concentration des TG hépatiques a été observée, tant chez la souche Lp/J que C58/J. Toutefois, l'accumulation des TG hépatiques est de 20 fois supérieure chez la souche C58/J que celle de la souche Lp/J. Cette différence est statistiquement significative ($p < 0.001$). Les résultats montrent également que le genre n'a pas d'incidence sur ce phénotype.

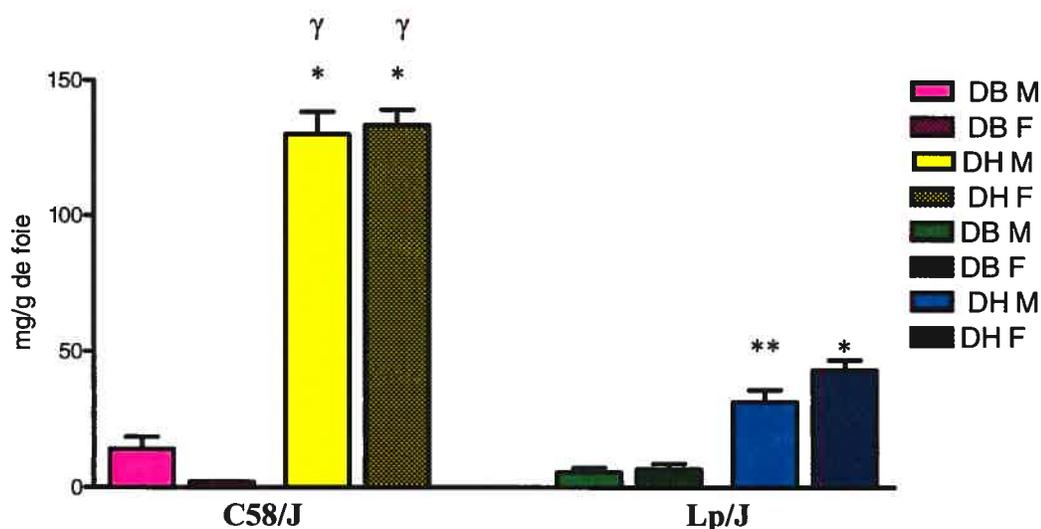


Figure 12 : Triglycérides hépatiques chez les souches parentales C58/J (M : mâles; F : femelles) et Lp/J (M : mâles; F : femelles) sous diète de base (DB) et diète hyperlipidique (DH). Données indiquent les moyennes \pm SEM. Analyses de variance à une voie et test « Tukey » : Lp/J DB M versus Lp/J DH M, ** $p < 0.01$; Lp/J DB F versus Lp/J DH F, * $p < 0.001$; C58/J DB versus C58/J DH, * $p < 0.001$; C58/J DH versus Lp/J DH, γ $p < 0.001$

5.2 Autres effets de la diète hyperlipidique chez les souches parentales C58/J et Lp/J

Afin de mieux comprendre la sensibilité des souches C58/J et Lp/J à la stéatose hépatique, nous avons comparé les paramètres anthropométriques, hépatiques et sériques de ces dernières.

5.2.1 Paramètres anthropométriques et hépatiques

En condition basale, le poids corporel (Pco), l'indice de masse corporelle, le poids hépatique (PF) et le pourcentage PF/Pco des deux souches C58/J et Lp/J sont similaires (figures 13).

Suite à l'administration de la diète hyperlipidique, le poids corporel et l'IMC final demeurent inchangés, aussi bien chez la souche C58/J que chez la souche Lp/J. Toutefois, une augmentation hautement significative du poids hépatique et du pourcentage PF/PC a été observée chez la souche C58/J, alors que ceux de la souche Lp/J demeurent inchangés. En effet, le poids hépatique est trois fois plus élevé pour la souche C58/J, ce qui témoigne d'une hépatomégalie.

Les résultats montrent également que le genre n'a pas d'incidence sur ces phénotypes.

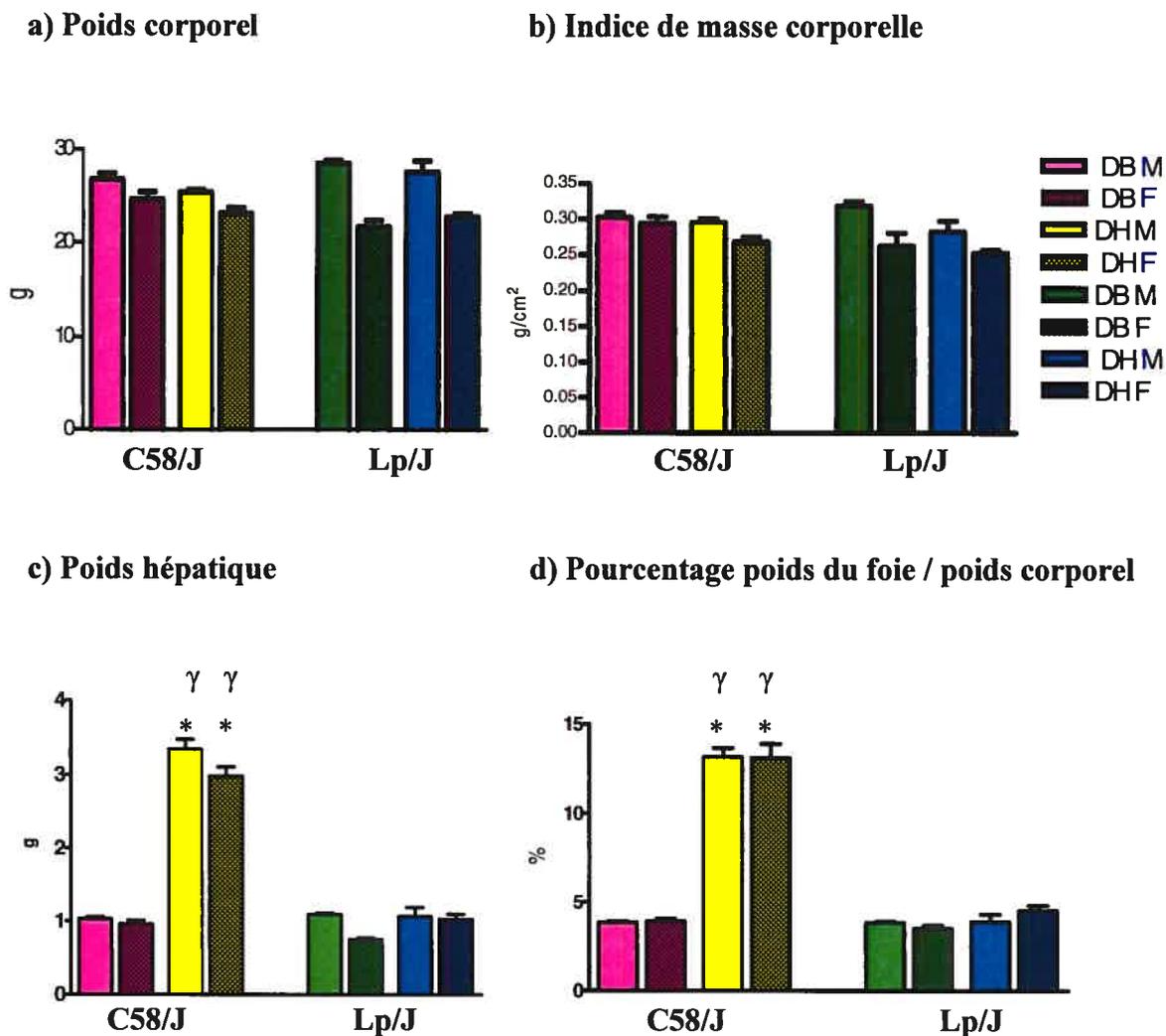


Figure 13 : Paramètres anthropométriques et hépatiques chez les souches parentales C58/J (M : mâles; F : femelles) et Lp/J (M : mâles; F : femelles) sous diète de base (DB) et diète hyperlipidique (DH). Données indiquent les moyennes \pm SEM. Analyses de variance à une voie et test « Tukey » : **c)** C58/J DB versus C58/J DH, * $p < 0.001$; C58/J DH versus Lp/J DH, γ $p < 0.001$ **d)** C58/J DB versus C58/J DH, * $p < 0.001$; C58/J DH versus Lp/J DH, γ $p < 0.001$

5.2.2 Paramètres sériques

En condition basale, aucune différence significative n'est observée entre les souches C58/J et Lp/J au niveau des TG, du cholestérol total et ses fractions (HDL et NON-HDL), des transaminases (AST et ALT), ainsi que du glucose (figure 14).

Suite à l'administration de la diète hyperlipidique, aucun changement significatif n'a été observé du taux de TG et de glucose sérique chez les deux souches.

Concernant le cholestérol total et ses fractions (HDL et NON-HDL), nous n'avons constaté aucun changement significatif chez la souche Lp/J. À l'inverse, nous avons remarqué une augmentation significative de l'ensemble des niveaux sériques chez la souche C58/J, excepté chez les femelles pour lesquelles le changement des NON-HDL et des HDL cholestérol n'est pas significatif. Une diminution non significative du ratio HDL/NON-HDL a aussi été observée chez la souche C58/J et Lp/J.

Enfin, les résultats ont révélé une légère augmentation non significative des transaminases sériques chez les deux souches de souris. Toutefois, nous n'avons noté une augmentation significative des ALT que chez les souris C58/J males. De plus, aucun changement significatif du ratio AST/ALT n'a été observé chez les deux souches.

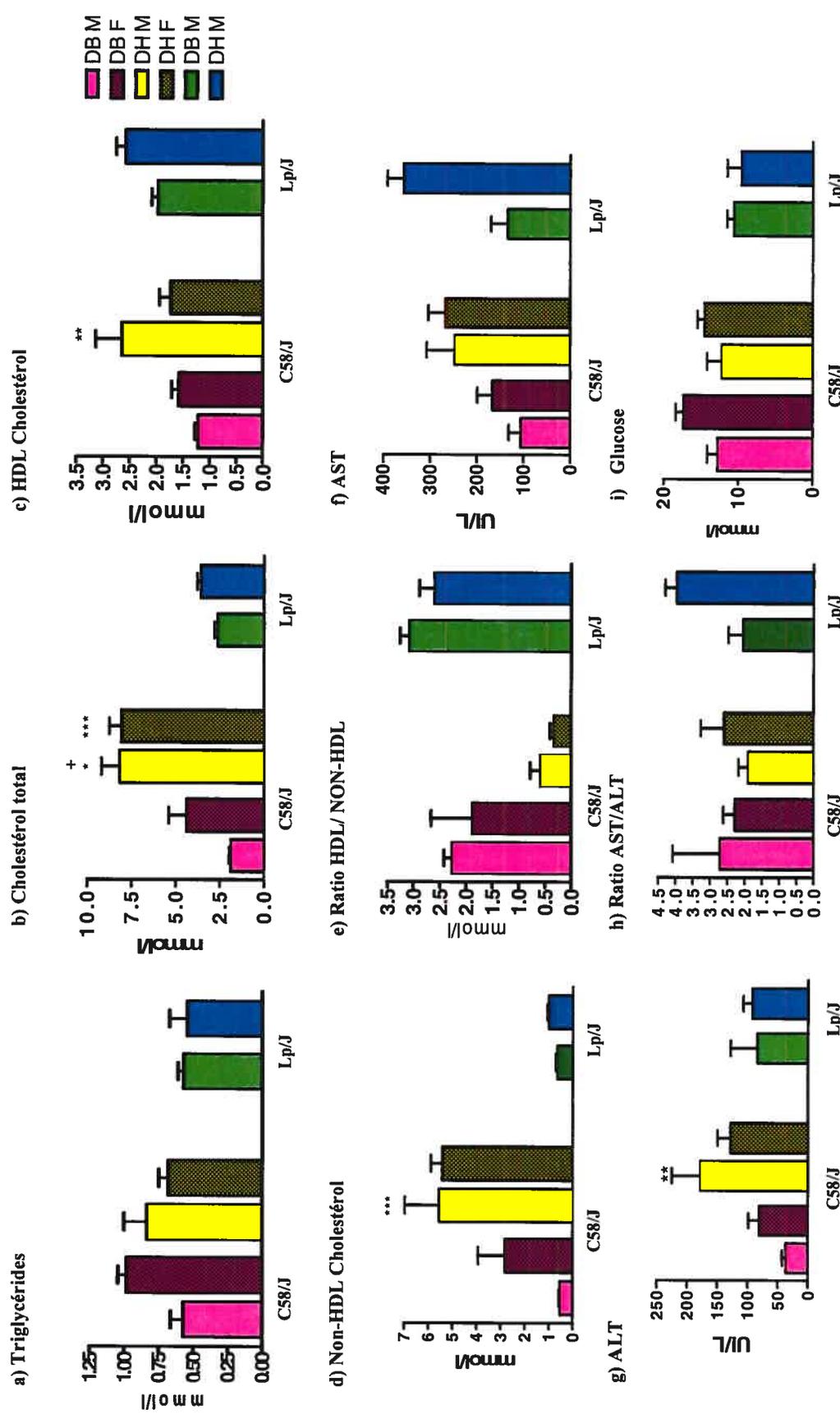


Figure 14 : Paramètres sériques des souches parentales C58/J (M : mâles; F : femelles), Lp/J mâles (M) sous diète de base (DB) et diète hyperlipidique (DH). Données indiquent les moyennes \pm SEM. Analyses de variance à une voie et test « Tukey »: **b)** C58/J DB F versus C58/J DH F, *** $p < 0.05$; Lp/J DH M versus C58/J DH M, + $p < 0.01$; C58/J DB M versus C58/J DH M, * $p < 0.001$ **c)** C58/J DB M versus C58/J DH M, ** $p < 0.01$ **d)** C58/J DB M versus C58/J DH M, *** $p < 0.05$ **g)** C58/J DB M versus C58/J DH M, ** $p < 0.01$

5.3 Suivi des principaux facteurs de risques de la stéatose hépatique chez les générations F1 C58LP et LPC58

Les résultats précédents avec les souches parentales ont montré que le genre n'a pas d'effet significatif sur les phénotypes étudiés. Conséquemment, nous avons combiné le genre dans le suivi des principaux facteurs risques de la stéatose hépatique chez les générations F1 C58LP et LPC58. Ceux-ci permettent d'une part l'identification des changements de la réponse à une diète hyperlipidique chez les générations F1 par rapport aux souches parentales et, d'autre part, de déterminer le croisement F2 nécessaire pour identifier des loci génétiques associés à la stéatose hépatique.

5.3.1 Paramètres anthropométriques et hépatiques

Suite à l'administration de la diète hyperlipidique, la concentration des TG hépatiques chez les générations F1 (C58LP et LPC58) est significativement diminuée ($p < 0.001$) par rapport à celle des souches parentales C58/J et Lp/J, ce qui témoigne d'une protection hétérozygote des générations F1. Toutefois, le poids hépatique et le pourcentage PF/Pco chez les générations F1 sont similaires à ceux de la souche Lp/J et statistiquement différents de ceux de la souche C58/J (excepté le poids hépatique de la génération F1 C58LP qui est statistiquement différent de la souche Lp/J) (figure 15).

Enfin, l'IMC et le poids corporel chez la génération F1 C58LP sont statistiquement différents de ceux de la souche C58/J ($p < 0.05$).

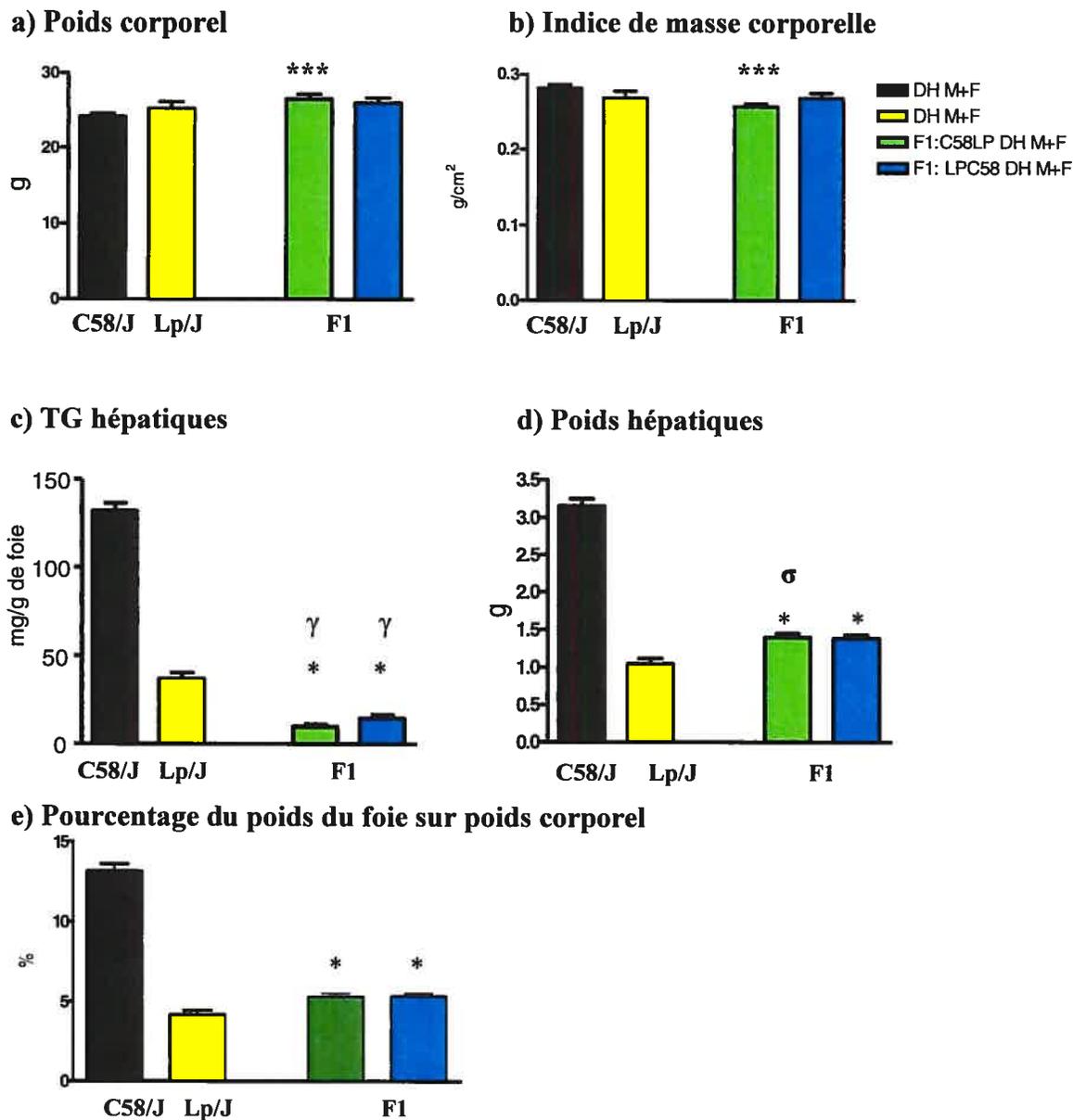


Figure 15 : Paramètres anthropométriques et hépatiques chez les souches parentales C58/J (M+F : mâles et femelles), Lp/J (M+F : mâles et femelles) et les générations F1 C58LP (M+F : mâles et femelles) et LPC58 (M+F : mâles et femelles). Toutes les souris sont soumises à une diète hyperlipidique (DH). Données indiquent les moyennes \pm SEM. Analyses de variance à une voie et test « Tukey »: **a)** C58/J versus F1 C58LP, *** $p < 0.05$ **b)** C58/J versus F1 C58LP, *** $p < 0.05$ **c)** C58/J versus F1 (C58LP et LPC58),* $p < 0.001$; Lp/J versus F1 (C58LP et LPC58), γ $p < 0.001$ **d)** Lp/J versus F1 C58LP, σ $p < 0.05$; C58/J versus F1 (C58LP et LPC58),* $p < 0.001$ **e)** C58/J versus F1 (C58LP et LPC58),* $p < 0.001$

5.3.2 Paramètres sériques

Suite à l'administration de la diète hyperlipidique, les concentrations de TG, de cholestérol total et de NON-HDL cholestérol des générations F1 (C58LP et LPC58) sont similaires à celles de la souche Lp/J, mais sont significativement plus faibles que celles de la souche C58/J. Concernant les HDL cholestérol, nous avons constaté une légère diminution des niveaux sériques chez les générations F1 par rapport à ceux des souches parentales (figure 16). En revanche, le ratio HDL/NON-HDL des générations F1 est similaire à celui de la souche C58/J, mais est significativement plus bas que celui de la souche Lp/J.

Quant aux transaminases sériques, nous avons remarqué que la concentration des ALT chez les générations F1 est similaire à celle de la souche Lp/J, mais est significativement inférieure à celle de la souche C58/J. De plus, nous avons noté une diminution significative des AST sériques chez la génération F1 LPC58 comparativement aux deux souches parentales.

Enfin, le ratio AST/ALT ne présente aucune différence significative entre les générations F1 et les souches parentales et le taux de glucose est significativement plus élevé chez la génération F1 C58LP que chez la souche Lp/J.

Dans la majorité des cas, ces résultats ont montré que la réponse à la diète hyperlipidique est similaire chez les deux générations F1 C58LP et LPC58 mais est statistiquement différente de celle des souches parentales. Pour la suite de notre étude, nous avons choisi la génération F2 C58LP.

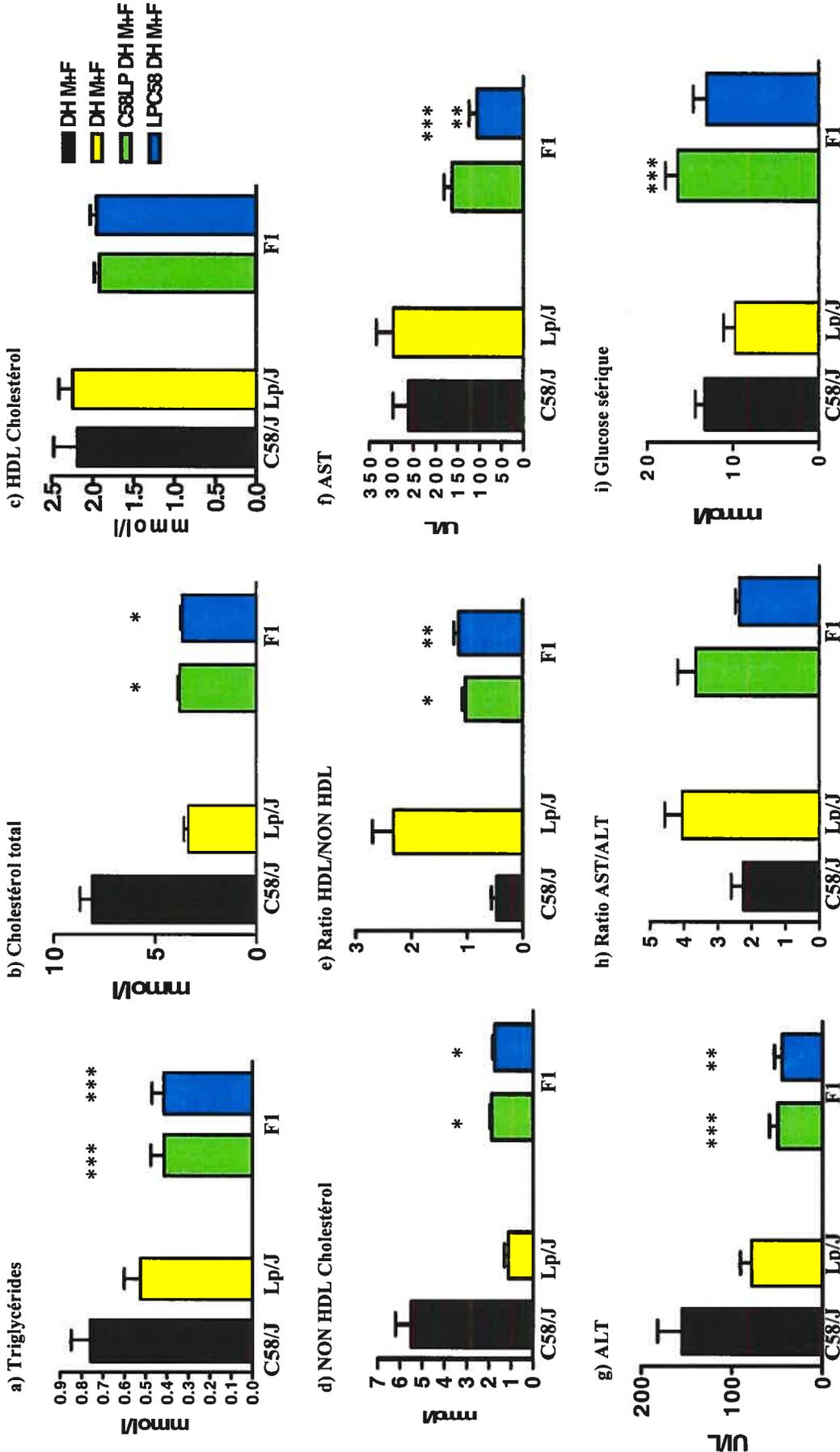


Figure 16 : Paramètres sériques chez les souches parentales C58/J (M+F : mâles et femelles), Lp/J (M+F : mâles et femelles) et les générations F1 C58LP (M+F : mâles et femelles) et LPC58 (M+F : mâles et femelles). Toutes les souris sont soumises à une diète hyperlipidique (DH). Données indiquent les moyennes ± SEM. Analyses de variance à une voie et test « Tukey »: a) C58/J versus F1 (C58LP et LPC58), *** p < 0.05 b) C58/J versus F1 (C58LP et LPC58), * p < 0.001 d) C58/J versus F1 (C58LP et LPC58), * p < 0.001 e) Lp/J versus F1 LPC58, ** p < 0.01; Lp/J versus F1 C58LP, * p < 0.001 f) C58/J versus F1 LPC58, *** p < 0.05; Lp/J versus F1 C58LP, *** p < 0.05; C58/J versus F1 LPC58, ** p < 0.01 i) Lp/J versus F1 LPC58, *** p < 0.05

5.4 Identification des loci associés aux TG hépatiques

5.4.1 Triglycérides hépatiques chez la colonie F2 C58LP

Tel qu'attendu, la réponse à la diète hyperlipidique chez la génération F2 C58LP est très variable. En effet, la figure 17 montre que la répartition des TG hépatiques chez les descendants F2 C58LP (n=357) est hétérogène.

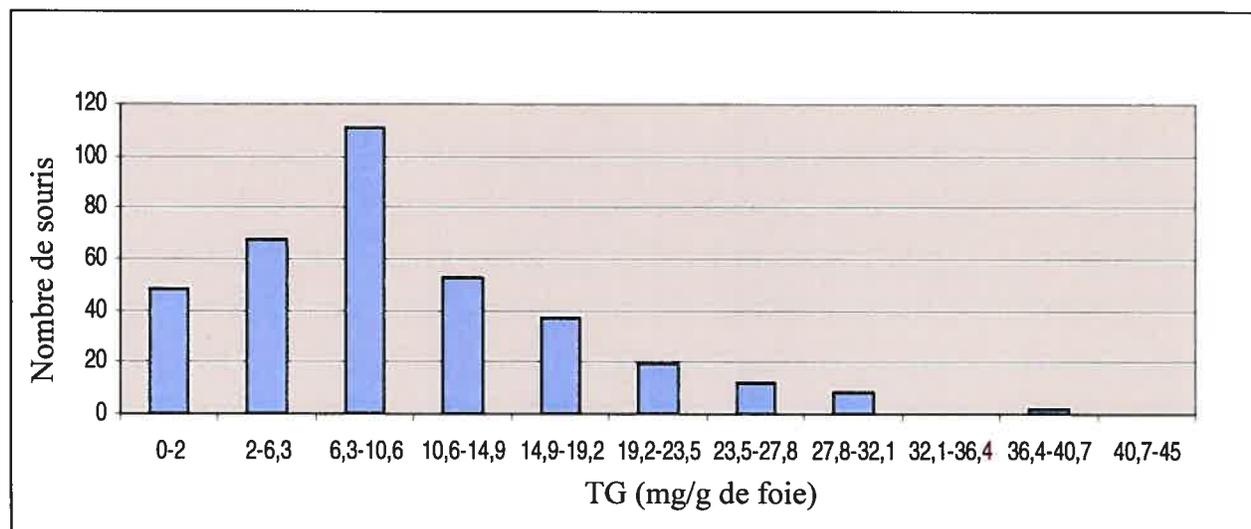


Figure 17 : Distribution des triglycérides hépatiques chez la colonie F2 C58LP.

5.4.2 Analyses des QTL associés aux TG hépatiques

Une analyse entière du génome a permis d'identifier un QTL sur le chromosome 11 associé aux TG hépatiques et est statistiquement significatif («Lod score» > 3.3) (figure 18).

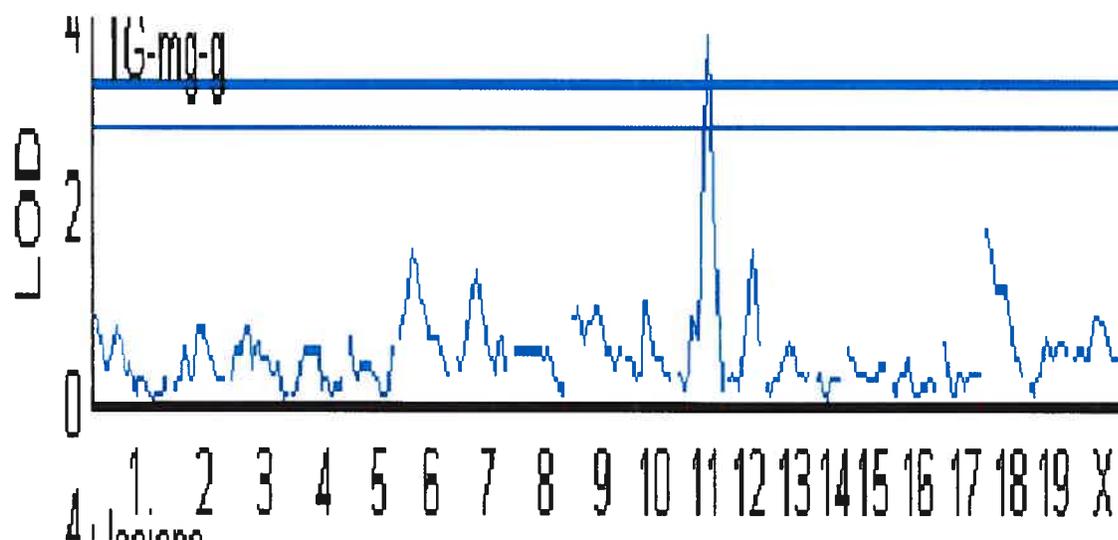


Figure 18 : Loci génétiques associés aux triglycérides hépatiques sur le génome

5.4.3 Suivi du QTL et gènes candidats

Une analyse plus détaillée sur le chromosome 11 montre que le QTL en question est situé dans l'intervalle des marqueurs microsatellites 11-143 (32 cM) et 11-214 (70 cM) avec un pic sur le marqueur 11-219 (43 cM) (Figure 19).

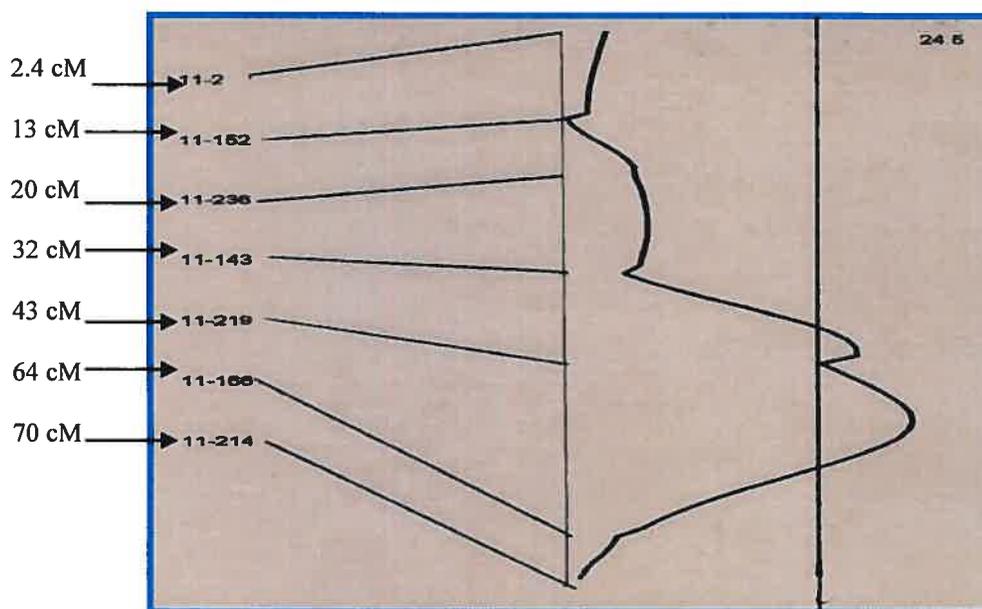


Figure 19 : QTL associé aux TG hépatiques dans le chromosome 11.

En nous référant à la banque de données « Mouse genome database » accessible sur le site www.ncbi.com, nous avons examiné plus spécifiquement 519 gènes situés dans la région du QTL identifié. La plupart de ces gènes ont une fonction encore méconnue, toutefois nous avons retenu trois gènes (*Fabp-6*, *Gfpt-2* et *Pemt*) qui pourraient être associés à la stéatose hépatique.

Une recherche complémentaire basée sur la littérature scientifique nous a permis de choisir le gène *Pemt* (voir discussion) afin d'analyser son implication possible dans le développement de la stéatose hépatique.

5.4.4 *Pemt* « Phosphatidylethanolamine N-Methyltransferase »

Le gène *Pemt* est formé de six exons dont la longueur varie entre 75 et 260 pb (23). Le clonage de l'ADN de ce gène révèle que deux des protéines synthétisées diffèrent de localisation cellulaire, ce qui suggère l'existence de deux isoformes de *Pemt*. Le premier (*Pemt-1*) est situé dans le réticulum endoplasmique et génère l'activité majeure de PEMT, et le second (*Pemt-2*) est localisé dans les mitochondries associées aux membranes. La différence entre ces deux isoformes n'est pas toujours claire, néanmoins elles sont toutes les deux capables de catalyser l'ensemble des étapes de la voie de méthylation afin de produire la PC.

Les études de Vance *et coll.* (63) ont permis de caractériser des souris déficientes en *Pemt*. Ces dernières développaient la stéatose hépatique et montraient les phénotypes suivants :

- 1 - diminution de la sécrétion de PC et des phospholipides biliaires.
- 2 - diminution du taux d'homocystéine plasmatique.

Par conséquent, le suivi de ces phénotypes peut nous conforter dans le choix du gène *Pemt*, candidat dans le développement de la stéatose hépatique.

5.4.4.1 Phospholipides biliaires chez la colonie F2 C58LP

Le premier test consiste à analyser la répartition des phospholipides biliaires chez la colonie F2 C58LP. Les résultats ont montré une répartition hétérogène (figure 20) ce qui nous a permis de chercher les QTL correspondants.

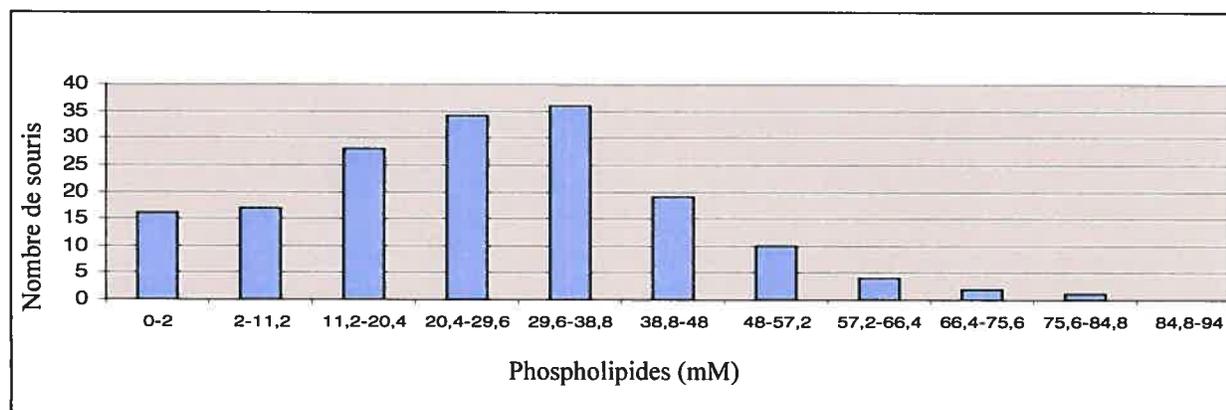


Figure 20 : Distribution des phospholipides biliaires chez la colonie F2 C58LP.

5.4.4.2 Analyses des QTL associés aux PL biliaires

Les analyses statistiques ont permis d'identifier un QTL significatif sur le chromosome 11. (figure 21)

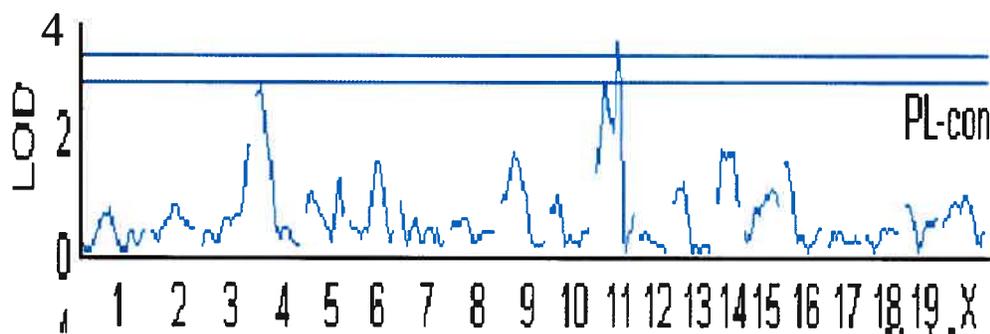


Figure 21 : Loci génétiques associés aux phospholipides biliaires sur le génome

Une analyse plus détaillée sur le chromosome 11 montre que le QTL associé aux PL biliaires est situé dans l'intervalle des marqueurs microsatellites 11-143 (32cM) et 11-160 (64cM). De plus, il est important de mentionner que ce dernier QTL colocalise celui des TG hépatiques avec le même pic sur le marqueur 11-219 (43cM) (Figure 22).

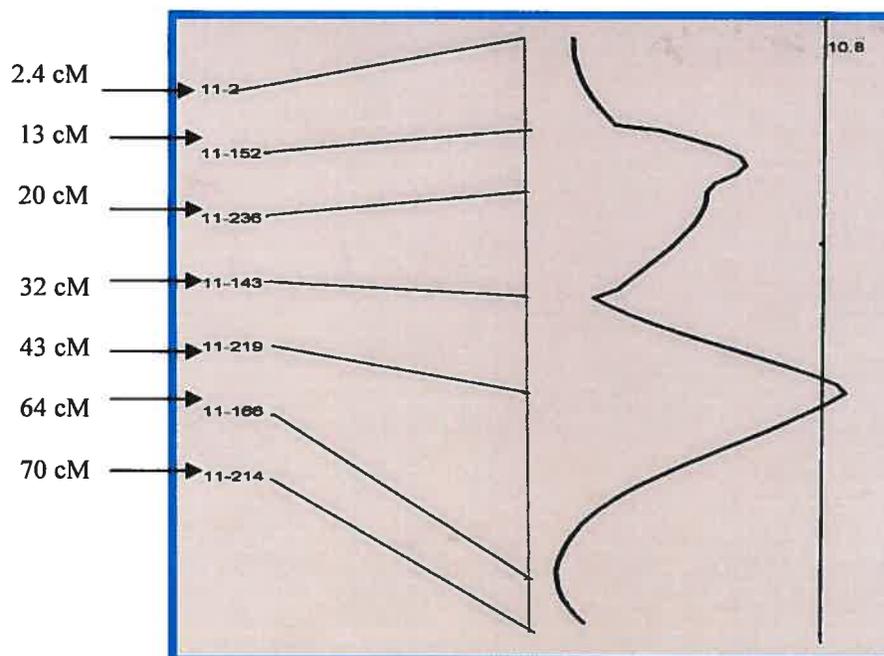


Figure 22 : QTL associé aux TG hépatiques dans le chromosome 11.

5.4.4.3 Homocystéine sérique chez la souris murine C58/J

Suite à l'administration de la diète hyperlipidique, une diminution significative ($p < 0.05$) de la concentration de l'homocystéine sérique a été observée chez les souris C58/J (figure 23). Ces résultats viennent supporter l'hypothèse d'une diminution de l'activité de PEMT chez la souche C58/J en présence d'une diète hyperlipidique.

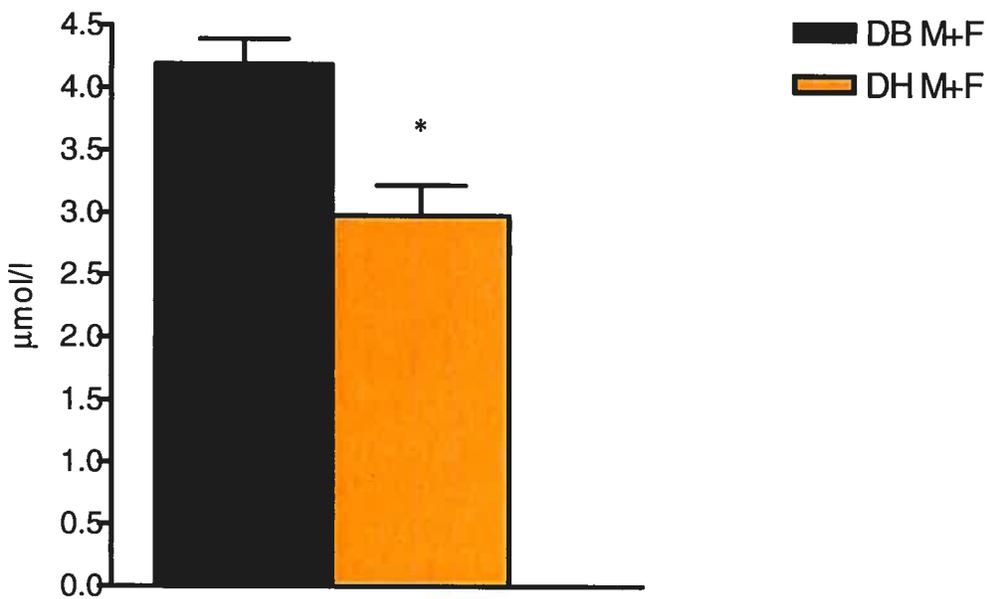


Figure 23 : Homocystéine sérique chez la souche C58/J (M+F : mâles et femelles, M : mâles, F : femelles) sous diète de base (DB) et diète hyperlipidique (DH). Données indiquent les moyennes \pm SEM. Analyses de variance à une voie et test «Tukey» : C58/J DH M+F versus C58/J DB M+F, * $p < 0.05$

6. DISCUSSION

Trente ans après sa première description formelle, la stéatose hépatique est un désordre métabolique dont la pathogénèse demeure énigmatique. Les études antérieures ont montré que les facteurs environnementaux et génétiques comptaient parmi les principales causes de cette anomalie. De ce fait, l'analyse des influences de l'alimentation, des facteurs de risque, des facteurs environnementaux et génétiques permettra de mieux comprendre cette pathologie et de développer des traitements mieux ciblés (36). Dans ce contexte, ma Maîtrise avait pour but l'identification des loci génétiques associés à la stéatose hépatique chez la souche murine C58/J sous diète hyperlipidique.

En nous appuyant sur les résultats d'une étude préliminaire, nous avons sélectionné deux souches parentales dont la réponse à la diète hyperlipidique est différente : la souche C58/J, sensible à la stéatose hépatique, et la souche Lp/J, beaucoup plus résistante à la stéatose hépatique selon des observations histologiques. Afin de confirmer ces choix, nous avons mesuré les TG hépatiques chez les deux souches après leur avoir administré une diète hyperlipidique. Il s'est avéré qu'en comparaison avec les souris ayant suivi une diète de base, l'accumulation des TG hépatiques était de 10 à 65 fois plus importante chez les souris C58/J sous diète hyperlipidique alors qu'elle n'était que 4 fois plus élevée chez les souris Lp/J. Ces résultats confirment donc l'hypersensibilité de la souche C58/J au développement de la stéatose hépatique.

Afin de mieux comprendre les effets de la diète hyperlipidique sur les souches C58/J et Lp/J, nous avons analysé la corrélation entre les paramètres hépatiques et les paramètres physiques et sériques. Nous avons pu noter une augmentation significative du poids hépatique et du pourcentage PF/Pco chez la souche C58/J sous diète hyperlipidique versus diète de base. Il est bien connue que l'administration d'une diète plus riche en gras (de l'ordre de 15% par rapport au régime de base composé de 7% de lipides) peut conduire à une accumulation des TG hépatiques et à une hépatomégalie (43). Lors d'une étude menée par Clark (29), une stéatose hépatique avait également été observée chez plusieurs patients dont le volume hépatique était au-dessus de la normale. Ceci démontre que le taux de TG dans le foie influence le poids hépatique. En effet, la souche Lp/J (sous

diète hyperlipidique) dont la concentration des TG hépatiques est moins élevée que la souche C58/J (sous diète hyperlipidique) montre un PC et un % PF/Pco inchangé, ce qui prouve que plus la concentration des TG hépatiques est élevée, plus le poids du foie est important.

Par ailleurs, nous n'avons observé aucun lien entre la concentration des TG hépatiques et l'IMC. Ce constat va dans le même sens que les études de Diehl (31) qui démontraient que la stéatose hépatique n'était pas nécessairement associée à une augmentation du poids corporel. Certaines recherches ont aussi démontré que la surexpression de 11 beta-hydroxystéroïde déhydrogénase type 1 chez des souris transgéniques, induisait une stéatose hépatique malgré l'absence d'obésité (64).

Au niveau sérique, une étude menée par Hecht et Chevrel (36) concluait que la synthèse de plusieurs marques biologiques telles que TG, glucose, cholestérol ou transaminases, était altérée par une accumulation des TG dans le foie, mais qu'une synthèse normale chez des patients atteints de stéatose hépatique n'était toutefois pas impossible. Lors de notre étude, nous avons observé que les taux des TG sériques chez les souris C58/J sous diète hyperlipidique n'ont pas changé de façon significatif. La stéatose hépatique chez ces souris pourrait donc être due à la conjonction de deux processus : l'augmentation de la vitesse de synthèse des TG hépatiques (suite à un apport accru des acides gras et une augmentation de la disponibilité des acides gras pour la capture hépatique) mais aussi et surtout à un blocage modéré de leur utilisation. Selon les travaux de Vance *et coll.* (63) un niveau normal des TG sériques chez des souris *Pemt*^{-/-} administrés par une diète riche en gras et en cholestérol (20%) s'expliquerait par une diminution de la synthèse des VLDL-TG empêchant ainsi le transport des TG du foie vers le sang.

De plus, nous avons constaté que la stéatose hépatique chez la souris C58/J sous diète hyperlipidique n'est pas associée à des changements significatifs des taux du glucose sérique. Plusieurs études cliniques ont souvent diagnostiqué la stéatose hépatique même en l'absence d'hyperglycémie ou d'hypoglycémie, dissociant la stéatose de la glycémie (27, 45). De manière beaucoup plus significative, nous avons noté une augmentation du taux de cholestérol total sérique chez la souche C58/J soumise à une diète hyperlipidique. Des résultats similaires avaient été obtenus par Aguilera *et coll.* (65) dans un tout autre

contexte expérimental. En effet, ils ont démontré que l'ingestion d'eau enrichie à 30% de sucrose conduisait au développement de la stéatose et à une élévation du cholestérol total sérique chez des rats « Wistar » ayant suivi ce régime pendant 21 semaines. Ces résultats prouvent que la stéatose hépatique s'associe à une hypercholestérolémie. Une étude réalisée par Tamura *et coll.* (66) mettait en évidence qu'en cas d'hypercholestérolémie, la stéatose hépatique était souvent accompagnée d'une diminution des HDL cholestérol (ou « bon cholestérol ») et d'une augmentation des NON-HDL (ou « mauvais cholestérol »). Au cours de notre recherche, nous avons également remarqué une augmentation significative du taux de NON-HDL cholestérol (celui des femelle est non significative). Toutefois, nous observons aussi une augmentation du taux de HDL cholestérol, en particulier chez les souris mâles (celui des femelles restant inchangé). Les souris C58/J mâles sous diète hyperlipidique sont donc moins prédisposées à une altération du métabolisme du cholestérol grâce à l'augmentation bénéfique de leurs HDL.

Enfin, pour évaluer les dommages hépatiques chez les deux souches parentales, nous avons mesuré les taux d'aminotransférases (AST et ALT). Une augmentation significative des ALT sériques a été observée seulement chez les souris mâles C58/J sous diète hyperlipidique. Ces résultats viennent corroborer ceux de Treem et Stanley (67). Nous pouvons donc affirmer que les souris mâles C58/J soumises à une diète riche en gras ont des lésions hépatiques plus élevées que les femelles.

Cette première partie du projet a permis d'observer une dissociation des facteurs liés au syndrome métabolique. En effet, nous avons confirmé que la stéatose hépatique peut être dissociée de certains facteurs du syndrome métabolique comme l'obésité et l'hyperglycémie.

La deuxième partie du projet avait pour but de mesurer l'effet de la diète hyperlipidique chez les descendants des parents dont le bagage génétique est différent. Pour ce faire, nous avons suivi l'expression des différents phénotypes de la stéatose hépatique chez les générations F1 C58LP et LPC58. Il s'agit de suivre la transmission des phénotypes chez les générations F1 et aussi de déterminer s'il y a une dépendance du genre. Ces observations sont nécessaires pour déterminer le croisement F2 idéal pour identifier les futurs QTL.

Nous avons pu noter que les taux de TG hépatiques sont similaires entre les deux générations F1 C58LP et LPC58. Nous pouvons déduire de ces résultats que le genre des parents n'influence pas l'expression du phénotype chez les descendants. De plus, nous constatons que le niveau des TG hépatiques des générations F1 est largement inférieur à celui des deux souches parentales. Nous pouvons donc conclure que le croisement des deux souches C58/J et Lp/J, dont l'expression des TG hépatiques est différente (sensible ou plus résistante à la stéatose hépatique), induit une protection hétérozygote.

De même, plusieurs phénotypes, comme le poids hépatique, les taux de TG sériques, de ALT, de cholestérol total et de NON-HDL cholestérol, sont identiques entre les deux générations F1 C58LP et LPC58, mais statistiquement différents de ceux de la souche C58/J. Nous pouvons en déduire que quelque soit le genre des souches parentales, les deux générations F1 développent une résistance à la diète hyperlipidique similaire à celle de la souche Lp/J. Ainsi, ces observations peuvent supporter que la transmission des phénotypes associés à la stéatose hépatique chez les générations F1 est indépendante du genre des souches parentales.

- *Identification du QTL associé à la stéatose hépatique chez la souris murine C58/J*

Nous avons montré que la répartition des TG hépatiques chez la colonie F2 C58LP est hétérogène, ce qui suggère que ce phénotype est contrôlé par plusieurs allèles. Il est donc possible d'identifier plusieurs QTL.

Grâce à une analyse réalisée avec le programme «Map manager», nous avons identifié un QTL sur le chromosome 11 qui est statistiquement le plus significatif («Lod Score» supérieur à 3.3). Ce QTL est localisé dans l'intervalle 32-70 cM. Des études antérieures ont identifié plusieurs QTL dans cette même région. En effet, les recherches menées par Ishimori *et coll.* (68) sur 294 descendants de la génération F2 C57BL/6Jx129S1/SvImJ ont identifié un QTL situé à 60 cM sur le chromosome 11 susceptible de développer l'athérosclérose. De plus, une étude menée par Cantor *et coll.* (69) sur 152 patients a permis de repérer un QTL associé au diabète de type 2. Ceci laisse penser que le QTL que nous avons identifié pourrait être lié à d'autres altérations métaboliques comme l'athérosclérose ou le diabète de type 2. La localisation de la stéatose hépatique, du

diabète de type 2 et de l'athérosclérose dans la même région chromosomique pourrait expliquer la corrélation clinique entre ces différentes pathologies. Toutefois, il est important de mentionner que la région chromosomique que nous avons identifiée sur le chromosome 11 est de grande taille, ce qui laisse supposer la possibilité d'identifier plusieurs gènes distincts responsables des caractéristiques du syndrome métabolique.

Dans cette même région chromosomique, nous avons examiné tous les gènes présents et nous avons choisis 3 gènes candidats (*Fabp-6* (43cM), *Gfpt-2* (49cM) et *Pemt* (59cM)) dont les fonctions sont connues.

Une mutation du gène *Fabp-6* induit une élimination du cycle entérohépatique et contribue par conséquent à une altération du métabolisme des acides biliaires. Chez la souris, il a été démontré que la mutation du gène *Fabp-6* provoque une augmentation plasmatique des acides biliaires et conduit à une hypertriglycéridémie. Au niveau hépatique, les TG restent toutefois inchangés par rapport à ceux des souris-contrôles (70). Ce dernier point justifie le fait de ne pas tester le gène *Fabp-6* dans notre modèle de stéatose hépatique. De plus, le dosage sérique des TG chez la souche C58/J sous diète hyperlipidique vient nous conforter dans cette décision puisque, ces derniers ne montrent pas une augmentation des taux circulants en TG.

Le deuxième gène que nous avons identifié est le gène *Gfpt-2*. Celui-ci est à l'origine de la production de glucosamine. Des études antérieures ont montré que l'infusion de cette substance dans des cultures de fibroblastes ou d'adipocytes induit une résistance à l'insuline. De même, une étude récente a conclu que la surexpression du gène *Gfpt-2* dans le foie provoque une résistance à l'insuline et une intolérance au glucose (71). Ces recherches démontrent donc que le gène *Gfpt-2* est davantage lié au diabète type-2 qu'à la stéatose hépatique. Ainsi, la corrélation entre le gène *Gfpt-2* et les facteurs-risques de la stéatose est plus forte qu'avec la pathologie elle-même. De même, une étude de Zhang *et coll.* (72) montre qu'une surexpression du gène *Gfpt-2* induit une hyperglycémie. Or, la souris C58/J sous diète hyperlipidique manifeste une légère réduction de son taux de glycémie. Ce constat nous a convaincu de ne pas suivre le gène *Gfpt-2* dans notre projet.

À l'inverse, le troisième gène identifié (*Pemt*) a suscité beaucoup d'intérêt de notre part. La première raison est son implication dans le développement de la stéatose hépatique. En effet, des souris *Pemt*^{-/-} développent la stéatose hépatique (63). De plus, l'expression

du gène *Pemt* est influencée par le régime alimentaire. Cette interaction a été démontrée par Watkins *et coll.* (73) qui ont mesuré l'activité de PEMT chez des souris sauvages. Les résultats ont révélé que l'administration d'une diète déficiente en choline (0 mM de chlorure de choline) diminue significativement l'activité de cette protéine chez les souris sauvages. Toutefois, la supplémentation d'une diète standard par la choline (28mM de chlorure de choline) permet d'augmenter l'activité de PEMT chez ces mêmes souris. Par conséquent, nous émettons l'hypothèse que l'administration d'une diète hyperlipidique à la souche C58/J pourra avoir un effet significatif sur l'activité de PEMT. Ainsi, pour tester ce gène, nous avons travaillé avec des souris C58/J développant la stéatose hépatique. Nous avons alors suivi des phénotypes établis comme étant modulés par le niveau d'activité de PEMT.

En premier lieu, nous nous sommes concentrés sur l'analyse des phospholipides biliaires puisque ceux-ci sont réduits de façon significative chez les souris *Pemt*^{-/-} soumises à une diète riche en gras. Les résultats obtenus sur la colonie F2 C58LP ont révélé une répartition hétérogène des PL biliaires suggérant un contrôle génétique. De plus, nos analyses «Map manager» nous ont permis d'identifier un QTL associé aux PL biliaires. Celui-ci est localisé dans la même région que le QTL lié aux TG hépatiques (chromosome 11 : 32-70 cM). Cette association permet d'émettre l'hypothèse qu'un gène commun puisse être responsable des deux phénotypes (TG hépatiques et PL biliaires).

En second lieu, nous avons choisi d'analyser l'homocystéine sérique chez la souche C58/J. En effet, les études antérieures ont démontré que le gène *Pemt* jouait un rôle important dans la régulation du niveau plasmatique de l'homocystéine (74), les souris *Pemt*^{-/-} étant caractérisées par une diminution des taux circulants d'homocystéine sérique. Ainsi, en partant du postulat que l'activité de PEMT est inhibée sous l'effet d'une diète hyperlipidique, nous formulons l'hypothèse que le taux circulant d'homocystéine chez la souche C58/J sera réduit. Les résultats obtenus chez les souris C58/J ont confirmé cette hypothèse (figure 23).

En résumé, les deux tests effectués précédemment sur le gène *Pemt* ont été concluants et supportent que des polymorphismes génétiques sur ce dernier puissent être responsables de l'hyper-réponse de la souche C58/J à la diète hyperlipidique. Il semble donc très

intéressant à ce point d'amorcer des études subséquentes, explorant la structure génique de *Pemt* ainsi que son activité en fonction de la diète.

7. MÉCANISME PROPOSÉ

Les résultats obtenus démontrent une interaction de la diète hyperlipidique avec un gène polymorphique entre la souche C58/J et Lp/J situé sur le chromosome 11, ce qui favorise le développement d'une stéatose massive. Nos travaux nous poussent à proposer que le gène codant pour PEMT soit directement responsable de cette réponse. Ainsi, nous nous sommes interrogés sur la façon dont le régime alimentaire pouvait affecter l'activité de PEMT dans le développement de cette pathologie.

Pour répondre à cette question, nous nous sommes référés aux résultats d'études antérieures. Comme nous l'avons mentionné précédemment, la phosphatidylcholine est synthétisée dans le foie par deux voies métaboliques : la voie de Kennedy et la voie de méthylation. Dans des conditions normales, la quantité de PC formés est suffisante pour synthétiser les VLDL qui permettront le relargage des TG hépatiques dans le sang. Toutefois, sous le stress d'une diète hyperlipidique, les besoins en PC sont accrus (64). Une réponse physiologique observée est l'augmentation de la contribution de la voie de méthylation pour satisfaire ces besoins supplémentaires en PC (24) tant au niveau de la sécrétion biliaire que de la synthèse des VLDL. Cette adaptation semble aussi essentielle, tel que démontré chez les souris *Pemt*^{-/-}, pour maintenir la synthèse des VLDL et prévenir l'accumulation des TG dans le foie.

De ce fait, nous supposons qu'un polymorphisme retrouvé sur le gène *Pemt* de la souche C58/J ne permettra pas de répondre par une activation de la voie de méthylation suite à l'administration d'une diète hyperlipidique ou même favorisera son inhibition, le tout résultant en une contribution insuffisante de la voie de méthylation dans la synthèse des PC. La diminution significative de l'homocystéine sérique que nous avons observée chez les souris C58/J vient confirmer cette hypothèse, puisque la synthèse de l'homocystéine est assurée par la voie de méthylation. Les besoins en PC n'étant pas comblés, une certaine inhibition sera observée tant au niveau de la sécrétion des PL biliaires que la synthèse et le relargage des VLDL. Ce relargage inhibé des TG hépatiques pourrait expliquer d'une part l'accumulation des TG dans le foie, et d'autre part un taux circulant de TG sérique inchangé (figure 24).

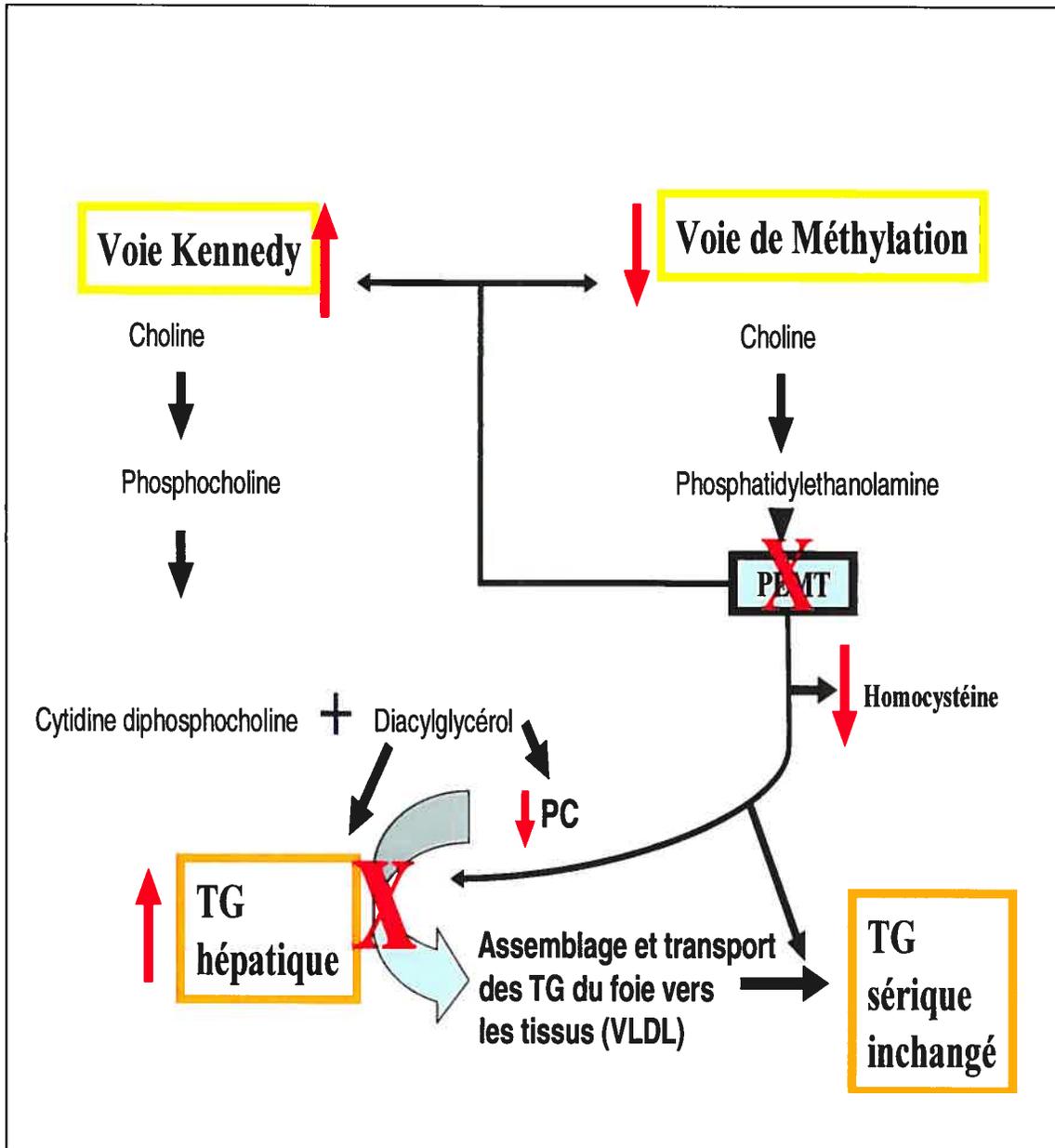


Figure 24 : Mécanisme proposé chez le modèle C58/J sous diète hyperlipidique

8. CONCLUSIONS

Cette étude a permis d'établir que la réponse à la diète hyperlipidique n'est pas identique chez les souris murines consanguines. Le développement de la stéatose hépatique étant hautement variable d'une souche à l'autre, nous avons confirmé l'existence d'une interaction entre le facteur environnemental et le facteur génétique dans le développement de la stéatose hépatique chez la souris C58/J sous diète hyperlipidique.

En utilisant une approche QTL, nous avons aussi réussi à identifier les principales régions chromosomiques (ou QTL) responsable de la forte susceptibilité à la stéatose hépatique en présence d'une diète hyperlipidique chez la souche C58/J.

En conclusion, cette étude permet de proposer plusieurs perspectives de recherche :

- a- Directement explorer si une ou des mutations du gène *Pemt* sont associées au développement de la stéatose hépatique chez la souris murine C58/J sous diète hyperlipidique versus Lp/J.
- b- Étudier les interactions possibles entre le gène *Pemt* et d'autres gènes dans le développement de la stéatose hépatique.
- c- Développer un traitement qui peut augmenter la disponibilité hépatique en PC.

9. RÉFÉRENCES

1. Marieb EN. Le système digestif. Anatomie et physiologie humaine. 2^{ème} édition: 768-821, 1993.
2. Alpini G, Philips JO et Larusso NF. The biology of biliary epithelia. Biology and Pathology. 3^{ème} édition: 623-645, 1997.
3. Wright M, Alberti J, Karran F, et Millward S. Normal anatomy. Liver and biliary disease. 1^{ère} édition: 3-13, 1979.
4. Couinaud C. Intrahepatic distribution of hepatic artery. Acta Anat. 22: 49-81, 1954.
5. Whitfield A. Le système digestif. Le corps humain. 1^{ère} édition: 1-20, 1996.
6. Karleskind A. Manuel des corps gras. Propriétés des corps gras. 1^{ère} édition: 442-469, 1992.
7. Freeland JH et Peckham GC. In Foundation of food preparation. Lipids. 6^{ème} édition: 49-61, 1996.
8. Murray RK, Granner DK et Mayes PA, Rodwell VW. Précis de biochimie de Harper. Métabolisme des lipides. 7^{ème} édition: 270-284, 1989.
9. Calandra S, Carulli N et Salvioli G. Liver. Liver and lipid metabolism. 1^{ère} édition: 1-14, 1983.
10. Windler E, Chao Y et Havel RJ. Regulation of the hepatic uptake of triglyceride-rich lipoproteins in the rat. J Biol Chem. 255(17): 8303-8307, 1980.

11. Shelburne F, Hanks J, Meyers W et Quarfordt S. Effect of apoproteins on hepatic uptake of triglyceride emulsions in the rat. *J Clin Invest.* 65(3):652-658, 1980.
12. Borel J. Biochimie pour le clinicien. Métabolisme des lipides. 1^{ère} édition: 42-50, 1999.
13. Campbell P et Smith D. Biochimie illustrée. 1^{ère} édition: 270-280, 2002.
14. Babineau M, Berlinguet L, Dufour D, Ghys R, Lemonde A, Loiseau JM, Marcoux H et Martel F. Précis de biochimie. Oxydation des graisses. 1^{ère} édition: 236-238, 1965.
15. Gurr MI, Harwood JL et Frayn KN. Lipid biochemistry. The liver. 5^{ème} édition: 13-58, 2002.
16. Lacour JR. Lipid metabolism and exercise. *Rev Prat.* 51:36-41, 2001.
17. Hogberg J, Orrenius S, Larson RE. Lipid peroxidation in isolated hepatocytes. *Eur J Biochem.* 50(3):595-602, 1975.
18. Germain B. Les phospholipides. Lipides et nutrition humaine. 1^{ère} édition: 1-20, 1982.
19. Kennedy E. The synthesis of cytidine diphosphate choline, cytidine diphosphate ethanolamine, and related compounds. *J Biol Chem.* 222(1): 185-191, 1956.
20. Kennedy E. The enzymic synthesis of phospholipids. *Prog Neurobiol.* 4: 260-264, 1959.

21. Kennedy E. The biosynthesis of phospholipids. *Am J Clin Nutr.* 6(3): 216-220, 1958.
22. Christopher JW, Zheng C, Luis BA et Vance DE. Characterisation of the murine phosphatidylethanolamine N-methyltransferase-2 gene. *J Lip Res.* 37: 2341-2350, 1996.
23. Neale DR et Vance DE. Purification of phosphatidylethanolamine N-Methyltransferase from Rat Liver. *J Biol Chem.* 262: 17231-17239, 1987.
24. Vance DE. Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase: unexpected finding from curiosity-driven research. *Eur J Med Res.* 1(4): 182-188, 1996.
25. Eguchi Y. Analysis of lipoprotein lipase activity using high-performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr.* 16(8):500-3, 2002.
26. Heeren J, Niemeier A, Merkel M et Beisiegel U. Endothelial-derived lipoprotein lipase is bound to postprandial triglyceride-rich lipoproteins and mediates their hepatic clearance in vivo. *J Mol Med.* 80(9):576-84, 2002
27. Zoltowska M, Ziv E, Delvin E, Stan S, Bar-On H, Kalman R et Levy E. Circulating lipoproteins and hepatic sterol metabolism in *Psammomys obesus* prone to obesity, hyperglycemia and hyperinsulinemia. *Atherosclerosis.* 157(1):85-96, 2001.
28. Paul A. Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *N Eng J Med.* 346: 1221-1231, 2002.
29. Clark JM, Brancati FL et Diehl AM. The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *Am J Gastroenterol.* 98(5): 960-967, 2003.

30. Fuhrman MP, Charney P et Mueller CM. Hepatic proteins and nutrition assessment. *J Am Diet Assoc.* 104(8): 1258-1264, 2004.
31. Diehl AM. Fatty liver, hypertension, and the metabolic syndrome. *Gut.* 53(7): 923-924, 2004.
32. Ohata K, Hamasaki K, Toriyama K, Matsumoto K, Saeki A, Yanagi K, Abiru S, Nakagawa Y, Shigeno M, Miyazoe S, Ichikawa T, Ishikawa H, Nakao K, Eguchi K. Hepatic steatosis is a risk factor for hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Cancer.* 97(12): 3036-3043, 2003.
33. Reaven GM. Syndrome X: 6 year later. *J Intern Med.* 736: 13-22, 1994.
34. Andrea ER. Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterol.* 121: 710-723, 2001.
35. Day CP. Pathogenesis of steatohepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 16(5): 663-678, 2002.
36. Hecht Y et Chevrel B. Les stéatoses hépatiques. *Stéatoses hépatiques chez l'homme.* 1^{ère} édition : 32-42, 1975.
37. McCullough AJ. Update on non-alcoholic fatty liver disease. *J Clin Gastroenterol.* 34(3): 255-262, 2002.
38. Berriot VN, Aggerbeck LO, Samson BME et Wetterau JR. The role of the microsomal triglyceride transfer in abetalipoproteinemia. *Annu Rev Nutr.* 20: 663-697, 2000.

39. Shoulders CC, Brett DJ, Bayliss JD, Narcisi TM, Jarmuz A, Grantham TT, Leoni PR, Bhattacharya S, Pease RJ, Cullen PM, et al. Abetalipoproteinemia is caused by defects of the gene encoding the 97 kDa subunit of a microsomal triglyceride transfer protein. *Hum Mol Genet* 2(12): 2109-2116, 1993.
40. Ohashi K, Ishibashi S, Osuga J, Tozawa R, Harada K, Yahagi N, Shionoiri F, Iizuka Y, Tamura Y, Nagai R, Illingworth DR, Gotoda T et Yamada N. mutations in the microsomal triglyceride transfer protein gene causing abetalipoproteinemia. *J Lipid Res.* 41(8): 1199-1204, 2000.
41. Narcisi TM, Shoulders CC, Chester SA, Read J, Brett DJ, Harrison GB, Grantham TT, Fox MF, Povey S, de Bruin TW, et al. Mutations of the microsomal triglyceride-transfer-protein gene in abetalipoproteinemia. *Am J Hum Genet.* 57(6): 1298-1310, 1995.
42. Bennion LJ et Grundy SM. Effects of obesity and caloric intake on biliary lipid metabolism in man. *J Clin Invest.* 56(4): 996-1011, 1975.
43. Buettner R, Ottinger I, Scholmerich J et Bollheimer LC. Preserved direct hepatic insulin action in rats with diet-induced hepatic steatosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 286(5): 828-833, 2004.
44. Sadanobu S, Takeuchi M et Tezuka M. Effect of 1,3-dithia-2-thioxo-cyclopent-4-ene and its derivatives on liver injury induced by carbon tetrachloride and orotic acid in rats. *J Toxicol Sci.* 22(5): 413-426, 1997.
45. Bacon BR, Park CH, Fowell EM, McLaren CE. Hepatic steatosis in rats fed diets with varying concentrations of sucrose *Fundam Appl Toxicol.* 4(5): 819-826, 1984.

46. Artom C. Role of choline in the oxidation of fatty acids by the isolated liver. *Nat.* 171(4347): 347-348, 1953.
47. Roche HM. Dietary lipids and gene expression. *Biochem Soc Trans.* 232: 999-1002, 2004.
48. Kusunoki M, Tsutsumi K, Inoue Y, Hara T, Miyata T, Nakamura T, Ogawa H, Sakakibara F, Fukuzawa Y, Okabayashi N, Kato K, Ikeda H, Kurokawa T, Ishikawa T, Otake K et Nakaya Y. Lipoprotein lipase activator NO-1886 improves fatty liver caused by high-fat feeding in streptozotocin-induced diabetic rats. *Metabolism.* 53(2): 260-263, 2004.
49. Quarfordt SH, Shelburne FA, Meyers W, Jakoi L et Hanks J. Effect of apolipoproteins on the induction of hepatic steatosis in rats. *Gastroenterol.* 80(1): 149-153, 1981.
50. Bandsma RH, Wiegman CH, Herling AW, Burger HJ, ter Harmsel A, Meijer AJ, Romijn JA, Reijngoud DJ et Kuipers F. Acute inhibition of glucose-6-phosphate translocator activity leads to increased de novo lipogenesis and development of hepatic steatosis without affecting VLDL production in rats. *Diabet.* 50(11): 2591-2597, 2001.
51. Van den Broek P, Goosen T, Wennekes B et van den Broek H. Isolation and characterization of the glucose-6-phosphate dehydrogenase encoding gene (*gsdA*) from *Aspergillus niger*. *Mol Gen Genet.* 247(2): 229-239, 1995.
52. Lehninger A. On the activation of fatty acid oxidation. *J Biol Chem.* 157: 437-451, 1999.

53. Yamamoto M et Nakamura Y. Inhibition of beta-oxidation by 3-mercaptopropionic acid produces features of Reye's syndrome in perfused rat liver. *Gastroenterology*. 107(2): 517-524, 1994.
54. Pan M, Cederbaum AI, Zhang YL, Ginsberg HN, Williams KJ et Fisher EA. Lipid peroxidation and oxidant stress regulate hepatic apolipoprotein B degradation and VLDL production. *J Clin Invest*. 113(9): 1277-1287, 2004.
55. Noga AA et Vance DE. A gender-specific role for phosphatidylethanolamine N-methyltransferase-derived phosphatidylcholine in the regulation of plasma high density and very low density lipoproteins in mice. *J Biol Chem*. 278(16): 14586-14592, 2003.
56. Zhu X, Song J, Mar MH, Edwards LJ et Zeisel SH. Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT) knockout mice have hepatic steatosis and abnormal hepatic choline metabolite concentrations despite ingesting a recommended dietary intake of choline. *Biochem J*. 370(Pt 3): 987-993, 2003.
57. Koteish A et Diehl AM. Animal models of steatosis. *Sem Liver Dis* 21(1): 89-104, 2001.
58. Andersson L, Haley CS, Ellegren H, et al. Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. *Science*. 263: 1771-1774, 1994.
59. Churchill G.A, Doerge RW. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics*. 138: 963-971, 1994.
60. Folch J, Lees M et Sloane S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 226: 497-509, 1957.

61. Bartlett GR. Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem.* 234(3): 466-468, 1959.
62. Lander ES. The new genomics: global views of biology. *Science.* 274(5287): 536-539, 1996.
63. Vance DE, Walkey CJ, Cui Z. Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase from liver. *Biochim Biophys Acta.* 1348(1-2): 142-50, 1997.
64. Gelernter-Yaniv L, Feng N, Sebring NG, Hochberg Z et Yanovski JA. Associations between a polymorphism in the 11 beta hydroxysteroid dehydrogenase type I gene and body composition. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 27(8): 983-986, 2003.
65. Aguilera AA, Diaz GH, Barcelata ML, Guerrero OA et Ros RM. Effects of fish oil on hypertension, plasma lipids, and tumor necrosis factor-alpha in rats with sucrose-induced metabolic syndrome. *J Nutr Biochem.* 15(6): 350-357, 2004.
66. Tamura A, Fukushima M, Shimada K, Han KH, Sekikawa M, Watanabe S, Nakano M, Matsumoto M et Chiji H. Cholesterol metabolism in rat is affected by protocatechuic acid. *J Nutr Sci Vitaminol.* 50(1): 13-8, 2004.
67. Treem WR, Stanley CA. Massive hepatomegaly, steatosis, and secondary plasma carnitine deficiency in an infant with cystic fibrosis. *Pediatrics.* 83(6): 993-997, 1989.
68. Ishimori N, Li R, Kelmenson PM, Korstanje R, Walsh KA, Churchill GA, Forsman-Semb K et Paigen B. Quantitative trait loci that determine plasma lipids and obesity in C57BL/6J and 129S1/SvImJ inbred mice. *J Lipid Res.* 45(9): 1624-1632, 2004.

69. Cantor RM, de Bruin T, Kono N, Napier S, van Nas A, Allayee H et Lusic AJ. Quantitative trait loci for apolipoprotein B, cholesterol, and triglycerides in familial combined hyperlipidemia pedigrees. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24(10): 1935-1941, 2004.
70. Kanda T, Foucand L, Nakamura Y, Niot I, Besnard P, Fujita M, Sakai Y, Hatakeyama K, Ono T, Fujii H. Regulation of expression of human intestinal bile acid-binding protein in Caco-2 cells. *Biochem J.* 330: 261-265, 1998.
71. Zitzler J, Link D, Schafer R, Liebetrau W, Kazinski M, Bonin-Debs A, Behl C, Buckel P, Brinkmann U. High-throughput functional genomics identifies genes that ameliorate toxicity due to oxidative stress in neuronal HT-22 cells: GFPT2 protects cells against peroxide. *Mol Cell Proteomics.* 3(8): 834-840, 2004.
72. Zhang H, Jia Y, Cooper JJ, Hale T, Zhang Z, Elbein SC. Common variants in glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase 2 (GFPT2) gene are associated with type 2 diabetes, diabetic nephropathy, and increased GFPT2 mRNA levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 89(2): 748-755, 2004.
73. Watkins SM, Zhu X, Zeisel SH. Phosphatidylethanolamine-N-methyltransferase activity and dietary choline regulate liver-plasma lipid flux and essential fatty acid metabolism in mice. *J Nutr.* 133(11): 3386-3391, 2003.
74. Nogga AA, Stead LM, Zhao Y, Brosnan ME, Brosnan JT, Vance DE. Plasma homocysteine is regulated by phospholipids methylation. *J Biol Chem* 277(44): 42358-42365, 2002.