



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE
École Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires (ENSAIA)
École Doctorale Ressources Procédés Produits Environnement (RP2E)
Laboratoire LIPIDOMIX

THÈSE

Présentée à l'INPL par

Marine HANSE

Ingénieure de l'École Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires
(ENSAIA)

en vue d'obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

RÔLE DU RÉCEPTEUR AUX LIPOPROTÉINES, LSR, DANS LA RÉGULATION DU TRANSPORT ET DE LA DISTRIBUTION DES LIPIDES ALIMENTAIRES

Soutenance publique le 15 novembre 2011 devant la commission d'examen

Membres du jury :

Président du jury :	Mr Guido RYCHEN	Professeur à l'ENSAIA-INPL, Vandœuvre-lès-nancy
Rapporteurs :	Mr John McGREGOR	Directeur de recherche INSERM King College, Londres
	Mr Philippe CARDOT	Professeur à l'Université Pierre et Marie Curie, Paris
Examineurs :	Mme Catherine CORBIER	Professeur à l'Université de Nancy I, Vandœuvre-lès-nancy
	Mme Sylvie BRETON	Ingénieur Agroalimentaire, PhD, Lesieur, Paris
	Mme Frances YEN POTIN	Directrice de thèse Directeur de recherche INSERM, LIPIDOMIX, Vandœuvre-lès-nancy

Remerciements

J'aimerais exprimer toute ma reconnaissance envers Mme Frances YEN POTIN, directrice du laboratoire LIPIDOMIX et directrice de cette thèse, pour avoir consacré autant de temps à cet encadrement et sans qui cette thèse n'aurait pas été possible. Je vous suis reconnaissante pour votre disponibilité, votre rigueur, votre bonne humeur et votre passion pour les sciences.

Mes remerciements s'adressent également à Mr Thierry PILLOT, co-directeur du laboratoire LIPIDOMIX à mon arrivée, qui m'a accueillie au sein du laboratoire et m'a accordé sa confiance pour de nombreux travaux. Vos conseils et vos connaissances scientifiques m'ont beaucoup apporté.

Toute ma gratitude va aussi particulièrement à Christophe STENGER avec qui j'ai énormément collaboré durant ces 3 années, qui m'a fait profiter de son immense connaissance scientifique ainsi que de très bons moments. Merci de m'avoir soutenu durant cette thèse et surtout dans les moments de doute, tu as toujours su valoriser nos résultats. The show must go on !

Je voudrais aussi remercier Thierry OSTER pour l'opportunité et la confiance qu'il m'a données concernant les enseignements que j'ai réalisés durant cette thèse. Je remercie aussi la société LESIEUR pour m'avoir permis d'exploiter certains résultats venant d'une étude en collaboration avec le laboratoire LIPIDOMIX. J'aimerais aussi remercier Jean Luc OLIVER et Violette KOZIEL pour leurs conseils avisés lors de l'élaboration des expériences ou des interprétations quelquefois compliquées.

Je voudrais sincèrement remercier tous les membres de l'équipe LIPIDOMIX, principalement Pierre, Samina, Laurent, Anthony, Dorine, Delphine, Nicolas et Ahmad avec qui j'ai passé de très bons moments et qui ont tous contribué à ce travail. Un grand merci aussi à Sabrina pour nos longues discussions au bureau ainsi que pour le lien que nous avons gardé malgré son départ.

Toute ma reconnaissance va aussi à mes amis de longue date avec qui j'ai partagé énormément de bons moments et d'épreuves durant ces dernières années. Merci à Milou, Thibault et leur paupiette pour être là depuis 10 ans quoi qu'il arrive. Merci à Émilie et Miko sans qui les années de la fac et toutes celles qui ont suivi auraient été plus tristes. Des gros bisouches à Laure et Felipe pour toutes ces années de folies. Enfin, merci à Doro et Jean Mat avec qui j'ai pu partager mes doutes scientifiques et bien plus encore ! Merci à vous tous.

Mes pensées vont aussi à ma grande famille et à Vincent qui m'ont toujours soutenue durant tout mon cursus scolaire et particulièrement dans cette dernière ligne droite qu'est la thèse. Merci d'avoir patienté durant toutes ces années et d'avoir toujours cru en moi, malgré les moments de doute et de fatigue. Merci d'avoir été là dans les bons et les mauvais moments. Il n'y a rien de plus précieux qu'une famille comme la nôtre.

Abréviations

AACE : *American association of clinical endocrinologists*

A β : *beta-amyloïde*

ABCA1 : *ATP-binding cassette transporter*

AC : *Adénylyl cyclase*

ACAT : *A-cholesterol acyl transferase*

ACC : *acétyl-CoA carboxylase*

ACE : *American college of endocrinology*

ACL : *ATP citrate lyase*

Ad : *Adénovirus*

ADN : *Adénosine desoxyribonucléique*

AJ : *A jeun*

AKT : *Protein kinase B*

ALBP (ou aP2) : *Adipocytes lipid binding protein*

AMPc : *AMP cyclique*

Apo : *Apolipoprotéine*

APP : *Amyloid precursor protein*

AR : *Récepteurs adrénergiques*

ARN : *Acide ribonucléique*

ASCVD : *Maladie cardiovasculaire athérosclérotique*

BHE : *Barrière hémato-encéphalique*

BSA : *Bovine serum albumin*

CE : *ester de cholestérol*

CETP : *Cholesteryl ester transfer protein*

CM : *Chylomicron*

CMV : *Cytomégalovirus*

CREB : *CRE-binding protein*

CPT-1 : *Carnitine palmitoyl transferase-1*

DAG : *Diacylglycérol*

DHA : *Acide docosahexaénoïque*

DIO : *Diet inducing obesity*

DMEM : *Dulbecco's modified eagle medium*

EDTA : *Acide éthylène diamine tétracétique*

ELISA : *Enzyme linked immunosorbent assay*

ERK : *Extra cellular signal-regulated kinase*

FFA (ou AGL) : *Acide gras*

FABPpm : *plasma membrane fatty acid-binding protein*

FAS : *Fatty acid synthase*

FATP : *Fatty acid transport protein*

G3P : *glycerol 3-phosphate*

GAPDH : *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*

GCE : *Garcinia cambogia extract*

GH : *Hormone de croissance*

Glc : *Glucose*

GPAT : *glycérophosphate acyltransférase*

Gs : *Complexe de la protein G*

HCA : *Acide hydroxycitrique*

HDL : *High density lipoprotein*

HFD : *High fat diet*

HL : *Lipase hépatique*

HMG-CoA : *3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA*

HSL : *Hormone-sensitive lipase*

HSPG : *Heparan sulfate proteoglycan*
HPLC : *High-performance liquid chromatography*
JAK : *Janus kinase*
IDF : *International diabetes federation*
IDL : *Intermediate density lipoprotein*
IMC : Indice de masse corporelle
IRS : Récepteur à l'insuline
LBP : *Lipid binding protein*
LCAT : *Lecithin-cholesterol acyltransferase*
LCR : Liquide céphalorachidien
LDL : *Low density lipoprotein*
LDLr : Récepteur aux LDL
LFD : *Low fat diet*
LpL : *Lipoprotéin lipase*
LRP : *Low-density-lipoprotein-receptor-related protein*
LSR : *Lipolysis stimulated lipoprotein receptor*
MA : Maladie d'Alzheimer
MAG : Monoacylglycérol
MCP-1 : *monocyte chemoattractant protein-1*
MG : Masse grasse
mTOR : *Mammalian target of rapamycin*
MTP : *microsomal triglyceride transfer protein*
NCEP-ATP III : *National cholesterol education program adult treatment panel III*
Ob-R : récepteur à la leptine
OGM : Organisme génétiquement modifié

OMS : Organisation mondiale de la santé
PAP : 4-aminoantipyrine
PBS : *Phosphate buffered saline*
PCR : *Polymerase chain reaction*
PDE-3 : Phosphodiesterase III
PIK (ou PI3K) : *Phosphatidylinositol 3-kinase*
PL : Phospholipide
PLTP : *Phospholipid transfer protein*
PKA : Protéine kinase A
POD : Peroxydase
PP : Postprandial
PPAR : *Peroxisome proliferator-activated receptor*
RAP : *Receptor-associated protein*
sAPP : APP soluble
SCD : *stearoyl CoA desaturase*
SOCS-3 : *Suppressors of cytokine signalling*
SR-B1 : *scavenger receptor class B*
SREBP : *Sterol regulatory element-binding protein*
STAT : *Signal transducer and activator of transcription*
TA : Tissu adipeux
TC : Cholestérol total
TG (ou TAG) : Triglycérides
TSH : *Thyroid stimulating hormone*
TNF : *Tumor necrosis factor*
UCP-2 : *Uncoupling protein-2*
VLDL : *Very low density lipoprotein*
VO₂ : Consommation en oxygène

Table des illustrations

Figures

Figure 1: Schéma d'une lipoprotéine	8
Figure 2: Structure des lipoprotéines	11
Figure 3: Métabolisme du récepteur aux LDL (LDLr)	15
Figure 4: ADNc et séquence d'acides aminés correspondant au LSR de rat	17
Figure 5: quantité d'ARNm de LSR, LDLr et LRP hépatique chez les souris LSR ^{+/-}	18
Figure 6: Lipémie postprandiale suite à un gavage de 300µL d'huile d'olive	18
Figure 7: Assemblage intracellulaire des lipoprotéines riches en triglycérides	20
Figure 8: Mouvement de cholestérol et de triglycérides entre les lipoprotéines	22
Figure 9: Métabolisme général des lipoprotéines	23
Figure 10: Voie métabolique de la lipogenèse et paramètres régulateurs	27
Figure 11: Schéma général des éléments régulateurs de la lipogenèse	31
Figure 12: Fonctionnement de la lipolyse adipocytaire	32
Figure 13: Prise en charge des acides gras lors de leur internalisation dans les membranes cellulaires	34
Figure 14: Représentation de la bêta-oxydation des acides gras	35
Figure 15: Distribution des lipides après un repas	38
Figure 16: Souris <i>ob/ob</i> et souris sauvage au même âge et sous régimes identiques	41
Figure 17: Voie de signalisation de la leptine impliquant la voie JAK/STAT	44
Figure 18: Interaction entre la leptine et mTOR	45
Figure 19: Mécanisme par lequel la leptine et le TNFalpha peuvent agir afin de diminuer la synthèse de TG	47
Figure 20: Classification des surpoids et obésité	53
Figure 21: Enzymes modifiant les LDL et les récepteurs interagissant avec les macrophages pour former les cellules spumeuses et favoriser l'athérosclérose	60
Figure 22: Voie de signalisation "métabolique" et "inflammatoire" de l'insuline	62
Figure 23: Tissu adipeux, adipokines et résistance à l'insuline	63
Figure 24: Schéma d'un changement dégénératif	66

Figure 25: Les différents clivages de l'APP	66
Figure 26: Interaction entre le tissu adipeux et cerveau.....	67
Figure 27: Composition du régime A.....	81
Figure 28: Composition du régime C.....	81
Figure 30 a et b: Représentation de l'acide hydroxycitrique (a) et de l'acide citrique (b)	127
Figure 31: Représentation de la plante subtropicale: <i>Garcinia cambogia</i>	127
Figure 32 a et b: Évolution de la prise de poids des souris sous gavage GCE.....	130
Figure 33: Évolution de la prise alimentaire des souris gavées GCE durant 40 jours	130
Figure 34 a et b: Dosages plasmatiques de TG postprandiaux (a) et à jeun (b)	131
Figure 35 a et b: Dosages plasmatiques de glucose postprandial (a) et à jeun (b)	132
Figure 36 a et b: Dosages plasmatiques de TC postprandiaux (a) et à jeun (b)	133
Figure 37 a et b: Eexpression d'ACL (a) et FAS (b)	134
Figure 38: Expression de LSR	135
Figure 39 a et b: Expression des lipases de la paroi endothéliale HL (a) et LpL (b)	136
Figure 40 a et b: Dosages hépatiques de TG (a) et cholestérol (b).....	137
Figure 41 a et b: Dosages musculaires de TG (a) et cholestérol (b).....	137
Figure 42: Dosage adipocytaire de TG	138
Figure 43: Expression de la LpL musculaire	138
Figure 44 a et b: Évolution de la prise de poids (a) et prise de poids au terme de l'étude (b)	141
Figure 45: Évolution de la prise alimentaire	141
Figure 46 a et b: Dosages plasmatiques des TG postprandiaux (a) et à jeun (b).....	142
Figure 47 a et b: Dosages plasmatiques du glucose postprandial (a) et à jeun (b).....	143
Figure 48 a et b: Dosages plasmatiques du cholestérol postprandial (a) et à jeun (b).....	143
Figure 49 a et b: Immunoblots de l'expression d'ACL (a) et de FAS (b)	144
Figure 50 a et b: Immunoblots de l'expression de LSR (a) et de LDLr (b)	145
Figure 51 a et b: Immunoblots de l'expression de HL (a) et de LpL (b)	146
Figure 52 a et b: Contenu hépatique en TG (a) et en cholestérol (b)	147
Figure 53 a et b: Contenu musculaire en TG (a) et en cholestérol (b)	147
Figure 54 a et b: Contenu en TG (a) et en cholestérol (b)	148
Figure 55: Contenu adipocytaire en TG	148
Figure 56 a et b: Profil lipoprotéique de TG (a) et de cholestérol (b)	150
Figure 57 a et b: Dosages des concentrations d'insuline (a) et de leptine (b) plasmatiques.	151
Figure 58: Corrélation entre l'expression de LSR et la prise de poids des souris	153

Figure 59: Corrélation entre l'expression de LSR et les taux de lipides plasmatiques	154
Figure 60: Corrélation entre les expressions de LSR et de LDLr	155
Figure 61: Corrélation entre les expressions de LSR et ACL	156
Figure 62: Corrélation entre l'expression de LSR et le contenu lipidique hépatique	157
Figure 63: Corrélation entre l'expression de LSR et le contenu en TG musculaire	158
Figure 64: Effet de la suppression de la lipogenèse sur le métabolisme lipidique	161
Figure 65: Effet de la suppression d'ACL sur l'expression des enzymes lipogéniques	166
Figure 66: Evolution du poids des souris sous régime différent durant 6 mois	169
Figure 67: Évolution de poids au cours du temps des souris sous régimes différents.	170
Figure 68: Évolution de la masse grasse pour tous les animaux sous régimes différents.....	171
Figure 69 a et b: Évolution des taux de triglycérides (a) et de cholestérol total (b) plasmatiques des souris sous différents régimes	172
Figure 70: Évolution de la glycémie à jeun des souris sous différents régimes.....	172
Figure 71: Expression de LSR dans les membranes de foie sous régimes différents	173
Figure 72: Corrélation entre l'expression de LSR et le poids des souris	174
Figure 73: Expression de LDLr dans les membranes de foie sous régimes différents	175
Figure 74: Expression de Ob-R dans les membranes de foie sous régimes différents.	175
Figure 75 a et b: Expression d'ACL (a) et FAS (b)	177
Figure 76: Corrélations entre les expressions de LSR et ACL	178
Figure 77: Expression de la lipoprotéine lipase	179
Figure 78 a et b: Contenu en triglycérides (a) et en cholestérol (b) hépatiques	180
Figure 79 a, b et c: Contenu en triglycérides (a) et en cholestérol (b) musculaires et contenu en triglycérides adipocytaires (c)	181
Figure 80 a et b: Évolution de la prise de poids des souris LSR ^{+/+} et LSR ^{+/-} (a) et prise de poids finale des souris LSR ^{+/+} et LSR ^{+/-} (b).	188
Figure 81: Évolution de la prise alimentaire des souris LSR ^{+/+} et LSR ^{+/-}	189
Figure 82: Évolution de la masse grasse des souris LSR ^{+/+} et LSR ^{+/-}	189
Figure 83 a et b: Dosages plasmatiques des TG postprandiaux (a) et à jeun (b).....	190
Figure 84 a et b: Dosages plasmatiques du glucose postprandial (a) et à jeun (b).....	191
Figure 85 a et b: Dosages plasmatiques de cholestérol postprandial (a) et à jeun (b).....	192
Figure 86: Immunoblots de l'expression de LSR des souris LSR ^{+/+} et LSR ^{+/-}	192
Figure 87: Immunoblots de l'expression du récepteur à la leptine (Ob-R).....	193
Figure 88 a et b: Immunoblots de l'expression de LDLr (a) et de LRP (b)	194
Figure 89 a et b: Immunoblots de l'expression de la LpL (a) et de la HL (b).....	194

Figure 90 a et b: Immunoblots de l'expression d'ACL et de FAS	195
Figure 91a et b: Corrélation entre les expressions de LSR et d'ACL	196
Figure 92: Corrélation entre les expressions de LSR et ACL	196
Figure 93 a et b: Contenu en TG (a) et cholestérol (TC) (b) hépatique	197
Figure 94 a et b: Contenu en TG (a) et en cholestérol (b) musculaire	197
Figure 95 a et b: Contenu en TG (a) et en cholestérol (b) adipocytaire	198
Figure 96: Taux de leptine plasmatique des souris LSR ^{+/+} et LSR ^{+/-}	199
Figure 97: Évaluation de la capacité cognitive immédiate par le labyrinthe en Y	200
Figure 98: Distribution des lipoprotéines en condition standard..	206
Figure 99: Distribution des lipoprotéines sous régime hyperlipidique ou une souris LSR ^{+/-}	206

Tableaux

Tableau 1: Identité, expression tissulaire, distribution plasmatique et fonctions des principales apolipoprotéines humaines	12
Tableau 2: Récepteurs cellulaires des lipoprotéines	14
Tableau 3: Caractéristiques des principales dyslipidémies.....	55
Tableau 4: Définition du syndrome métabolique par l'OMS	57
Tableau 5: Définition du syndrome métabolique par le NCEP-ATP III	57
Tableau 6: Définition du syndrome métabolique par l'AACE-ACE	58
Tableau 7: Définition du syndrome métabolique par l'IDF	58
Tableau 8: Conditions de PCR pour la détection des allèles sauvages et mutés du gène <i>lsr</i> ..	80
Tableau 9: Composition du régime hyperlipidique	82
Tableau 10: Composition des gellules d'extrait de <i>Garcinia cambogia</i>	84
Tableau 11: Composition des gélules Pure Super Citrimax®	84
Tableau 12: Coefficient de corrélation linéaire. Table R de Bravais Pearson	94
Tableau 13: Matrice de corrélation entre tous les facteurs étudiés	152
Tableau 14: Matrice de corrélation avec 7 facteurs interagissant avec LSR	158
Tableau 15: Régression multiple entre LSR et 5 facteurs.....	159
Tableau 16: Actions principales des acides gras polyinsaturés.	182
Tableau 17: Composition du régime hyperlipidique	187
Tableau 18: Matrice de corrélation entre les paramètres étudiés de toutes les souris	201
Tableau 19: Matrice de corrélation entre les paramètres des animaux LSR ^{+/+}	202
Tableau 20: Matrice de corrélation entre les paramètres des animaux LSR ^{+/-}	203
Tableau 21: Régression multiple entre LSR et 7 facteurs.....	226
Tableau 22: Régression multiple pas à pas entre LSR et 7 facteurs	227
Tableau 23: Régression multiple pas à pas entre LSR et 6 facteurs	227
Tableau 24: Régression multiple entre LSR et 5 facteurs.....	228

Sommaire général

INTRODUCTION GÉNÉRALE 1

CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE 5

I.	LE MÉTABOLISME DES LIPOPROTÉINES	7
II.	LA LIPOLYSE ET LA LIPOGÈNESE: DISTRIBUTION ET UTILISATION DES LIPIDES À L'INTÉRIEUR DES CELLULES	25
III.	LA LEPTINE	41
IV.	LES DÉSORDRES DU MÉTABOLISME LIPIDIQUE.....	53
V.	CONCLUSION GÉNÉRALE DE LA SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	73
VI.	OBJECTIFS DE LA THÈSE	75

CHAPITRE 2 : MATÉRIELS & MÉTHODES..... 77

I.	ÉTUDES ANIMALES	79
II.	LES ÉTUDES CELLULAIRES	87
III.	IMMUNOFLUORESCENCE	88
IV.	PRÉPARATION DE MEMBRANES TOTALES DE FOIE DE SOURIS.....	88
V.	IMMUNOBLOTS	89
VI.	EXTRACTION LIPIDIQUE	90
VII.	PROFIL LIPOPROTÉIQUE.....	90
VIII.	ANALYSE QPCR DE LYSAT OU DE TISSU.....	90
IX.	ANALYSES BIOCHIMIQUES.....	91
X.	ANALYSE DU STATUT COGNITIF	93
XI.	ANALYSES STATISTIQUES.....	94

CHAPITRE 3 : RÉGULATION DE L'EXPRESSION DE LSR PAR LA LEPTINE : UN LEVIER POTENTIEL POUR LA CLAIRANCE LIPIDIQUE EN PHASE POSTPRANDIALE 95

I.	INTRODUCTION	97
II.	CONCLUSION.....	122

CHAPITRE 4 : EFFET DE L'INHIBITION DE L'ATP CITRATE LYASE SUR L'EXPRESSION DE LSR ET LE MÉTABOLISME LIPIDIQUE.. 124

I.	INTRODUCTION	126
II.	ÉTUDE DE L'EFFET DE L'EXTRAIT DE <i>GARCINIA CAMBOGIA</i> SUR L'EXPRESSION DE LSR : TEST DE DOSE.....	128
III.	ÉTUDE DE L'EFFET DE L'EXTRAIT DE <i>GARCINIA CAMBOGIA</i> SUR L'EXPRESSION DE LSR : CHOIX DE LA DOSE 20 MG/J	139

IV.	CONCLUSION DE L'EFFET DE L'INHIBITION DE L'ATP CITRATE LYASE SUR L'EXPRESSION DE LSR ET LE MÉTABOLISME LIPIDIQUE	160
-----	--	-----

CHAPITRE 5 : EFFET D'UN RÉGIME HYPERLIPIDIQUE SUR LA RÉGULATION DU MÉTABOLISME LIPOPROTÉIQUE ET DE LSR 162

I.	INTRODUCTION	164
II.	OBJECTIF DE L'ÉTUDE	166
III.	MISE EN PLACE DE L'ÉTUDE	167
IV.	RÉSULTATS ET DISCUSSION	168
V.	CONCLUSION DE L'ÉTUDE	181

CHAPITRE 6 : ÉTUDE DE L'EFFET DE LA PERTE D'UN ALLÈLE LSR CHEZ UN MODÈLE MURIN LORS D'UN RÉGIME HYPERLIPIDIQUE..... 184

I.	OBJECTIF DE L'ÉTUDE	186
II.	MISE EN PLACE DE L'ÉTUDE	186
III.	RÉSULTATS ET DISCUSSION	188
IV.	CONCLUSION DE L'EFFET D'UN RÉGIME HYPERLIPIDIQUE SUR LA RÉGULATION DU MÉTABOLISME LIPOPROTÉIQUE ET DE LSR.....	204

CHAPITRE 7 : DISCUSSION GÉNÉRALE 208

CHAPITRE 8 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 218

ANNEXE 224

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 230

Introduction générale

Introduction générale

Les études qui ont été réalisées dans le cadre de cette thèse s'intègrent dans la thématique du laboratoire : Lipides et neurodégénérescence dans la maladie d'Alzheimer. En effet, l'obésité et les dyslipidémies sont des facteurs de risque reconnus des maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer. Or, en 1994, Bihain et Yen ont découvert un récepteur hépatique aux lipoprotéines, le *lipolysis stimulated lipoprotein receptor* (LSR) impliqué dans la clairance des lipoprotéines riches en triglycérides en phase postprandiale (Yen, F. T., *et al.*, 1994). Le génotype hétérozygote murin provoque une dyslipidémie au cours du vieillissement ou sous stress lipidique. De nombreuses études antérieures ont montrées que ce récepteur pourrait être un facteur important dans l'apparition des troubles du métabolisme lipidique périphérique. Afin de prévenir ces troubles, nous avons voulu comprendre les paramètres régulant ce récepteur ainsi que les conséquences métaboliques et lipidiques d'une perte de l'homéostasie lipidique périphérique.

Ce mémoire est composé de 4 parties.

La première partie est consacrée à la synthèse bibliographique, et décrit notamment le fonctionnement du métabolisme des lipoprotéines en détaillant les différents transports des lipides dans le cadre de l'étude du métabolisme lipidique périphérique. De plus, dans le but de mieux comprendre le transport et la distribution des lipides, un chapitre a été consacré à la lipogénèse et la lipolyse, des étapes nécessaires au bon déroulement du métabolisme des lipoprotéines. Puis, le cas particulier d'une adipokine sécrétée par le tissu adipeux, la leptine, a fait l'objet d'un chapitre afin de mieux comprendre son rôle essentiel dans le métabolisme lipidique. Enfin, un chapitre a été consacré aux désordres du métabolisme lipidique périphérique qui peuvent être impliqués dans des problèmes de santé publique tels que les maladies cardiovasculaires, le syndrome métabolique et les maladies neurodégénératives.

La seconde partie détaille les différentes méthodologies expérimentales et les techniques analytiques utilisées au cours des travaux de cette thèse.

La troisième partie développe nos résultats concernant les études qui ont été menées lors de cette thèse. Tout d'abord, la leptine a été démontrée comme modulant l'expression de LSR *in vitro* et *in vivo* avec des doses physiologiques comprises entre 1 et 25 ng/mL. Sachant que la leptine est impliquée dans le contrôle de la lipogénèse et qu'elle module LSR, la lipogénèse a été réduite par l'utilisation d'un inhibiteur de l'enzyme lipogénique ACL, HCA,

afin de déterminer s'il existe un lien entre la lipogenèse et l'expression de LSR. Pour finir, une dyslipidémie a été induite chez un modèle murin par la mise en place d'un régime hyperlipidique ou l'utilisation du modèle dyslipidémique LSR^{+/-} sous régime hyperlipidique afin de comprendre les mécanismes mis en jeu lors de ces troubles lipidiques, déterminer les interactions entre les paramètres étudiés et tenter de corriger les effets délétères engendrés par ces pathologies.

Enfin, la quatrième partie de ce mémoire est consacrée aux conclusions et aux perspectives découlant de ce travail.

Chapitre 1 :

Synthèse Bibliographique

Les lipides constituent une grande famille de molécules hydrophobes, insolubles dans les milieux biologiques aqueux. Apportés par l'alimentation, ils ont un rôle primordial au sein de l'organisme. Ils peuvent avoir :

- un rôle énergétique puisqu'ils sont les nutriments les plus riches en énergie : **1 gramme de lipides produit 9 kcal.**
- un rôle de constitution : les lipides complexes (phospholipides, lécithines, sphingomyélines) sont les constituants essentiels des membranes biologiques. Par leur imperméabilité, ils permettent de délimiter les différents compartiments des cellules.
- un rôle de précurseur : certains lipides sont les précurseurs métaboliques des prostaglandines, acides gras cycliques à caractère hormonal.
- d'autres rôles tels que l'implication dans les voies de signalisation (Wang, X., 2004) et dans l'induction de transcription pour certains récepteurs nucléaires (André-Fouët, X., *et al.*, 2004).

I. LE MÉTABOLISME DES LIPOPROTÉINES

1. Les lipoprotéines

Les lipoprotéines sont des complexes de protéines et de lipides, hydrosolubles, transporteurs des lipides dans la circulation (André-Fouët, X., *et al.*, 2004). La coque externe est une monocouche de phospholipides contenant du cholestérol libre et une ou plusieurs protéines appelées apolipoprotéines (par exemple ApoA, ApoB, etc.) (figure 1). La structure amphiphile des phospholipides permet une solubilité adéquate des lipoprotéines : la tête hydrophile est en contact avec le plasma alors que le pôle opposé, hydrophobe, interagit avec le noyau lipidique contenant des triglycérides, des esters de cholestérol et de petites quantités d'autres substances hydrophobes, comme des vitamines liposolubles (Shepherd, J., 1994, Toussaint, J.-F., *et al.*, 2003). Les lipoprotéines ne sont pas des particules stables mais subissent des remaniements lors du transport des lipides.

La classification des lipoprotéines vient de leurs caractéristiques physico-chimiques principalement réparties selon leurs mobilités électrophorétiques, par électrophorèse en agarose. La migration des protéines se fait selon leur charge. A pH supérieur à leur pHi moyen (pH en général 8,2 à 8,6), les protéines sont toutes chargées négativement et se

comportent comme des anions suite à l'ionisation des groupements carboxyliques des acides aminés dicarboxyliques (glutamine et acide aspartique). Sous l'action d'un champ électrique de l'électrophorèse, elles vont migrer vers l'anode (+). La mobilité électrophorétique est une valeur exprimée par la relation $\mu=v/E$ avec v pour la vitesse de la molécule, d'autant plus grande que le pH du milieu est éloigné du pHi de la protéine et E pour le champ électrique. Les lipoprotéines forment 2 classes avec des mobilités électrophorétiques proches des globulines α_1 (HDL) et β (VLDL, IDL et LDL) (Stocks, J. and Miller, N. E., 1999). Cependant, les techniques d'ultracentrifugation ont permis d'affiner cette classification en tenant compte de la densité hydratée des lipoprotéines et de leur taille (Gofman, J. W., *et al.*, 1949). Les lipoprotéines diffèrent aussi selon leur composition lipidique, au niveau du cœur hydrophobe mais aussi au niveau de leur composition en apolipoprotéines. Les lipoprotéines de faible densité telles que les VLDL et les chylomicrons sont riches en triglycérides alors que les lipoprotéines de densité plus élevée telles que les LDL et les HDL transportent essentiellement du cholestérol estérifié.

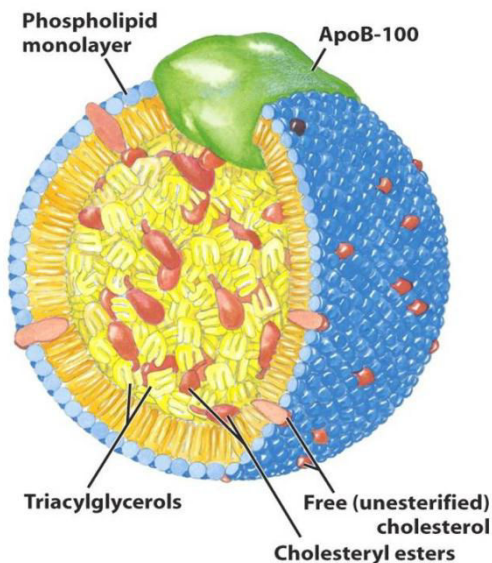


Figure 1: Schéma d'une lipoprotéine
d'après Nelson, D L et Cox, M M, 2006

Les lipoprotéines se classent en 5 groupes qui sont :

- les *very low density lipoprotein* (VLDL)
- les *intermediate density lipoprotein* (IDL)
- les *low density lipoprotein* (LDL)
- les *high density lipoprotein* (HDL)
- les lipoprotéines (a) (Lp(a))
- et les chylomicrons

1) Classification

a. Les VLDL

Les VLDL sont des molécules de densité très faible, inférieure à 1,006 et ayant un diamètre compris entre 30 et 80 nm. Elles sont formées au niveau du foie en tant que VLDL naissante contenant principalement des triglycérides, de l'ApoE et de l'ApoB (Eaton, R. P. and Kipnis, D. M., 1969, Koga, S., *et al.*, 1969). Les VLDL naissantes interagissent avec les molécules de HDL, qui leur apportent du cholestérol, des phospholipides, de l'ApoC-II et ApoC-III, pour générer des VLDL matures. Elles permettent de transporter les triglycérides endogènes et contiennent principalement des ApoB-100, ApoE et ApoC-II/C-III. Leur analyse électrophorétique leur confère un profil pré β . Les VLDL matures subissent l'action de la *lipoprotein lipase* (LPL) qui hydrolyse les triglycérides pour générer des résidus de VLDL, aussi appelés les IDL (Toussaint, J.-F., *et al.*, 2003).

b. Les IDL

Les IDL sont des molécules ayant une densité comprise entre 1,006 et 1,019 et un diamètre compris entre 25 et 35 nm (Chen, G. C. and Kane, J. P., 1979). Les IDL transportent principalement des esters de cholestérol, des triglycérides et sont composées d'ApoB-100, d'ApoE, d'ApoC-II et d'ApoC-III. Comme les VLDL, les IDL sont des molécules de mobilités électrophorétiques pré β . Les IDL sont ensuite dégradées par la lipase hépatique (HL) pour générer des LDL (Vaubourdolle, M., 2007).

c. Les LDL

La densité des LDL est encore plus élevée, de 1,019 à 1,063 (Shen, M. M., *et al.*, 1981), due à l'hydrolyse des triglycérides, leur cœur hydrophobe étant principalement formé d'esters de cholestérol destinés aux tissus périphériques. La coque externe contient l'ApoB-100. Ces molécules ont une mobilité électrophorétique β .

d. Les HDL

Les molécules de HDL ont une densité qui varie entre 1,063 et 1,210 et un diamètre compris entre 5 et 12 nm (Scanu, A., 1966). Leur cœur hydrophobe est chargé d'esters de cholestérol et de phospholipides. Leur coque externe contient l'ApoA-I, l'ApoA-II, l'ApoC-II et C-III et ApoE. Contrairement aux molécules de faible densité telles que les VLDL, IDL et LDL, les HDL ont une mobilité électrophorétique de type α .

Différentes familles de HDL existent (Green, P. H., *et al.*, 1978) :

- Les HDL discoïdales :

Ces lipoprotéines en forme de disque contiennent principalement du cholestérol, des phospholipides ainsi que les apolipoprotéines ApoA-I, ApoA-II et ApoE. Elles sont formées au niveau du foie et de l'intestin et réagissent avec les résidus de chylomicrons et la LCAT pour former les HDL₃.

- Les HDL₃ :

Ces lipoprotéines sont composées de cholestérol, d'esters de cholestérol, de phospholipides et des apolipoprotéines ApoAI, ApoAII et ApoE. Elles interagissent avec les membranes plasmatiques des cellules afin d'éliminer le cholestérol libre. Leur réaction avec la LCAT convertit les HDL₃ en HDL_{2a} (une molécule d'HDL avec une ApoE et un cœur hydrophobe contenant des esters de cholestérols). Les HDL_{2a} riches en esters de cholestérol sont ensuite converties en HDL_{2a} riches en triglycérides via un transfert d'ester de cholestérol des HDL vers les VLDL et un transfert des triglycérides des VLDL vers les HDL par l'action de la CETP.

Les fonctions des HDL sont multiples. Elles permettent entre autre le transfert des protéines à d'autres lipoprotéines en récupérant leurs lipides. Elles récupèrent aussi le cholestérol des membranes cellulaires des tissus périphériques et le convertissent en esters de cholestérol grâce à l'action de la LCAT. Puis elles transfèrent les esters de cholestérol à d'autres lipoprotéines afin de les ramener vers le foie.

e. Les Lp(a)

Ces molécules font partie d'une autre famille de lipoprotéines identifiées comme étant un facteur de risque pour certaines maladies coronariennes telles que le développement d'athérosclérose conduisant aux maladies cardiovasculaires. Cette lipoprotéine est composée

d'une particule LDL contenant une apolipoprotéine (a) et forme une liaison covalente avec l'ApoB-100 des LDL grâce à un pont disulfure (Mondola, P. and Reichl, D., 1982). Elle est dépourvue d'activité protéolytique mais elle compte, dans sa séquence, de 12 à 51 répétitions de motifs appelés KRINGLES (par ressemblance à la structure du gâteau Danois), structures tri-dimensionnelles contenant des hélices stabilisées par 3 ponts disulfures. Ces motifs contribuent à la forte hydrophilicité des Lp(a) (André-Fouët, X., *et al.*, 2004).

f. Les chylomicrons

Les chylomicrons sont les premières lipoprotéines formées à partir des lipides alimentaires (figure 2), d'une densité inférieure à 1,006 et d'un diamètre allant de 80 à 500nm (Scanu, A. and Page, I. H., 1959). Les chylomicrons sont formés dans les entérocytes et transportent les triglycérides et cholestérol captés par l'intestin. Ils sont constitués d'ApoB-48, d'ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, d'ApoC-II, d'ApoC-III et d'ApoE.

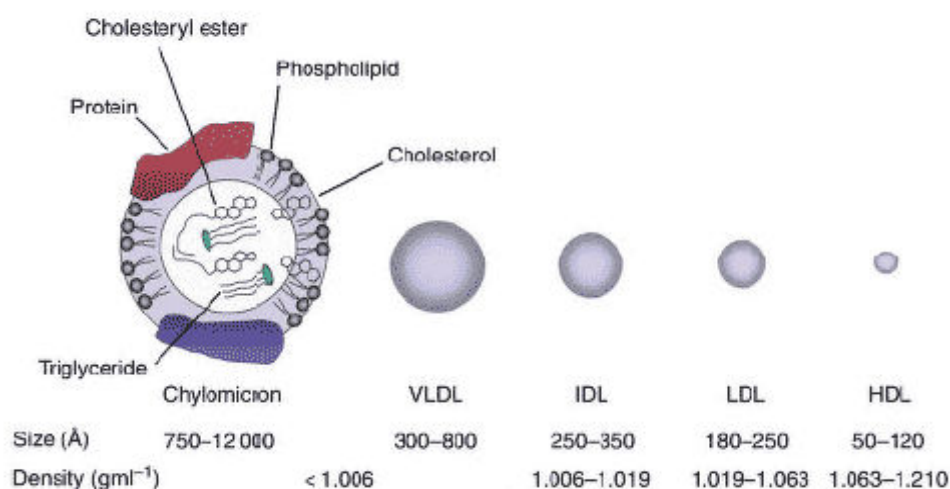


Figure 2: Structure des lipoprotéines d'après Fayanne E, Thorngate et David L. Williams

2) Structure : Les apolipoprotéines

Les apolipoprotéines sont des protéines constitutives des lipoprotéines. Il existe 4 familles d'apolipoprotéines (nomenclature A, B, C et E) (tableau 1). Leur élément moléculaire commun est un motif de 11 acides aminés formant une hélice de 3,6 acides aminés par tour (Mahley, R. W., *et al.*, 1984). Les acides aminés polaires sur une face et les acides aminés

apolaires sur l'autre face lui confèrent des caractéristiques d'hélice α amphiphile. Elles ont des origines communes et ont évolué différemment au cours du temps. Les ApoA ont été purifiées à partir des α -lipoprotéines (HDL), les ApoB100 purifiées à partir des β -lipoprotéines (LDL), les ApoC purifiées à partir des VLDL et les ApoE purifiées à partir des IDL. Cependant, cette nomenclature a évolué en raison des découvertes de nouvelles apolipoprotéines et des fonctions associées. C'est ainsi qu'on distingue 5 ApoA, 2 ApoB, 4 ApoC... Les apolipoprotéines majeures sont les ApoA1 à A5, B48 et B100, C1 à C4 et l'ApoE et ses différentes isoformes. Il existe d'autres apoprotéines humaines comme les Apo D ou A3, F, G, H, J, L, M ou SAA.

Tableau 1: Identité, expression tissulaire, distribution plasmatique et fonctions des principales apolipoprotéines humaines d'après Toussaint et al., 2004

NOM	TISSU	DISTRIBUTION	FONCTION
apo AI	foie, intestin	chylo, HDL	Structurale ; activateur physiologique de la LCAT ; efflux de cholestérol
apo AII	foie (intestin)	HDL	Structurale ; activateur/inhibiteur de la HL ; efflux de cholestérol
apo AIV	foie, intestin	chylo, HDL	Transport reverse du cholestérol ; activateur de la LCAT ; métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides
apo AV	foie		Métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides
apo B100	foie	VLDL, IDL, LDL	Structurale : synthèse et sécrétion des VLDL ; ligand du récepteur LDLR
apo B48	intestin	chylomicrons	Structurale ; synthèse et sécrétion des chylomicrons ; ligand du récepteur B48R
apo CI	foie (intestin)	chylo, VLDL, HDL	Inhibiteur physiologique de la CETP ; activateur de la LCAT ; inhibiteur de la liaison aux LDLR, LRP et VLDLR
apo CII	foie (intestin)	chylo, VLDL, HDL	Activateur physiologique de la LPL
apo CIII	foie (intestin)	chylo, VLDL, HDL	Inhibiteur physiologique de la LPL ; inhibiteur de la captation hépatique des lipoprotéines riches en TG
apo D (apo AIII)	foie, intestin, rate, pancréas, cerveau, surrénales, rein	HDL, LDL, VLDL	Transport reverse du cholestérol (?)
apo E	foie, macrophage, cerveau	chylo, VLDL, IDL, HDL	Ligand des récepteurs LDLR et LRP
apo F	foie	LDL (VLDL, HDL)	Inhibiteur de la CETP
apo G		HDL	?
apo H (b2 glycoprotéine I)		HDL	?
apo J (clusterine)		HDL	Anti-inflammatoire
apo L		HDL	?
apo SAA		HDL, chylo	Phase aiguë de l'inflammation

Elles exercent trois rôles fondamentaux. Tout d'abord, grâce à leur structure en α -hélice amphipathique, elles assurent la cohésion structurale des lipoprotéines telles que les ApoB48 (chylomicrons et VLDL), ApoB100 (LDL) ou ApoAI (HDL) en interagissant avec les lipides mais aussi avec le milieu plasmatique. De plus, elles peuvent avoir un rôle d'effecteur enzymatique tel que l'ApoCII activant la LpL alors que l'ApoCIII inhibe son activité. Les lipoprotéines, durant leur parcours, échangent leur contenu en cholestérol et TG mais aussi leurs apolipoprotéines.

Seule l'ApoB est hydrophobe, donc insoluble dans l'eau, et reste associée à la même lipoprotéine durant tout son parcours métabolique des VLDL aux LDL. C'est pour cette raison qu'elle peut être un bon marqueur pour suivre les lipoprotéines riches en TG. Enfin, les apolipoprotéines permettent la reconnaissance de récepteurs membranaires spécifiques, principalement les ApoB et les ApoE (Mahley, R. W., *et al.*, 1984).

3) Les récepteurs lipoprotéiques

Au niveau des tissus périphériques tels que le cœur, le tissu adipeux et le muscle squelettique, les lipides sont extraits des lipoprotéines par l'action de différentes enzymes lipolytiques. Les enzymes agissent en présence de co-facteurs pour libérer les esters de cholestérol et les triglycérides des lipoprotéines et permettre leur internalisation au niveau de l'endothélium des tissus périphériques. Les lipoprotéines peuvent aussi être captées par des récepteurs lipoprotéiques principalement au niveau du foie (tableau 2).

Tableau 2: Récepteurs cellulaires des lipoprotéines d'après Toussaint et al., 2004

NOM	FAMILLE	PRINCIPAUX TISSUS	TYPE DE LIPOPROTÉINE CONCERNÉ	LIGAND
LDLR <i>LDL-receptor</i>	<i>LDL-receptor</i>	foie, muscle, cerveau, cœur	LDL, VLDL, VLDL remnants, <i>chylomicron remnants</i>	apoB100, E
LRP <i>LDL-receptor related protein</i>	<i>LDL-receptor</i>	foie, cerveau, poumon	VLDL, VLDL remnants, <i>chylomicron remnants</i>	apoE
VLDLR <i>VLDL-receptor</i>	<i>LDL-receptor</i>	muscle, cœur, tissu adipeux	VLDL, VLDL remnants, <i>chylomicron remnants</i>	apoE
ER-2 <i>apoE-receptor</i>	<i>LDL-receptor</i>	cerveau, placenta	VLDL, VLDL remnants, <i>chylomicron remnants</i>	apoE
Mégaline	<i>LDL-receptor</i>	rein, intestin, placenta	HDL, LDL, VLDL	apoE, B100, AI
Cubiline	-	rein, intestin, placenta	HDL	apoAI
SR-AI/AII <i>scavenger receptor types AI/AII</i>	<i>scavenger receptor class A</i>	macrophages, endothélium	LDL oxydées LDL acétylées	polyanions
SR-B1 <i>scavenger receptor type B1</i>	<i>scavenger receptor class B</i>	foie, tissus stéroïdogènes	HDL, LDL, VLDL	apoAI, B
CD36 <i>glycoprotein IV</i>	<i>scavenger receptor class B</i>	monocytes, endothélium, plaquettes, adipocytes, cellules musculaires lisses	LDL modérément oxydées	
SREC <i>Scavenger Receptor expressed by Endothelial Cells</i>		cellules endothéliales	LDL oxydées LDL acétylées	
LOX1 <i>lectin-like oxidized LDL receptor</i>	<i>lectin</i>	macrophages, cellules endothéliales	LDL oxydées	
B48R <i>apoB48 receptor</i>		macrophages, endothélium	chylomicrons <i>chylomicron remnants</i>	apoB48

a. Le récepteur aux LDL (LDLr)

Le récepteur des LDL (LDLr) a été initialement découvert comme étant celui qui assure l'endocytose des LDL par interaction spécifique avec l'ApoB100 (Goldstein, J. L. and Brown, M. S., 2009). Cependant, il capte aussi les VLDL par interaction avec l'ApoE. Il est présent principalement dans les tissus nécessitant du cholestérol (la substance blanche du système nerveux, les tumeurs, les tissus à fort renouvellement) et le foie. Une fois endocytées, les vésicules d'endocytoses (endosomes) fusionnent avec les lysosomes (figure 3) ; le pH acide des lysosomes dissocie la lipoprotéine et libère son contenu en cholestérol. Les récepteurs sont alors recyclés vers la surface membranaire. L'afflux de cholestérol intracellulaire induit l'inhibition des enzymes clefs de la synthèse du cholestérol (HMG-CoA synthetase, HMG-CoA reductase, farnesyl pyrophosphate...) et du récepteur des LDL.

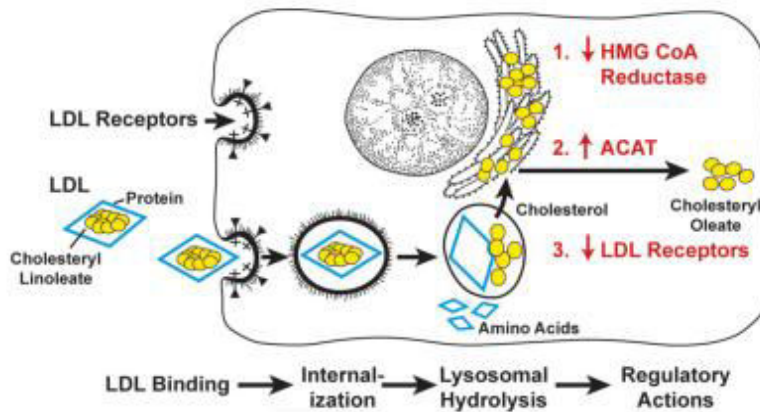


Figure 3: Métabolisme du récepteur aux LDL (LDLr) d'après Joseph L Goldstein et Michael S Brown, 2009

b. Le récepteur *lipoprotein receptor-related protein* (LRP)

D'autres récepteurs sont apparentés au récepteur LDL tel que le récepteur LRP identifié comme un membre de la famille des LDLr et identique au récepteur à $\alpha 2$ -macroglobuline comme l'a constaté Dudley Strickland (Qiu, Z., *et al.*, 2002), présent principalement au niveau du foie, du cerveau et des poumons (Sugiyama, T., *et al.*, 2000). Récepteur de 600-kDa, Ca^{2+} dépendant, il lie et internalise les VLDL enrichies avec des ApoE recombinantes (Kowal, R. C., *et al.*, 1989). Son expression est inhibée par la protéine 39-kDa *receptor associated protein* (RAP) ainsi que la lactoferrine qui empêche l'internalisation des lipoprotéines effectuée par LRP (Herz, J., *et al.*, 1991). C'est pourquoi LRP fut décrit comme le principal récepteur impliqué dans la clairance des lipoprotéines riches en TG, les VLDL et les résidus de chylomicrons.

Cependant, cette hypothèse fut controversée puisque, bien que LRP soit présent dans les hépatocytes comme dans les cellules de Kupffer (2 types cellulaires impliqués dans la clairance des $\alpha 2$ -macroglobulines), la clairance des résidus de chylomicrons a lieu uniquement dans les hépatocytes (van Dijk, M. C., *et al.*, 1991). De plus, la culture primaire d'hépatocytes montre une capacité réduite de liaison avec l' $\alpha 2$ -macroglobuline sans modification de la capacité de liaison des résidus de chylomicrons (van Dijk, M. C., *et al.*, 1992). Enfin, les hépatocytes de rat maintiennent leur capacité à capter les VLDL lorsque LRP est supprimé de la surface cellulaire et séquestré dans des vésicules d'endocytose (van Berkel, T. J., *et al.*, 1995). Ces observations ont permis d'établir une hypothèse selon laquelle il existerait un autre récepteur aux résidus de chylomicrons, biochimiquement distinct de LRP et de LDLr (Rohlmann, A., *et al.*, 1998, Yen, F. T., *et al.*, 1994). Une simple inactivation de

LRP ne suffit pas pour observer une hyperlipidémie *in vivo*, cependant l'absence des deux allèles de LRP est létale (Dietrich, M. F., *et al.*, 2010). Seule la suppression de LRP chez les souris déficientes en LDLr résulte en une accumulation de lipoprotéines riches en ApoB48, ce qui indique que LRP joue principalement un rôle de soutien dans la clairance des résidus de chylomicrons plutôt qu'un rôle majeur (Rohlmann, A., *et al.*, 1998).

c. Le récepteur *lipolysis stimulated lipoprotein receptor* (LSR)

Bihain et Yen ont découvert en 1992 un récepteur aux lipoprotéines génétiquement distinct du récepteur aux LDL, activé par les acides gras libres (Bihain, B. E. and Yen, F. T., 1992). Ce récepteur lie les lipoprotéines contenant une ApoB et/ou une ApoE et a une forte affinité pour les lipoprotéines riches en TG (principalement les résidus de chylomicrons) menant à l'hypothèse de la présence d'un récepteur silencieux en temps normal, activé lors de l'hydrolyse des TG des lipoprotéines en acides gras libres principalement en phase postprandiale, lors de la présence de chylomicrons (Yen, F. T., *et al.*, 1994). Son activité est inhibée par la lactoferrine (Mann, C. J., *et al.*, 1995), protéine de lait inhibant la capture des chylomicrons au niveau du foie ainsi que par la protéine RAP (Troussard, A. A., *et al.*, 1995). De plus, LSR est inhibé par l'ApoCIII, une apolipoprotéine responsable d'hypertriglycéridémie lors de sa surexpression qui inhibe la liaison des lipoprotéines riches en TG (chylomicrons et VLDL) mais pas celle des LDL au LSR (Mann, C. J., *et al.*, 1997). La présence d'acide gras libres (tel que l'oléate) est nécessaire pour la liaison entre l'ApoB ou l'ApoE et LSR et par conséquent l'endocytose médiée par LSR (Yen, F. T., *et al.*, 2008).

La quantité de récepteurs LSR présents à la surface des hépatocytes est fortement corrélée négativement avec le taux de TG plasmatiques en phase postprandiale (Mann, C. J., *et al.*, 1995). Cependant, cette activité nécessite la présence d'acides gras libres (relargués par la lipase hépatique ou la lipoprotéine lipase à partir des VLDL et des chylomicrons) en concentration excédant la capacité de liaison avec l'albumine. Ce récepteur est constitué de 3 sous-unités α , α' et β dont les 2 principales sont α et β de 68-kDa et 56-kDa respectivement, les formes α et α' ne pouvant être distinguées avec précision. La sous-unité β est plus abondante que les 2 autres sous-unités α et α' . Les complexes LSR murins les plus abondants sont à 41% $\alpha_1\beta_2$ à 180-kDa et à 31% $\alpha_1\beta_3$ à 236-kDa organisés en hétérotrimère ou tétramère reliés par des ponts disulfures (Yen, F. T., *et al.*, 1999). La sous-unité α correspond à LSR 2097 de 593 acides aminés (68-kDa). La sous-unité α' correspond à LSR 2040 de 574 acides

aminés, identique à la séquence α à l'exception d'une répétition de dileucine. Enfin, la sous-unité β correspond à LSR 1893 de 525 acides aminés (56-kDa). Le domaine manquant de cette sous-unité comprend les signaux d'adressage aux lysosomes, un domaine riche en cystéine ainsi que le domaine transmembranaire. Cependant, cette sous-unité contient les domaines hydrophobes supposés permettre la liaison des acides gras libres mais cette hypothèse n'a pas encore été démontrée. Cela laisse donc penser que les sous-unités α et α' détiennent le domaine transmembranaire leur conférant la capacité d'accroche à la membrane cellulaire des hépatocytes, contrairement à la sous-unité β , qui semblerait être extracellulaire (Figure 4).

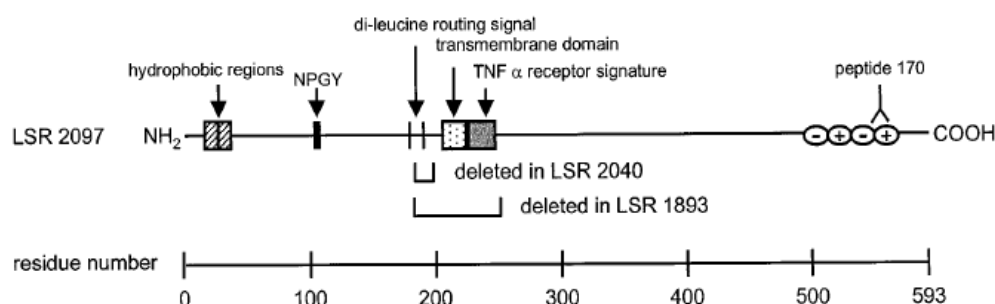


Figure 4: ADNc et séquence d'acides aminés correspondant au LSR de rat

L'ARNm de LSR est abondamment présent chez les souris au niveau du foie, des poumons, de l'intestin, des reins, des ovaires et des testicules (Mesli, S., *et al.*, 2004, Yen, F. T., *et al.*, 1999). Cependant, il n'a pas été détecté au niveau du muscle et du cœur. Durant l'embryogénèse, l'ARNm de LSR peut être détecté à 7,5 j post-coitum (E7) et augmente jusqu'à E17 parallèlement à la prothrombine, marqueur hépatique.

Afin d'étudier le rôle du récepteur LSR *in vivo*, LSR a été inactivé dans les cellules souches embryonnaires de souris 129/Ola par la délétion d'un segment de gène contenant l'exon 2-5 (figure 5). Des souris 129/Ola-C57BL/6 contenant la délétion ont été produites. Les souris homozygotes LSR^{-/-} meurent au bout de 12,5 à 15,5 jours de gestation suggérant la crucialité de LSR lors du développement embryonnaire, principalement lors du développement du foie. Voilà pourquoi les études *in vivo* portent sur les souris hétérozygotes LSR^{+/-}, viables.

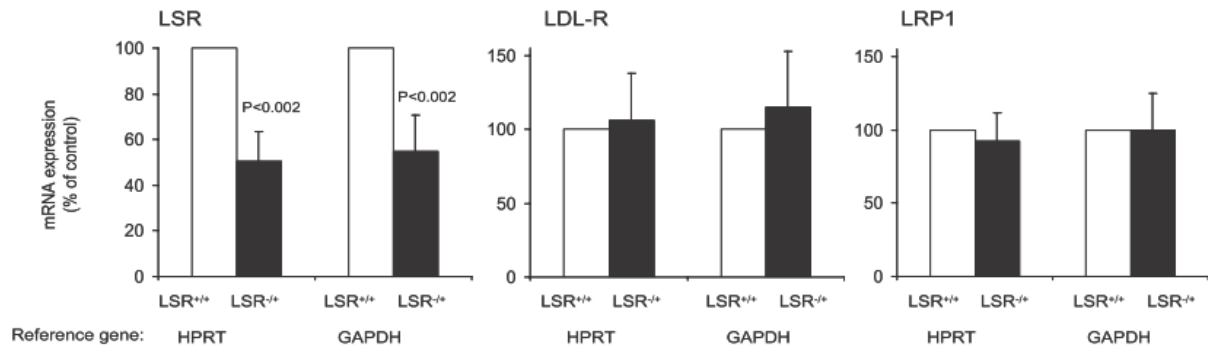


Figure 5: quantité d'ARNm de LSR, LDLr et LRP hépatique chez les souris LSR^{+/-} d'après Yen *et al.*, 2008

Ce génotype a pour conséquence une accumulation de TG et cholestérol plasmatiques sous régime hyperlipidique type « Western », associée à une diminution de l'ordre de 50% de la clairance des TG lors de la phase postprandiale (figure 6). De plus, l'augmentation du poids des souris LSR^{+/-} sous régime dit « Western » est directement corrélée avec l'augmentation des taux de TG et cholestérol plasmatiques. Lors de la prise alimentaire, les résidus de chylomicrons sont internalisés dans l'hépatocyte par LSR après avoir distribué leur contenu aux organes périphériques. Cependant, lors d'une diminution d'expression de LSR hépatique (LSR^{+/-}), la clairance des résidus de chylomicrons est plus faible. Par conséquent, l'accumulation des particules riches en Apo-B mène à l'augmentation des taux de TG et cholestérol plasmatiques (Yen, F. T., *et al.*, 2008).

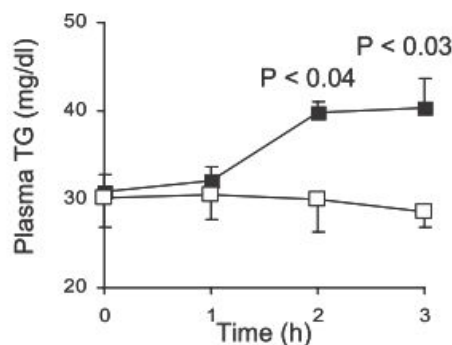


Figure 6: Lipémie postprandiale suite à un gavage de 300µL d'huile d'olive d'après Yen *et al.*, 2008

En conclusion, le récepteur LSR, fortement impliqué dans la clairance des lipoprotéines riche en apo-B, a été clairement démontré lors de ces dernières années comme étant un récepteur primordial dans le métabolisme des lipoprotéines spécifiquement en phase postprandiale.

2. Le transport des lipoprotéines

1) Le transport exogène

Les lipides alimentaires, acides gras et cholestérol, sont absorbés au niveau de la lumière intestinale par les entérocytes, et y sont assemblés en lipoprotéines puis relargués dans la circulation systémique sous forme de chylomicrons au niveau de la membrane basale des entérocytes.

Les chylomicrons sont impliqués dans la distribution des triglycérides et du cholestérol apportés par l'alimentation aux tissus périphériques, correspondant à la voie exogène du métabolisme des lipoprotéines (Ginsberg, H. N., *et al.*, 2006, Scriver, C. R., *et al.*, 1995).

a. Absorption des lipides au niveau de l'intestin et sécrétion de chylomicrons

La synthèse et la sécrétion des chylomicrons par les entérocytes sont directement liées à l'absorption des lipides en phase postprandiale. Le cholestérol alimentaire transporté est transformé en ester de cholestérol au sein des entérocytes par une enzyme localisée dans le réticulum endoplasmique appelée *A-cholesterol acyl transferase* (ACAT).

De nombreuses protéines cellulaires sont impliquées dans l'absorption intestinale des lipides alimentaires et peuvent favoriser ou ralentir cette absorption. Par exemple, la *plasma membrane fatty acid-binding protein* (FABPpm) se lie aux acides gras, aux lysoPC et au cholestérol pour permettre leur absorption, de même que le *scavenger receptor class B* (SR-B1) qui permet l'absorption du cholestérol. La protéine *microsomal triglyceride transfer protein* (MTP), quant à elle, est impliquée dans l'assemblage et la sécrétion des chylomicrons en se liant aux esters de cholestérol (figure 7), aux triglycérides et aux phospholipides (Iqbal, J., *et al.*, 2008). Son rôle est primordial concernant l'assemblage des chylomicrons dans l'intestin mais aussi des VLDL dans le foie, permettant surtout de stabiliser l'apolipoprotéine B lors de son entrée dans le réticulum endoplasmique. La structure de l'ApoB va déterminer la nature des lipoprotéines produites. La synthèse de l'ApoB48 (seulement 48% de la masse de l'ApoB100) résulte d'une maturation post-transcriptionnelle et mène à la synthèse de

récupération des résidus de chylomicrons hépatiques (Martins, I. J., *et al.*, 2000). Cependant, un nouveau récepteur hépatique aux lipoprotéines, LSR, a été découvert et identifié comme ligand des lipoprotéines ApoB et ApoE, ayant une forte affinité pour les lipoprotéines riches en triglycérides telles que les chylomicrons. Ce récepteur est actif en présence des acides gras libres produits lors de la lipolyse et est impliqué dans la clairance des résidus de chylomicrons, permettant leur internalisation (Yen, F. T., *et al.*, 2008). Une fois internalisés, les résidus de chylomicrons peuvent fusionner avec des lysosomes qui induisent une lipolyse et une protéolyse quasi complète de ses constituants. En effet, les esters de cholestérol (CE) et les TG sont hydrolysés au niveau des lysosomes puis le cholestérol libre est ensuite re-estérifié par l'ACAT et stocké comme gouttelettes de CE ; les AGL sont oxydés et rentrent dans le système de synthèse des TG. Le cholestérol et les TG sont alors soit intégrés dans de nouvelles particules synthétisées par le foie (VLDL) ayant pour but d'approvisionner les tissus périphériques (transport endogène) soit excrétés dans les canicules biliaires en vue de leur élimination.

2) Le transport endogène

Une fois internalisés, les TG et esters de cholestérol sont déversés dans le cytosol des hépatocytes. De nouvelles lipoprotéines garantissent l'apport de TG et esters de cholestérol aux tissus et initient une nouvelle voie de transport des lipides, dite endogène puisqu'elle permet leur transport du foie vers les tissus périphériques.

Les VLDL, molécules riches en TG, sont formées dans le foie et contiennent 4 à 5 TG pour un ester de cholestérol (André-Fouët, X., *et al.*, 2004). Les apolipoprotéines C et E sont les protéines les plus échangeables ; cependant l'ApoB100 reste la protéine constitutive des VLDL. Elles peuvent enrichir leur contenu en esters de cholestérol par un transfert provenant des HDL et médié par la CETP. De plus, suite à l'action de la LpL qui hydrolyse les TG, les VLDL se transforment en IDL, rapidement captés par le foie via LRP ou LDLr qui reconnaissent l'ApoE, puis en LDL, appauvris en TG et enrichis en esters de cholestérol dont le rôle principal est de fournir le cholestérol nécessaire aux tissus périphériques. Les LDL sont ensuite reconnus par leur propre récepteur, ubiquitaire, qui lie spécifiquement l'ApoB100. Les LDL sont endocytés, fournissant du cholestérol aux cellules (Veniant, M. M., *et al.*, 1998).

3) Le transport inverse du cholestérol

Cette voie de transfert assure le retour du cholestérol excédentaire des tissus périphériques incapables de le stocker vers le foie. Le foie est le seul organe capable d'éliminer le cholestérol excédentaire de l'organisme par la voie biliaire, où le cholestérol peut être excrété sous forme native ou sous forme d'acides biliaires (Li, T., *et al.*, 2011). Cependant, les organes périphériques sont incapables de stocker ce cholestérol ; c'est pourquoi ils sécrètent des lipoprotéines HDL, dont le but est de ramener ce cholestérol excédentaire au foie.

Ces HDL sont principalement constituées d'ApoAI et d'une monocouche de phospholipides associée au cholestérol libre. Ce sont les HDL natives qui se chargent du transport du cholestérol cellulaire. Les HDL natives sont pauvres en lipides et ont une forme discoïdale du fait de l'absence de lipides neutres dans leur cœur. Elles ont une mobilité électrophorétique de type pré β (pré β -HDL) qui les distingue des molécules de HDL (de type α) retrouvées principalement dans les compartiments intravasculaires.

Les mouvements de cholestérol peuvent se faire par diffusion à travers la membrane plasmique puis par incorporation dans les HDL (figure 8), mais peuvent être favorisés par le récepteur SR-B1 ainsi que par la protéine codée par le gène ABCA1 (Hovingh, G. K., *et al.*, 2003, Peng, Y., *et al.*, 2004).

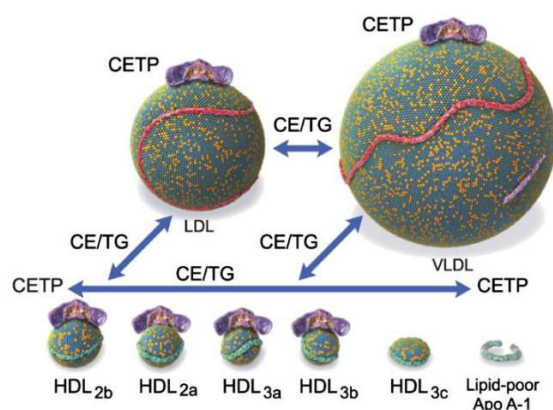


Figure 8: Mouvement de cholestérol et de triglycérides entre les lipoprotéines d'après Niesor *et al.*, 2010

Le flux de cholestérol est dépendant de la LCAT plasmatique, activée par l'ApoAI. Elle permet le transfert d'un acide gras des phospholipides vers les particules de cholestérol. Les esters de cholestérol ainsi formés, ils intègrent le cœur des HDL qui, par gonflement, vont

adopter une forme sphérique. Une fois sphériques, les particules se chargent en apolipoprotéines échangeables, telles que les ApoE et C. Elles échangent alors des esters de cholestérol contre des TG aux VLDL ou chylomicrons grâce à l'action de la CETP. Elles deviennent alors des HDL₂ captées par le foie via ApoE. Leurs TG peuvent aussi être hydrolysés par la lipase hépatique menant à un autre type de particules, les HDL₃ (figure 9).

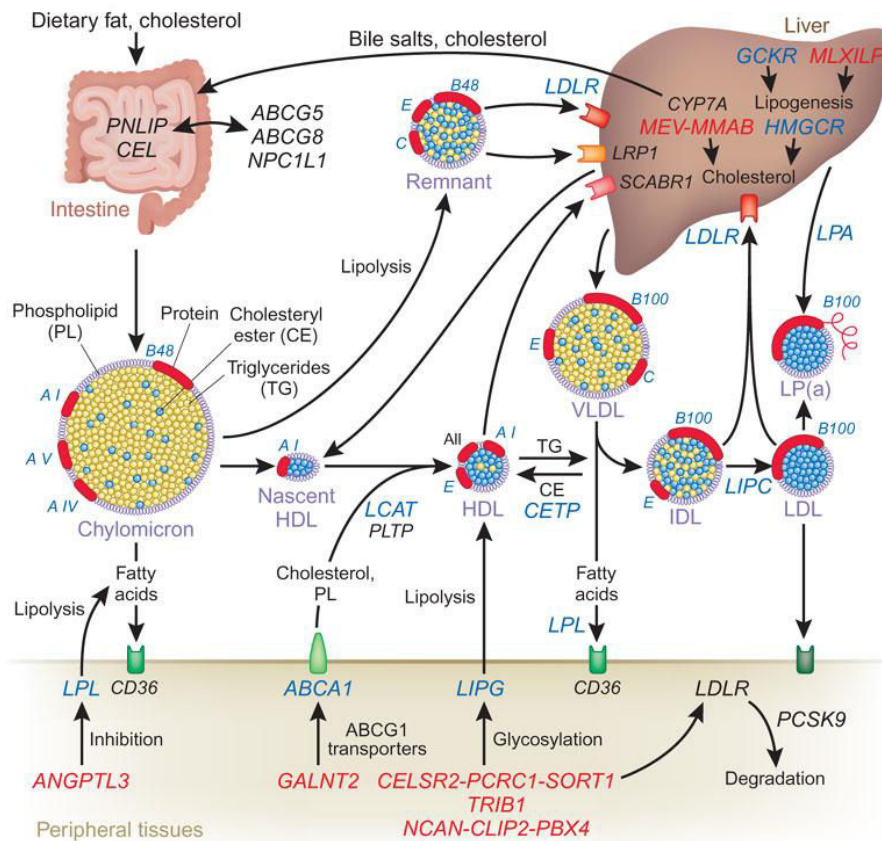


Figure 9: Métabolisme général des lipoprotéines d'après (Lusis, A. J. and Pajukanta, P., 2008)

La description du transfert des lipoprotéines en 3 voies sera bientôt dépassée car trop restrictive. Néanmoins, elle permet de différencier le transfert rapide de grosses quantités de particules résultant de la distribution des lipides alimentaires ; le transfert endogène permanent et régulé permettant l'apport en lipides des tissus périphériques en dehors des prises alimentaires et le retour du cholestérol au foie, unique issue d'évacuation du cholestérol.

II. LA LIPOLYSE ET LA LIPOGENÈSE: DISTRIBUTION ET UTILISATION DES LIPIDES À L'INTÉRIEUR DES CELLULES

1. La lipogenèse

La lipogenèse désigne l'ensemble des processus qui mènent à la synthèse des acides gras et des lipides en général. La néosynthèse des acides gras (lipogenèse) est un processus qui permet de convertir les excès de glucides en acides gras. Une grande partie du glucose absorbé par l'intestin grêle est acheminée vers les hépatocytes qui le convertissent en glycogène. Cependant, lorsque le foie est saturé en glycogène (approximativement 5% du poids du foie), le glucose restant récupéré par les hépatocytes est acheminé vers les voies métaboliques de synthèse des acides gras. Les acides gras libres ainsi formés (sous forme d'acyl-CoA) sont par la suite estérifiés avec du glycérol 3-phosphate (G3P) pour donner des TG et être exportés vers les tissus périphériques sous forme de lipoprotéines (VLDL) (Postic, C. and Girard, J., 2008).

1) Lieu de la lipogenèse

Chez les mammifères, la lipogenèse a lieu majoritairement dans le foie et le tissu adipeux où elle est 10 à 1000 fois supérieure, comparée aux autres tissus (Hillgartner, F. B., *et al.*, 1995). L'importance relative du tissu adipeux et du foie dans la lipogenèse varie selon les espèces. Chez l'Homme, le foie est l'organe principal de la lipogenèse (Hillgartner, F. B., *et al.*, 1995, Shrago, E., *et al.*, 1971) alors qu'elle est aussi importante dans le foie que dans le tissu adipeux chez le rat et la souris (Baker, N., *et al.*, 1978, Clarke, S. D., *et al.*, 1977). La lipogenèse hépatique est la plus étudiée et donc la plus connue. La lipogenèse ne représente qu'une faible partie de l'utilisation des TG hépatiques, comparée à l'apport de TG alimentaires (1g issus de la lipogenèse pour 80g d'apport alimentaire par jour). Un régime riche en glucides induit une forte lipogenèse (2 à 4 fois supérieure comparée à un régime standard) mais reste toujours minoritaire par rapport à l'apport de lipides alimentaires (Large, V., *et al.*, 2004).

2) Rôle de la lipogenèse

La lipogenèse répond à deux impératifs dans l'organisme :

- fournir les cellules en acides gras nécessaires à la synthèse des lipides de structure,
- permettre la mise en réserve de l'énergie lorsque les aliments excèdent les besoins de l'organisme (stockage).

Les voies métaboliques qui peuvent conduire au stockage excessif de lipides dans le foie (principalement sous la forme de TG) sont multiples et peuvent être liées à :

- une forte augmentation de la lipolyse adipocytaire par action de la LpL,
- une augmentation de la synthèse *de novo* des acides gras par la lipogenèse,
- une réduction de la β -oxydation des acides gras (Postic, C. and Girard, J., 2008).

Le substrat indispensable de la lipogenèse est le citrate, issu du cycle de Krebs dans la mitochondrie qui, une fois sorti de la mitochondrie, subit un clivage par l'enzyme *ATP citrate lyase* (ACL), relargant d'une part une molécule d'acétyl-CoA et d'autre part une molécule d'oxaloacétate. La molécule d'acétyl-CoA subit l'action de plusieurs enzymes telles que l'*acétyl-CoA carboxylase* (ACC) qui transforme l'acétyl-CoA en malonyl-CoA, lui-même transformé en palmitoyl-CoA par l'enzyme *fatty acid synthase* (FAS) puis en palmitoleyl-CoA par l'enzyme *stearoyl CoA desaturase* (SCD). Les différents acyl-CoA ainsi formés sont ensuite estérifiés avec une molécule de glycérol dont le processus est assuré par l'enzyme glycérophosphate acyltransférase (GPAT) (figure 10).

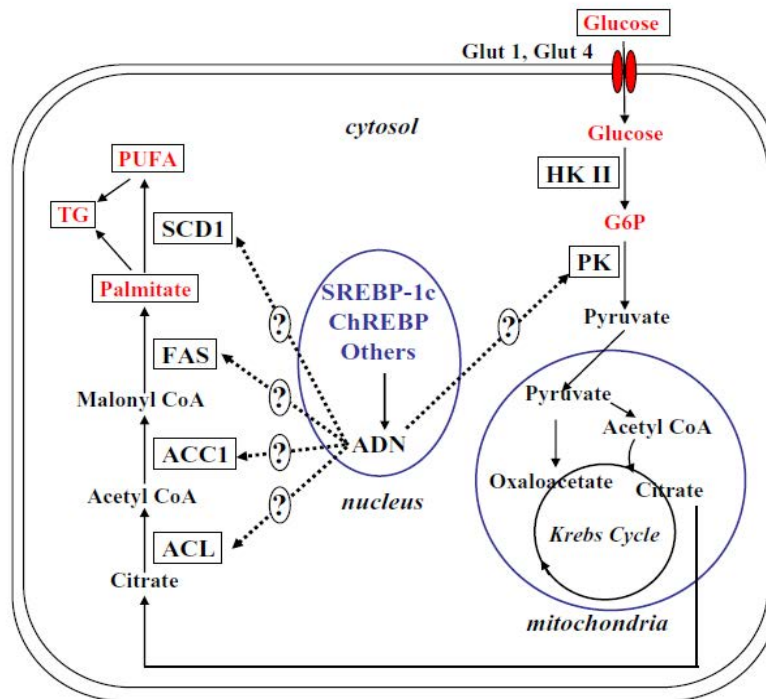


Figure 10: Voie métabolique de la lipogenèse et paramètres régulateurs d'après Large *et al.*, 2004

3) Régulation de la lipogenèse

L'accumulation de lipides est déterminée par l'équilibre entre la synthèse lipidique (lipogenèse) et la dégradation lipidique (lipolyse ou oxydation des acides gras).

Elle peut être régulée par de multiples facteurs divisés en 3 groupes :

- les facteurs nutritionnels,
- les facteurs hormonaux,
- les facteurs transcriptionnels.

a. Les facteurs nutritionnels régulant la lipogenèse

L'activité de cette lipogenèse est fortement dépendante des conditions nutritives et il a été démontré que la transcription des enzymes impliquées dans la lipogenèse nécessitait la présence de glucose et d'insuline pour être pleinement induite (Puigserver, P., *et al.*, 2003). Les conditions associées à une forte lipogenèse telles qu'une alimentation pauvre en graisse et riche en glucides, une hyperglycémie ou une hyperinsulinémie, sont associées à une

modification du métabolisme cellulaire, allant de l'oxydation lipidique à l'estérification des TG.

Les acides gras poly insaturés ont la capacité de diminuer la lipogenèse à travers la suppression de l'expression de certains gènes hépatiques tels que les gènes impliqués dans la synthèse des acides gras, *spot14* et *stearyl-CoA desaturase* (SCD) (Jump, D. B., *et al.*, 1994). Inversement, une alimentation hyperglucidique provoque la stimulation de la lipogenèse hépatique et adipeuse. Les taux de TG plasmatiques sont donc plus élevés lors d'une lipogenèse activée. Les périodes de jeun réduisent la lipogenèse dans le tissu adipeux, ce qui, combiné avec une augmentation du taux de lipolyse, mène à une perte importante des TG adipocytaires. Les acides gras venant du tissu adipeux affluent massivement au foie et augmentent la synthèse de TG hépatiques, aboutissant à une légère stéatose hépatique (Kersten, S., *et al.*, 1999).

Le glucose étant un substrat essentiel pour la synthèse hépatocytaire des acides gras, la prise alimentaire régule cet apport en glucose et de ce fait influence la lipogenèse. De plus, le glucose induit l'expression des gènes lipogéniques, stimule le relargage d'insuline et inhibe celui du glucagon du pancréas.

b. Régulation hormonale de la lipogenèse

Lors d'une période de jeûne, des modifications hormonales sont observées au niveau plasmatique (diminution des taux d'insuline et de leptine, augmentation du glucagon et des facteurs de croissance). L'insuline est largement connue pour augmenter la capture de glucose au niveau du tissu adipeux en recrutant les transporteurs de glucose à la membrane. Elle apparaît être certainement le facteur hormonal ayant le plus d'impact sur la lipogenèse. De plus, l'insuline influence la transcription de SREBP-1 ayant pour conséquence l'induction de l'expression et de l'activité de la glucokinase. Cette induction a pour effet l'augmentation de la concentration des métabolites du glucose qui sont supposés influencer les effets du glucose sur l'expression des gènes lipogéniques (Foretz, M., *et al.*, 1999).

Les hormones de croissance (GH) sont aussi considérées comme des facteurs importants influençant la lipogenèse puisqu'elles ont été montrées comme diminuant la lipogenèse dans le tissu adipeux, qui mène à une perte de poids significative accompagnée d'un gain de masse musculaire (Etherton, T. D., 2000). Cette implication peut être liée à l'interférence avec les voies de signalisation de l'insuline réduisant la sensibilité à l'insuline

qui résulte en une diminution de l'expression de FAS dans le tissu adipeux (Yin, D., *et al.*, 1998). De plus, la GH permet la phosphorylation des facteurs de transcription Stat5a et Stat5b, impliqués dans l'accumulation de lipides dans le tissu adipeux (Teglund, S., *et al.*, 1998).

La leptine semble être une autre hormone impliquée dans la lipogenèse car, au-delà de son action sur la prise alimentaire, elle limite le stockage lipidique en stimulant le relargage du glycérol des adipocytes (Siegrist-Kaiser, C. A., *et al.*, 1997). De plus, la leptine diminue l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des acides gras et des triglycérides, tels que SREPB-1 (Kakuma, T., *et al.*, 2000, Kim, J. B., *et al.*, 1998, Soukas, A., *et al.*, 2000).

c. Régulation transcriptionnelle de la lipogenèse

Les facteurs de transcription SREBP sont fortement impliqués dans la régulation de l'expression des gènes en relation avec le métabolisme du cholestérol et des triglycérides (Briggs, M. R., *et al.*, 1993, Dentin, R., *et al.*, 2005, Wang, X., *et al.*, 1993). Ces facteurs de transcription se divisent en 3 groupes : SREBP-2, SREBP-1a et SREBP-1c. SREBP-1a et SREBP-1c sont produits à partir d'un seul gène et ne diffèrent que d'un seul exon, SREBP-1c étant le facteur le plus important physiologiquement (Horton, J. D., *et al.*, 2002).

Les taux de cholestérol libre cellulaire sont positivement corrélés à la présence des précurseurs immatures de SREBP-2. Lors d'un déclin de cholestérol libre cellulaire, la forme immature est clivée et un fragment mature est relargué et acheminé vers le noyau, stimulant l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol tels que LDLr, *farnesyl pyrophosphate synthase* et *HMG-CoA reductase*.

Lors d'une surexpression de SREBP-1a ou SREBP-1c hépatique, une augmentation de l'expression des gènes lipogéniques et du taux de TG hépatique a été révélée par Horton et Shimomura en 1999 (Horton, J. D. and Shimomura, I., 1999). Lorsque le clivage de SREBP-1 est empêché, les résultats montrent une diminution de l'expression des ARNm de FAS, *insulin-induced gene* (Insig 1) et SCD sans changement au niveau des ARNm de ACC et ACL (Horton, J. D. and Shimomura, I., 1999).

De nombreuses études tendent à montrer que le glucose et l'insuline ont un impact important sur l'expression des gènes lipogéniques à travers plusieurs mécanismes influençant l'action de SREBP-1. Tout d'abord, l'insuline est connue pour stimuler l'expression de l'ARNm de SREBP-1 dans les adipocytes (Kim, J. B., *et al.*, 1998) et les hépatocytes (Foretz,

M., *et al.*, 1999). De plus, l'insuline augmente l'activation transcriptionnelle de SREBP-1 à travers la cascade de phosphorylations des voies de signalisation de MAP kinase (Roth, G., *et al.*, 2000).

Cependant, certains facteurs peuvent réguler négativement l'expression des gènes lipogéniques tels que les acides gras poly-insaturés par l'inhibition de l'expression de l'ARNm de SREBP-1 (Kim, H. J., *et al.*, 1999) ainsi que par l'inhibition du clivage du précurseur de SREBP-1 (Takeuchi, Y., *et al.*, 2010).

Au niveau du tissu adipeux, le facteur de transcription PPAR γ activé par les acides gras et les dérivés éicosanoïdes est impliqué dans la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes matures. PPAR γ est un facteur de transcription connu pour réguler l'expression de certains gènes dans le tissu adipeux incluant FABP adipocytaire, LpL, et FATP. Cependant, l'expression de PPAR γ est stimulée par l'insuline et SREBP-1, cela suggère donc que son action n'est pas seulement adipogénique mais aussi lipogénique (Kersten 2001).

En conclusion, de nombreuses études se sont intéressées à la régulation nutritionnelle ou hormonale de la lipogenèse. Il semblerait qu'un réseau de facteurs transcriptionnels utilisant SREBP-1 soit impliqué dans le contrôle de la lipogenèse à travers le rôle régulateur de l'alimentation et des hormones au niveau du foie. Toutefois, le facteur de transcription PPAR γ , présent principalement dans le tissu adipeux, semble critique pour la régulation de l'adipogenèse et la lipogenèse. Le rôle que SREBP-1 pourrait jouer au niveau du tissu adipeux reste encore à définir (figure 11).

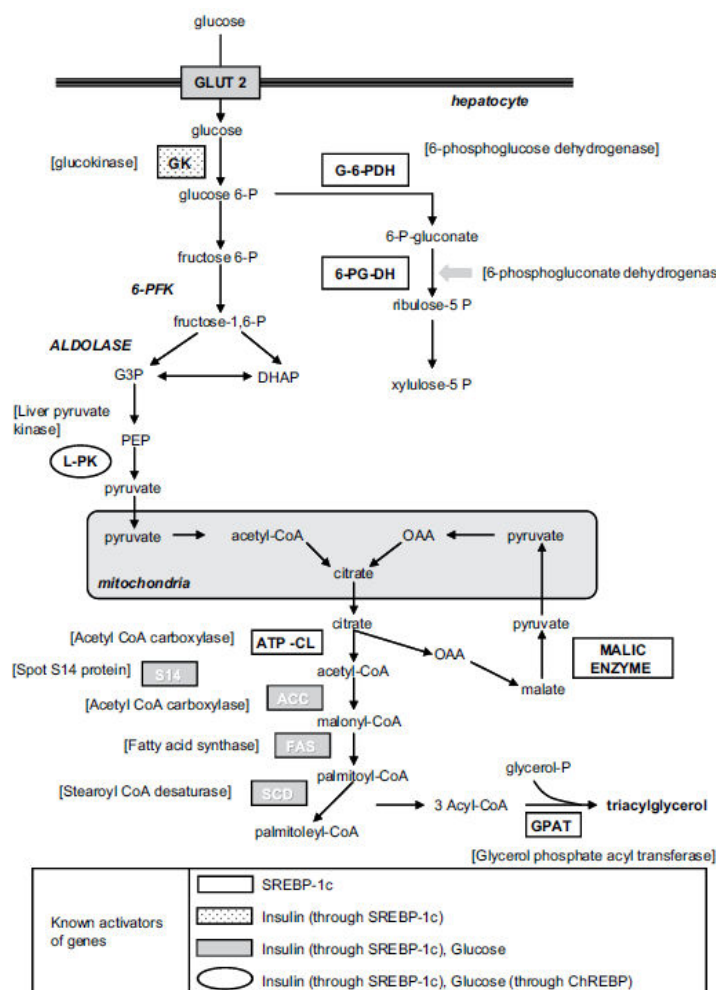


Figure 11: Schéma général des éléments régulateurs de la lipogenèse d'après Tessari, P., et al., 2009

2. La lipolyse

1) Rôle de la lipolyse

La lipolyse correspond à l'hydrolyse enzymatique des triglycérides sous l'action des lipases, aboutissant à la formation de 3 acides gras libres et une molécule de glycérol.

a. Lipolyse adipocytaire

Elle a pour objectif la libération des acides gras, substrats essentiels à la dépense énergétique. L'enzyme limitante de cette lipolyse est l'*Hormone sensitive lipase* (HSL ; E.C. 3.1.1.3) répondant à l'insuline, aux catécholamines et intensément régulée par phosphorylations

réversibles (figure 12). La cascade lipolytique qui est entraînée par la suite implique l'action des catécholamines, des endocrines et/ou paracrines régulatrices de la lipolyse et leur liaison aux récepteurs plasmiques membranaires. Les catécholamines sont certainement les régulateurs de la lipolyse les plus sophistiqués puisqu'ils utilisent des récepteurs adrénergiques (AR) bien distincts (Lafontan, M. and Berlan, M., 1993). Trois sous-unités β -AR (β_1 , β_2 et β_3) sont positivement couplées avec l'*adénylyl cyclase* (AC) par la stimulation du complexe de la protéine G (Gs) et activent la lipolyse. En revanche, la sous-unité α_2 -AR est négativement couplée à l'enzyme HSL par l'inhibition du Gs et inhibe la lipolyse. La stimulation de l'*adénylyl cyclase* mène à une accumulation d'AMP cyclique (AMPC) intracellulaire qui permet l'activation de la protéine kinase A (PKA) ce qui active HSL et donc la lipolyse des TG en DAG puis en MAG (Karlsson, M., *et al.*, 2000). Les MAG sont ensuite hydrolysés en acides gras libres et en glycérol par une lipase mono-acylglycérol non spécifique qui est présente en abondance et non régulée par les hormones. Les taux d'AMPC, et donc la lipolyse, peuvent aussi être régulées par l'enzyme phosphodiesterase III (PDE-3) qui clive l'AMPC en 5'AMPC (Degerman, E., *et al.*, 1997).

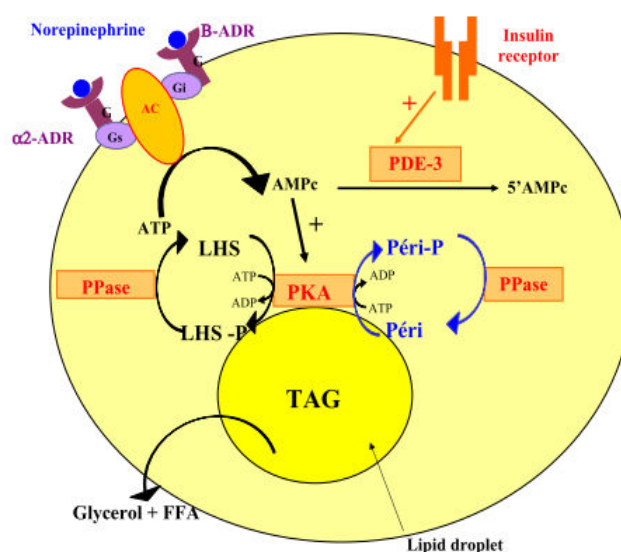


Figure 12: Fonctionnement de la lipolyse adipocytaire d'après Large, V, *et al.*, 2004

b. Lipolyse hépatique et musculaire

La lipolyse peut aussi avoir lieu dans d'autres tissus tels que le muscle et le foie dans lesquels une plus faible quantité d'acides gras est stockée, dans le but d'apporter l'énergie

nécessaire aux cellules du tissu en question. Les acides gras et le glycérol libérés sous l'action de la LpL sont ensuite relargués dans la circulation sanguine, où le glycérol hydrosoluble pourra se déplacer librement contrairement aux acides gras, liposolubles, nécessitant une liaison à l'albumine, protéine relarguée par le foie, afin de se déplacer (van der Vusse, G. J., 2009).

2) Transport des acides gras et absorption par les tissus

Les acides gras, transportés par l'albumine, sont apportés aux cellules mais ne peuvent pas traverser la membrane plasmatique par diffusion, c'est pourquoi un système d'internalisation est indispensable. Au niveau du tissu adipeux, il semblerait qu'un transport passif par un système de flip-flop soit présent ainsi qu'un transport de protéine spécifique. Plusieurs transporteurs coexistent tels que la protéine CD36 (Abumrad, N. A., *et al.*, 1993), la *fatty acid transport protein* (FATP) (Schaffer, J. E. and Lodish, H. F., 1994) ainsi que la *fatty acid binding protein plasma membrane* (FABPpm) (Isola, L. M., *et al.*, 1995). FATP et CD36 sont des transporteurs inter-membranaires alors que FABPpm est un ligand d'acides gras se trouvant en périphérie de la membrane (figure 13). De nombreuses études suggèrent que les dysfonctionnements de transport d'acides gras peuvent jouer un rôle important dans l'apparition de maladies telles que la résistance à l'insuline, le diabète et l'obésité, causées par le manque de relocalisation à la membrane des transporteurs CD36 et FATP (Luiken, J. J., *et al.*, 2001, Wu, Q., *et al.*, 2006). Une fois internalisés, les lipides sont pris en charge par une protéine appelée *Lipid Binding Protein* (LBP). Lorsqu'elle se trouve dans les adipocytes, cette protéine est appelée *Adipocytes Lipid Binding Protein* (ALBP ou aP2). Cependant, chez les humains, un autre type de LBP existe en moindre proportion, présente dans d'autres types cellulaires que le tissu adipeux et appelé *Keratinocyte Lipid Binding Protein* (KLBP) (Schwenk, R. W., *et al.*, 2010).

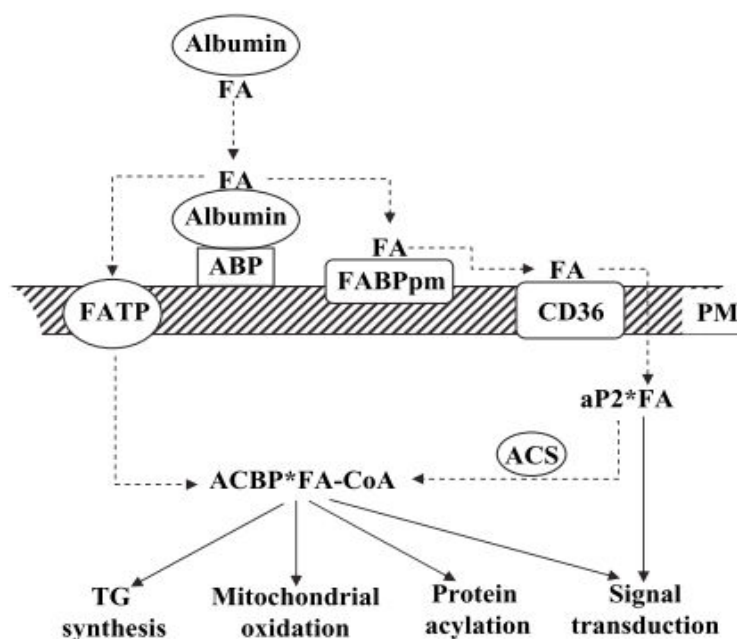


Figure 13: Prise en charge des acides gras lors de leur internalisation dans les membranes cellulaires d'après Large *et al.*, 2004

Le devenir des acides gras dans les cellules dépend ensuite du tissu et de l'état nutritionnel. Dans le tissu adipeux par exemple, la plupart des acides gras sont réestérifiés en triglycérides pour être stockés, alors que dans le muscle squelettique, ils entrent dans un pool de triglycérides pour un stockage transitoire, destiné ensuite à la β -oxydation mitochondriale qui fournira de l'énergie.

En absence de lipogenèse, ils seront transformés par une des voies suivantes :

- La β -oxydation : ce processus se déroule dans la mitochondrie, où l'association des acides gras avec un coenzyme A permet, sous l'action de plusieurs enzymes, la production d'Acétyl-Coenzyme A (Acétyl-CoA) (figure 14). Cet Acétyl-CoA ainsi produit sera intégré au cycle de l'acide citrique (aussi appelé cycle de Krebs en hommage à Sir Hans A Krebs, prix Nobel 1953) qui, en présence d'oxygène, permettra de fournir du CO_2 et de l'énergie sous forme d'ATP (Kawamoto, S., *et al.*, 1978).

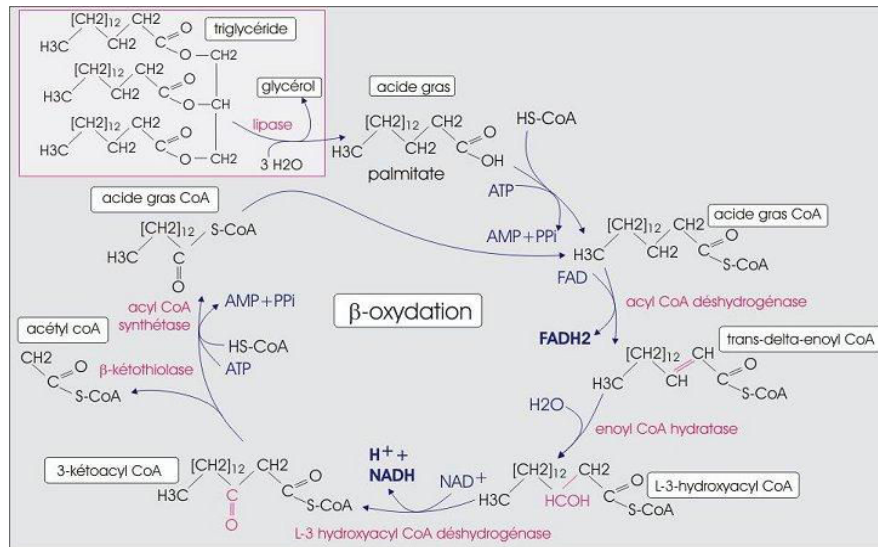


Figure 14: Représentation de la bêta-oxydation des acides gras

- La cétogenèse : lors d'un jeûne prolongé (environ 18h), le cycle de Krebs ne fonctionne plus en tant qu'utilisateur d'acétyl-CoA mais est détourné pour produire du glucose par la néoglucogénèse. La β -oxydation des acides gras, uniques substrats énergétiques du foie, provoque alors l'accumulation de l'acétyl-CoA dans les cellules hépatiques. L'acétyl-CoA est transformé en corps cétoniques, exportés dans le sang pour être utilisés comme substituts au glucose (cœur/cellules nerveuses). En excès, ils s'évacuent dans l'urine ou s'évaporent par les poumons en provoquant une haleine rance (Garber, A. J., *et al.*, 1974).

3) Hydrolyse des lipoprotéines

a. Hydrolyse des lipoprotéines grâce à de nombreuses molécules

Une fois sécrétées, les lipoprotéines circulantes vont subir une série de transformations intravasculaires. Certaines se produisent dans la lumière artérielle grâce à l'activité de plusieurs enzymes, principalement des lipases ainsi que le transfert de lipides via des protéines de transfert.

➤ La lipoprotéine lipase

Synthétisée par les cellules parenchymateuses, principalement par les adipocytes et les myocytes, la lipoprotéine lipase (LpL) se fixe aux héparane sulfate protéoglycanes (HSPG) à la surface des cellules endothéliales des tissus sous forme d'homodimère et hydrolyse les TG des chylomicrons et des VLDL en acides gras libres et glycérol, en clivant les liaisons esters des TG (Montalto, M. B. and Bensadoun, A., 1993).

L'ApoCII, activateur allostérique, est un co-facteur indispensable à l'activité de la LpL. Elle permet, lorsque la LpL se lie à l'ApoCII des chylomicrons ou VLDL, de libérer le site hydrolytique de l'enzyme (Shachter, N. S., *et al.*, 1994). En revanche, l'ApoCIII est un inhibiteur de la LpL (Ebara, T., *et al.*, 1997). De plus, de récentes études ont montré que l'ApoAV facilitait la liaison de la LpL aux HSPG et leur interaction avec les lipoprotéines (Vaessen, S. F., *et al.*, 2009).

➤ La lipase hépatique

De structure et de fonction proche de la LpL, l'*hepatic lipase* (HL) est synthétisée uniquement par les hépatocytes et se fixe aussi aux HSPG à la surface des cellules endothéliales du foie et de l'espace de Disse. Elle agit principalement comme phospholipase mais elle permet aussi d'hydrolyser les TG issus des lipoprotéines riches en TG (chylomicrons ou VLDL) (Yasuda, T., *et al.*, 2010). Contrairement à la LpL, elle agit sous forme de monomère et n'a besoin d'aucun co-facteur (Dallinga-Thie, G. M., *et al.*, 2010). De plus, elle transforme les IDL, issus de l'hydrolyse des VLDL, en LDL ainsi que les HDL₂ en HDL₃.

➤ La *cholesteryl ester transfer protein*

La lipolyse des lipoprotéines par les lipases, au niveau de la lumière artérielle, induit un excès de composants de surface (phospholipides, cholestérol libre, apolipoprotéines) et un appauvrissement en TG du noyau hydrophobe. Des protéines interviennent alors pour remodeler la lipoprotéine, en assurant le transfert de lipides entre particules, comme le fait la CETP (Dallinga-Thie, G. M., *et al.*, 2010).

La *cholesteryl ester transfer protein* (CETP) est une glycoprotéine plasmatique synthétisée principalement dans le foie, le tissu adipeux et la rate. Son rôle est de permettre l'échange de cholestérol estérifié et de TG entre les HDL et les lipoprotéines riches en TG générant un flux de cholestérol estérifié des HDL vers les VLDL. Son activité est modulée par

le contenu en apolipoprotéines des HDL. Elle assure quotidiennement 50% des transferts lipidiques plasmatiques entre les différents types de lipoprotéines chez l'Homme. Son expression est induite par les prises alimentaires, dont l'activité est corrélée positivement avec le transport du cholestérol par les lipoprotéines riches en ApoB.

➤ *La phospholipid transfer protein*

La phospholipid transfer protein (PLTP) permet le transfert des phospholipides vers les HDL (Yazdanyar, A., *et al.*, 2011).

➤ *La lecithin-cholesterol acyltransferase*

La lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) estérifie le cholestérol capté à partir des membranes cellulaires des tissus périphériques pour enrichir le cœur des particules HDL. C'est pourquoi, en permettant la maturation des HDL, elle joue un rôle majeur dans le transport inverse du cholestérol (Tanigawa, H., *et al.*, 2009).

b. Recapture des lipoprotéines

Les lipoprotéines peuvent être captées par une série de récepteurs, spécifiques ou non, qui permettent leur internalisation au niveau des tissus périphériques (HDL et LDL) ou du foie (chylomicrons, VLDL, LDL).

D'après d'anciennes études (Lee, S. J., *et al.*, 2004, Martins, I. J., *et al.*, 2000), il a été démontré que les résidus de chylomicrons sont capturés par le foie grâce à la liaison de l'ApoE des résidus avec LRP ou LDLr. Une fois fixés sur ces récepteurs, les résidus sont internalisés par endocytose et dégradés par l'hépatocyte. D'après ces études, l'ApoB des résidus n'a aucun rôle dans cette internalisation puisqu'elle n'interagit pas avec les récepteurs LRP ou LDLr. Cependant, nous avons vu qu'il existe un autre récepteur aux lipoprotéines riches en TG qui joue un rôle primordial dans la captation des chylomicrons, le *lipolysis stimulated lipoprotein receptor* (LSR) (Yen, F. T., *et al.*, 1994).

Concernant les VLDL, après leur sécrétion par le foie et leur distribution aux organes périphériques, une grande partie sera transformée en LDL. Cependant, les VLDL restantes seront recapturées à nouveau par le foie par la liaison de l'ApoE aux LRP ou LDLr (figure 15).

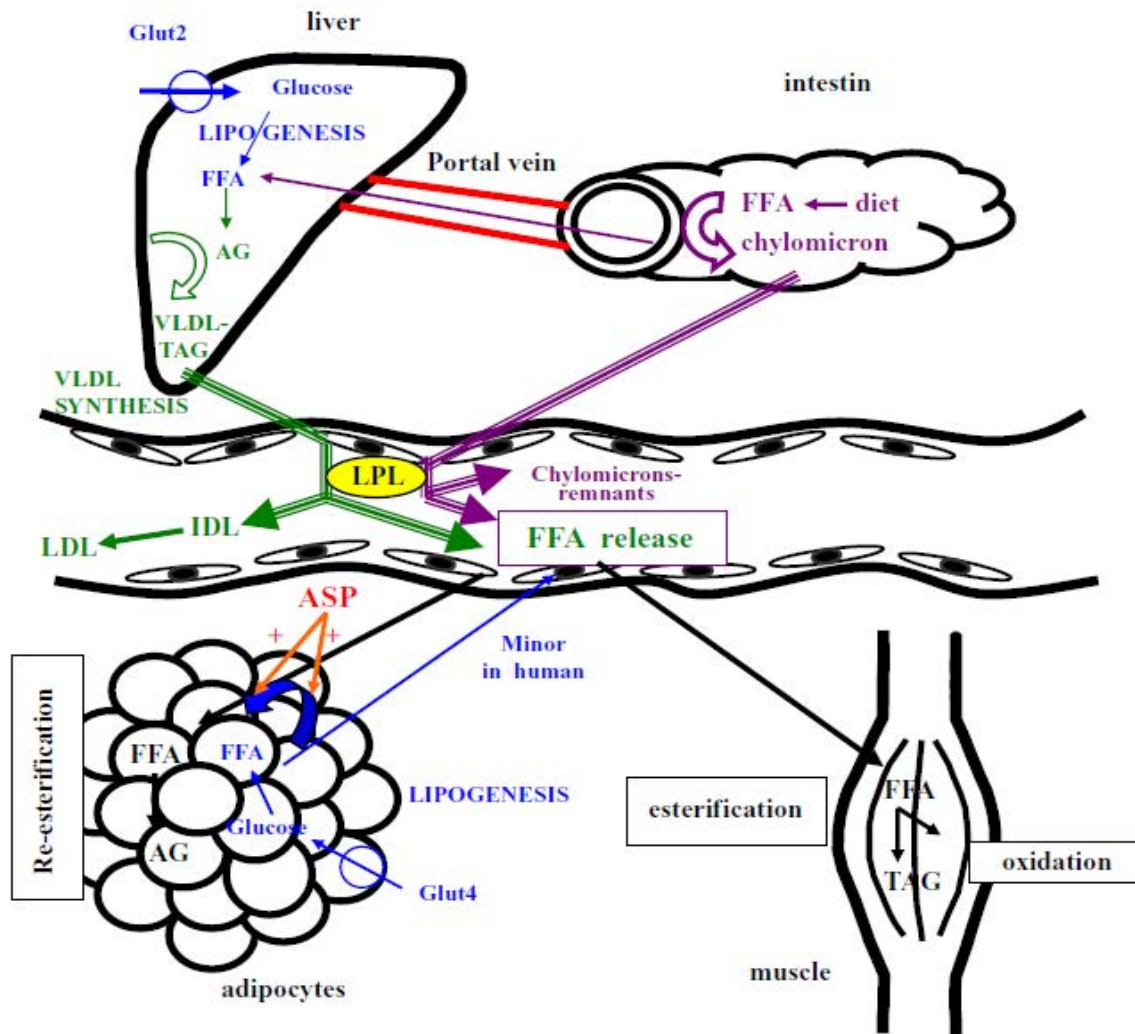


Figure 15: Distribution des lipides après un repas d'après Large et al., 2004

4) Régulation de la lipolyse

En absence de toute stimulation ou inhibition de la lipolyse (par exemple en condition *in vitro*), une activité lipolytique basale est mesurée, de l'ordre de 0,3 à 1,0 mmol de glycérol/h/g de tissu graisseux (Arner, P., 1988). Cette activité basale est en revanche indétectable *in vivo*, passant pour un bruit de fond.

Cependant, la régulation de la lipolyse est essentielle afin d'assurer un transport adéquat des lipides vers les tissus utilisant les acides gras et assurer un équilibre entre le stockage et l'utilisation de ces lipides.

a. Stimulation de la lipolyse

Plusieurs catécholamines (adrénaline, noradrénaline et dopamine), qui sont des neurotransmetteurs et des hormones issues du système sympathique, sont capables de stimuler la lipolyse en modulant les trois sous-unités β -AR qui sont impliquées dans l'activation de la cascade lipolytique (Enocksson, S., *et al.*, 1995). *In vivo*, la sous-unité β_2 -AR est la principale forme impliquée dans cette stimulation chez les sujets en bonne santé (Hansen, O., *et al.*, 1990). Les catécholamines ne stimulent pas la lipolyse uniquement par le biais du complexe de la protéine G mais aussi en activant les voies de signalisation de ERK qui permettent la phosphorylation et donc l'activation de HSL (Greenberg, A. S., *et al.*, 2001). D'autres hormones telles que la *thyroid stimulating hormone* (TSH), le glucagon et la cholécystokinine sont impliquées d'une manière moins importante dans la stimulation de la lipolyse, à travers la modulation du complexe de la protéine G. De plus, de nombreuses hormones favorisent l'action des catécholamines, telles que les glucocorticoïdes, l'hormone de croissance, l'hormone thyroïde et les stéroïdes (Carlson, M. G., *et al.*, 1993, Marcus, C., *et al.*, 1988).

La cytokine *tumor necrosis factor α* (TNF α) mais aussi l'interleukine 1 (IL-1) et l'interféron α , β ou γ , présents dans les adipocytes humains, sont aussi connus pour stimuler la lipolyse en tant que facteurs paracrines *in vivo* mais aussi dans les cultures primaires de pré-adipocytes ou lors de traitement de cellules 3T3-F442A (Feingold, K. R., *et al.*, 1992).

De plus, il semblerait que le glucose soit aussi impliqué dans la stimulation de la lipolyse par la régulation de l'ARNm de HSL ainsi que par la régulation de l'activité de HSL qui serait réduite lors de l'incubation de cellules 3T3 en milieu pauvre en glucose (McIntosh, C. H., *et al.*, 1999).

b. Inhibition de la lipolyse

D'après de nombreuses études, il a été montré que l'insuline est l'hormone anti-lipolytique la plus importante de tous les tissus effectuant la lipolyse (Coppack, S. W., *et al.*, 1989). En effet, une fois fixé à son propre récepteur, le complexe insulino-récepteur engendre une cascade de phosphorylations débutant par l'autophosphorylation du récepteur insuline sur ses résidus tyrosine. Puis, une cascade de phosphorylation aboutit à la stimulation de PDE-3 nécessaire au processus de transformation de l'AMPc en 5'AMP, réduisant le pool d'AMPc nécessaire à la phosphorylation de HSL (Burns, T. W., *et al.*, 1979). La déphosphorylation de HSL peut aussi avoir lieu via l'insuline à travers l'activation d'une protéine phosphatase

(Wood, S. L., *et al.*, 1993). De plus, l'insuline stimule l'absorption du glucose dans les cellules, favorisant l'absorption des acides gras libres via l'action de la lipoprotéine lipase (LpL), ce qui a pour conséquence l'inhibition de la lipolyse ainsi que l'activation de la voie de synthèse *de novo* des TG. Cependant, le système de récepteurs à l'insuline incluant le mécanisme d'inhibition de la lipolyse n'est pas bien maîtrisé.

Une autre inhibition de la lipolyse vient de l'action des sous-unités α_2 -AR sur le complexe protéine G, principalement lorsque les taux de noradrénaline plasmatiques sont élevés. Cependant, la stimulation de la lipolyse par les sous-unités β -AR est toujours dominante par rapport à l'inhibition des sous-unités α_2 -AR (Stich, V., *et al.*, 2003).

L'inhibition de la lipolyse peut aussi être induite par l'*Insulin like growth factor-1* (IGF-1) à travers les voies de signalisation PIK-3/PDE-3 (Boulware, S. D., *et al.*, 1992).

D'autres molécules semblent inhiber la lipolyse telle que les prostaglandines E1 et E2 ainsi que le neuropeptide Y et le peptide YY qui inhibent tous l'*adénylyl cyclase* par un mécanisme identique à celui des sous-unités α_2 -AR (Richelsen, B., *et al.*, 1984, Valet, P., *et al.*, 1990).

III. LA LEPTINE

1. Découverte de la leptine

La présence d'une molécule pouvant être liée directement à l'obésité a été découverte lors de l'étude de souris *ob/ob*, modèle murin d'obésité. Ces souris développent une mutation homozygote du gène à la leptine résultant en une déficience complète en leptine qui se manifeste par une hyperphagie, une obésité extrême, un diabète, des anomalies neuroendocriniennes et une infertilité (figure 16). Le gène *ob* a pu être cloné en 1994 par la méthode de clonage positionnel définissant le gène humain composé de 167 acides aminés (Zhang, Y., *et al.*, 1994). La leptine, codée par le gène *ob*, détectée à 16-kDa, a été identifiée en 1995 par une étude qui a montré qu'elle agissait en tant que signal hormonal de régulation de l'équilibre énergétique (Campfield, L. A., *et al.*, 1995). Cette protéine a été appelée « leptine » en référence au mot grecque «leptos» signifiant mince (Friedman, J. M., 2011).

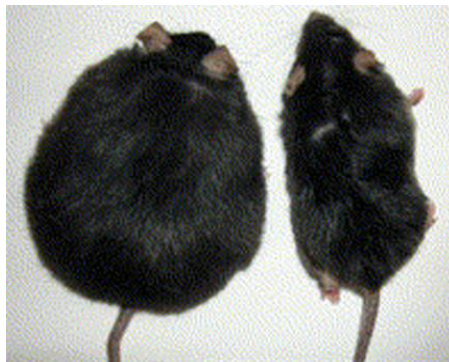


Figure 16: Souris *ob/ob* et souris sauvage au même âge et sous régimes identiques

2. Biologie de la leptine

La leptine est sécrétée par le tissu adipeux dans la circulation sanguine et la quantité sécrétée est fortement corrélée avec la masse grasse (Considine, R. V., *et al.*, 1996). Les taux circulants de leptine dans le sang reflètent d'une part l'importance de la masse adipeuse et d'autre part les changements aigus de prise alimentaire.

1) Le récepteur à la leptine

La structure de la leptine est similaire à celle d'une cytokine dont les récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs de classe I, qui inclut gp-130, le récepteur commun au signal de transcription de IL-6, de la famille des cytokines (Baumann, H., *et al.*, 1996, Tartaglia, L. A., *et al.*, 1995). Six isoformes du récepteur à la leptine ont été identifiées chez l'Homme, appelées Ob-R isoforme a à f, se distinguant par des tailles différentes de la partie C-terminal. Deux isoformes ont été retrouvées uniquement dans une espèce, Ob-Rd chez les souris et Ob-Rf chez les rats (Chua, S. C., Jr., *et al.*, 1997). Chez l'Homme, seules les expressions d'ARNm de Ob-Ra, Ob-Rb et Ob-Rc ont été détectées. Ob-Re est une isoforme soluble du récepteur à la leptine à laquelle il manque le domaine cytoplasmique et transmembranaire. Or, chez l'Homme, les transcrits correspondant à Ob-Re n'ont pas été détectés mais un récepteur à la leptine soluble peut être généré par clivage protéique de Ob-Ra et Ob-Rb (Ge, H., *et al.*, 2002). Les deux formes les plus représentées chez toutes les espèces sont Ob-Ra et Ob-Rb, le plus abondant étant Ob-Rb. Ces isoformes sont détectées au niveau du cerveau et au niveau de certains organes périphériques (Bjorbaek, C. and Kahn, B. B., 2004, Scott, M. M., *et al.*, 2009). L'isoforme Ob-Ra, la forme courte du récepteur à la leptine, joue un rôle important dans le passage de la leptine à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE), barrière physique permettant la régulation du flux de molécules entre le sang et le liquide céphalorachidien (LCR) (Bjorbaek, C., *et al.*, 1998). En effet, plusieurs résultats confirment cette hypothèse. Tout d'abord, la leptine a été montrée comme liant les microvésicules cérébrales humaines, où l'on retrouve un taux élevé d'ARNm de Ob-Ra (Golden, P. L., *et al.*, 1997). De plus, il a été établi que la leptine entrait dans le cerveau par un mécanisme spécifique et saturable (Banks, W. A., *et al.*, 1996). Pour finir, d'autres résultats montrent que Ob-Ra est capable de transporter la leptine intacte à travers des cellules épithéliales polarisées *in vitro* (Hileman, S. M., *et al.*, 2000).

D'autre part, des taux importants de ARNm de Ob-Ra ont été détectés au niveau des organes périphériques tels que les poumons, les reins, ainsi qu'en plus faible quantité dans le cœur, le foie et le tissu adipeux (Fei, H., *et al.*, 1997, Ghilardi, N. and Skoda, R. C., 1997, Hoggard, N., *et al.*, 1997, Lee, G. H., *et al.*, 1996, Tartaglia, L. A., *et al.*, 1995). Bien que la capacité de signalisation de Ob-Ra soit bien définie dans le système cellulaire (Bjorbaek, C., *et al.*, 1997, Murakami, T., *et al.*, 1997), sa fonction dans le système périphérique reste à éclaircir.

L'isoforme Ob-Rb, aussi appelée la forme longue du récepteur à la leptine, permet la transmission du signal par son interaction directe avec la leptine. Son ARNm est fortement exprimé dans l'hypothalamus, site important dans la régulation de l'homéostasie énergétique et des fonctions neuroendocriniennes (Elmqvist, J. K., *et al.*, 1998, Fei, H., *et al.*, 1997) ainsi que dans tous les types de cellules immunitaires (Gorska, E., *et al.*, 2010) et dans les cellules de Purkinje au niveau du cervelet. L'ARNm de Ob-Rb a été aussi retrouvé aux mêmes sites périphériques que l'ARNm de Ob-Ra en quantité moins importante (Chen, S. C., *et al.*, 1999, Hoggard, N., *et al.*, 1997, Kielar, D., *et al.*, 1998) et pendant de longues années, la protéine Ob-Rb n'a pu être détectée dans les tissus périphériques (du fait de sa très faible expression dans le système périphérique), laissant penser à une absence d'action périphérique de la leptine (Bjorbaek, C., *et al.*, 1997, da Silva, B. A., *et al.*, 1998, Uotani, S., *et al.*, 1999).

2) Voies de signalisation de la leptine

La fixation de la leptine sur son récepteur Ob-Rb entraîne une cascade de signalisation impliquant la voie *Janus Kinase-Signal Transducer et Activator of Transcription* (JAK-STAT), importante dans la régulation de l'homéostasie énergétique (Bates, S. H. and Myers, M. G., Jr., 2003) ainsi que *Phosphatidylinositol 3-Kinase* (PI3K) impliquée dans la régulation de la prise alimentaire et de l'homéostasie du glucose (Niswender, K. D., *et al.*, 2001) (figure 17). Bien que STAT3, STAT5 et ERK soient les sites de phosphorylation spécifique de Ob-Rb (figure 17), il existe d'autres voies de signalisation impliquées dans la transduction du signal de la leptine telles que les voies incluant *Mitogen-activated Protein Kinase* (MAPK), *5'Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase* (AMPK) et *Mammalian Target of Rapamycin* (mTOR) (Robertson, S. A., *et al.*, 2008). Aussi, les signalisations incluent l'activation de PI3K et mTOR ainsi que l'inhibition d'AMPK.

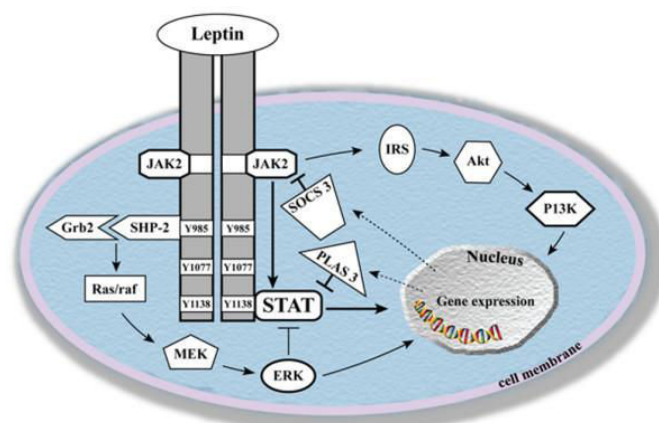


Figure 17: Voie de signalisation de la leptine impliquant la voie JAK/STAT d'après (Bernotiene, E., et al., 2006)

La voie PI3K / AKT / mTOR est une voie de signalisation intracellulaire jouant un rôle clef dans l'homéostasie cellulaire par sa fonction de régulation de l'apoptose, de la croissance du cycle cellulaire, ainsi que de l'angiogenèse. mTOR est un composé central dans la signalisation cellulaire impliqué dans la croissance cellulaire, la traduction des ARNm, et le métabolisme en général. Son rôle dans le contrôle de la prise alimentaire a été largement démontré dans la signalisation de la leptine au niveau de l'hypothalamus ainsi que son rôle de régulateur du métabolisme lipidique et de l'inflammation au niveau périphérique. La leptine induit l'activation de mTOR impliqué dans les physiopathologies de l'obésité telles que le diabète, les maladies cardiovasculaires et les cancers.

Les adipocytes matures produisent et sécrètent la leptine par un mécanisme dépendant de l'activation de mTOR (figure 18). La voie d'activation de mTOR par la leptine dans l'hypothalamus mène à une réponse satiétale. La leptine active aussi les macrophages à travers une voie dépendant de mTOR ayant pour conséquence l'amélioration de la réponse immunitaire. La leptine peut aussi moduler l'activité de mTOR dans d'autres tissus tels que les adipocytes dans lesquels il pourrait y avoir un rétrocontrôle dû à la synthèse de leptine (figure 18). Les macrophages décrits dans cette figure ont été incubés avec Oil Red mettant en évidence les gouttelettes lipidiques en rouge après une stimulation par la leptine.

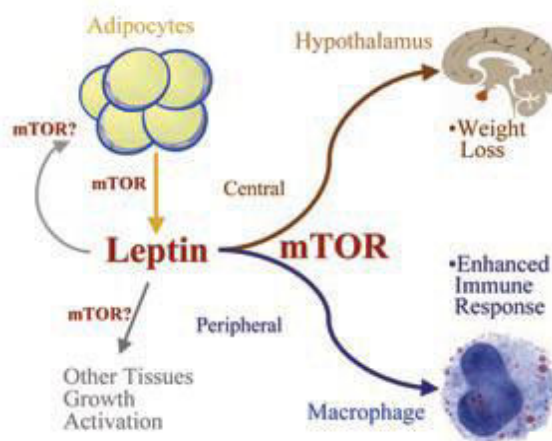


Figure 18: Interaction entre la leptine et mTOR d'après Maya Monteiro CM, Almeida PE, 2008

3) Leptinémie

Les taux plasmatiques ou sériques de leptine varient suivant le modèle animal, l'âge et le sexe. Le taux de leptine plasmatique chez l'homme de poids normal est de $7,5 \pm 9,3$ ng/mL alors qu'il est de $31,3 \pm 24,1$ ng/mL chez le sujet obèse. La leptinémie est plus élevée chez la femme et augmente proportionnellement avec son indice de masse corporelle (IMC) ($5,2 \pm 0,2$; $8,1 \pm 0,2$ et $13,2 \pm 0,4$ ng/mL pour les femmes ayant un IMC $\leq$ à $22,0$ kg/m², compris entre 22 et 25 kg/m² et $\geq$ à 25 kg/m² respectivement) et ces valeurs augmentent chez les sujets obèses quel que soit le sexe (Considine, R. V., *et al.*, 1996, Matsubara, M., *et al.*, 2002).

3. Rôle de la leptine

1) Implication dans l'homéostasie énergétique

Le rôle le plus connu de la leptine est sa capacité à réguler la prise alimentaire en agissant directement au niveau du système nerveux central. Lors d'une prise alimentaire, un pic de leptine plasmatique est observé en réponse à une sécrétion accrue par le tissu adipeux (Friedman, J. M., 2011, Robertson, S. A., *et al.*, 2008). Par sa fixation sur son récepteur Ob-Rb au niveau de l'hypothalamus, la leptine active des circuits neuronaux comprenant les neuropeptides anorexigènes (diminuant l'appétit) et inhibe ceux comprenant les neuropeptides orexigènes (stimulant l'appétit). L'hypothalamus n'est pas la seule structure cérébrale avec

laquelle la leptine interagit, le rôle de la leptine de régulateur de la prise alimentaire passe aussi par son interaction avec le système dopaminergique mésolimbique impliqué aussi dans le rôle de satiété (Robertson, S. A., *et al.*, 2008).

En plus d'un effet immédiat, la leptine peut aussi exercer un effet à plus long terme. En effet, lors de son administration durant une longue période, la leptine augmente le nombre de synapses des neurones sécrétant le neuropeptide anorexigène *Proopiomelanocortin* (POMC) et diminue le nombre de synapse sécrétant le neuropeptide orexigène *Neuropeptide Y* (NPY) au niveau du noyau arqué de l'hypothalamus (Pinto, S., *et al.*, 2004).

2) Implication dans la régulation du métabolisme lipidique

Les études tendent à prouver que la leptine serait impliquée dans la régulation du métabolisme lipidique mais cette fonction reste controversée. Elle serait impliquée dans la dépense énergétique (Haynes, W. G., *et al.*, 1997), par l'activation du système sympathique et de la thermogénèse du tissu adipeux. En effet, le contrôle rétroactif de la production de TG par les adipocytes n'a pu être en partie expliqué qu'à la découverte de l'action de la leptine dont la production et la sécrétion sont fortement influencées par la quantité de TG adipocytaires (Campfield, L. A., *et al.*, 1996, Caro, J. F., *et al.*, 1996, Houseknecht, K. L. and Portocarrero, C. P., 1998). La leptine serait aussi impliquée dans la lipolyse, principalement l'oxydation des acides gras dans le foie et d'autres tissus (Flier, J. S., 1997, Zhou, Y. T., *et al.*, 1997). En effet, l'induction d'une hyperleptinémie chez les rats par une simple injection d'un adénovirus recombinant contenant l'ADNc de leptine de rat sous le contrôle du promoteur du cytomégalovirus (CMV) révèle l'induction de la *uncoupling protein-2* (UCP-2), impliquée dans l'oxydation mitochondriale des acides gras. De plus, cette hyperleptinémie induite entraîne une augmentation d'expression des enzymes d'oxydation des acides gras telles que *acyl-CoA oxidase* et *carnitine palmitoyl transferase-1* (CPT-1) ainsi qu'une diminution du contenu en TG du foie, du muscle squelettique et pancréas sans modification des taux d'acide gras plasmatiques, suggérant une oxydation intracellulaire des TG (Shimabukuro, M., *et al.*, 1997).

De plus, au-delà de la stimulation de la lipolyse, la leptine a été montrée comme inhibant la lipogénèse (Bai, Y., *et al.*, 1996, Wang, M. Y., *et al.*, 1999). L'action de la leptine conduit à la diminution de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des TG et des acides gras (figure 19) certainement à travers la diminution d'expression du facteur de

transcription SREBP-1 (induisant l'expression des ARNm de FAS, *insulin-induced gene* (Insig 1) et SCD), démontrée principalement lors d'une analyse micro-array (Soukas, A., *et al.*, 2000).

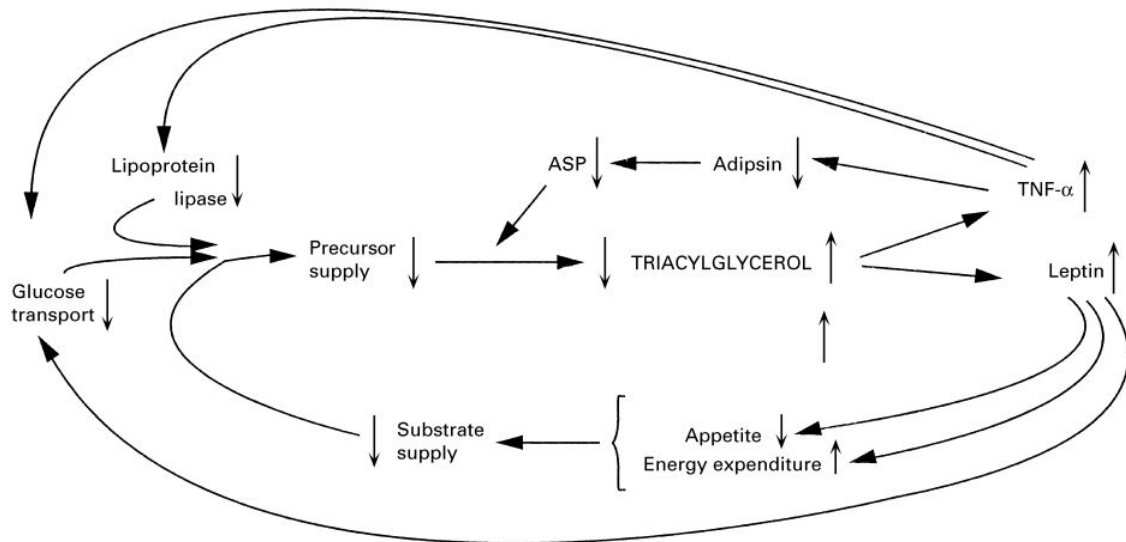


Figure 19: Mécanisme par lequel la leptine et le TNFalpha peuvent agir afin de diminuer la synthèse de TG d'après Vernon *et al.*, 1998

3) Implication dans la régulation des fonctions endocrines

Lors d'une période de jeûne, le taux de leptine chute rapidement sans corrélation directe avec la perte de masse grasse (Boden, G., *et al.*, 1996). Le jeûne, entraînant un manque d'énergie, déclenche une réponse neuroendocrine (Chan, J. L., *et al.*, 2003) incluant :

- la diminution des taux d'hormone de reproduction afin de prévenir les processus nécessitant des besoins importants en énergie (grossesse) : un seuil d'environ 3 ng/mL serait nécessaire afin de transmettre le message au cerveau d'une quantité suffisante de tissu adipeux pour mener une grossesse à terme (Kelesidis, T., *et al.*, 2010),
- la diminution des taux d'hormone thyroïde, impliquée dans la régulation des rendements métaboliques,
- l'augmentation des taux d'hormones de croissance permettant la mobilisation de l'énergie stockée,

- la diminution des taux d'*insulin-like growth factor-1* (IGF-1) impliqués dans les processus associés à la croissance (Ahima, R. S., *et al.*, 1996, Chan, J. L., *et al.*, 2003).

Les modèles animaux semblent plus concernés par l'interaction entre la leptine et les hormones de croissance que l'Homme puisque des patients atteints de déficit en leptine ont des fonctions de croissance apparemment normales contrairement aux animaux (Farooqi, I. S., *et al.*, 1999).

4) Implication dans les phénomènes de résistance à l'insuline et au syndrome métabolique

Une forte corrélation a pu être montrée entre l'hyperinsulinémie, représentative de la résistance à l'insuline, et l'hyperleptinémie chez les souris *ob/ob*, *db/db* ainsi que chez l'Homme à travers de nombreuses études épidémiologiques (Haffner, S. M., *et al.*, 1999, Madeira, I. R., *et al.*, 2009). L'association de ces deux facteurs mène à l'apparition d'un diabète non insulino-dépendant (NID) ainsi qu'à d'autres pathologies associées (obésité centrale, intolérance au glucose, hypertension, hyperlipidémie). Tous ces symptômes favorisent le développement de maladies cardiovasculaires ainsi que ce qu'on appelle le syndrome métabolique (Bonin-Guillaume, S., *et al.*, 2006). Lorsque l'hyperleptinémie est induite par perfusion directement dans le pancréas de rat, elle provoque une disparition de la sensibilité des cellules β au glucose. Cela mène à une perte de la synthèse d'insuline dans ces cellules β . (Fehmann, H. C., *et al.*, 1997).

Chez les souris *ob/ob*, le traitement à la leptine améliore l'hyperglycémie ainsi que l'hyperinsulinémie avant d'entraîner la perte de poids (Harris, R. B., *et al.*, 1998). De plus, ce traitement chez des patients atteints de déficit en leptine ne se traduit pas uniquement par une réduction de la glycémie et de l'insulinémie mais aussi par la diminution des taux de LDL-cholestérol, HDL-cholestérol et TG par le biais d'actions centrales et périphériques qui restent encore à approfondir (Farooqi, I. S., *et al.*, 2002). Ces modifications peuvent aussi être observées lors d'un déficit en tissu adipeux entraînant une hypoleptinémie (Gavrilova, O., *et al.*, 2000).

En conclusion, la leptine joue un rôle très important dans le contrôle de l'homéostasie énergétique, ce qui pourrait expliquer qu'un déficit en leptine, qu'il soit génétique ou acquis, entraîne de multiples troubles du métabolisme.

4. Pathologies associées à la leptine

Les pathologies liées à la leptine peuvent être issues d'une mutation du gène de la leptine et/ou du récepteur résultant en un déficit en leptine ou d'une résistance due à une obésité importante.

1) Déficit congénital en leptine

Ce type de pathologie est rare mais les personnes ayant un déficit congénital en leptine souffrent d'une hyperphagie sévère depuis la petite enfance, et bien que leur poids de naissance soit normal, elles deviennent rapidement obèses au cours de l'enfance (Farooqi, I. S., *et al.*, 2007). De plus, les enfants atteints de cette pathologie souffrent d'une hyperinsulinémie, une hypothyroïdie hypothalamique et un hypogonadisme hypogonadotrophique entraînant une absence de puberté (Ozata, M., *et al.*, 1999). L'absence de leptine détectable chez ces patients est due à des mutations faux-sens ou à un décalage du cadre de lecture du gène *ob* (7q31.3) (Clement, K., *et al.*, 1998). Le mode de transmission de cette pathologie est autosomique récessif. Le diagnostic du déficit congénital en leptine peut être confirmé par l'analyse du taux de leptine plasmatique ou par l'identification de mutations dans le gène *ob*.

2) Résistance à la leptine

Cette pathologie est beaucoup plus fréquemment rencontrée. Le taux de leptine circulante étant fortement corrélé avec la masse du tissu adipeux, les modèles murins de l'obésité (à l'exception des souris *ob/ob*) ont des taux élevés de leptine plasmatiques (Maffei, M., *et al.*, 1995). De plus, la leptine est transportée jusqu'au système nerveux central par la voie sanguine puis pénètre dans le cerveau par la Barrière Hémato-Encéphalique (BHE). Or, chez les souris soumises à un régime hyperlipidique induisant une obésité (DIO), le transport

de la leptine à travers la BHE est déficient, réduisant de ce fait l'entrée de leptine dans le cerveau et donc la réponse hypothalamique anorexigène attendue. La présence d'un taux élevé de l'hormone en dehors des prises alimentaires chez ces souris suggère un souci d'acheminement de la leptine à son site d'action, l'hypothalamus, et traduit un phénomène de résistance à la leptine. De ce fait, les taux endogènes de leptine élevés chez les sujets obèses tendent vers l'hypothèse indiquant que l'obésité ne pourrait être qu'une conséquence de la résistance à la leptine (Halaas, J. L., *et al.*, 1997).

3) Administration de leptine

Chez les patients présentant un déficit en leptine, l'administration de leptine entraîne une perte de poids associée à l'activation des circuits neuronaux, menant à la sensation de satiété (Farooqi, I. S., *et al.*, 2007). Par exemple, les souris *ob/ob* développent un profond diabète qui peut être entièrement prévenu par l'administration i.p. journalière de faibles doses de leptine durant 3 semaines, par réduction de l'appétit et de la prise alimentaire, menant à une perte significative de poids (Pellemounter, M. A., *et al.*, 1995). De plus, l'injection cérébrovasculaire de leptine stimule la récupération du glucose dans les cellules musculaires (Cusin, I., *et al.*, 1998, Haque, M. S., *et al.*, 1999) et inhibe la production de glucose hépatique (Pocai, A., *et al.*, 2005). Lors d'une administration de leptine à des sujets non obèses durant 4 jours, la diminution de poids ne se révèle pas significative. Cependant, une diminution de la masse adipeuse est démontrée ($0,4 \pm 0,0$ et $0,6 \pm 0,1$ kg de perte de masse grasse pour les sujets traités au placebo et les sujets traités à la leptine respectivement avec une valeur de p de 0,05), (Canavan, B., *et al.*, 2005).

5. Conclusion

La leptine est associée à la régulation de l'homéostasie énergétique, des fonctions neuroendocrines et du métabolisme lipidique. En effet, elle permet le contrôle de la sensation de satiété, des hormones de croissance et de reproduction et permet de contrôler l'équilibre entre la lipogenèse et la dépense énergétique par la lipolyse. De plus, la leptine recombinante humaine est une thérapie émergente potentielle afin de traiter les patients atteints de déficience congénitale en leptine mais reste cependant inefficace lors d'une résistance à la leptine.

Très impliquée dans le métabolisme lipidique central mais aussi périphérique, elle est donc une cible thérapeutique pour certaines pathologies. Cependant, tous les troubles du métabolisme lipidique ne prennent pas leur source dans la dérégulation de la leptine. De nombreux acteurs du métabolisme lipidique autres que la leptine peuvent, par leur dysfonctionnement, engendrer des pathologies importantes du métabolisme lipidique. Lors du prochain chapitre, nous allons étudier les principales pathologies liées au métabolisme lipidique qu'il est possible de rencontrer et en quoi nos travaux peuvent avoir un impact sur la prévention ou les cibles thérapeutiques de ces pathologies.

IV. LES DÉSORDRES DU MÉTABOLISME LIPIDIQUE

Les désordres du métabolisme lipidique sont à l'origine de nombreuses pathologies provoquant de nombreux problèmes de santé publique tels que les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives. De nombreux acteurs du métabolisme lipidique sont à l'origine de ces pathologies. Dans ce chapitre, nous allons identifier les pathologies importantes de ce métabolisme et étudier les paramètres impliqués dans leur mise en place afin de mettre en évidence l'importance des études réalisées durant cette thèse. En effet, la modulation du récepteur LSR engendre des perturbations au niveau lipidique pouvant être liées à plusieurs pathologies qui seront expliquées dans ce chapitre. Afin de bien comprendre les enjeux d'une telle étude, il est important de relier les conséquences de la perturbation de notre récepteur avec les problèmes de santé publique actuels.

1. Risques de maladies cardiovasculaires

1) L'obésité centrale

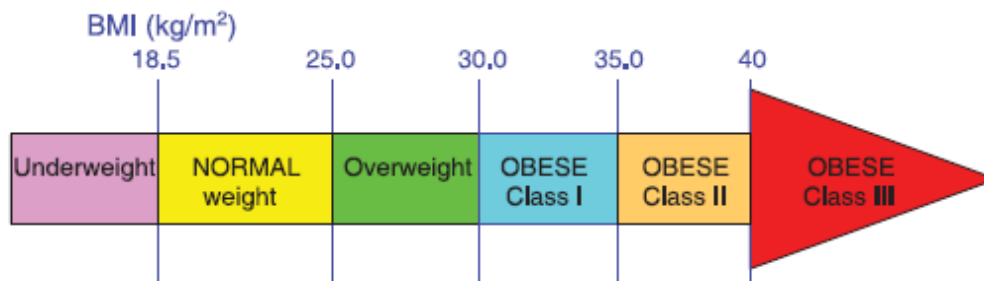


Figure 20: Classification des surpoids et obésité d'après Lien et Guyton, 2008

L'obésité est l'une des pathologies les plus répandues dans les pays industrialisés (Oppert, J.-M. and Rolland-Cachera, M.-F., 1998) et elle est devenue un véritable problème de santé publique, principalement à cause de l'étendue de l'épidémie ainsi que des complications métaboliques et vasculaires. De plus, il s'agit aussi d'une maladie chronique difficile à traiter. De nombreuses études épidémiologiques ont démontré que les régimes excédentaires en lipides constituent la principale cause du développement de l'obésité. Elle est définie par un Indice de Masse Corporelle (IMC) supérieur à 30. Cet indice, défini par l'OMS se calcule en fonction de la taille (m) et de la masse (kg) d'un individu (figure 20) (Keen, H., *et al.*, 1979, Kuczmarski, R. J., *et al.*, 1997). $IMC = \text{masse} / (\text{taille})^2$. Cependant,

d'autres techniques permettent le calcul de la graisse viscérale telle que le tour de taille ou le ratio entre le tour de taille et le tour de hanche (Krotkiewski, M., *et al.*, 1983).

L'obésité est la conséquence d'un stockage important des graisses au niveau des adipocytes, sécrétant des hormones liées au métabolisme énergétique du corps entier. Les adipocytes sont impliqués dans la modulation à la sensibilité à l'insuline à travers la leptine, l'adiponectine et la résistine (Bjorbaek, C. and Kahn, B. B., 2004, Lehrke, M., *et al.*, 2004, Weyer, C., *et al.*, 2001). Le taux de graisse viscérale a été montré comme étant fortement corrélé avec la résistance à l'insuline ainsi que d'autres critères du syndrome métabolique. Par exemple, l'excès d'accumulation de TG dans les cellules musculaires et les adipocytes aboutit à une résistance à l'insuline dans ces cellules (Kelley, D. E. and Mandarino, L. J., 2000).

Les patients obèses développent une résistance à l'insuline qui inhibe la suppression de la lipolyse par l'insuline et engendre un excès d'acides gras libres relargués par les adipocytes. Ces acides gras libres sont donc relargués dans la circulation sanguine et sont à nouveau distribués aux organes périphériques tels que le foie et le muscle. Une grande partie des acides gras libres arrivant au foie sera ré-estérifiée en TG et excrétée sous forme de VLDL pour éventuellement être stockée à nouveau dans les adipocytes. Lorsque ce transport n'est pas suffisamment orienté en faveur du tissu adipeux, le foie accumule les TG et le patient peut développer une stéatose hépatique. Le foie augmente donc son export de VLDL, augmentant les taux de TG plasmatiques. De plus, les concentrations élevées en glucose arrivant au foie favorisent la lipogenèse et donc aggravent l'accumulation de TG dans le foie. L'accumulation de TG au niveau du muscle squelettique est aussi envisageable et est impliquée dans la résistance à l'insuline.

2) La dyslipidémie

La dyslipidémie consiste en une modification des concentrations de lipides (cholestérol, TG, acides gras libres et phospholipides). En règle générale, la dyslipidémie est caractérisée par des TG plasmatiques élevés (transportés par les VLDL), des taux de HDL faibles et des taux élevés de particules de LDL petites et denses, un trio appelé phénotype de lipoprotéines athérogéniques (tableau 3) (Ginsberg, H. N., 2000).

Tableau 3: Caractéristiques des principales dyslipidémies d'après (Calop, J., *et al.*, 2008)

Désordres	Problèmes métaboliques	Effets sur les lipoprotéines
Hypercholestérolémie familiale	Récepteurs des LDL dysfonctionnels ou absents	↗ LDL
Dys-β-lipoprotéinémie	↘ de l'élimination des VLDL restants	↗ VLDL restants, ↗ IDL
Hypercholestérolémie polygénique	↘ de l'élimination des LDL	↗ LDL
Hyperlipidémie familiale combinée	↗ production d'apoB et de VLDL	↗ cholestérol et/ou triglycérides
Hyperapo-β-lipoprotéinémie familiale	↗ production d'apoB	↗ apoB
Hypo-α-lipoprotéinémie	↗ catabolisme des HDL	↘ HDL

Les taux élevés de triglycérides accompagnés par un faible taux en HDL-chol font aussi partie des critères retrouvés dans toutes les définitions du syndrome métabolique. Ces troubles sont principalement retrouvés chez les patients atteints de diabète de type 2. Les taux de TG sont inversement corrélés avec les taux de HDL-chol, permettant de faire le lien entre les lipoprotéines riches en TG et l'athérosclérose (Goldberg, I. J., 2001). De récentes observations ont montré que les taux de TG postprandiaux seraient de meilleurs prédicateurs des maladies cardiovasculaires que les taux de TG à jeun, indépendamment des taux de HDL-chol (Bansal, S., *et al.*, 2007, Nordestgaard, B. G., *et al.*, 2007).

On retrouve des LDL de grosseur variable comprenant des grosses particules de LDL chargées en TG et des petites particules denses de LDL. La formation de ces petites particules denses de LDL vient de la lipolyse des grosses particules, qui deviennent plus denses et plus petites et sont plus athérogéniques que les grosses LDL. Le pouvoir athérogénique des petites particules de LDL est causé d'une part par la diminution de leur capacité antioxydante ou par l'augmentation de leur pénétration dans l'intima artérielle (Gentile, M., *et al.*, 2008, Miranda, P. J., *et al.*, 2005). De nombreuses études ont montré que la présence de petites particules denses de LDL est un marqueur important de la sévérité du syndrome métabolique.

2. Le syndrome métabolique

Les physiopathologies du métabolisme lipidique se traduisent la plupart du temps par des désordres au niveau du métabolisme des lipoprotéines, qui engendre un problème de transport ou de stockage des lipides. Ces perturbations, telles que l'obésité et les dyslipidémies, ont pour conséquence un ensemble de facteurs de risques pour les maladies cardiovasculaires athérosclérotiques. L'ensemble de ces facteurs de risques ajouté à l'insulinorésistance et l'hypertriglycéridémie a été appelé « syndrome métabolique ».

1) Différentes définitions à travers le monde

Durant plusieurs dizaines d'années, la définition du syndrome métabolique a évolué. La première définition a été établie initialement par Vague (Vague, J., 1956), Albrink et Meigs (Albrink, M. J. and Meigs, J. W., 1964) et Reaven (Reaven, G. M., *et al.*, 1967).

Depuis les années 1990, différents groupes internationaux ont étudié ce syndrome et ont établi des critères permettant le diagnostic précis de ce syndrome.

L'organisation mondiale de la santé (OMS) publie les critères qu'elle estime nécessaire afin de diagnostiquer un syndrome métabolique en 1998 (tableau 4) (Alberti, K. G. and Zimmet, P. Z., 1998), aussitôt modifié par l'European Group for the study of Insulin Resistance (EGIR) en 1999 (Balkau, B. and Charles, M. A., 1999).

En 2001, le guide du *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III* (NCEP-ATP III) a défini plusieurs facteurs augmentant les risques de maladie cardiovasculaire athérosclérotique (ASCVD) (tableau 5). Il propose une définition différente basée sur les observations cliniques, modifiée à nouveau en 2004 et 2005 (National Institutes of Health, 2001).

En 2003, l'*American Association of Clinical Endocrinologists* (AACE) et l'*American College of Endocrinology* (ACE) focalisent préférentiellement sur le terme de « syndrome de résistance à l'insuline » (tableau 6) (Einhorn, D., *et al.*, 2003).

Pour finir, l'*International Diabetes Federation* (IDF) établit un consensus permettant une définition unique du syndrome métabolique suivant les populations mondiales, en tenant compte de la spécificité ethnique du critère de tour de taille (tableau 7) (Zimmet, P. Z., *et al.*, 2005).

Tableau 4: Définition du syndrome métabolique par l'OMS diagnostique de 1998 d'après Alberti KG et Zimmet PZ, 1998

Syndrome métabolique d'après les critères de l'OMS	
Critère obligatoirement requis:	
Anomalies des taux de glucose ou de l'insuline plasmatiques définies par:	Diagnostique de diabète de type 2, perte de la tolérance au glucose ou insulino-résistance
Nécessité d'avoir au moins 2 des trois symptômes suivants:	
Obésité centrale définie par:	ratio taille/hanche $> \geq 0,90$ (pour les hommes) et $0,85$ (pour les femmes) ou $IMC > \geq 30$ kg/m^2
Dyslipidémie définie par:	$TG \geq \geq 150$ mg/dL ou $HDL < < 35$ mg/dL (pour les hommes) ou $HDL < < 39$ mg/dL (pour les femmes)
Pression sanguine élevée définie par:	Pression sanguine $\geq \geq 160/90$ mm Hg
Dysfonction rénale définie par:	Taux d'excrétion d'albumine urinaire $\geq \geq 20$ mcg/min ou ration albumine/créatine $\geq \geq 20$ mg/g

Tableau 5: Définition du syndrome métabolique par le NCEP-ATP III établi en 2001 d'après l'executive summary of the third NCEP-ATP III, 2001

Syndrome métabolique d'après les critères de NCEP-ATP III	
Au moins 3 des 5 critères obligatoires	
Anomalies des taux de glucose ou de l'insuline plasmatiques définies par:	Glucose plasmatique à jeun $\geq \geq 100$ mg/dL
Obésité centrale définie par:	Circonférence de la taille $\geq \geq 102$ cm (pour les hommes) et $\geq \geq 88$ cm (pour les femmes)
Dyslipidémie définie par:	$TG \geq \geq 150$ mg/dL
Dyslipidémie définie par:	$HDL < < 40$ mg/dL (pour les hommes) ou $HDL < < 50$ mg/dL (pour les femmes)
Pression sanguine élevée définie par:	Pression sanguine $> > 130/85$

Tableau 6: Définition du syndrome métabolique par l'AAACE-ACE établi en 2004 d'après Einhorn, Reaven GM, 2003

Syndrome métabolique d'après les critères de l'AAACE-ACE	
<i>"Un individu... avec des valeurs qui exèdent les valeurs critiques pour 2 des 4 variables... et ayant une insulino-résistance et des risques de maladies cardiovasculaires augmentés"</i>	
Anomalies des taux de glucose ou de l'insuline plasmatiques définies par:	Glucose plasmatique à jeun entre 110 et 125 mg/dL ou 2h après 75g d'absorption de glucose: glycémie entre 140 et 200 mg/dL ≥ à 100 mg/dL
Dyslipidémie définie par:	TG ≥ à 150 mg/dL
Dyslipidémie définie par:	HDL < à 40 mg/dL (pour les hommes) ou HDL < à 50 mg/dL (pour les femmes)
Pression sanguine élevée définie par:	Pression sanguine > à 130/85

Tableau 7: Définition du syndrome métabolique par l'IDF établi en 2005 d'après Alberti KG et Zimmet PZ, 2005

Syndrome métabolique d'après les critères de la Fédération internationale de diabète	
Critère obligatoirement requis:	
Obésité centrale définie par:	Circonférence de taille définie par les spécificités ethniques
Nécessité d'avoir au moins 2 des trois symptômes suivants:	
Anomalies des taux de glucose ou de l'insuline plasmatiques définies par:	Glucose plasmatique à jeun ≥ à 100 mg/dL ou diagnostique de diabète de type 2,
Dyslipidémie définie par:	TG ≥ à 150 mg/dL ou traitement spécifique pour des anomalies lipidiques
Dyslipidémie définie par:	HDL < à 40 mg/dL (pour les hommes) ou HDL < à 50 mg/dL (pour les femmes) ou traitement spécifique pour des anomalies lipidiques
Pression sanguine élevée définie par:	Pression sanguine ≥ à 130/85 mm Hg ou traitement d'une hypertension diagnostiquée

En considérant les différences ethniques, il apparaît que la définition établie par NCEP-ATPIII soit la plus utilisée aux USA alors que celle de l'OMS, et plus récemment de l'IDF, serait plus favorable pour les pays Européens (Pi-Sunyer, X., 2007). Cependant, cette controverse est toujours en évolution.

2) Pathologies associées au syndrome métabolique

Les critères principaux permettant le diagnostic d'un syndrome métabolique parmi toutes les définitions données incluent :

- une obésité centrale,
- une dyslipidémie (hypertriglycéridémie, LDL-chol augmentées, HDL-chol diminuées),
- une résistance à l'insuline (suivi d'une hyperinsulinémie),
- une hypertension.

D'autres critères non essentiels peuvent être aggravants pour le diagnostic du syndrome métabolique tels que les maladies hépatiques (stéatoses non alcooliques, dysfonctions endothéliales et l'inflammation), (Miranda, P. J., *et al.*, 2005).

a. Lien entre le syndrome métabolique et l'athérosclérose

L'athérosclérose est responsable d'environ 80% des décès de patients diabétiques, ce qui renforce l'hypothèse d'un lien important entre le diabète et l'athérosclérose (National Diabetes Data Group, 1995). Une des premières étapes dans le développement de l'athérosclérose est le mouvement des LDL circulantes vers l'espace sous-endothélial, lié directement avec l'excès de petites particules denses de LDL circulantes. Ce phénomène peut être induit par l'hypertension, le tabagisme, le stress, etc. Une fois entrées dans l'espace sous-endothélial, les LDL sont modifiées principalement par oxydation, ce qui induit une attraction des monocytes. Ces monocytes sont ensuite transformés en macrophages. Les LDL oxydés sont captés par les macrophages monocytes et les cellules musculaires lisses par une voie métabolique dite « voie SCAVENGER » ne possédant pas de rétro-contrôle. Il s'ensuit une charge excessive en lipides des monocytes, macrophages et cellules musculaires lisses qui se transforment ainsi en cellules spumeuses, premier stade de la formation de la plaque

d'athérome (figure 21). Les cellules musculaires lisses migrent de la média vers l'intima artérielle et se multiplient, perdent leur phénotype contractile pour acquérir des capacités sécrétoires. Elles sécrètent alors du collagène et participent ainsi à la formation de la chape fibreuse de la plaque (de Winther, M. P. and Hofker, M. H., 2000).

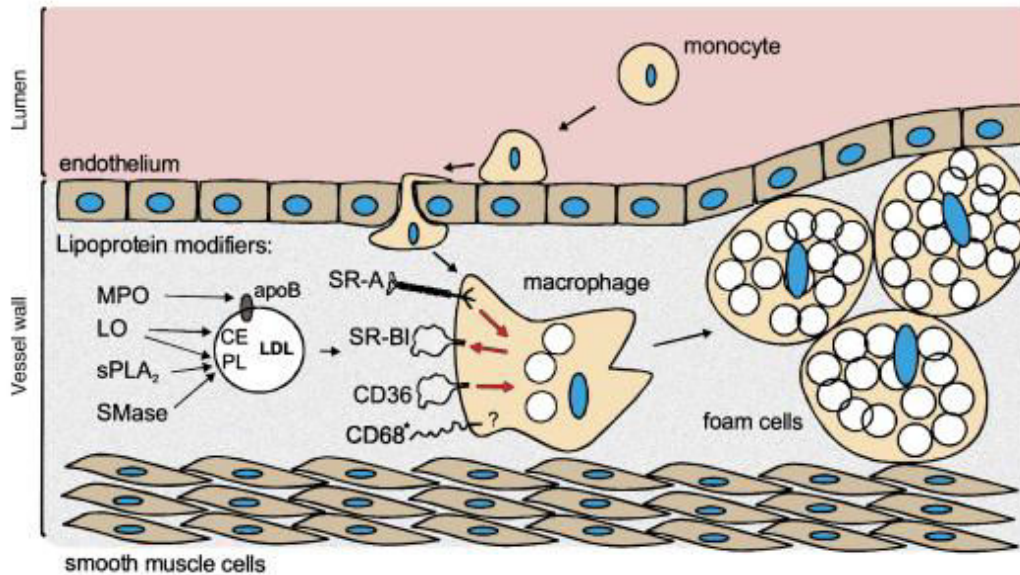


Figure 21: Enzymes modifiant les LDL et les récepteurs interagissant avec les macrophages pour former les cellules spumeuses et favoriser l'athérosclérose d'après De Winther et Hofker, 2000. De gauche à droite : Les LDL modifiées, les macrophages interagissant avec ces LDL modifiés, les cellules spumeuses formées. Les flèches allant aux LDL modifiées indiquent les composés agissant avec les LDL lors de leur modification. Les flèches rouges dans les macrophages indiquent si le récepteur impliqué permet l'intégration du cholestérol ou le relargage. Les cercles dans les macrophages indiquent l'accumulation intracellulaire d'esters de cholestérol. CD68 est inclut dans cette figure car il a été montré comme ayant un rôle dans l'oxydation des LDL mais son rôle dans l'intégration des LDL modifiés n'est pas encore clair. SR-A, scavenger receptor class A type I/II; SR-BI, scavenger receptor class B type I; MPO, myeloperoxidase; 12/15-LO, lipoxygénase; sPLA₂, secretory phospholipase A₂; SMase, sphingomyelinase; CE, cholesteryl ester; PL, phospholipids.

b. L'hypertension

L'une des composantes nécessaires pour le diagnostic du syndrome métabolique est l'hypertension (élévation de la pression sanguine), qui représente un facteur de risque important pour les maladies cardiovasculaires. L'interaction entre l'hypertension et les autres composantes du syndrome métabolique est complexe. Cependant, il a été montré que 50% des patients atteints d'hypertension souffraient aussi d'insulinorésistance. En effet, l'insulinorésistance peut aussi augmenter la pression sanguine à travers la diminution de la vasodilatation réalisée par le NO et l'augmentation de la sensibilité au sel. Ces mécanismes

peuvent aussi affecter la réponse aux hypertenseurs chez les patients atteints d'insulinorésistance (Higashi, Y., *et al.*, 2001, Semplicini, A., *et al.*, 1994).

c. La résistance à l'insuline

L'élément qui reste controversé lors de la définition du syndrome métabolique est la résistance à l'insuline. Elle est retrouvée chez la majorité des patients atteints de diabète de type 2, symptôme du syndrome métabolique. Cependant, certains experts estiment qu'il s'agit d'une conséquence plutôt qu'une cause du syndrome métabolique, pensant que la cause sous-jacente à ce syndrome réside en la dysfonction du processus de stockage énergétique et du métabolisme lipidique. La perturbation du métabolisme lipidique entraînerait une accumulation des TG dans différents tissus périphériques (principalement le muscle) qui conduirait la résistance à l'insuline (Levin, M. C., *et al.*, 2007, Miranda, P. J., *et al.*, 2005).

D'autre part, d'autres experts estiment que la résistance à l'insuline est une composante nécessaire pour le diagnostic du syndrome métabolique, telle que la définition donnée par l'OMS (Figure #) qui nécessite le diagnostic d'un diabète de type 2 ou la perte de la tolérance au glucose. Cette théorie laisserait penser que l'hyperglycémie causée par la résistance à l'insuline pourrait accélérer l'apparition d'athérosclérose par l'augmentation de la formation de collagène entre autres choses (Miranda, P. J., *et al.*, 2005).

Les patients souffrant d'une anomalie du récepteur à l'insuline génétique, résultant en une résistance à l'insuline, ne souffrent pas du syndrome métabolique. C'est pourquoi ce symptôme n'est pas toujours assimilé au syndrome (Le Roith, D. and Zick, Y., 2001).

i. Lien entre la résistance à l'insuline et l'athérosclérose :

Il existe deux différentes voies de signalisation résultant de la fixation de l'insuline sur son récepteur :

- la voie de signalisation « métabolique » passant par la phosphorylation de PI3-kinase,
- la voie de signalisation « inflammatoire » activant la phosphorylation des voies MAP-kinase (figure 22).

Lors d'un phénomène de résistance à l'insuline résultant du syndrome métabolique, la voie de signalisation métabolique est bloquée. La voie de signalisation des PI3-kinases étant nécessaire à l'intégration du glucose dans la cellule, les concentrations de glucose plasmatique augmentent. En réponse aux taux élevés de glucose, les cellules B pancréatiques sécrètent

plus d'insuline afin de forcer l'entrée du glucose dans les cellules. La voie de signalisation MAP-kinase étant sans obstacle, elle peut être fortement stimulée par la présence de taux élevés d'insuline circulants. Cette activation excessive de MAP-kinase mène à des effets pro-inflammatoires pouvant être athérogènes dans certaines cellules telles que les parois artérielles (Cusi, K., *et al.*, 2000, Le Roith, D. and Zick, Y., 2001).

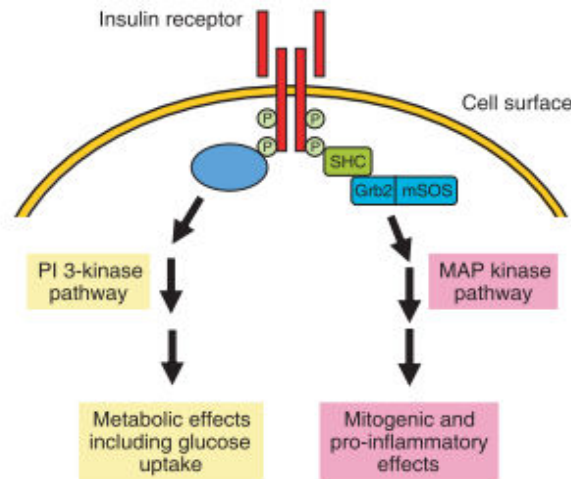


Figure 22: Voie de signalisation "métabolique" et "inflammatoire" de l'insuline d'après Lien et Guyton, 2008

ii. Rôle du tissu adipeux :

Le tissu adipeux, connu pour son action sécrétoire d'adipokines, joue un rôle important dans la résistance à l'insuline et les complications des maladies cardiovasculaires associées à l'obésité. La production de ces adipokines a un impact majeur sur les pathologies telles que l'obésité, le diabète de type 2 et par conséquent le syndrome métabolique (figure 23).

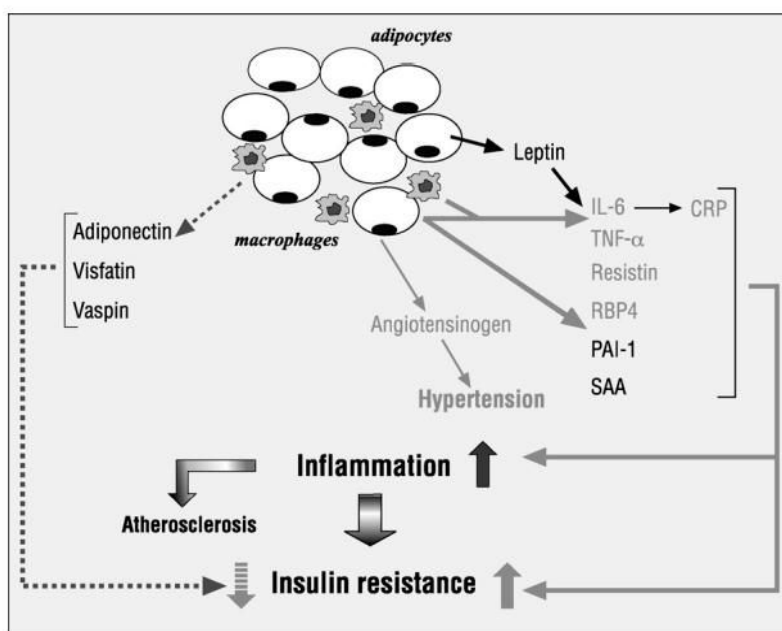


Figure 23: Tissu adipeux, adipokines et résistance à l'insuline d'après Antuna Puente *et al.*, 2008

Parmi les médiateurs biologiques de l'insulinorésistance, des substances sécrétées par l'adipocyte sont incriminées, telles que les acides gras libres ou les cytokines. Ils interviendraient dans le rôle délétère de l'adiposité viscérale sur les paramètres métaboliques (Boulogne, A. and Vantighem, M. C., 2004).

➤ La leptine

Au-delà de l'effet central de la leptine en tant qu'hormone de satiété, tel que l'a montré le chapitre précédent, elle exerce un rôle important dans le processus inflammatoire lié à l'obésité. Par des moyens qui restent encore à être clarifiés, la leptine permettrait de contrôler la production de TNF- α ainsi que l'activation des macrophages (Loffreda, S., *et al.*, 1998). D'autre part, TNF- α et IL-6 seraient impliqués dans la stimulation de la production de la leptine par les adipocytes (Mai, X. M., *et al.*, 2009). D'autres molécules voient leur production liée de près à la leptine telles que l'endothelin-1, (*nitric oxide*)-*synthase* et *monocyte chemoattractant protein* (MCP)-1 (Yamagishi, S. I., *et al.*, 2001). De plus, la leptine est impliquée dans l'accumulation du cholestérol dans les macrophages lors d'une hyperglycémie (O'Rourke, L., *et al.*, 2002). Ces résultats suggèrent l'implication de la leptine dans l'athérosclérose, en recrutant les monocytes au niveau de la paroi artérielle. De plus, la voie de signalisation de la leptine active SOCS-3, connu pour inhiber les voies de signalisation de l'insuline (Howard, J. K. and Flier, J. S., 2006).

➤ TNF- α

Chez les rongeurs, les TNF- α ont été démontrés comme ayant un effet dans la résistance à l'insuline à travers la phosphorylation anormale du récepteur à l'insuline (IRS)-1 (Hotamisligil, G. S., *et al.*, 1993). De plus, le TNF- α peut accélérer l'athérosclérose à travers l'induction de l'expression de certaines molécules d'adhésion (*vascular cell adhesion molecule* (VCAM)-1 et MCP-1) dans les cellules endothéliales ou vasculaires du muscle, pouvant provoquer l'apoptose des cellules endothéliales (Hermann, M. and Sloniewski, P., 2000).

➤ Autres molécules

D'autres molécules telles que l'interleukin-6 et l'adiponectine produites entre autre par le tissu adipeux peuvent être impliquées dans l'insulinorésistance.

Comme la leptine, l'adiponectine accroît la sensibilité à l'insuline par l'activation des voies de signalisation AMP-kinase (Yamauchi, T., *et al.*, 2002), ce qui pourrait expliquer sa sous-expression chez les patients obèses ou atteints de diabète de type 2. De plus, elle a un effet anti-athérogène en interférant avec la régulation de l'expression des molécules d'adhésion (Ouchi, N., *et al.*, 1999) et la transformation des macrophages en cellules spumeuses (Ouchi, N., *et al.*, 2001). L'adiponectine semble donc réduire la réponse inflammatoire induite par le TNF- α à travers la réduction de l'activité des macrophages et de la production de TNF- α lors du traitement in vitro de macrophages avec cette adipokine (Ouchi, N., *et al.*, 2000).

L'interleukin-6 est connu pour son contrôle de la production hépatique de protéines inflammatoires telles que *C-reactive protein* (CRP), représentant un facteur de risque important pour les maladies cardiovasculaires (Maachi, M., *et al.*, 2004, Ridker, P. M. and Morrow, D. A., 2003). De plus, des études ont montré l'implication de IL-6 dans la résistance à l'insuline et ses complications (Bastard, J. P., *et al.*, 2000, Bastard, J. P., *et al.*, 2002) par la participation des protéines kinases et l'activation des tyrosines phosphatases avec le récepteur à l'insuline. Ces études démontrent l'inhibition des voies de signalisation de l'insuline en présence de cytokines menant à la résistance à l'insuline (Kroder, G., *et al.*, 1996, Mooney, R. A., *et al.*, 2001).

3) Conclusion

Le syndrome métabolique, fortement lié à la résistance à l'insuline, devient un problème de santé mondial et a un impact important sur les risques de diabète de type 2 et les risques de maladies cardiovasculaires. Les autres composantes du syndrome métabolique démontrent clairement l'implication du métabolisme lipidique dans ce syndrome, notamment par la présence de l'obésité et de dyslipidémie.

3. Les maladies neurodégénératives

L'interaction entre les démences et les pathologies liées au métabolisme lipidique tel que le diabète ou la résistance à l'insuline a été montrée par certaines études (Mooradian, A. D., 1997). Cependant, un lien direct entre la MA et ces différentes pathologies reste encore à être prouvé (Nielson, K. A., *et al.*, 1996).

La maladie d'Alzheimer est la plus connue des maladies neurodégénératives, représentant 70% à 90% des démences (Ritchie, K. and Lovestone, S., 2002). Les facteurs de risques de la maladie d'Alzheimer (MA) peuvent être génétiques ou non génétiques. La part des patients atteints de MA génétique ne représente que 5% des cas alors que les formes sporadiques représentent 95%. Trois gènes semblent très impliqués dans les formes génétiques de la maladie qui touchent les personnes à un âge intermédiaire, environ 40 à 50 ans (Cummings, J. L., 2004, Selkoe, D. J., 1997) :

- *Amyloid Precursor Protein (APP)*,
- *Presenilin-1*,
- *Presenilin-2*.

Concernant l'apparition des formes sporadiques de la maladie, les facteurs de risques les plus pertinents semblent être l'âge, le faible niveau d'éducation et l'apolipoprotéine Apo-E4 (Cummings, J. L., 2004). Cette maladie se caractérise par l'apparition de plaques séniles composées de dépôts amyloïdes ainsi que d'enchevêtrements neurofibrillaires causés par une agrégation de la protéine Tau dans les structures cérébrales (figure 24).



Figure 24: Schéma d'un changement dégénératif dans un cerveau d'un patient sain et atteint de MA. Les plaques séniles déposées entre les neurones sont composées principalement de protéines bêta-amyloïde

Le peptide bêta-amyloïde ($A\beta$) est issu du clivage de la protéine *Amyloid Precursor Protein* (APP) qui peut subir l'action de plusieurs sécrétases menant à deux différentes voies (figure 25). Le clivage d'APP par l' α -sécrétase mène à la voie non-amyloïdogène et la sécrétion de peptide $sAPP\alpha$ neuroprotecteurs alors que le clivage d'APP par la β -sécrétase mène à la voie amyloïdogène et la sécrétion de peptides $A\beta$ neurotoxiques (Florent-Bechard, S., *et al.*, 2009).

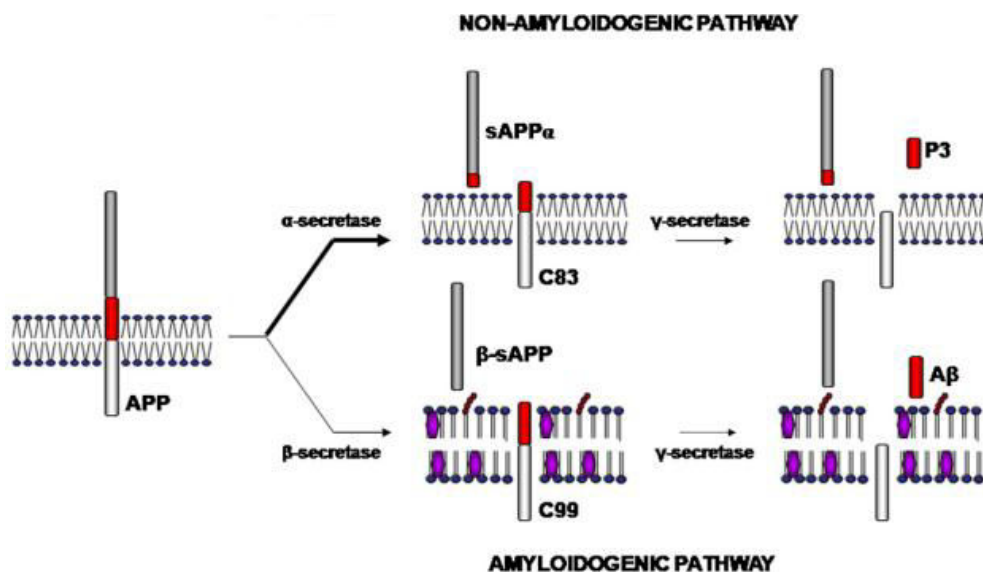


Figure 25: Les différents clivages de l'APP. Le clivage de la protéine APP peut se faire par l' α -sécrétase aboutissant à la formation de propéptides $sAPP$ neuroprotectrices, cette voie de signalisation est appelée la voie non amyloïdogénique. Cependant, la protéine APP peut aussi être clivée par la β -sécrétase menant à la formation de la protéine β -amyloïde, neurotoxique selon la voie de signalisation amyloïdogénique. Schéma d'après Florent-Bechard S *et al.*, 2009

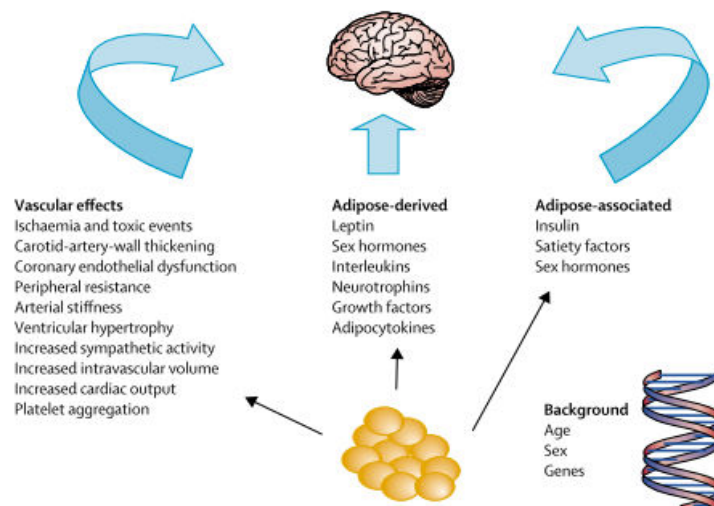


Figure 26: Interaction entre le tissu adipeux et cerveau d'après Gustafson, 2006

Dans ce chapitre, les différentes relations entre les démences et le métabolisme lipidique vont être détaillées afin d'établir les facteurs de risques lipidique liés aux démences, principalement la maladie d'Alzheimer (figure 26).

1) La glucorégulation dans la maladie d'Alzheimer

Des études ont porté sur le statut de glucorégulation chez les patients atteints uniquement de maladie d'Alzheimer, dite Alzheimer « pure ». La plupart de ces études ne révèlent aucune différence entre les taux de glucose et d'insuline chez les patients atteints d'Alzheimer comparés aux patients contrôles de même âge (Kilander, L., *et al.*, 1993, Winograd, C. H., *et al.*, 1991). Toutefois, certaines études détectent des hauts taux de glucose postprandiaux et d'insuline (Bucht, G., *et al.*, 1983, Craft, S., *et al.*, 1992, Fisman, M., *et al.*, 1988) ou bien détectent des plus faibles taux de glucose postprandiaux ou d'insuline (Fujisawa, Y., *et al.*, 1991, Landin, K., *et al.*, 1993). Une étude spécifique a révélé que, lorsque le taux basal de glucose est augmenté chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, cela résulte en une diminution de la sensibilité à l'insuline (Meneilly, G. S. and Hill, A., 1993).

Le statut de glucorégulation semblant être très variable d'un patient à un autre, les mesures prises doivent mener à des interprétations à prendre avec précaution. Cependant, certains résultats tendent à montrer que l'augmentation des taux d'insuline chez les patients

atteints de maladie d'Alzheimer résulte en une diminution de la sensibilité à l'insuline mais ces résultats restent à être renforcés.

2) Lien entre le diabète et les démences

De nombreuses études épidémiologiques ont porté sur la relation entre la présence de diabète et la maladie d'Alzheimer. Bien qu'aucune étude n'ait pu montrer un lien inévitable entre ces deux pathologies, certaines études ont montré que les patients atteints de diabète ont un risque de développer une maladie d'Alzheimer 1,3 à 1,9 fois supérieur aux patients contrôles (Brayne, C., *et al.*, 1998, Ott, A., *et al.*, 1996, Ott, A., *et al.*, 1999, Peila, R., *et al.*, 2002). Contrairement à ces résultats, d'autres études montrent l'absence ou la faible corrélation entre le diabète et la maladie d'Alzheimer (Curb, J. D., *et al.*, 1999, Leibson, C. L., *et al.*, 1997, Luchsinger, J. A., *et al.*, 2001).

Récemment, une étude longitudinale révèle que les patients atteints de diabètes de type 2 ont un risque de développer une démence de 1,5 fois, une démence vasculaire de 2,3 fois et une maladie d'Alzheimer de 1,8 fois supérieure aux patients contrôles (Peila, R., *et al.*, 2002). De plus, les patients atteints de diabète combiné avec la présence d'Apo-E4 ont un risque de développer une maladie d'Alzheimer 5,5 fois supérieures aux patients n'ayant pas ce marqueur de la MA.

En conclusion, la présence de diabète seul n'est pas directement associée avec la MA car les plaques séniles ne sont pas augmentées dans le cerveau des patients atteints de diabètes (Heitner, J. and Dickson, D., 1997). Cependant, d'autres études ont montré que le diabète pouvait être un facteur de risque de la MA, se basant certainement sur l'hypothèse que le diabète augmente les risques de maladies cérébrovasculaires et que ces maladies sont impliquées dans le processus pathologiques de la MA menant au dépôt amyloïde et à la mort neuronale (Brayne, C., *et al.*, 1998).

3) Lien entre le syndrome métabolique et les démences

Les études reliant le syndrome métabolique avec les démences, principalement la MA sont peu nombreuses. Une étude prospective de 5 ans sur 2632 personnes âgées a permis d'associer le syndrome métabolique à un risque augmenté de déclin cognitif, particulièrement chez les patients ayant des marqueurs d'inflammation (Yaffe, K., *et al.*, 2004). Une autre

étude européenne a croisé la présence du syndrome métabolique et de la MA chez 959 personnes âgées entre 69 et 78 ans. La prévalence de la MA chez les patients atteints du syndrome métabolique est plus importante que chez les patients contrôles (7,2% contre 2,8%), principalement chez les femmes atteintes du syndrome métabolique (8,3% contre 1,9%) (Vanhanen, M., *et al.*, 2006). Durant une autre étude prospective, le syndrome métabolique est associé aux démences vasculaires mais pas à la MA (Kalmijn, S., *et al.*, 2000). D'autre part, une autre étude prospective n'a montré aucune incidence du syndrome métabolique sur la prévalence de la MA alors que la présence de diabète et d'hyperinsulinémie aurait une incidence dans cette étude (Muller, M., *et al.*, 2007).

Le syndrome métabolique aurait un impact sur le déclin cognitif, qu'il s'agisse de la MA ou d'une autre démence. Cependant, cela serait dû principalement à l'effet de certaines composantes du syndrome telles que le diabète et l'insulinorésistance, comme nous l'avons dit auparavant.

4) L'implication de l'apolipoprotéine E dans les démences

Les récepteurs lipoprotéiques ont un rôle important dans les processus pathologiques qui mènent à la MA. Ils sont connus pour moduler le métabolisme du cholestérol neuronal ainsi que l'apolipoprotéine E. En effet, chez les patients atteints de la forme sporadique de la MA, la proportion de patients homozygotes pour le gène Apo-E4 est très importante, faisant de ce gène un facteur de risque supplémentaire pour la MA (Corder, E. H., *et al.*, 1993, Schmechel, D. E., *et al.*, 1993, Strittmatter, W. J., *et al.*, 1993) bien qu'il n'y ait pas de lien direct (McDowell, I., 2001, Small, G. W., *et al.*, 2000).

L'Apo-E4, qui est le produit de l'allèle e4, est principalement produite et sécrétée par le foie. C'est une composante des lipoprotéines qui détermine la clairance de la circulation sanguine des lipoprotéines riches en cholestérol en se fixant sur leurs récepteurs au niveau des tissus spécifiques. Cependant, l'Apo-E4 est aussi produite par les astrocytes et la microglie dans le cerveau, et est connue pour délivrer le cholestérol aux neurones. Ce cholestérol est nécessaire pour le développement et le maintien de la plasticité et la fonction neuronale. Parmi les trois isoformes humaines de Apo-E (E2, E3 et E4), seule Apo-E4 est un facteur de risque important pour la MA. En effet, 40% des patients atteints de MA ont au moins un allèle Apo-E4 et le fait d'être homozygote pour cet allèle augmente les risque de MA de 4 fois (Wolozin, B., 2004). D'après certaines hypothèses, l'Apo-E4 serait un facteur de risque

contrairement aux autres Apo-E car ce serait la seule Apo-E à interagir directement avec l'A β et elle facilite l'oligomérisation et la formation des plaques séniles. Ce rôle du métabolisme des lipoprotéines dans la MA a été confirmé lors de l'utilisation des statines, suppresseurs de la biosynthèse du cholestérol endogène qui diminue le risque de MA sporadiques (Shobab, L. A., *et al.*, 2005).

L'apolipoprotéine E permet la restructuration des membranes neuronales lésées en apportant les lipides nécessaires. Cependant, l'Apo-E4 semble être l'apolipoprotéine la moins efficace dans ce rôle, tel qu'on peut le voir dans d'autres maladies neurodégénératives. La localisation de l'Apo E au sein des plaques serait le résultat de son association avec le peptide amyloïde (Naslund, J., *et al.*, 1995). Les sujets homozygotes pour l'allèle e4 ont un nombre accru de dépôts amyloïdes au sein des vaisseaux et de plaques amyloïdes (Schmechel, D. E., *et al.*, 1993). Le polymorphisme de l'Apo E peut également jouer sur les déficits neurochimiques, et notamment sur le déficit cholinergique. En effet, des déficits cholinergiques sont plus importants chez les patients porteurs de l'allèle e4 (Beffert, U. and Poirier, J., 1996). La liaison du peptide amyloïde et de l'Apo E n'est pas spécifique de la maladie d'Alzheimer, car elle est retrouvée dans l'angiopathie cérébrale et différentes pathologies cérébrales avec amyloïdoses. Les différentes isoformes ont des propriétés particulières vis à vis de la protéine bêta-amyloïde. Cette affinité de l'Apo E pour le peptide A β est controversée, et l'intervention de l'Apo E dans l'amyloïdogénèse est le sujet de diverses hypothèses. L'Apo E4 purifiée de plasma se lierait au peptide amyloïde avec une affinité plus importante que les autres allèles (Strittmatter, W. J., *et al.*, 1993, Wisniewski, T., *et al.*, 1993). La liaison de l'A β avec l'Apo E4 s'effectue de façon plus rapide que celle de l'Apo E3 et de l'A β (Strittmatter, W. J., *et al.*, 1993), et entraîne l'apparition de fibrilles plus précocement (Sanan, D. A., *et al.*, 1994, Wisniewski, T., *et al.*, 1994).

Les études génétiques ont donc montré un rôle de l'Apo E dans la maladie d'Alzheimer, différent selon les allèles: l'allèle e4 est un facteur de risque et l'allèle e2 un facteur protecteur.

5) Conclusion

Si les démences peuvent avoir une origine génétique, l'implication environnementale n'est pas à négliger. En effet, certains facteurs de risque ont une origine lipidique tels que le syndrome métabolique, le diabète, l'insulinorésistance... Les facteurs génétiques peuvent eux aussi être impliqués dans le métabolisme lipidique tel que l'allèle e4 codant pour l'apolipoprotéine E4, facteur de risque dans la MA. Cependant, aucun de ces facteurs ne peut représenter un marqueur unique pour le diagnostic de la MA sachant qu'ils ont vraisemblablement une valeur prédictive au niveau d'une population, mais certainement pas au niveau individuel.

V. CONCLUSION GÉNÉRALE DE LA SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Le métabolisme lipidique, orchestré principalement par les lipoprotéines, les enzymes et les récepteurs associés, repose sur un équilibre constant entre un apport lipidique, qu'il s'agisse d'une synthèse endogène ou d'un apport exogène, et une utilisation de ces lipides par la dépense énergétique ou la lipolyse. Ce système, très complexe, fait intervenir de nombreux acteurs qui participent chacun au bon fonctionnement de ce métabolisme. De par la quantité importante de molécules impliquées dans ce système, la perte de l'équilibre peut être trouvée à plusieurs niveaux. Que ces troubles soient environnementaux ou génétiques, ils ont tous pour conséquence la perturbation du métabolisme lipidique. Ces perturbations peuvent avoir pour cause un apport trop important de graisses alimentaires menant à l'obésité, à l'insulinorésistance et participant à la formation du syndrome métabolique et de l'athérosclérose. De plus, ces perturbations peuvent représenter un facteur de risque non négligeable des maladies neurodégénératives telle que la maladie d'Alzheimer ou les autres démences.

Le métabolisme lipidique, aussi complexe soit-il, est un système à étudier avec soin car les troubles de ce métabolisme sont les causes principales de beaucoup de pathologies. La plupart de ces pathologies sont devenues des problèmes de santé publique tels que l'obésité, le diabète et plus généralement le syndrome métabolique et les maladies neurodégénératives pour lesquelles elles représentent des facteurs de risques importants. Une meilleure compréhension de ce métabolisme permettrait une approche préventive ou thérapeutique des pathologies lipidiques.

VI. OBJECTIFS DE LA THÈSE

Afin de mieux comprendre le métabolisme lipidique et son implication dans certaines pathologies, nous nous sommes intéressés au transport et à la distribution des lipides alimentaires. Pour ce faire, nous nous sommes focalisés sur l'étude d'un récepteur hépatique aux lipoprotéines, *lipolysis stimulated lipoprotein receptor* (LSR), impliqué dans la clairance des chylomicrons en phase postprandiale. La clairance des chylomicrons est très importante dans le métabolisme lipidique car elle détermine la rapidité d'élimination des lipides alimentaires plasmatiques par l'intégration des lipoprotéines au niveau du foie, chargées en TG et cholestérol afin de les distribuer aux tissus périphériques. Plus les chylomicrons sont captés par le foie rapidement, moins ils permettent aux tissus périphériques de s'enrichir en TG et cholestérol et de les stocker dans leurs cellules.

Chez les sujets obèses, l'expression de ce récepteur est diminuée, réduisant la clairance des lipoprotéines riches en TG au niveau du foie lors de l'ingestion d'un plat, ayant pour conséquence l'augmentation des TG plasmatiques et favorisant le stockage des graisses. De plus, au cours du vieillissement, ou lors d'un stress hyperlipidique, les souris n'ayant qu'un seul allèle du gène *lsr* voient leur TG plasmatiques augmentés accompagnés par une augmentation du poids et de leur masse adipeuse. Ces résultats préliminaires ont fait de ce récepteur une cible thérapeutique pour l'étude de la dyslipidémie et de son implication dans les troubles du métabolisme lipidique tels que le syndrome métabolique et les maladies neurodégénératives.

Durant ces trois années, nous avons étudié l'impact de LSR sur l'homéostasie lipidique dans plusieurs modèles cellulaires et animaux. D'une part, nous avons étudié le potentiel lien entre les facteurs endogènes tels que la leptine ou les enzymes clefs impliquées dans la lipogenèse et LSR. D'autre part, nous avons cherché à connaître l'impact potentiel des lipides alimentaires sur l'activité et l'expression de LSR en étudiant les effets d'une alimentation riche en lipides appliquée au modèle murin sauvage ou n'ayant qu'un allèle du récepteur LSR.

En étudiant les différents modulateurs d'expression de ce récepteur, qu'ils soient alimentaires, hormonaux ou enzymatiques, nous serons plus éclairés sur son rôle dans le transport et la distribution des lipides aux tissus périphériques.

Chapitre 2 :

Matériels & Méthodes

Cette thèse est composée de 4 études différentes mais complémentaires qui allient les expériences *in vitro* et *in vivo* dans le but d'identifier les acteurs principaux de la régulation de LSR. La première étude a porté sur la régulation de LSR par la leptine et a nécessité des cultures cellulaires de lignée de souris en combinaison avec des études *in vivo* faites sur des souris suivies d'analyses biochimiques. Les 3 autres études ont focalisé sur des études animales suivies d'analyses biochimiques et comportementales.

I. ÉTUDES ANIMALES

1. Animaux utilisés et conditions d'hébergement

Une partie des études a porté sur des souris sauvages C57Bl6/J femelles ou mâles fournies par Janvier Breeding (Le Genest Saint Isle, France) de 10 semaines ou de 9 mois. D'autres études ont été réalisées sur des souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} femelles de 10 semaines ou de 14 mois issues de reproduction au sein du laboratoire. Le génotype LSR^{-/-} étant létal (Yen, F. T., *et al.*, 2008), les mâles LSR^{+/-} ont été mis en reproduction avec des femelles sauvages C57Bl6/J âgées de 3 à 8 mois maximum. Les petits ont été séparés des parents à l'âge de 4 semaines et génotypés à l'âge de 6 semaines.

Les souris ont été maintenues dans une animalerie agréée et certifiée pour l'hébergement des souris OGM avec un cycle jour/nuit de 12h/12h, une température variant de 21 à 22°C et une hygrométrie de 50 ± 20%, sous alimentation standard en quantité non restreinte.

2. Le géotypage

Les échantillons de queues des souris ont été prélevés (0,2 cm) sous anesthésie gazeuse (isoflurane). Les échantillons de queues ont ensuite été digérés dans un tampon de digestion à la protéinase K composé de *DirectPCR Lysis Reagent* (Euromedex) et de Protéinase K (20 mg /mL) (Biosystems) dans un four à hybridation rotatif durant une nuit à 55°C afin de libérer l'ADN. Les échantillons de queues digérés sont ensuite placés 45 minutes dans un bain marie à 85°C afin d'inactiver l'enzyme digestive protéinase K puis utiliser pour la PCR. Les amorces de PCR ont été sélectionnées afin de générer un produit spécifique pour la forme sauvage ou mutée du gène *lsr*. L'allèle sauvage a été détecté à 773 paires de bases

(pb), produit de la PCR générée par une amorce « sens » située sur l'exon 4 (5'-CAGGACCTCAGAAGCCCCTGA-3') et une amorce « inverse » située sur l'exon 5 (5'-AACAGCACTTGTCTGGGCAGC-3'). Cette région du gène est supprimée dans l'allèle muté. L'allèle muté a été détecté par la présence du gène néo. Le couple d'amorce utilisé est l'amorce « sens » (5'-GGCGCCCGGTTCTTTTGTCA-3') et l'amorce « inverse » (5'-TTGGTGGTCGAATGGGCAGGT-3') donnant un produit de 179 pb (Mesli, S., *et al.*, 2004). Les conditions de PCR sont données par le tableau 8.

Tableau 8: Conditions de PCR pour la détection des allèles sauvages et mutés du gène *lsr*

LSR wild		LSR Néo	
158	159	lsr néo l5F	lsr néo l5R
94°C	5'	94°C	5'
94°C	30"	94°C	30"
63°C	60"	55°C	30"
72°C	30"	72°C	90"
72°C	7'	72°C	7'
4°C	∞	4°C	∞

3. Traitements

1) Régimes

a. Chez les souris témoins âgées

Les 80 souris C57Bl6/J mâles de 9 mois ont été placées sous 4 régimes alimentaires différents durant 6 mois :

Régime A : Régime standard composé de 5% de lipides apportés par de l'huile et du saindoux, garantissant un apport standard en nutriments essentiels (figure 27) (n=20).

Régime B : Composé du régime A supplémenté en acides gras polyinsaturés $\omega 3$ sous la forme de triglycérides riches en DHA et en précurseurs d' $\omega 3$ afin d'avoir un pourcentage final de 0,2% de DHA dans le régime (n=20).

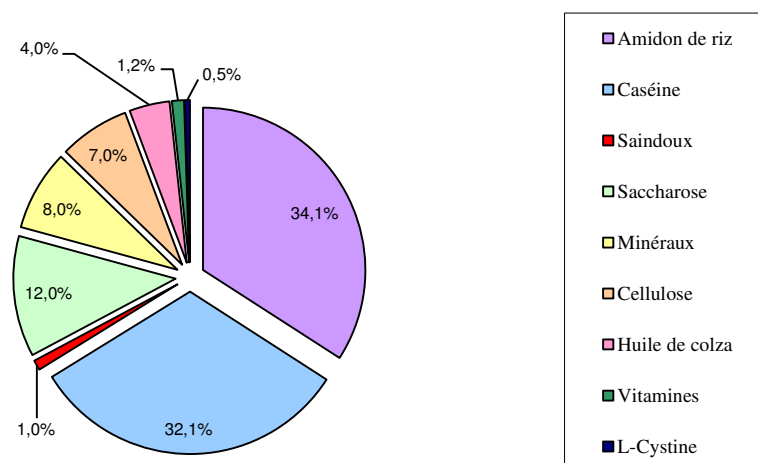


Figure 27: Composition du régime A

Régime C : Régime hyperlipidique censé conduire à la souris obèse DIO, riche en lipides et en cholestérol, composé de 21% de lipides apportés par l'huile d'olive raffinée et le saindoux (figure 28) (n=20).

Régime D : Composé du régime C supplémenté en acides gras polyinsaturés $\omega 3$ sous la forme de triglycérides riches en DHA et en précurseurs d' $\omega 3$ afin d'avoir un pourcentage final de 0,2% de DHA dans le régime (n=20).

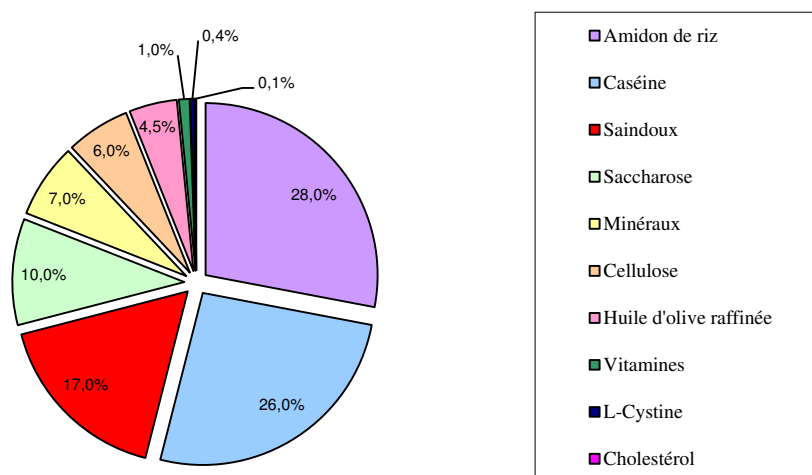


Figure 28: Composition du régime C

b. Chez les souris déficientes en LSR

Les souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} femelles de 7 mois ont été placées sous un régime hyperlipidique durant 6 ou 10 semaines contenant 60% de lipides en kcal apportés principalement par du lard, fourni par SDS Dietex (Saint Gratien, France) disponible pour les souris en quantité non restreinte (tableau 9).

Tableau 9: Composition du régime hyperlipidique

Ingrédient	pour 100 g
Caséine	29,94
Bitartrate choline	0,33
L-cystine	0,45
Lard	29,25
Amidon de riz	10,08
Cellulose	6,96
Huile de soja	4,86
Sucre	11,84
Mix minéral	4,88
Mix vitamines	1,39

Composition	% (w/w)	kcal /g	% kcal
Lipides	34,3	3,09	60
Protéines	25,9	1,04	20
Glucides	25,2	1,01	20
Fibres	5	/	/
Autres	4,5	/	/
Total		5,13	100

2) Administration par gavage

L'extrait de *Garcinia cambogia* (GCE) contient un principe actif, l'acide hydroxycitrique (HCA), bloquant l'activité d'une enzyme clef de la lipogenèse. Des tests de gavage de cette molécule ont été réalisés dans le but d'étudier l'impact de la réduction de la lipogenèse sur l'expression de LSR et les répercussions sur le statut lipidique des souris.

Suivant différentes études (Amran, A. A., *et al.*, 2009, Soni, M. G., *et al.*, 2004), nous avons défini un écart de concentration d'extrait de *Garcinia cambogia* (GCE) à partir d'études de gavage réalisées chez les rats et de supplémentation alimentaire chez les souris, représentant 2 à 5% de la prise alimentaire des animaux. Nous avons adapté cette

concentration aux souris puis testé la solubilité de l'extrait. L'extrait a été dilué dans un mélange d'eau physiologique et d'huile de maïs (v : v). L'eau physiologique permet la solubilisation de l'extrait et l'huile de maïs permet une formation de micelles incorporant les lipides de cette huile avec la partie hydrophobe de l'extrait et facilite leur absorption au niveau des entérocytes. Après plusieurs tentatives, la concentration maximum soluble dans ce mélange a été définie comme étant 67 mg/mL après sonication de la préparation afin de rendre la solution plus soluble.

Le gavage a été réalisé avant la prise alimentaire quotidienne des souris. Les souris étant nocturnes, le gavage s'est fait le soir aux alentours de 18h.

a. Étude de l'effet de l'acide hydroxycitrique (HCA) sur l'expression de LSR : Effet dose

Durant la première étude, les souris C57Bl6/J femelles de 10 semaines ont été gavées chaque soir (18h) avec 300 µL d'une solution contenant un extrait de *Garcinia cambogia* (GCE) (Arkopharma, Carros, France) dont la composition peut être trouvée dans le tableau 10. 4 solutions contenant ou non des concentrations croissantes de GCE (0 mg/j, 5 mg/j, 10 mg/j et 20 mg/j) ont été administrées par gavage dans un volume final de 300µL à 10 souris C57Bl6/J femelles.

Nous avons traité les souris de la manière suivante :

- Groupe 0 mg/j : 2 souris ont été gavées avec une solution contenant 50% d'eau physiologique et 50% d'huile de maïs à raison de 300µL par jour. Ce mélange a été appelé le « véhicule ».
- Groupe 5 mg/j : 2 souris ont été gavées avec le véhicule contenant une quantité de GCE telle que les souris gavées avec 300µL de cette solution chaque jour ont reçu 5 mg/j de GCE, soit une concentration de 17 g/L de GCE.
- Groupe 10 mg/j : 3 souris ont été gavées avec le véhicule contenant une quantité de GCE telle que les souris gavées avec 300µL de cette solution chaque jour ont reçu 10 mg/j de GCE, soit une concentration de 33 g/L de GCE.
- Groupe 20 mg/j : 3 souris ont été gavées avec le véhicule contenant une quantité de GCE telle que les souris gavées avec 300µL de cette solution chaque jour ont reçu 20 mg/j de GCE, soit une concentration de 67 g/L de GCE.

Tableau 10: Composition des gélules d'extrait de *Garcinia cambogia*

Composition
Extrait de péricarpe de fruit de <i>Garcinia cambogia</i> (80%)
Anticoagulant: stéarate de magnésium
Enveloppe d'origine végétale: hydroxypropylméthylcellulose

Les concentrations des solutions finales de gavage étaient donc :

- 5 mg/j correspondant à une solution finale ayant une concentration de 17 g/L de GCE.
- 10 mg/j correspondant à une solution finale ayant une concentration de 33 g/L de GCE.
- 20 mg/j correspondant à une solution finale ayant une concentration de 67 g/L de GCE.

b. Étude de l'effet d'HCA sur l'expression de LSR : Dose 20 mg/j

La dose maximum (20 mg/j) de la première expérience a été retenue pour réaliser la deuxième expérience car elle a montré des conséquences très importantes sans avoir observé d'effets délétères.

Des problèmes de solubilité des solutions étant apparus au cours de la précédente étude, la deuxième étude a été menée avec l'utilisation d'un autre extrait de *Garcinia cambogia* plus soluble étant donné que l'acide hydroxycitrique était associé au calcium dans ce nouveau produit, augmentant sa solubilité (H G Preuss, Garis, et al. 2005; Downs, Manashi Bagchi, et al. 2005). C'est ainsi que nous avons poursuivi notre étude de suppression de la lipogénèse à l'aide du produit Pure Super CitriMax[®] (tableau 11) du laboratoire Natrol (Chatsworth, CA, USA).

Tableau 11: Composition des gélules Pure Super Citrimax[®]

Composition
Extrait de <i>Garcinia cambogia</i> (80% dont HCA 60%)
calcium (10%)
gélatine
eau
magnésium
stéarate

Les gavages ont porté sur 3 groupes de souris C57Bl6/J femelles de 10 semaines répartis ainsi :

- Groupe « Contrôle » : 10 souris ont été gavées 300 μ L/j avec uniquement de l'eau physiologique.
- Groupe « Huile de maïs » : 10 souris ont été gavées 300 μ L/j avec une solution contenant 50% d'eau physiologique et 50% d'huile de maïs.
- Groupe « GCE » : 10 souris ont été gavées 300 μ L/j avec la solution du deuxième groupe dans laquelle est incorporé l'extrait de *Garcinia Cambogia* (GCE) contenant le HCA. Cette solution a pour concentration de 67 g/L de GCE afin d'obtenir 20 mg dans un volume de 300 μ L de gavage quotidien.

4. Prélèvements sanguins

Les prélèvements sanguins ont été réalisés dans la cavité rétro orbitaire des souris sous anesthésie gazeuse (isoflurane). Un volume total de 100 μ L de sang a été récupéré à chaque prélèvement par capillarité en utilisant une pipette pasteur dans un tube en polypropylène contenant 5% d'EDTA. Le plasma a été immédiatement récupéré après une centrifugation de 5 minutes à 10 000 rpm puis dosé immédiatement ou stocké à -20°C pour des analyses ultérieures.

5. Prélèvements tissulaires

Lors du sacrifice, un échantillon de tissu adipeux épididymal a été prélevé ainsi qu'un muscle gastrocnémien, chacun rincé avec du PBS et plongé dans l'azote liquide dans des tubes ependorfs. De plus, le foie entier a été récupéré ainsi que le cœur, chacun rincé au PBS puis plongés dans l'azote liquide dans des tubes ependorfs.

6. Mesure de masse grasse

La masse grasse des souris a été réalisée par l'appareil EM-Scan modèle SA-3000 (EM-SCAN Inc, Springfield, MA). Ce système utilise la conductivité électrique du corps total pour mesurer un index de conductivité, utilisé pour calculer la masse maigre et la masse grasse de l'animal introduit dans l'appareil. Il est possible de détecter entre 5 et 30% de masse

grasse avec une corrélation de 0,98 avec les analyses chimiques. Il est nécessaire de calibrer l'appareil avant l'utilisation. Deux passages du même animal sont nécessaires suite à une faible anesthésie gazeuse à l'isoflurane. Des facteurs sont pris en compte dans ce calcul tel que la taille des souris et leur poids général.

Le calcul de la masse grasse se fait par l'équation :

$$MG = 100 - \left(\left[-3.732 + (0.578 * P) + \sqrt{(2.967 * (\sqrt{(MV * T)))} \right] / (P * 100) \right) / 1.12$$

7. Mesure de la calorimétrie

La calorimétrie a été mesurée par l'étude de la consommation en oxygène (VO₂) (Panlab Oxylet ; Bioseb, Paris, France). Après 24h d'adaptation des souris dans la cage d'étude, la VO₂ a été mesurée toutes les 45 minutes durant 24h. Les animaux n'étaient pas anesthésiés et aucun prélèvement sanguin n'avait été réalisé la semaine précédant cette mesure calorimétrique. La dépense énergétique moyenne durant les 24h a été calculée en utilisant les facteurs de conversion 4,8 kcal/L d'O₂ et 4,19 kJ/kcal (Stenger, C., *et al.*, 2010).

8. Mesure de la lipémie et élimination d'Intralipid

La lipémie postprandiale par gavage d'huile d'olive et l'élimination d'Intralipide (émulsion apportant des triglycérides) ont été réalisées sur des souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} femelles de 14 mois.

L'étude de l'élimination des TG a été réalisée par l'injection d'Intralipid en i.v. (10μL d'une solution contenant 2,6% d'Intralipid dans de l'eau physiologique) à 9h chez des souris n'étant pas à jeun. Les études précédentes ont montré que le pic de TG était observé 2 minutes après l'injection.

Afin d'étudier la lipémie postprandiale, des souris à jeun depuis 12h ont été gavées avec 300μL d'huile d'olive. Des échantillons sanguins ont été prélevés avant le gavage puis 1 ; 2 et 3h après le gavage dans des tubes contenant du paraoxon afin d'inhiber l'activité lipasique (Zambon, A., *et al.*, 1993). Les échantillons plasmatiques ont ensuite été congelés pour des dosages de TG ultérieurs.

9. Mesure de la sécrétion de VLDL

La sécrétion de VLDL a pu être établie chez les souris par injection de Tyloxapol (Triton WR1339), fourni par Sigma Aldrich qui permet de bloquer la dégradation des lipoprotéines. Les VLDL sécrétées par le foie n'ont pas été épurées de la circulation générale et leur contenu lipidique peut être dosé dans un échantillon plasmatique. A la fin du traitement à la leptine, ces souris ont été mises à jeun durant 3h avant de recevoir l'injection intraveineuse (i.v.) d'une solution d'eau physiologique ou de Tyloxapol (15% dans de l'eau physiologique) à raison de 500 mg/kg de poids de la souris. Un prélèvement de sang par la cavité rétro-orbitaire sous anesthésie gazeuse (isoflurane) a été réalisé avant l'expérience puis à 30 ; 60 et 120 minutes après l'injection. Le plasma récupéré de ces prélèvements a été immédiatement utilisé afin de doser les triglycérides grâce à un kit de dosage (Biomerieux, Capronne, France).

II. LES ÉTUDES CELLULAIRES

La lignée cellulaire cancéreuse d'hépatocytes de souris Hepa1-6 a été obtenue par LGC Promochem (Molsheim, France) et maintenue en milieu DMEM complet (milieu DMEM contenant 10% de sérum bovin, 100 mM de glutamine, 100 mM de pénicilline et streptomycine) à 37°C et 5% de CO₂. Cette lignée n'a été utilisée qu'à des passages inférieurs à 10. Pour les besoins de l'étude, elles ont été placées en plaques 6 puits à hauteur de 3.10^5 cellules par puits ou en plaques 24 puits puis laissées 48h afin d'obtenir une confluence de 80% avant le début de l'expérience. À la fin des 48h, les cellules sont lavées avec du PBS puis incubées pendant 1h à 37°C avec du milieu frais contenant la concentration en leptine. Pour l'étude avec l'inhibiteur α -amanitin ou PD98059, les cellules ont été pré-incubées durant 3h à 37°C avec ces agents puis incubées 1h avec le milieu DMEM contenant la leptine sans l'inhibiteur. Suite à cette heure de traitement, les cellules en plaques 6 puits ont été utilisées pour la réalisation d'immunoblots et de PCR quantitatives et les cellules en plaques 24 puits avec lamelles ont été utilisées pour la préparation d'immunofluorescence.

III. IMMUNOFLUORESCENCE

Les cellules fixées ont été perméabilisées par l'ajout de 0,1% de TritonX-100 dans du PBS contenant 0,1% de BSA (poids/volume). Les cellules ont ensuite été lavées puis incubées avec l'anticorps primaire anti-LSR (dilution à 1/100^{ème}) durant 1h à température ambiante. Les cellules ont ensuite été lavées 3 fois durant 5 minutes puis incubées avec l'anticorps secondaire anti-lapin IgG couplé avec l'AlexaFluor 488 (Invitrogen) pendant 1h à température ambiante. Les lamelles de cellules ont ensuite été lavées puis montées en lames grâce à Fluoromount (Sigma-Aldrich). Les cellules ont été visualisées en utilisant un microscope Nikon (Nikon, Tokyo, Japon), les images réalisées ont été prises à au moins 3 temps d'exposition différents. L'analyse de ces images a été faite en utilisant le programme ImageJ.

IV. PRÉPARATION DE MEMBRANES TOTALES DE FOIE DE SOURIS

Un échantillon de foie d'environ 300 mg a été déposé dans un tube contenant un tampon STM 1,5M (sucrose 85,58 g/L, Tris-HCl 788 mg/L, MgCl₂ 203,3 mg/L) à raison de 4 mL/g de tissu puis broyé à l'aide d'un ultraturax[®] (Fischer Bioblock) à une vitesse de 500 rpm permettant de séparer et casser les cellules. La mixture a ensuite été centrifugée une première fois à 800 g durant 10 minutes afin de culoter les débris cellulaires. La pellicule grasseuse à la surface de l'échantillon a été délicatement enlevée puis le surnageant a été récupéré et déposé dans un autre tube. L'échantillon a été centrifugé à 1 500 g durant 15 minutes dans le but de culoter les membranes totales. Le surnageant a été enlevé délicatement puis 3 mL de tampon STM 1,5M ont été ajouté afin de purifier les membranes totales après une autre centrifugation de 1 500 g durant 15 minutes. A ce stade, le culot cellulaire renfermait toutes les membranes d'un hépatocyte comprenant les membranes cellulaires ainsi que les membranes des organelles. Le surnageant a été enlevé et le culot cellulaire contenant les membranes totales a été récupéré dans 1 mL d'un tampon de lavage (Tris-HCl 20 mM, EDTA 2 mM, pH ajusté à 7,4) puis congelé à -20°C en attendant les analyses.

V. IMMUNOBLOTS

1. Préparations des lysats cellulaires

Les cellules en plaques 6 ou 24 puits ont été lavées 2 fois avec du PBS froid puis placées sur glace. D'une part, pour la préparation des immunoblots, 300µL d'un tampon RIPA (NaCl 8g/L ; Na₂HPO₄ 1,44g/L ; KH₂PO₄ 0,24g/L ; NP40 1% ; DOC 0,5% ; SDS 0,1% ; PMSF 1% ; Na₃VO₄ 1%) ont été déposés dans chaque puits, et les lysats cellulaires ont été récupérés puis centrifugés à 13 000 g pendant 30 minutes à 4°C. D'autre part, pour la réalisation des lames d'immunofluorescence, les cellules ont été fixées 15 minutes au paraformaldéhyde 4% dans du PBS. Pour finir, afin de réaliser les PCR quantitatives, les culots cellulaires ont été préparés, lavés avec du PBS puis congelés en vue d'une extraction ARN.

2. Préparation des westerns blots

Des gels SDS-PAGE ont été préparés avec un pourcentage d'acrylamide de 10% (H₂O, acrylamide 10%, tampon Tris 1,5 M, APS 10%, SDS 10%, Temed). Les échantillons ont été déposés dans les puits des gels à une quantité de protéines équivalente (20 à 30 µg) et à volume équivalent (complété avec du PBS). La migration des protéines par électrophorèse s'est faite durant 1h30 à 150 V dans un tampon de migration (Tris-HCl 25 mM, Glycine 192 mM, SDS 0,1%, qsp H₂O) puis les gels ont été transférés sur membranes de nitrocellulose (GE Healthcare) pendant 45 minutes à 350 mA dans un tampon de transfert (Tris-HCl 48 mM, Glycine 39 mM, SDS 0,0375%, qsp H₂O). La qualité du transfert a été vérifiée à l'aide d'une solution de Rouge Ponceau (Sigma) et a permis de déterminer l'homogénéité du dépôt de protéines sur la membrane. Après lavage avec un tampon TBST (Tris-HCl 20 mM, NaCl, qsp H₂O, pH ajusté à 7,4), les membranes sont incubées 1h avec une solution de saturation (tampon TBST contenant 5% de lait) puis 2h avec l'anticorps primaire (dilution à 1/500^{ème} s'il s'agit d'un anticorps venant du fournisseur Santacruz et 1/1000^{ème} pour les autres dans la solution de lait 5%). Les membranes ont ensuite été lavées avec le tampon TBST puis incubées 1h avec l'anticorps secondaire couplé à une peroxydase. Suite à ces incubations, les membranes sont lavées puis révélées par un lit de chimioluminescence (GE Healthcare, Orsay,

France). Les analyses densitométriques ont été réalisées en utilisant le logiciel ImageJ (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA; <http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>).

VI. EXTRACTION LIPIDIQUE

Environ 50 mg d'échantillon de tissu congelé a été déposé dans un tube et lyophilisé durant 5h. Suite à la lyophilisation, une solution de chloroforme/méthanol (2:1) a été ajoutée au tube (100-200 µL) et le tube a été vortexé pendant 1 minute toutes les 20 minutes durant 1h. La solution de chloroforme/méthanol a ensuite été récupérée dans un autre tube et l'extraction a été renouvelée deux autres fois. Les dosages lipidiques ont été réalisés après évaporation d'une faible quantité de la solution récupérée (10-50 µL) avant l'ajout du réactif du kit de dosage. Les valeurs obtenues ont tenu compte des dilutions réalisées (quantité de solution ajoutée à chaque extraction et quantité déposée pour évaporation et dosage).

VII. PROFIL LIPOPROTÉIQUE

Une quantité de 210 µL d'échantillons plasmatiques a été ajoutée à 290 µL de tampon phosphate de 30 mM contenant 150 mM NaCl, 1 mM EDTA et 0.02 % azide de sodium, pH 7.4. L'ensemble a été passé dans une colonne Superose 6 10-300 GL (GE Healthcare) dans un système AKTA Explorer 10 équilibré avec le même tampon. (0.2 mL/min). 30 fractions de 500 µL ont été collectées avec lesquelles les lipides (TC et TG) ont été analysés en utilisant les kits de détections (Biomerieux, Craonne, France).

VIII. ANALYSE QPCR DE LYSAT OU DE TISSU

Un échantillon de foie congelé (30 mg) ou de culot cellulaire ($1-2 \cdot 10^6$ cellules) a été homogénéisé dans un réactif *QIAzol Lysis* (Qiagen, Courtaboeuf, France). Les ARN ont été extraits en utilisant le minikit *RNeasy lipid tissue* (Qiagen) puis l'intégrité des ARN a été testée en vérifiant la présence de bandes 28S et 18S en gel d'agarose. Ensuite 10µg d'ARN totaux ont été utilisés afin de réaliser une RT-PCR pour laquelle on obtiendra environ 500 ng d'ADNc. Les réactifs utilisés étaient Applied Biosystems (Foster City, CA, USA), *SYBER Green PCR Master Mix* puis *StepOnePlus real-time PCR system* (Applied Biosystems). Le

gène référence utilisé a été *hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase* (HPRT). L'expression relative a été calculée en utilisant le logiciel *Relative Expression Software Tool* (REST) 2009.

IX. ANALYSES BIOCHIMIQUES

1. Dosages ELISA

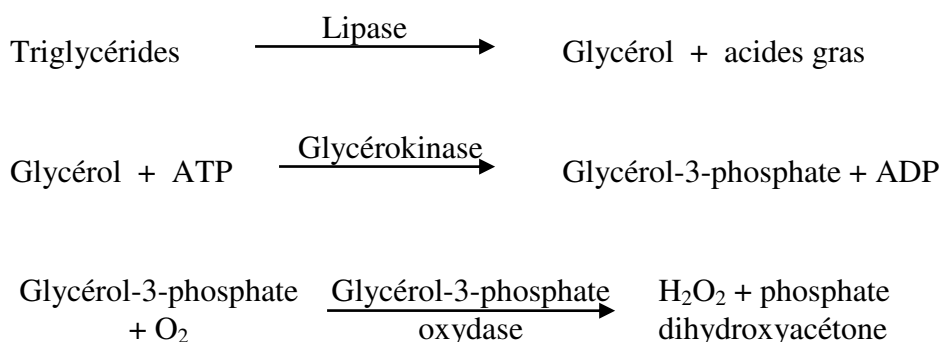
Des kits *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) ont été utilisés afin de détecter la leptine et l'adiponectine. Ces kits ont été fournis par R&D Systems (Lille, France), et l'insuline a été détectée en utilisant un kit ELISA fourni par millipore (Billerica, MA, USA). La technique de l'ELISA repose sur une technique de "sandwich" entre une quantité d'anticorps précise, l'échantillon contenant la molécule détectée par l'anticorps et un autre anticorps couplé à une enzyme peroxydase fluorescente.

2. Dosages lipidiques

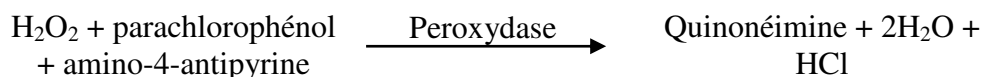
Les kits enzymatiques de dosage lipidique (triglycérides et cholestérol total) ont été fournis par Biomerieux (Craponne, France) et le kit de dosage des phospholipides a été fourni par mti-diagnostics (Idstein, Allemagne).

1) Dosage des triglycérides

Les triglycérides d'un échantillon plasmatique ou tissulaire ont été dosés selon le principe :



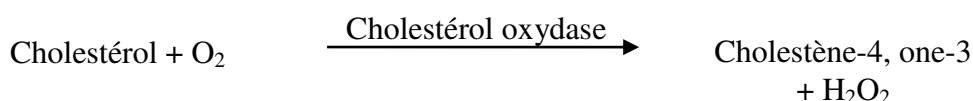
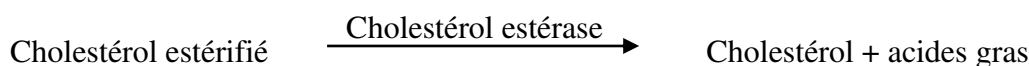
L'eau oxygénée formée est dosée selon une réaction de type TRINDER :



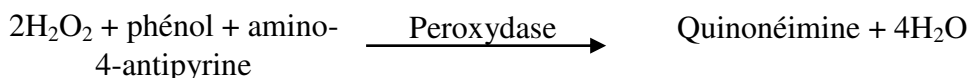
L'intensité de la coloration de la quinonéimine, mesurée à une longueur d'onde de 505 nm, est proportionnelle à la quantité de triglycérides présente dans l'échantillon.

2) Dosage du cholestérol total

Le cholestérol total d'un échantillon plasmatique ou tissulaire a été dosé selon le principe suivant :



L'eau oxygénée formée est dosée de la même manière que les triglycérides :



L'intensité de la coloration de la quinonéimine, mesurée à une longueur d'onde de 500 nm, est proportionnelle à la quantité de cholestérol total présente dans l'échantillon.

3) Dosage des phospholipides

Le dosage des phospholipides repose sur une méthode enzymatique d'après le mode Trinder. La première étape est l'hydrolyse des phospholipides en présence de phospholipase D et de choline sur les acides phosphatidiques. La deuxième étape est l'oxydation de la choline par la choline oxydase bétaine et le peroxyde d'hydrogène. En présence de peroxydase (POD), le peroxyde d'hydrogène réagit avec le 4-aminoantipyrine (PAP) et le phénol pour donner une chinonimine rouge. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la quantité de phospholipides.

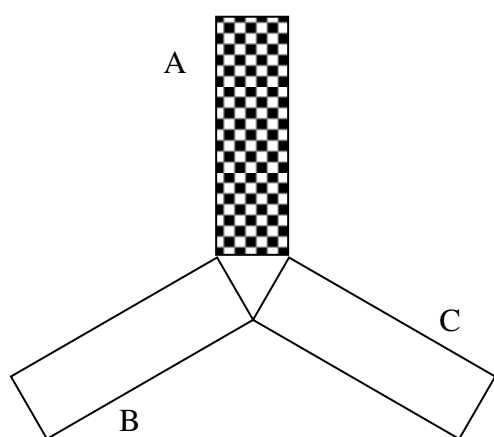
3. Dosages des protéines par la méthode de Lowry

Le dosage par la méthode Lowry consiste en une interaction entre le cuivre alcalin et les liaisons peptidiques qui entraîne la formation d'un complexe coloré (violet pourpre) dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en protéines.

Une gamme étalon a été préparée en utilisant de la BSA purifiée. Chaque échantillon a été dosé en double. Une dilution de chaque échantillon a été préparée à laquelle a été ajouté le réactif C composé de 1% de réactif B (4% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) et 99% de réactif A (2% Na_2CO_3 , 0,16% Na-Tartrate, 0,2% SDS, 0,4% NaOH) puis ce mélange a été laissé 30 minutes sous agitation à température ambiante. Le réactif D (Réactif de Folin Ciocalteus dilué 1 : 1 (v/v) dans H_2O) a été ajouté et incubé sous agitation à température ambiante durant 20 minutes. Pour finir, 200 μL de cette solution a été déposée dans une plaque 96 puits afin d'être dosée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 750 nm.

X. ANALYSE DU STATUT COGNITIF

Le comportement représente les actions et réactions comme résultats finaux du système nerveux au niveau de tout l'organisme en réponse à des stimuli externes ou internes. De nombreux tests comportementaux existent pour tester la mémoire chez un modèle murin. Ce test permet d'estimer la capacité cognitive instantanée de la souris en se basant sur son instinct d'exploration.



Le labyrinthe en Y se compose de 3 branches en Plexiglas opaques de 40 cm de long, 16 cm de haut et 9 cm de largeur et longueur égales mais ayant un marquage au sol différent d'une branche à une autre et sous faible exposition lumineuse (Starter et al., 1988). La hauteur de ce labyrinthe est telle que les souris sont incapables de voir ce qu'il se passe à l'extérieur de ce labyrinthe. Les souris sont déposées au fond d'une branche du Y et chaque souris est laissée dans le labyrinthe durant 5 minutes.

Par instinct, la souris cherche à explorer son environnement. L'entrée dans une branche par la souris a été comptabilisée uniquement lorsque le corps entier se trouvait dans la branche. Le nombre de branches explorées et le nombre d'alternances réalisées ont été comptabilisés. L'alternance consiste à ne pas retourner dans la dernière branche explorée. Par exemple le trajet CBC n'est pas compté comme étant une alternance alors que le trajet ACB est compté comme étant une alternance. Le pourcentage d'alternance a été calculé par l'équation

$$\text{pourcentage d'alternance} = \text{nombre d'alternances} / (\text{totales des entrées} - 2)$$

XI. ANALYSES STATISTIQUES

Le choix du test de Student a été motivé par la possibilité d'utiliser un test unilatéral contrairement aux tests non paramétriques tels que le test de Mann et Whitney. Bien que le test de Student nécessite un échantillon plus important (supérieur à 30), les valeurs de probabilité obtenues avec ces deux tests ont été établies comme étant très proches, c'est pourquoi le test de Student a été utilisé pour nos analyses.

Les études statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel statistique Statview. Les significativités des corrélations ont été établies sur la base de la table de R de Bravais Pearson (Tableau 12). Le logiciel Statview a été utilisé pour la réalisation des régressions multiples, les régressions pas à pas et les matrices de corrélations.

Tableau 12: Coefficient de corrélation linéaire. Table R de Bravais Pearson

v / a	0.10	0.05	0.02	v / a	0.10	0.05	0.02
1	0.9877	0.9969	0.9995	16	0.4000	0.4683	0.5425
2	0.9000	0.9500	0.980	17	0.3887	0.4555	0.5285
3	0.8054	0.8783	0.9343	18	0.3783	0.4438	0.5155
4	0.7293	0.8114	0.8822	19	0.3687	0.4329	0.5034
5	0.6694	0.7545	0.8329	20	0.3598	0.4227	0.4921
6	0.6215	0.7067	0.7887	25	0.3233	0.3809	0.4451
7	0.5822	0.6664	0.7498	30	0.2960	0.3494	0.4093
8	0.5494	0.6319	0.7155	35	0.2746	0.3246	0.3810
9	0.5214	0.6021	0.6851	40	0.2573	0.3044	0.3578
10	0.4973	0.5750	0.6581	45	0.2428	0.2875	0.3384
11	0.4762	0.5529	0.6339	50	0.2306	0.2732	0.3218
12	0.4575	0.5324	0.6120	60	0.2108	0.2500	0.2948
13	0.4409	0.5139	0.5923	70	0.1954	0.2319	0.2737
14	0.4259	0.4973	0.5742	80	0.1829	0.2172	0.2565
15	0.4124	0.4821	0.5577	90	0.1726	0.2050	0.2422
				100	0.1638	0.1946	0.2301

v: le degré de liberté. v = n-p-1 avec n: le nombre d'observations,
p: le nombre de variables explicatives. a : le risque d'erreur.

Chapitre 3 :
Régulation de l'expression de LSR
par la leptine : un levier potentiel
pour la clairance lipidique en phase
postprandiale

I. INTRODUCTION

Lors de l'ingestion d'un repas, les lipides alimentaires sont absorbés au niveau de l'intestin, assemblés en esters de cholestérol et en triglycérides au sein des entérocytes puis sécrétés sous forme de chylomicrons riches en apolipoprotéines B (ApoB) dans la circulation sanguine. Les taux de lipides plasmatiques circulants en phase postprandiale représentent la lipémie postprandiale. Les chylomicrons ont donc en charge de distribuer leurs lipides aux tissus périphériques pour leur utilisation en tant que substrat énergétique ou leur stockage puis, dépourvus d'une partie de leur contenu lipidique, les résidus de chylomicrons reviennent au foie où ils sont captés par les récepteurs lipoprotéiques. La rapidité à laquelle ils sont épurés de la circulation sanguine dépend principalement de l'hydrolyse des TG par le système lipasique et représente une étape critique. En effet, une lipémie postprandiale élevée peut représenter un facteur de risque important pour de nombreuses pathologies telles que l'athérosclérose (Boquist, S., *et al.*, 1999, Groot, P. H., *et al.*, 1991, Zilversmit, D. B., 1979), l'obésité et plus généralement le syndrome métabolique (Couillard, C., *et al.*, 1998, Guerci, B., *et al.*, 2000, Lewis, G. F., *et al.*, 1990).

Nous avons récemment montré qu'il existait un récepteur hépatique aux lipoprotéines, le *lipolysis stimulated lipoprotein receptor* (LSR), impliqué dans la régulation de la lipémie postprandiale à travers la clairance des chylomicrons de la circulation sanguine au niveau de l'espace de Disse (Yen, F. T., *et al.*, 2008). En effet, chez les souris déficientes en LSR (LSR^{-/-}), la clairance des lipoprotéines est perturbée, menant à l'augmentation des triglycérides et du cholestérol plasmatiques (Yen, F. T., *et al.*, 2008). LSR semble donc impliqué dans la disponibilité des lipides pour les tissus périphériques. Lors d'un stress lipidique tel qu'un régime hyperlipidique, les souris LSR^{+/-} montrent une prise de poids corrélée avec leurs TG et cholestérol plasmatiques beaucoup plus importante que les souris contrôles LSR^{+/+}. Ces résultats suggèrent que la déficience en LSR, menant à la réduction de la clairance des lipoprotéines riches en ApoB, augmente le temps de présence des lipides dans la circulation sanguine et de ce fait l'apport lipidique aux tissus périphériques.

Parmi ces tissus périphériques, le tissu adipeux est le site majeur de stockage lipidique dû à sa capacité illimitée d'accumulation de TG. Au-delà de son rôle de stockage, ce tissu est aussi connu comme étant un organe endocrine, sécrétant un certain nombre d'adipokines dans la circulation sanguine. La leptine est une de ces adipokines, sécrétée par le tissu adipeux, ce qui permet d'établir un lien entre la prise alimentaire et le stockage lipidique à travers son

action de facteur de satiété au niveau du noyau arqué de l'hypothalamus (Friedman, J. M. and Halaas, J. L., 1998, Leshan, R. L., *et al.*, 2006). La fixation de la leptine sur la forme longue de son récepteur (Ob-Rb) permet l'activation de la voie de signalisation JAK/STAT (Signore, A. P., *et al.*, 2008) et l'*extra cellular signal-regulated kinase* (ERK) (Banks, A. S., *et al.*, 2000) menant à la transcription des gènes anorexigènes (Elmquist, J. K., *et al.*, 1998, Schwartz, M. W., *et al.*, 2000). Chez les modèles murins d'obésité (*ob/ob* et *db/db*) n'ayant pas de leptine circulante ou pas de voie de signalisation pour transporter et répondre à cette hormone, la prise alimentaire est augmentée avec pour conséquence l'augmentation de la masse grasse associée à l'intolérance au glucose (Friedman, J. M. and Halaas, J. L., 1998). De plus, la leptine est maintenant reconnue pour exercer des effets au niveau du métabolisme périphérique, incluant la régulation de la production d'insuline par les cellules β pancréatiques (Kahn, B. B., *et al.*, 2005, Morioka, T., *et al.*, 2007).

Nous avons remarqué qu'au cours du vieillissement, les souris LSR^{+/-} développent une dyslipidémie modérée et montrent aussi des changements significatifs de la distribution lipidique, notamment au niveau du tissu adipeux. Cela nous a mené à étudier le rôle potentiel de la leptine en tant que régulateur du récepteur lipoprotéique LSR dans le foie.

**Upregulation of hepatic lipolysis stimulated lipoprotein receptor by leptin:
a potential lever for controlling lipid clearance during the postprandial
phase**

Christophe Stenger^{1*}, Marine Hanse^{1*}, Dagmar Pratte¹, Marie-Ludvine Mbala¹, Samina Akbar¹, Violette Koziel¹, Marie-Christine Escanyé^{1,2}, Badreddine Kriem¹, Catherine Malaplate-Armand^{1,2}, Jean-Luc Olivier^{1,2}, Thierry Oster^{1,3}, Thierry Pillot¹, Frances T. Yen¹

* co-authors, ¹Lipidomix, Nancy University-INPL ENSAIA, Vandoeuvre-lès-Nancy, France,

²Clinical Biochemistry Department, CHU Nancy, and ³UFR SciFA, University of Paul Verlaine Metz,
France

Running title: Leptin regulation of hepatic LSR

Address correspondence and reprint requests to : F.T. Yen, Lipidomix, Nancy University-INPL ENSAIA, 2 ave de la Forêt de Haye, 54501 Vandoeuvre-lès-Nancy, France; Telephone +33.(0)3.83.59.61.84; Fax: +33.(0)3.83.59. 61.81; E-mail: frances.yenpotin@ensaia.inpl-nancy.fr

ABSTRACT

As a hepatic receptor for triglyceride-rich lipoproteins, the lipolysis stimulated lipoprotein receptor, LSR, may be involved in the dynamics of lipid distribution between the liver and peripheral tissues. Here, we explore the potential role of leptin in regulating LSR. At physiological concentrations (1-10 ng/mL), leptin increased LSR protein and mRNA levels in Hepa1-6 cells through an Erk1/2-dependent and α -amanitin-sensitive pathway. *In vivo* leptin treatment of C57Bl6/Rj mice (1 μ g twice daily, 8 days) led to a significant increase in hepatic LSR mRNA and protein, decreased liver triglycerides and increased VLDL secretion as compared to controls. LSR^{+/-} mice with elevated postprandial lipemia placed on a high-fat (60% kcal) diet exhibited accelerated weight gain and increased fat mass as compared to controls. While plasma leptin levels were increased 3-fold, hepatic leptin receptor protein levels and phosphorylation of Erk1/2 were significantly reduced. Therefore, leptin is an important regulator of LSR protein levels providing the means for the control of hepatic uptake of lipids during the postprandial phase. However, this may no longer be functional in LSR^{+/-} mice placed under a chronic dietary fat load, suggesting that this animal model could be useful for the study of molecular mechanisms involved in peripheral leptin resistance.

Additional keywords: leptin receptor, liver, adipose tissue, peripheral leptin resistance

INTRODUCTION

Postprandial lipemia represents the transitory increase in plasma lipids, primarily triglycerides, due to the processing of dietary fats following ingestion of a meal. The rapid removal of these exogenously-derived lipids is critical in order to avoid prolonged accumulation in the circulation. Indeed, elevated postprandial lipemia is a risk factor that is associated with a number of disorders. It has been reported to be related to risk of atherosclerosis (1-3), and is often associated with metabolic diseases such as obesity (4-7). The regulation of postprandial lipemia has been the subject of numerous studies. A number of factors influence the degree of lipemia during the postprandial phase, among which includes the hydrolysis of triglycerides (TG) by the lipolytic system in the periphery, as well as in the space of Disse [for review, (8, 9)]. Indeed, reduced sulfation of heparan proteoglycans in the liver leads to a significant increase in postprandial lipemia (10). The final destination of the dietary lipids in the form of chylomicron residual particles nevertheless remains the hepatocyte via receptor-mediated endocytosis (11).

We have recently demonstrated that the hepatic lipolysis stimulated lipoprotein receptor (LSR) was actively implicated in the regulation of postprandial lipemia (12). Indeed, in mice with reduced expression of LSR (LSR^{+/-}), lipoprotein clearance was impaired leading to increased triglyceride and cholesterol levels due to the accumulation of atherogenic apoB-containing particles in the plasma (12). As a hepatic receptor for the removal of lipoproteins during the postprandial phase, LSR could be involved in determining the availability of lipids for the peripheral tissues. Indeed, we observed that when mice with reduced LSR expression (LSR^{+/-}) were placed on a Western-type cholesterol-containing diet, the increase in body weight was directly correlated with the increase in plasma cholesterol and TG, unlike their control littermates (12), suggesting that the delayed clearance of apoB-containing lipoproteins due to decreased LSR could lead to increased influx into the circulation and therefore non-hepatic peripheral tissues.

Among the peripheral tissues, the adipose tissue is the site for energy storage due to its unlimited capacity to accumulate triglycerides. It has been recognized to play an active role as an

endocrine organ, sending signals to other tissues through the secretion of adipokines into the circulation. Leptin is the adipokine which provides the link between food intake and energy storage in the adipose tissue, through its action as satiety factor at the level of the arcuate nucleus of the hypothalamus (13, 14), the feeding control center in the brain. Binding of leptin to the long form of its receptor (Ob-Rb) leads to activation of the JAK/STAT pathway (15) and extracellular signal-regulated kinase (Erk) (16), which in turn results in enhanced transcription of genes coding for anorectic hormones (17, 18). The absence of leptin or inhibition of leptin signaling is sufficient to lead to increased food intake, and as a consequence, increased fat mass associated with glucose intolerance as demonstrated in *ob/ob* and *db/db* mouse models, which lack either the protein or the signaling-competent form of its receptor, respectively (13). Leptin has now been recognized to exert peripheral effects, including the regulation of insulin production in pancreatic β -cells (19, 20).

During our studies of the LSR^{+/-} mice, we observed significant changes in tissue lipid distribution in aging LSR^{+/-} mice, most notably in the adipose tissue, which led us to investigate the potential role of leptin as regulator of this lipoprotein receptor in the liver.

MATERIALS AND METHODS

Materials and Antibodies

All chemicals and solvents were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) unless otherwise indicated. Cell culture media and supplements were obtained from Invitrogen (Cergy Pontoise, France). Anti-LSR and anti β -tubulin antibodies were purchased from Sigma-Aldrich and anti-Ob-R from Abcam (Paris, France) (for cell lysates) and Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) (for liver membranes). Erk1/2, phosphorylated Erk1/2 (p-Erk1/2), AkT, phosphorylated AkT (p-AkT) ATP citrate lyase (ACL) antibodies and PD98059 were obtained from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Anti-fatty acid synthase (FAS) antibodies were purchased from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France). Mouse recombinant leptin was purchased from Merck Chemicals (Fontenay-sous-Bois, France). Secondary anti-mouse and

anti-rabbit HRP-conjugated antibodies were acquired from Santa Cruz Biotechnology and Cell Signaling Technology, respectively.

Animal studies

The production and genotyping of LSR heterozygote mice on a C57Bl6/Rj background have been described earlier (12). All animals were provided a normal rodent chow diet and water *ad libitum* in a room maintained on a 12-h light/dark cycle with a mean temperature of 21-22 °C and relative humidity of 50 ± 20%. Animals were handled in accordance with French State Council guidelines for the use and care of laboratory animals.

For the leptin treatment study, ten-week old C57Bl6/Rj male mice (Janvier Breeding, Le Genest St Isle, France) were injected *ip* with PBS or leptin (1 µg/injection) in phosphate buffered saline (PBS) twice daily at 9AM and 6PM for 7 days, during which the body mass and food intake were monitored. In order to measure food intake, mice were housed individually in cages. The wire lid containing the same amount of food pellets was measured before at 9AM, and then 24h later to determine the food intake. Care was taken to take into account any pellets that may have fallen into the cage. On day 8, the last injection was performed at 9AM, food was removed from the cages, and the animals were sacrificed at noon. This experiment was performed in 2 separate experiments using 2 different leptin lots and on a total of 7 mice injected with PBS and 8 mice injected with leptin. Similar results in food intake and weight change were observed. Livers were perfused with PBS, followed by preparation of homogenates and total liver membranes as described previously (12). Membrane-free cytosolic fractions from the homogenates were used for detection of Erk1/2 and its phosphorylated form. Liver samples (30-100 mg) were also snap frozen in liquid nitrogen for determination of TG content after lipid extraction or for total RNA extraction.

In a group of animals from the leptin treatment study, VLDL secretion was measured using the Tyloxapol (Triton WR1339) method to block degradation of lipoproteins. After the last injection on day 8, the mice were fasted for 3 h, and then injected *iv* (tail vein) with 15% Tyloxapol (Sigma-Aldrich) in physiological saline (500 mg/kg body weight). Blood samples were taken before (0), 30, 60 and 120 min after injection, by retro-orbital bleeding after isofluorane anesthesia. Plasma (EDTA)

was immediately recovered by centrifugation and stored at -20°C for later analysis of plasma TG content. Because of the Tyloxapol injection, the livers of these animals were not used in any of the biochemical or expression analyses.

In the high-fat diet study, 10-week old LSR^{+/-} and LSR^{+/+} were placed on a high fat diet (60% kcal primarily from lard, SDS Dietex, Saint Gratien, France) provided *ad libitum*. Mice were weighed on a regular basis, and food intake was measured weekly. For analyses of leptin, adiponectin, and insulin, blood was obtained from fasting (3 h) animals. Plasma was stored at -20°C for later analysis. Body fat mass was measured using the EM-Scan (21). Near the end of the study (week 9), oxygen consumption (vO₂) was measured in the animals using indirect calorimetry (Panlab Oxylet, Bioseb, Paris, France). After a 24 h adaptation period, measurements of vO₂ were taken every 45 min for 24 h starting from 9AM. The animals were neither anesthetized nor were blood samples taken the week before the calorimetric measurements. Average energy expenditure over the time period was calculated using the conversion factors 4.8 kcal/L O₂ and 4.19 kJ per kcal.

Postprandial lipemia after gavage with olive oil, and clearance of Intralipid was measured in 14-month old female LSR^{+/+} and LSR^{+/-} mice as described previously (12).

Cell culture studies

The mouse Hepa1–6 liver cell line was obtained from LGC Promochem (Molsheim, France). Cells were maintained in high glucose DMEM containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 100 mM glutamine, 100 mM penicillin and streptomycin, as described (12), and used only at low passages (< 10). Cells were seeded either in 6-well plates (3 x 10⁵ cells/well) or in 24-well plates on cover slides, and then grown for 48 h to achieve 80% confluence before use in experiments. On the day of the experiment, cells were washed in PBS, and then incubated at 37°C for 1 h with fresh growth media containing the indicated concentrations of leptin. In experiments using the inhibitors α -amanitin or PD98059, cells were pre-incubated for 3 h with these agents. After which, cells were incubated 1 h at 37°C with fresh media containing leptin and inhibitor. Cells were then placed on ice, and washed 2 times with ice-cold PBS. For Western blotting, cell lysates were prepared using ice-cold RIPA buffer, followed by centrifugation at 13,000 x g for 30 min at 4°C. Protein was measured in the recovered

supernatants using the Lowry assay. For immunofluorescence studies, cells were fixed 15 min at room temperature in 4% paraformaldehyde in PBS. For real-time PCR analysis, cell pellets were prepared, washed with PBS and snap-frozen for total RNA extraction.

Western blotting

Identical amounts of protein (20-30 µg) were applied to Novex 4–12% (Invitrogen) gradient or 10% SDS-PAGE gels. After electrophoresis, separated proteins were transferred onto nitrocellulose membranes for Western blotting as described previously (12). Loading was systematically verified using Red Ponceau staining. Bands were revealed by chemiluminescence (GE Healthcare, Orsay, France) using a peroxidase-conjugated secondary antibody and a chemiluminescence kit (GE Healthcare). Densitometric analysis of the autoradiographs was performed using ImageJ software (National Institute of Health, <http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>).

Immunofluorescence studies

Fixed cells were permeabilized using 0.1% TritonX-100 in PBS containing 0.1% (w/v) BSA. After washing in PBS, cells were incubated with anti-LSR (1/100th dilution) for 1 h at room temperature. For detection, cells were then incubated with anti-rabbit IgG conjugated with Alexafluor 488 (Invitrogen). Cells were washed and mounted on slides using Fluormount (Sigma-Aldrich). Cells were visualized using a Nikon microscope and digitized images were taken using identical exposure times of at least 3 different areas. Analysis was performed on individual cells using ImageJ as described previously (12).

Real-time PCR analysis of LSR mRNA levels

Frozen liver samples (30 mg) or cell pellets (1-2 x 10⁶ cells) were homogenized in QIAzol Lysis reagent (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to manufacturer's instructions. Total RNA was extracted using RNeasy lipid tissue mini-kit (Qiagen); the integrity of the RNA was verified by the presence of 28S and 18S bands on agarose gels. Ten micrograms of total RNA was used for RT from which 500 ng was used for real-time PCR as previously described (12). Reactions were prepared using the Applied Biosystem SYBR Green PCR Master Mix and then performed on the StepOnePlusTM Real-time PCR system (Applied Biosystems). Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase

(HPRT) was used as the reference housekeeping gene. Relative expression calculations and statistical analyses were performed using the Relative Expression Software Tool (REST) 2009.

Biochemical analyses

Plasma TG was measured using an enzymatic kit (Biomerieux, Craonne, France) according to manufacturer's instructions. Leptin, adiponectin and insulin were measured by ELISA (R&D Systems, Lille, France).

Statistical analysis

All results are shown as the mean $\pm$ SEM, unless otherwise indicated. Statistical analysis was performed using Student's *t* test; significance was considered as $p < 0.05$.

RESULTS

Our first goal in this study was to determine the effect of leptin on hepatic LSR *in vitro* using the mouse hepatoma cell line Hepa1-6, which has previously been demonstrated to exhibit LSR activity and expression (12). Hepa1-6 cells were incubated for 1 h with increasing concentrations of leptin typically found in the physiological range (1-10 ng/mL). Western blots revealed a significant increase in LSR protein induced by leptin concentrations even at levels as low as 1 ng/mL (Fig. 1A, upper panel). Leptin signaling through interaction with its receptor, Ob-Rb is known to be mediated through several pathways, one of which is the phosphorylation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) family member Erk (16-18, 22, 23). On the same nitrocellulose membrane, an increase in p-Erk1/2 was detected (Fig. 1A, middle panel); there was no detectable change in Erk1/2 (Fig. 1A, lower panel). The ratio between the LSR and Erk1/2 signal was increased by 38-44% in cells treated with leptin as compared to that measured for cells incubated in absence of leptin. We verified that these cells express Ob-R, whose levels did not significantly change in cells incubated with increasing concentrations of leptin (data not shown). Leptin interaction with Ob-R is also known to activate phosphorylation of AkT. However, we were unable to detect p-AkT at these concentrations of leptin (data not shown). Studies using the mitogen activated protein kinase (MEK) inhibitor PD98059 showed that when Erk1/2 phosphorylation was inhibited before treating cells with leptin (Fig. 1B,

middle panel), the increase in LSR protein expression in response to leptin was no longer observed (Fig. 1B, upper panel). These results therefore indicate that the observed increase of LSR protein is most likely mediated by leptin through its canonical downstream signaling form, p-Erk1/2.

Immunofluorescence studies were next performed where staining with anti-LSR followed by detection with a fluorescent secondary antibody revealed both intracellular and surface staining of this receptor (Fig. 1C, upper left panel). Image analysis revealed that the fluorescence signal of this staining was significantly increased in cells incubated with 10 ng/mL leptin as compared to control cells (Fig. 1C, upper right panel and bar graph). These results were therefore in agreement with those of the immunoblots in Figure 1A. In order to determine if *de novo* transcription of LSR was induced by leptin, as suggested by the phosphorylation of Erk1/2, Hepa1-6 cells were pre-incubated 3 h at 37°C with α -amanitin, and then incubated 1 h with 10 ng/mL leptin in fresh media containing α -amanitin. Treatment with this RNA polymerase inhibitor abolished the leptin-mediated increase in LSR protein levels (Fig. 1C, lower panels and bar graph), suggesting therefore that this leptin effect was mediated at least in part through increased transcription. This was further supported by results from real-time PCR, which revealed that LSR mRNA expression relative to that of the reference housekeeping gene HPRT was significantly increased in cells incubated in the presence of the same concentrations of leptin used that led to an increase in LSR protein (Fig. 1A and 1D).

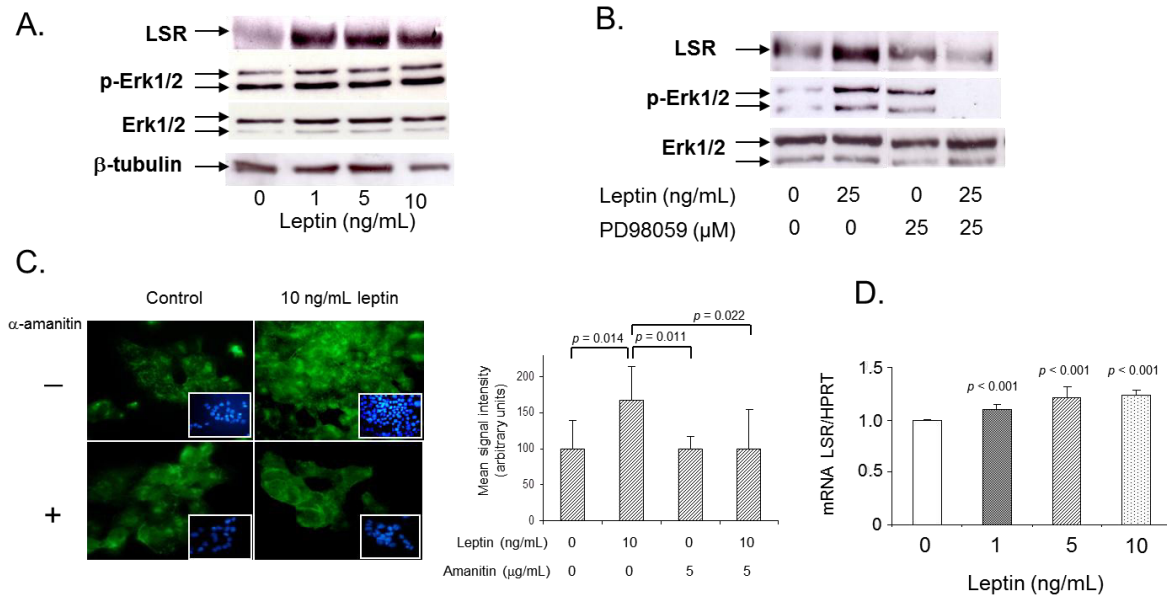


Figure 1: Effect of leptin treatment on LSR protein and mRNA levels in Hepa1-6 cells. **A.** Hepa 1-6 cells were incubated at 37°C for 1 h with increasing concentrations of leptin. Western blots were then performed to detect LSR, Erk1/2, or p-Erk1/2, and β-tubulin, as described in Materials and Methods. **B.** In another set of plates, Hepa1-6 cells were preincubated 3 h at 37°C in the absence or presence of 25 μM PD98059 before addition of 25 ng/mL leptin. Cells were further incubated at 37°C for 1 h in fresh media containing the inhibitor. Western blots were performed to detect LSR, Erk1/2 and p-Erk1/2 as indicated; the same nitrocellulose membrane was used to detect the three proteins. Representative blots are shown from experiments using three different cell preparations. **C.** Representative images of LSR staining in Hepa1-6 cells incubated at 37°C for 1 h with 0 or 10 ng/mL leptin are shown (upper panels), with corresponding DAPI staining of nuclei as inserts. Images of cells preincubated with 5 μg/mL α-amanitin for 3 h before leptin treatment as described in Materials and Methods are shown in the lower panels. Mean ± SD of signal intensity after image analysis is summarized in the bar graph adjacent to the cell photos. **D.** mRNA levels of LSR were determined in cells incubated with the indicated concentrations of leptin using real-time PCR as described in Materials and Methods. Results are shown as mean ± SD (triplicate determinations) of LSR mRNA expression relative to HPRT used as reference housekeeping gene. Only *p*-values for significant differences are indicated; for D, *p* values are for tests comparing PBS-treated cells to leptin-treated cells.

We next sought to determine if we could observe a similar leptin-mediated increase of LSR *in vivo*. C57Bl6/Rj mice were injected *ip* twice daily at 9AM and 6PM with 1 μg mouse leptin per injection. Daily monitoring of the mice revealed no detectable change in food intake (data not shown). However, body weight decreased continuously during the treatment with leptin, and reached significance between day 4 and day 6 (Fig. 2A). After 7 days of treatment, mice were sacrificed on day 8 and total liver membranes and extracts were prepared. In mice treated with leptin, a significant increase in hepatic LSR in membranes was observed as compared to mice treated with PBS (Fig. 2B, upper panel). Immunoblot detection revealed no detectable difference in liver membrane Ob-R

between mice injected with PBS and those injected with leptin (Fig. 2B, lower panel). Analysis of LSR expression relative to that of Ob-R showed that LSR was significantly increased by more than 60% in leptin-treated mice as compared to controls (Fig. 2B, bar graph). Further, real-time PCR analysis indicated that LSR mRNA expression was increased almost 2-fold in mice that had been treated with leptin (Fig. 2C). These *in vivo* results therefore are in keeping with our cell culture studies which show that leptin can modulate hepatic LSR protein and mRNA levels. Interestingly, TG content in liver samples was measured and found to be slightly but significantly decreased in the animals that were treated with leptin (Fig. 2D). A previous study reported that treatment of leptin could lead to decreased lipogenesis by reducing expression of key enzymes involved in TG synthesis including ACL and FAS. Even though our study used 20-fold less leptin, we sought to determine if the expression of these two enzymes were affected. Immunoblots revealed only a very small decrease in expression of ACL, and no change in FAS protein levels (Fig. 2E). We next measured TG output from the liver using the Tyloxapol method to inhibit lipoprotein removal from the circulation. Results revealed that in the initial 30 minutes after *iv* injection of Tyloxapol, a greater amount of TG was released from the liver in leptin-treated mice as compared to controls (Fig. 2F). This could contribute to the lower hepatic TG content observed in animals injected with very low doses of leptin.

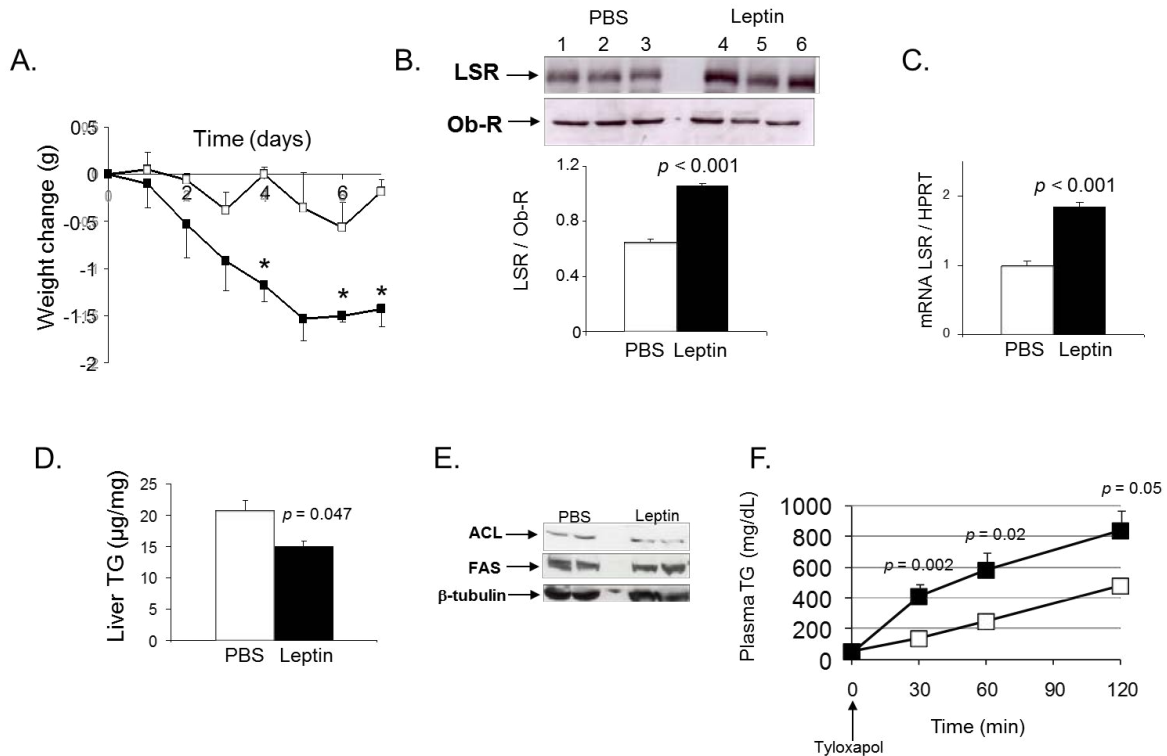


Figure 2. Body weight changes, hepatic LSR, Ob-R levels, and liver TG metabolism in mice treated with leptin. A. C57Bl6/Rj male mice were *ip* injected twice daily with PBS ($\square$, $n = 5$) or leptin ($1\mu\text{g}/\text{injection}$, $2\mu\text{g}/\text{day}$) ($\blacksquare$, $n = 5$) for 8 days as described in Materials and Methods, during which changes in body weight were monitored. Asterisks indicate significance $p < 0.05$ comparing PBS- to leptin-injected mice. On day 8, animals were sacrificed and livers were removed. B. Total membranes were isolated and immunoblots performed to detect hepatic LSR and Ob-R as indicated. Each lane represents a different animal. LSR expression relative to that of Ob-R is shown in the bar graph below ($n = 3$ per group). C. LSR mRNA expression was determined as described in Materials and Methods, and is shown here relative to HPRT as mean $\pm$ SD (PBS, $n = 2$; leptin $n = 3$, triplicate determinations). D. TG content of liver samples ($n = 3$ per group) was determined as described in Materials and Methods. E. The expression of two enzymes involved in TG synthesis, ACL and FAS are shown in representative Western blots. F. In a separate group of PBS- and leptin-treated animals ($n = 5$ per group), TG secretion was determined on day 8 as described in Materials and Methods. Mice were fasted 3 h, and then injected *iv* with Tyloxapol. Blood samples were obtained at the times indicated to determine plasma TG levels. Mean $\pm$ SEM values are indicated with p -values showing significant differences between PBS- and leptin-treated mice.

We had previously shown that reduced LSR expression in LSR^{+/-} mice led to increased postprandial lipemia, and in view of leptin's influence on LSR protein levels, our next goal in this study was to determine the impact of low LSR on lipid homeostasis in the form of weight gain or changes in fat mass. Monitoring of aging LSR^{+/-} mice maintained on a standard laboratory chow diet revealed that the body weights of 14-month old female LSR^{+/-} mice were 1.5 fold higher as compared to controls (Fig. 3A), despite no detectable difference in food intake (Fig. 3B). The higher body weight

was accompanied by an increase in body fat mass (Fig. 3C), and a large 4-fold increase in plasma leptin concentrations (Fig. 3D).

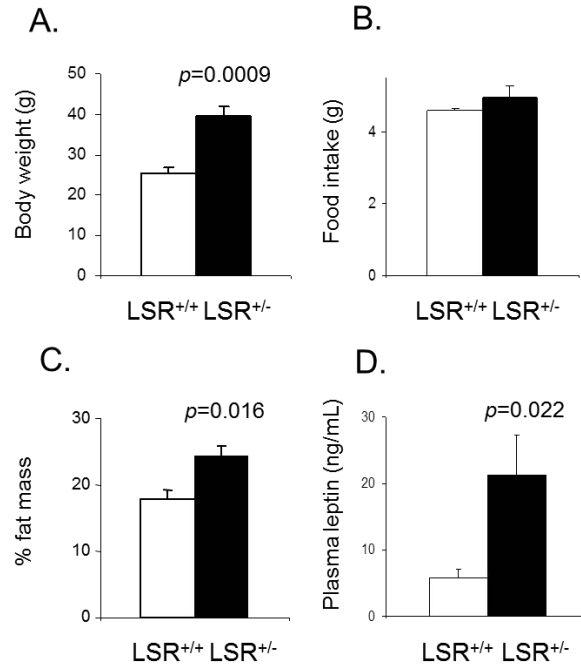


Figure 3. Body weight, fat mass and leptin levels in 14-month old LSR^{+/-} mice. A-C. Body weight (A), food intake (B) and fat mass (C) were measured in 14 month-old female LSR^{+/+} (open bars) and LSR^{+/-} (closed bars) mice, as described in Materials and Methods. D. Plasma leptin values were also measured from blood samples obtained after a 3 h fasting period. Mean ± SEM values (n = 5 per group) are shown and p-values are indicated where significant comparing LSR^{+/+} to LSR^{+/-} groups.

Both fasting plasma glucose and insulin levels, and glucose tolerance curves were not different in the 2 groups of mice, indicating that there was no glucose intolerance in these aging LSR^{+/-} mice (data not shown). We verified in these animals that postprandial lipemia was elevated following the gavage of a high-fat meal (Fig. 4A), and that their ability to clear Intralipid was significantly reduced (Fig. 4B), as has been previously reported in younger LSR^{+/-} mice (12).

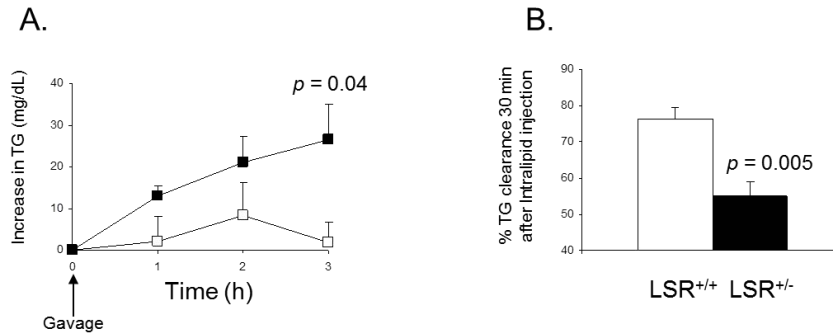


Figure 4. Elevated postprandial lipemia and decreased Intralipid clearance in 14-month old LSR^{+/-} mice. *A.* Plasma TG levels were measured in LSR^{+/+} (□) and LSR^{+/-} (■) mice after gavage of olive oil. *B.* After *iv* injection of Intralipid into LSR^{+/+} (open bar) and LSR^{+/-} (closed bar) mice, blood samples were taken at 2 and 30 minutes and plasma TG was determined, as described in Materials and Methods. Results are shown as % TG cleared in 30 minutes using plasma TG levels at 2 minutes as the 100% value. Mean ± SEM values (n = 5 per group) are shown and *p*-values are indicated where significant comparing LSR^{+/+} to LSR^{+/-}.

We next sought to determine if a chronic dietary lipid challenge could accelerate this process in younger animals. LSR^{+/+} and LSR^{+/-} 10-week old female mice were placed on a very high-fat diet (60% kcal) for a period of 10 weeks. In Figure 5A, the slope of the weight gain curve was much more pronounced in LSR^{+/-} mice as compared to their control littermates. This difference was observed as early as 10 days after being placed on the diet. Despite this difference in weight gain, food intake was not significantly different with the exception of the last point measured before the end of the study (Fig. 5B). At t = 10 weeks, the final body weights of LSR^{+/+} and LSR^{+/-} mice were 25.5 ± 0.84 g and 30.1 ± 2.0 g (*p* = 0.034), respectively. As shown in Figure 5C, concomitant to this increased body weight, fat mass was observed to be significantly increased by 1.3 fold. To estimate energy expenditure, oxygen consumption was measured over a 24-h period in these animals using indirect calorimetry, and results revealed that the average energy expenditure over the 24 hour period was significantly higher in LSR^{+/-} mice as compared to LSR^{+/+} animals.

Animals were sacrificed 10 weeks after the start of the diet, and lipid content was analyzed in the liver, skeletal muscle and adipose tissue (Supplementary Table 1). TG content expressed relative to the PL content was found to be increased almost 2-fold in adipose tissue of LSR^{+/-} mice on the high-fat diet (LSR^{+/+}, 1.79 ± 0.36; LSR^{+/-}, 3.46 ± 0.58, *p* = 0.038). Plasma leptin levels were 3-fold higher in LSR^{+/-} mice as compared to control animals (Fig. 5E), and strongly correlated to fat mass in both

groups ($LSR^{+/+}$, $r = 0.86$, $p = 0.028$; $LSR^{+/-}$, $r = 0.97$, $p = 0.033$), as has been previously reported (24, 25). However, neither adiponectin nor insulin levels were found to be different in these mice (Fig. 5F and 5G, respectively). Therefore, under conditions of a high-fat chronic dietary challenge, $LSR^{+/-}$ mice were more susceptible as compared to their wild-type littermates towards weight gain and increased fat mass associated with increased plasma leptin levels.

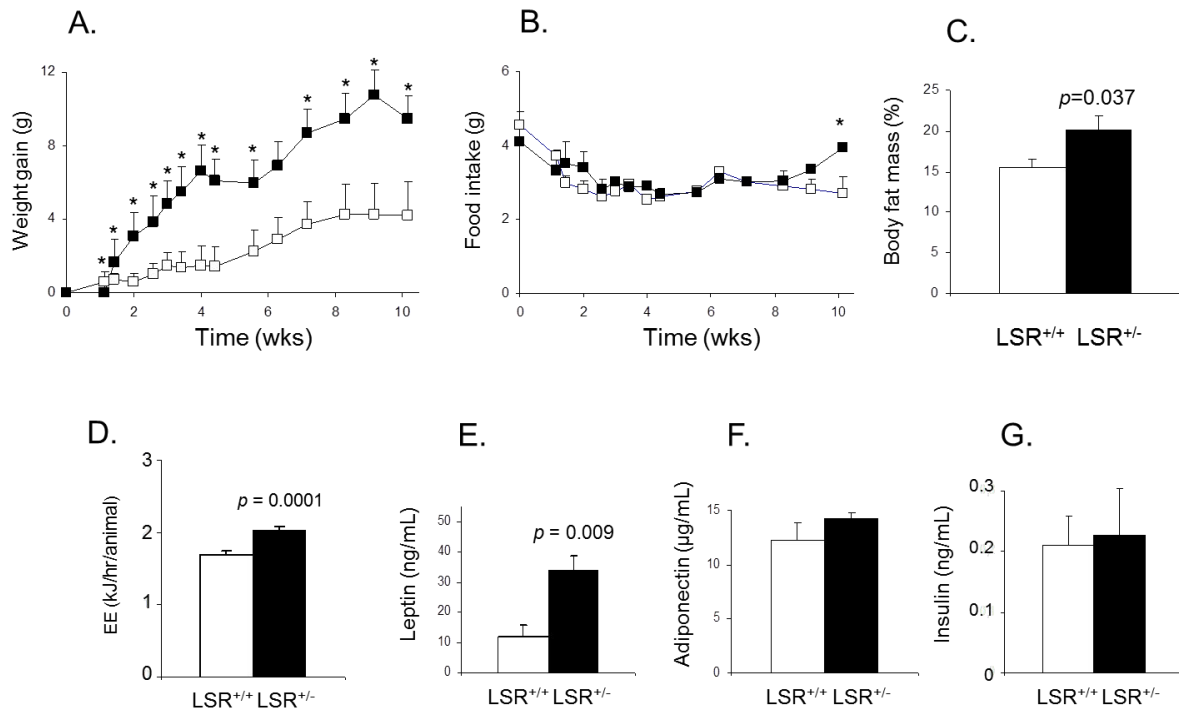


Figure 5. Weight gain, food intake, fat mass, energy expenditure, leptin, adiponectin and insulin levels in $LSR^{+/-}$ mice following a 10 week high-fat diet. $LSR^{+/+}$ ($n = 6$, open bars or $\square$) and $LSR^{+/-}$ female mice ($n = 5$, closed bars or $\blacksquare$) were placed on a high-fat (60% kcal) diet for 10 weeks as described in Materials and Methods. A-B. Weight gain (A) and food intake (B) were monitored during the study (asterisks indicate significance $p < 0.05$ comparing $LSR^{+/+}$ and $LSR^{+/-}$ groups). C. Body fat mass was measured as described in Materials and Methods. D. Oxygen consumption was measured in mice near the end (week 9) of the dietary study using indirect calorimetry as described in Materials and Methods. Energy expenditure (EE) is expressed as the mean $\pm$ SEM of kJ/hr/animal. E-G. Plasma leptin (E), adiponectin (F) and insulin (G) levels were measured in plasma collected at the end of the study after a 3 h fasting period. Mean $\pm$ SEM values are shown with p -values indicating significance after comparing $LSR^{+/+}$ with $LSR^{+/-}$ groups.

Total liver membranes were prepared from these mice and used for immunoblots to obtain a relative measure of LSR protein levels in the $LSR^{+/+}$ and $LSR^{+/-}$ groups that were on the high-fat diet. Immunoblot analysis confirmed the reduced hepatic LSR protein levels in $LSR^{+/-}$ mice (Fig. 6A).

Interestingly, linear regression analysis of all data points revealed a significant and negative correlation between the relative degree of hepatic LSR protein expression and plasma leptin levels (Fig. 6B).

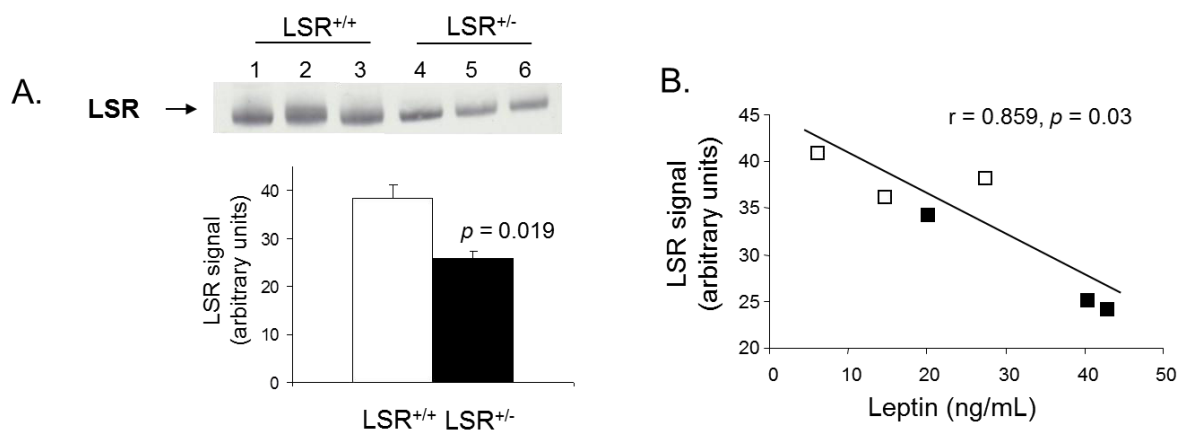


Figure 6. Relationship between hepatic LSR protein and plasma leptin levels in LSR^{+/-} mice after 10 weeks on a high-fat diet. **A.** Immunoblots were performed to detect the level of expression of LSR in liver total membrane preparations obtained from LSR^{+/+} (open bar) and LSR^{+/-} (closed bar) mice fed on a high-fat diet for 10 weeks (see Figure 5). Each lane represents a different animal. Mean $\pm$ SEM values are shown with p -value indicating significance after comparing LSR^{+/+} with LSR^{+/-} groups. **B.** Linear regression analysis of LSR signal intensity on the immunoblot and plasma leptin levels from high-fat fed animals ($n=3$ for each group, LSR^{+/+}, $\square$; LSR^{+/-}, $\blacksquare$), with the correlation and p -value indicated.

Protein levels of Ob-R in hepatic membranes were analyzed in these same animals by immunoblotting. Figure 7A shows that Ob-R was significantly decreased in LSR^{+/-} mice as compared to LSR^{+/+} mice on the high-fat diet. Furthermore, a positive correlation was observed between hepatic Ob-R protein and plasma leptin levels only in LSR^{+/+} ($r = 0.86$, $p = 0.03$) and not in LSR^{+/-} mice ($r = -0.14$, ns) on the high fat diet (data not shown). Ob-R levels were measured in age-matched LSR^{+/-} and LSR^{+/+} mice on a standard diet, and found to be similar in both groups (Fig. 7B). In LSR^{+/-} mice on the high fat diet, the relative amount of phosphorylated form of Erk1/2 (p-Erk1/2) as compared to Erk1/2 was significantly lower as compared to controls on the same diet (Fig. 7C). This was not the case in LSR^{+/-} mice on a standard diet. Indeed, in these mice, p-Erk1/2 was detected in both LSR^{+/-} and LSR^{+/+} mice at similar levels (Fig. 7D). Taken together, these data indicate that reduced LSR expression in mice led to accelerated weight gain and increased leptin. Furthermore, a 10-week chronic stress of

dietary lipid led to decreased leptin receptor levels in the liver, as well as lower levels of the downstream signaling form of the Erk1/2 pathway, but only in LSR^{+/-} animals.

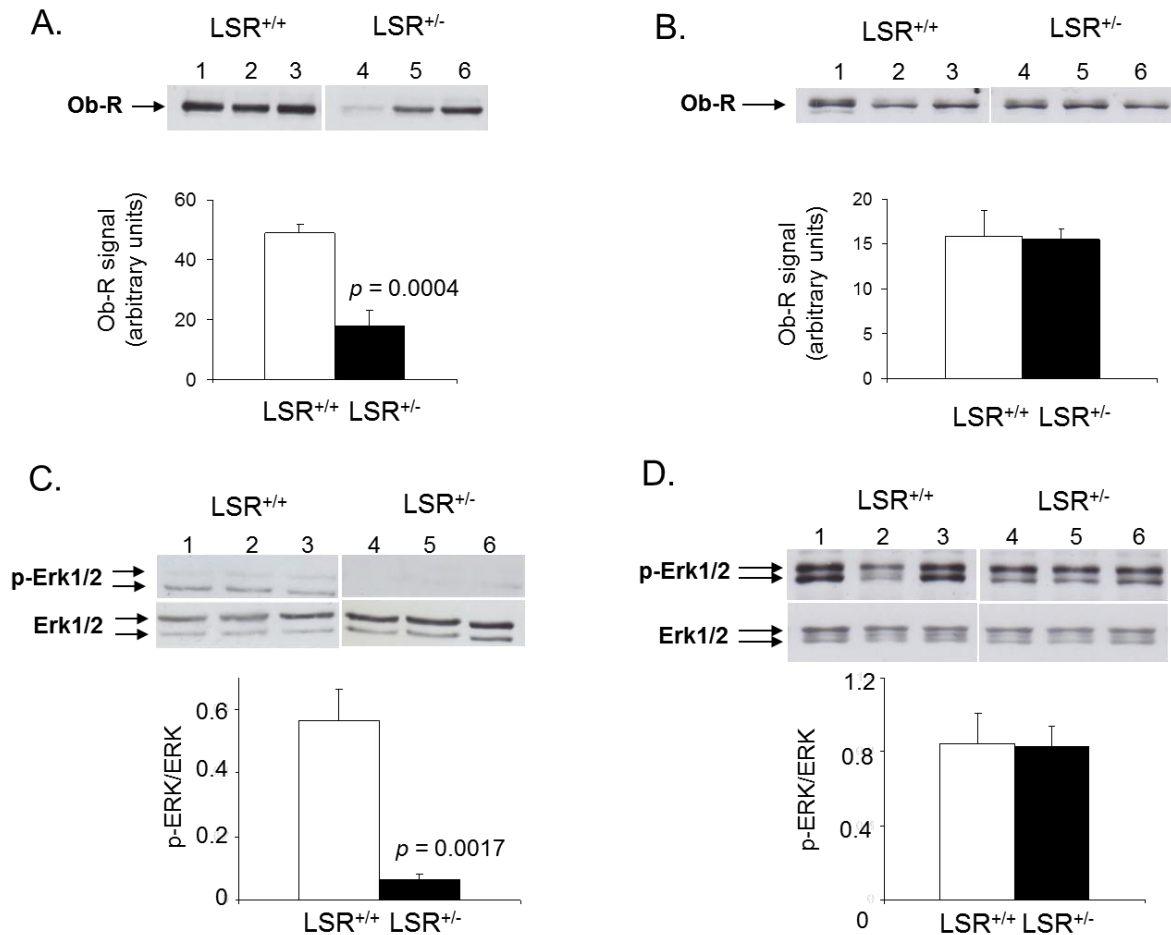


Figure 7. Hepatic protein levels of leptin receptor (Ob-R) and phosphorylated Erk1/2 (p-Erk1/2) in LSR^{+/+} and LSR^{+/-} mice on high-fat or standard diet. A-B. Liver extracts and membranes from LSR^{+/+} mice (open bars, n = 6) and LSR^{+/-} (closed bars, n = 5) on high-fat (A) or standard (B) diets were analyzed for protein levels of Ob-R. C-D. The cytosolic fractions were used in immunoblots to detect Erk1/2 and p-Erk1/2 in mice placed on a high-fat (C) or standard (D) diet. Representative blots are shown for individual animals, as well as bar graphs of the mean $\pm$ SEM values with p-value indicating significance after comparing LSR^{+/+} with LSR^{+/-}. The ratio of p-Erk1/2 to Erk is shown in the bar graphs of C and D.

DISCUSSION

In this study, we provide *in vitro* and *in vivo* evidence for a new peripheral role of leptin in the modulation of the lipoprotein receptor LSR that is expressed in the liver.

In vitro data using immunoblotting and immunofluorescence revealed that LSR protein levels were increased in Hepa1-6 cells incubated 1 h with leptin at levels in the physiological range. PD98059-mediated inhibition of phosphorylation of Erk1/2 completely suppressed leptin-mediated increase of LSR protein levels, in keeping with previous studies showing that leptin interaction with Ob-Rb leads to phosphorylation of Erk1/2 (16). Leptin has also been shown to activate STAT3 (15), but we were unable to detect phosphorylation in these cells in the presence of leptin (data not shown). Indeed, leptin-mediated signaling in hepatoma cell lines has previously been shown to be independent of STAT3 activation (26). A weak band of the phosphorylated form on residue Ser473 of Akt in cells incubated with 10-25 ng/ml of leptin was detected (data not shown). Nevertheless, the data using the inhibitor PD98059 indicated that Erk1/2 phosphorylation represented the principal downstream signaling form by which leptin mediated its effect on LSR protein. The phosphorylated form of Erk is known to translocate into the nucleus and activate transcription factors. Inhibition of the leptin effect in cells pre-incubated with α -amanitin indicates that a part of leptin's effect may be due to increased transcription of the *lsr* gene (Fig. 8A), which was confirmed by real-time PCR analysis. Both the increase in mRNA and protein levels of LSR in such a brief time illustrates the potent action of physiological concentrations of leptin in the regulation of LSR.

In vivo studies confirmed leptin's activating effect that was observed *in vitro*. Following 7 days of twice daily administration of leptin, liver membrane-associated protein levels of LSR in wild-type C57Bl6/Rj mice were significantly increased. Interestingly, this was accompanied by a small but significant decrease in liver TG content. Leptin has been shown to suppress the expression of lipogenic enzymes, leading to decreased TG in the liver (27). However, in our study, ACL expression was only slightly decreased, while that of FAS was not significantly different in mice treated with leptin as compared to controls. The dose of leptin used in the previous report (27) was 20-fold higher than that used in this study, which could explain the lack of effect on these lipogenic enzymes. Instead, we observed an increase in VLDL measured as TG appearance in the plasma after *iv* injection with Tyloxapol. Tyloxapol has been previously shown to coat the surface of lipoprotein particles thus inhibiting their removal from the circulation (28). Therefore, after the 3 h fasting period, the TG that is

measured represents that being secreted from the liver in the form of VLDL. In view of the fact that these mice are losing weight, it is possible that this may reflect increased energy substrate demand by the peripheral tissues, most notably the skeletal muscle. Indeed, a recent paper demonstrated that in *ob/ob* mice treated with leptin, lipoprotein lipase activity in only skeletal muscle and not adipose tissue was increased (29). This would be consistent with increasing availability of free fatty acids to muscle. Another potential explanation for the decreased hepatic TG content may be increased TG metabolism as a result of increased LSR activity. Indeed, adenovirus-mediated overexpression of LSR in *ob/ob* mice led to an increase in TG input in the liver that was compensated for by increased fatty acid oxidation (30). Further investigation is required to delineate the mechanisms underlying leptin's regulation of lipid metabolism in the liver.

The leptin injections led to a significant decrease in animal body weight, without any evident change in food intake. This was surprising because if the degree of weight change observed (1.5 g) was directly due to a modified dietary input, it should have been detectable. The weight loss itself does not seem to be the cause for the changes in LSR levels, since food restriction alone does not lead to increased LSR. We measured LSR protein levels in mice that were placed on a food restriction diet for 1 week. Even with a significant average body weight loss of 4 g, no detectable difference was observed in hepatic levels of LSR (data not shown). Therefore, the increase in LSR reported in Figure 2 is directly related to the leptin injection, rather than a consequence of reduced body weight.

The majority of the papers studying leptin peripheral effects have used supra-physiological doses, which clearly will involve leptin signaling at the central nervous system level, as evidenced by decreased food intake (27, 31). We cannot completely rule out the possibility of leptin activity at the level of the central nervous system. Nevertheless, using lower leptin doses allowed us to avoid or at least to minimize the added influence of the hypothalamus-mediated response to leptin. This raises a very interesting point in demonstrating the specific and significant peripheral effect of leptin on LSR expression *in vivo*. From a therapeutic point of view, we could speculate that by virtue of its effect on LSR, such doses of leptin could help the liver to increase LSR and thus reduce post-prandial lipemia without affecting other physiological and vital functions in the liver.

In view of these data, we propose that the leptin-mediated increase in LSR may provide a means to increase removal of lipids during the postprandial phase, which would contribute to the dynamics of lipid distribution and utilization amongst the different tissues.

Indeed, our data indicate that reduced LSR expression in the LSR^{+/-} mouse, shown previously to exhibit elevated postprandial lipemia and decreased lipid clearance (12, 30), is also associated with increased body fat mass and increased energy expenditure, two hallmarks of obesity (32). This is observed in aged LSR^{+/-} mice on a standard diet, and can be accelerated in younger LSR^{+/-} mice by exposure to a very high-fat diet. The weight gain is significant, but does not approach massive obesity. Furthermore, another marker for obesity, adiponectin, was not modified in these mice. Also, neither glucose intolerance nor hyperinsulinemia were detected in these mice, which would indicate the absence of any defect in glucose metabolism or problem in insulin resistance.

In these LSR^{+/-} mice, we also observed an increase in leptin, which would be expected due to the higher fat mass. However, further investigation revealed that Ob-R was significantly decreased in the LSR^{+/-} mice on the high-fat diet. In addition, the phosphorylated form of Erk1/2 was largely reduced in these mice. A previous study has reported a high-fat diet-induced decrease in Ob-R/STAT mediated signaling in T-lymphocytes (33). Furthermore, exercise training appears to decrease both plasma leptin and hepatic Ob-R levels (34), suggesting a close link between metabolic state and the regulation of leptin and Ob-R levels in the liver. We also observed a strong positive correlation between hepatic membrane Ob-R levels and leptin levels in the plasma in wild-type mice. This is in keeping with a study by Cohen *et al.*, who reported an association between plasma leptin and hepatic Ob-R levels (35). Strikingly, this correlation was no longer detected in the LSR^{+/-} mice on the high-fat diet, reinforcing the notion that the signaling is somehow impaired. These data, combined with the reduced levels of Ob-R and impaired phosphorylation of Erk1/2 in the LSR^{+/-} mouse on the high-fat diet lead us to propose this as a new model for the study of mechanisms underlying the development of leptin resistance in the periphery. If these mice placed on a high-fat diet develop such signaling impairments in liver, it would also be interesting to investigate the status of leptin signaling capacity in other compartments such as the central nervous system in this mouse model.

This study demonstrates a new peripheral role for leptin in the regulation of a hepatic receptor in the periphery involved in the clearance of lipoproteins following a meal (Fig. 8A). We would propose that the presence of leptin is important to maintain LSR protein at optimal levels to ensure efficient lipid clearance during the postprandial phase (Fig. 8A and 8B), which would be complementary to its action as a satiety factor. However, if leptin signaling in the liver is defective, this could lead to events, including suboptimal LSR protein expression, which would contribute to elevated postprandial lipemia (Fig. 8B). This promotes increased distribution of lipids in the periphery, mainly the adipose tissue, leading to increased fat mass, and provides a novel explanation for the delayed postprandial lipemia that is often associated with obese subjects. The role of leptin in the control of postprandial lipemia via LSR provides therefore a new lever for the regulation of the removal of lipids during the postprandial phase, an important risk factor associated with cardiovascular and metabolic diseases.

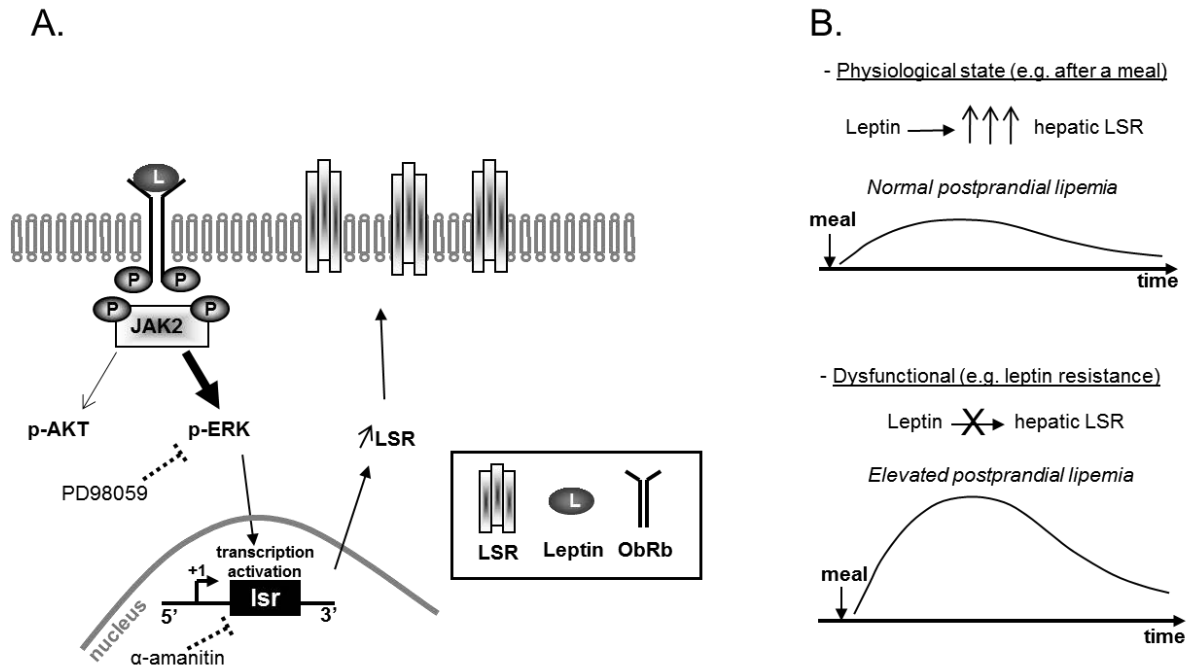


Figure 8. Schematic diagram for leptin-mediated up-regulation of LSR and potential consequences on postprandial lipemia. *A.* We propose that the canonical leptin-induced signaling pathway involving phosphorylation of Erk leads to increased transcription of the *lsr* gene and increased protein levels of LSR at the surface of hepatocyte membranes. *B.* Under normal conditions, physiological levels of leptin are sufficient to maintain an optimal amount of LSR at the cell surface, permitting clearance of TG rich lipoproteins during the postprandial phase. However, when leptin interaction with its receptor in the liver is impaired, such as in leptin resistance, LSR protein levels at the cell surface may no longer be optimal, leading to decreased efficiency in removing lipids from the cell surface, resulting in elevated postprandial lipemia.

REFERENCES

1. Boquist, S., Ruotolo, G., Tang, R., Bjorkegren, J., Bond, M. G., de Faire, U., Karpe, F., and Hamsten, A. (1999) Alimentary lipemia, postprandial triglyceride-rich lipoproteins, and common carotid intima-media thickness in healthy, middle-aged men. *Circulation* **100**, 723-728
2. Groot, P. H., van Stiphout, W. A., Krauss, X. H., Jansen, H., van Tol, A., van Ramshorst, E., Chin-On, S., Hofman, A., Cresswell, S. R., and Havekes, L. (1991) Postprandial lipoprotein metabolism in normolipidemic men with and without coronary artery disease. *Arterioscler Thromb* **11**, 653-662
3. Zilversmit, D. B. (1979) Atherogenesis: a postprandial phenomenon. *Circulation* **60**, 473-485

4. Couillard, C., Bergeron, N., Prud'homme, D., Bergeron, J., Tremblay, A., Bouchard, C., Mauriege, P., and Despres, J. P. (1998) Postprandial triglyceride response in visceral obesity in men. *Diabetes* **47**, 953-960
5. Guerci, B., Verges, B., Durlach, V., Hadjadj, S., Drouin, P., and Paul, J. L. (2000) Relationship between altered postprandial lipemia and insulin resistance in normolipidemic and normogluco se tolerant obese patients. *Int J Obes Relat Metab Disord* **24**, 468-478
6. Lewis, G. F., O'Meara, N. M., Soltys, P. A., Blackman, J. D., Iverius, P. H., Druetzler, A. F., Getz, G. S., and Polonsky, K. S. (1990) Postprandial lipoprotein metabolism in normal and obese subjects: comparison after the vitamin A fat-loading test. *J Clin Endocrinol Metab* **71**, 1041-1050
7. Mekki, N., Christofilis, M. A., Charbonnier, M., Atlan-Gepner, C., Defoort, C., Juhel, C., Borel, P., Portugal, H., Pauli, A. M., Vialettes, B., and Lairon, D. (1999) Influence of obesity and body fat distribution on postprandial lipemia and triglyceride-rich lipoproteins in adult women. *J Clin Endocrinol Metab* **84**, 184-191
8. Havel, R. J., and Kane, J. P. (1995) Structure and Metabolism of plasma lipoproteins. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., and Valle, D., eds) Vol. 2 pp. 1841-1851, McGraw-Hill, Inc., New York
9. Mahley, R. W., and Huang, Y. (2007) Atherogenic remnant lipoproteins: role for proteoglycans in trapping, transferring, and internalizing. *J Clin Invest* **117**, 94-98
10. MacArthur, J. M., Bishop, J. R., Stanford, K. I., Wang, L., Bensadoun, A., Witztum, J. L., and Esko, J. D. (2007) Liver heparan sulfate proteoglycans mediate clearance of triglyceride-rich lipoproteins independently of LDL receptor family members. *J Clin Invest* **117**, 153-164
11. Attie, A. D., Pittman, R. C., and Steinberg, D. (1982) Hepatic catabolism of low density lipoprotein: mechanisms and metabolic consequences. *Hepatology* **2**, 269-281
12. Yen, F. T., Roitel, O., Bonnard, L., Notet, V., Pratte, D., Stenger, C., Magueur, E., and Bihain, B. E. (2008) Lipolysis stimulated lipoprotein receptor: A novel molecular link between hyperlipidemia, weight gain, and atherosclerosis in mice. *J Biol Chem* **283**, 25650-25659
13. Friedman, J. M., and Halaas, J. L. (1998) Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* **395**, 763-770

14. Leshan, R. L., Bjornholm, M., Munzberg, H., and Myers, M. G., Jr. (2006) Leptin receptor signaling and action in the central nervous system. *Obesity (Silver Spring)* **14 Suppl 5**, 208S-212S
15. Signore, A. P., Zhang, F., Weng, Z., Gao, Y., and Chen, J. (2008) Leptin neuroprotection in the CNS: mechanisms and therapeutic potentials. *J Neurochem* **106**, 1977-1990
16. Banks, A. S., Davis, S. M., Bates, S. H., and Myers, M. G., Jr. (2000) Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *J Biol Chem* **275**, 14563-14572
17. Elmquist, J. K., Maratos-Flier, E., Saper, C. B., and Flier, J. S. (1998) Unraveling the central nervous system pathways underlying responses to leptin. *Nat Neurosci* **1**, 445-450
18. Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D., Jr., Seeley, R. J., and Baskin, D. G. (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature* **404**, 661-671
19. Morioka, T., Asilmaz, E., Hu, J., Dishinger, J. F., Kurpad, A. J., Elias, C. F., Li, H., Elmquist, J. K., Kennedy, R. T., and Kulkarni, R. N. (2007) Disruption of leptin receptor expression in the pancreas directly affects beta cell growth and function in mice. *J Clin Invest* **117**, 2860-2868
20. Kahn, B. B., Alquier, T., Carling, D., and Hardie, D. G. (2005) AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* **1**, 15-25
21. Irigaray, P., Ogier, V., Jacquenet, S., Notet, V., Sibille, P., Mejean, L., Bihain, B. E., and Yen, F. T. (2006) Benzo[a]pyrene impairs beta-adrenergic stimulation of adipose tissue lipolysis and causes weight gain in mice. A novel molecular mechanism of toxicity for a common food pollutant. *Febs J* **273**, 1362-1372
22. Carpenter, L. R., Farruggella, T. J., Symes, A., Karow, M. L., Yancopoulos, G. D., and Stahl, N. (1998) Enhancing leptin response by preventing SH2-containing phosphatase 2 interaction with Ob receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6061-6066
23. Cui, H., Cai, F., and Belsham, D. D. (2006) Leptin signaling in neurotensin neurons involves STAT, MAP kinases ERK1/2, and p38 through c-Fos and ATF1. *Faseb J* **20**, 2654-2656

24. Frederich, R. C., Hamann, A., Anderson, S., Lollmann, B., Lowell, B. B., and Flier, J. S. (1995) Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med* **1**, 1311-1314
25. Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R. E., Lee, G. H., Zhang, Y., Fei, H., Kim, S., Lallone, R., Ranganathan, S., and et al. (1995) Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* **1**, 1155-1161
26. Uotani, S., Abe, T., and Yamaguchi, Y. (2006) Leptin activates AMP-activated protein kinase in hepatic cells via a JAK2-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **351**, 171-175
27. Jiang, L., Wang, Q., Yu, Y., Zhao, F., Huang, P., Zeng, R., Qi, R. Z., Li, W., and Liu, Y. (2009) Leptin contributes to the adaptive responses of mice to high-fat diet intake through suppressing the lipogenic pathway. *PLoS One* **4**, e6884
28. Schotz, M. C., Scanu, A., and Page, I. H. (1957) Effect of triton on lipoprotein lipase of rat plasma. *Am J Physiol* **188**, 399-402
29. Donahoo, W. T., Stob, N. R., Ammon, S., Levin N., and Eckel, R.H. (2010) Leptin increases skeletal muscle lipoprotein lipase and postprandial lipid metabolism in mice. *Metabolism* May 20. [Epub ahead of print]
30. Narvekar, P., Berriel Diaz, M., Krones-Herzig, A., Hardeland, U., Strzoda, D., Stohr, S., Frohme, M., and Herzig, S. (2009) Liver-specific loss of lipolysis-stimulated lipoprotein receptor triggers systemic hyperlipidemia in mice. *Diabetes* **58**, 1040-1049
31. Garza, J. C., Guo, M., Zhang, W., and Lu, X. Y. (2008) Leptin increases adult hippocampal neurogenesis in vivo and in vitro. *J Biol Chem* **283**, 18238-18247
32. Butler, A. A., and Kozak, L. P. (2010) A recurring problem with the analysis of energy expenditure in genetic models expressing lean and obese phenotypes. *Diabetes* **59**, 323-329
33. Papathanassoglou, E., El-Haschimi, K., Li, X. C., Matarese, G., Strom, T., and Mantzoros, C. (2006) Leptin receptor expression and signaling in lymphocytes: kinetics during lymphocyte activation, role in lymphocyte survival, and response to high fat diet in mice. *J Immunol* **176**, 7745-7752
34. Yasari, S., Wang, D., Prud'homme, D., Jankowski, M., Gutkowska, J., and Lavoie, J. M. (2009) Exercise training decreases plasma leptin levels and the expression of hepatic leptin receptor-a, -b, and, -e in rats. *Mol Cell Biochem* **324**, 13-20

35. Cohen, P., Yang, G., Yu, X., Soukas, A. A., Wolfish, C. S., Friedman, J. M., and Li, C. (2005) Induction of leptin receptor expression in the liver by leptin and food deprivation. *J Biol Chem* **280**, 10034-10039

ACKNOWLEDGEMENTS

CS and MH contributed equally to this work. CS received funding from the *Region Lorraine* and Nancy University – INPL(BQR) and MH from the Ministry of Research and Higher Education (thesis fellowship). This work was funded in part by the French Ministry of Higher Education and Research, Nancy University - INPL (BQR grant), and grants from local government agencies including the Council for the Lorraine Region and the Nancy commune (CUGN).

II. CONCLUSION

Lors de cette étude, nous avons montré *in vitro* et *in vivo* un nouveau rôle de la leptine dans le métabolisme périphérique, celui de la régulation du récepteur lipoprotéique hépatique LSR.

La régulation *in vitro* de LSR par la leptine semble être réalisée par l'augmentation de sa transcription à travers la voie de signalisation JAK/STAT et ERK. D'autre part, les études *in vivo* ont confirmé l'effet *in vitro* observé sur l'expression de LSR par la leptine lors d'injection de leptine à des souris C57Bl6/J entraînant l'augmentation de l'expression de LSR accompagnée d'une réduction du contenu en TG hépatiques. Cette diminution du contenu lipidique du foie est liée à l'augmentation de la sécrétion des VLDL hépatiques et à une faible diminution de l'expression des enzymes lipogéniques (principalement ACL). De plus, lors d'un régime hyperlipidique, les souris déficientes en LSR (LSR^{+/-}) montrent une augmentation significative de leptine plasmatique, accompagnée d'une augmentation de la prise de poids et de masse grasse. L'augmentation de leptine plasmatique peut être expliquée par l'augmentation de la masse grasse, sécrétant cette hormone. Cependant, l'expression du récepteur à la leptine (Ob-R) est significativement diminuée dans les foies des souris LSR^{+/-} sous régime hyperlipidique, pouvant aussi expliquer l'augmentation de leptine plasmatique.

Cette étude démontre un nouveau rôle périphérique de la leptine dans la régulation d'un récepteur hépatique aux lipoprotéines LSR, impliqué dans la clairance des lipoprotéines à la suite de l'ingestion d'un repas. En phase postprandiale, la présence de leptine permet le maintien de l'expression protéique de LSR afin de permettre une meilleure clairance lipidique, en complémentarité avec son rôle de facteur de satiété. Toutefois, en cas de déficience des voies de signalisation de la leptine (résistance à la leptine), la réduction de l'expression de LSR mène à l'augmentation de la lipémie postprandiale. Cet événement augmente la distribution des lipides aux organes périphériques tels que le tissu adipeux, aboutissant à l'augmentation de la masse grasse, ce qui pourrait expliquer l'épuration retardée de la lipémie postprandiale observée souvent chez les sujets obèses.

Le rôle de la leptine dans le contrôle de la lipémie postprandiale à travers LSR fournit un nouveau levier pour la régulation de la clairance des lipides en phase postprandiale, un facteur de risque important associé aux maladies cardiovasculaires et aux maladies métaboliques.

Chapitre 4 :
Effet de l'inhibition de l'ATP citrate
lyase sur l'expression de LSR et le
métabolisme lipidique

I. INTRODUCTION

Avec la découverte de l'expression du récepteur à la leptine à la surface des membranes de plusieurs tissus périphériques, il est apparu que la leptine pouvait moduler directement le métabolisme lipidique périphérique sans l'implication de l'hypothalamus (Fruhbeck, G., *et al.*, 1999). La littérature a clairement montré *in vivo* et *in vitro* les effets directs et indirects de la leptine sur la lipolyse et la lipogenèse chez les mammifères (Lopez-Soriano, J., *et al.*, 1998, Wang, M. Y., *et al.*, 1999). Certaines études indiquent l'implication de la leptine dans la régulation de la lipogenèse principalement à travers SREBP-1c (Dridi, S., *et al.*, 2005, Nogalska, A., *et al.*, 2005). En effet, l'augmentation de l'expression du gène de la leptine (*lep*) pourrait expliquer en partie la réduction de l'expression du gène SREBP-1c et par conséquent la diminution d'activité lipogénique du tissu adipeux au cours du vieillissement. De plus, nos résultats du chapitre précédent ont révélé que la leptine avait un effet régulateur *in vitro* et *in vivo* de l'expression protéique et de l'ARNm de LSR à des doses physiologiques (Stenger, C., *et al.*, 2010). Lors de cette même étude, nous avons observé une modification faible de l'expression d'ACL et de FAS lors d'injection quotidienne de leptine démontrée dans d'autres études animales (Jiang, L., *et al.*, 2009, Tobe, K., *et al.*, 2001) utilisant des doses plus élevées de leptine, ce qui nous a amené à étudier plus profondément le rôle de l'enzyme ACL dans la régulation de LSR, lui-même modulé par la leptine. En effet, puisque ce récepteur aux lipoprotéines est impliqué dans l'apport des lipides exogènes vers le foie, il est possible qu'il existe un effet régulateur directement entre la lipogenèse et l'expression de LSR.

La suppression d'une des enzymes clefs de la lipogenèse, l'*ATP Citrate Lyase* (ACL) hépatique entraîne une hypotriglycémie accompagnée d'une augmentation du contenu des triglycérides hépatiques (Wang, Q., *et al.*, 2010). D'autre part, la déficience en ACL hépatique mène à la réduction de la sécrétion de VLDL riches en ApoB48 par le foie. L'acide hydroxycitrique (HCA), structurellement proche de l'acide citrique (figure 30 a et b) est un puissant inhibiteur compétitif d'ACL, EC 4.1.3.8, $K_i=150\text{nM}$ (Cheema-Dhadli, S., *et al.*, 1973, Sullivan, A. C., *et al.*, 1972, Triscari, J. and Sullivan, A. C., 1977, Watson, J. A., *et al.*, 1969). Il a été démontré que l'HCA supprimait la biosynthèse des acides gras et du cholestérol *in vitro* (Mathias, M. M., *et al.*, 1981, Sullivan, A. C., *et al.*, 1977) et *in vivo* (Lowenstein, J. M., 1971, Sullivan, A. C., *et al.*, 1972). Lors du traitement à l'acide hydroxycitrique, une diminution de la triglycémie est observée, accompagnée d'une perte

de poids, suite à la diminution de la prise alimentaire démontrée sur des modèles animaux (Leonhardt, M., *et al.*, 2001, Lowenstein, J. M., 1971) comme chez l'Homme (Onakpoya, I., *et al.*, 2011).

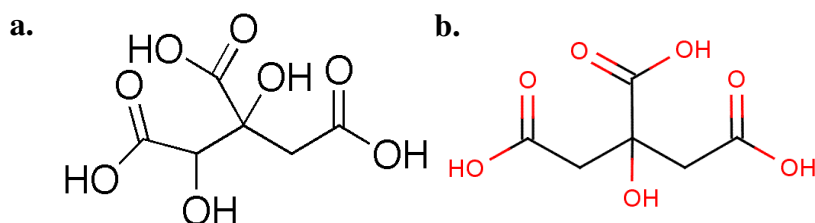


Figure 29 a et b: Représentation de l'acide hydroxycitrique (a) et de l'acide citrique (b)

L'acide hydroxycitrique est le principal constituant (10-30%) de l'écorce de fruit sec de *Garcinia cambogia* (figure 31), plante subtropicale d'origine indonésienne utilisée en médecine traditionnelle indienne depuis plusieurs siècles démontrant l'effet d'HCA (Downs, B. W., *et al.*, 2005, Heymsfield, S. B., *et al.*, 1998).



Figure 30: Représentation de la plante subtropicale: *Garcinia cambogia*

L'extrait de *Garcinia cambogia* (GCE) contenant l'acide hydroxycitrique est retrouvé sur le marché des compléments alimentaires depuis de nombreuses années, du fait de son implication dans la perte de poids et la réduction des triglycérides plasmatiques. Nous avons pu nous en procurer sous le nom de Garcinia Arkogelules (Arkopharma, Carros, France). L'objectif de cette étude a été d'utiliser le GCE dans le but de supprimer la synthèse *de novo* des triglycérides hépatiques et de déterminer son effet potentiel sur l'expression de LSR.

D'autres analyses ont été réalisées afin de voir si cet effet était corrélé avec les modifications du métabolisme lipidique périphérique, observées lors des études précédentes.

Ce chapitre fait l'objet d'un article en cours d'écriture.

Deux expériences ont été réalisées. Tout d'abord, un premier test a été réalisé sur différentes doses d'extrait de *Garcinia cambogia* afin de sélectionner la dose optimale nécessaire pour obtenir l'effet hypotriglycéridémiant chez les souris. Puis une deuxième étude a été réalisée avec la concentration optimale et avec un échantillon plus élevé d'animaux.

II. ÉTUDE DE L'EFFET DE L'EXTRAIT DE *GARCINIA CAMBOGIA* SUR L'EXPRESSION DE LSR : TEST DE DOSE

1. Objectif de l'étude

Le test de doses nous a permis de réaliser un premier essai afin de savoir si l'extrait avait un effet sur l'expression de LSR et si tel était le cas, à quelle dose.

2. Mise en place de l'étude

Afin d'identifier une dose optimale permettant la suppression de la lipogenèse chez les souris C57Bl6/J et de tester l'hypothèse d'un lien direct entre la lipogenèse et l'expression de LSR et les conséquences lipidiques, 4 solutions contenant ou non des concentrations croissantes de GCE (0 mg/j, 5 mg/j, 10 mg/j et 20 mg/j) ont été administrées par gavage dans un volume final de 300µL à 10 souris C57Bl6/J femelles durant 40 jours (voir le chapitre « Matériels et Méthodes »).

Le véhicule utilisé lors de ce gavage a été composé de 50% d'eau physiologique et 50% d'huile de maïs.

Durant cette période, le poids a été mesuré 2 fois par semaine alors que la prise alimentaire a été mesurée chaque semaine. Les dosages sanguins ont été réalisés à 0 ; 20 et 40 jours de traitement afin de mesurer l'évolution des taux lipidiques plasmatiques (triglycérides,

cholestérol total et glucose) postprandiaux (le matin à 9h) et à jeun (à 12h, après 3h de jeûne). Le 40^{ème} jour, les souris ont été mises à jeun à 9h puis sacrifiées à 12h après anesthésie gazeuse à l'halothane. La récupération de 3 structures périphériques (foie, muscle squelettique et tissu adipeux) a permis l'évaluation biochimique du statut des récepteurs lipoprotéiques et du statut lipidique.

Toutes les analyses étant réalisées sur des échantillons de 2 ou 3 animaux par groupe, aucun test de significativité n'a pu être établi. Les résultats obtenus n'ont pu mettre en évidence que des tendances ne pouvant mener à des interprétations formelles. Ces tendances ont ensuite été confirmées lors de la deuxième étude comprenant des échantillons plus importants.

3. Résultats et discussion

Durant 40 jours de traitement, les souris gavées avec l'extrait de *Garcinia cambogia* (GCE) ont montré une prise de poids diminuée par rapport à celle des souris contrôles (figure 32 a). Cette différence de prise de poids a pu être observée à partir de la première semaine où l'on aperçoit un décrochage de la courbe de croissance pour les doses 10 et 20 mg/j. La dose la plus faible, 5 mg/j de GCE, a semblé avoir eu peu d'effet sur la prise de poids des souris avec une courbe de croissance de pente similaire avec celle des souris contrôles. L'effet le plus important a été observé avec une dose de 20 mg/j d'extrait. La prise de poids n'a pas évolué après une semaine de traitement. Effectivement, les souris sous 20 mg/j d'extrait ont montré une stabilisation de leur prise de poids à partir de la première semaine avec une différence de prise de poids finale de 1g en comparaison avec les souris contrôles (figure 32 b).

Cependant, aucune modification importante n'a pu être observée concernant la prise alimentaire des souris durant les 40 jours de traitement (figure 33) indiquant que la différence de prise de poids ne semble pas être un effet de HCA sur la satiété. En effet, la prise de poids au terme de l'expérience semblait être dépendante des doses de GCE administrées laissant penser que la prise de poids des souris est liée directement à la dose administrée de GCE.

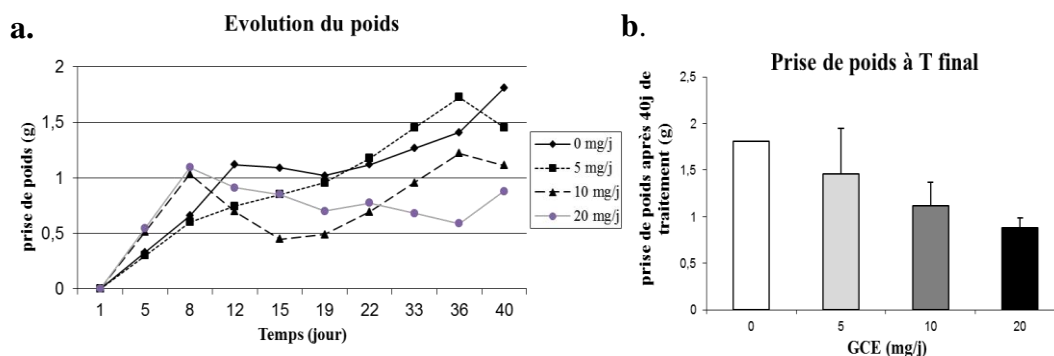


Figure 31 a et b: Évolution de la prise de poids des souris sous gavage GCE aux doses 0; 5; 10 et 20 mg/j durant 40 j (a) et prise de poids finale au terme des 40 jours de traitement (b) (n=2 pour les souris sous 0 mg/j et 5 mg/j de GCE, n=3 pour les souris sous 10 mg/j et 20 mg/j de GCE)

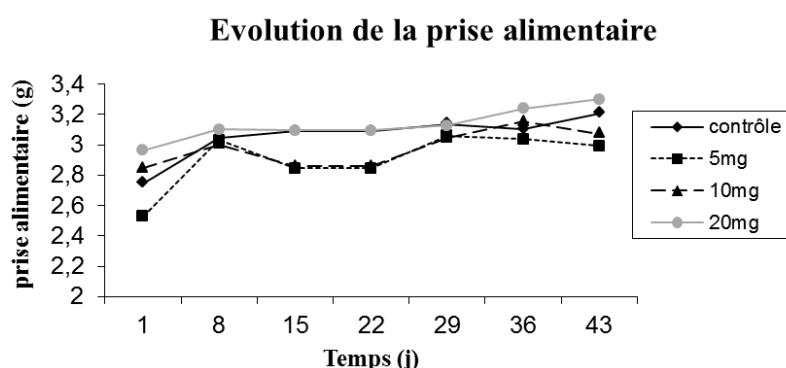


Figure 32: Évolution de la prise alimentaire des souris gavées GCE durant 40 jours (n=2 pour les souris sous 0 mg/j et 5 mg/j de GCE, n=3 pour les souris sous 10 mg/j et 20 mg/j de GCE)

1) Dosages lipidiques plasmatiques

Les prélèvements sanguins ont été réalisés au début de l'expérience, après 20 jours de traitement ainsi qu'à la fin de l'expérience. Nous avons constaté une réduction importante des triglycérides postprandiaux (figure 34 a) et des triglycérides à jeun (figure 34 b) lors de l'augmentation des concentrations de GCE administrées aux souris. La réduction des taux de TG postprandiaux était très importante entre les animaux traités à 20 mg/j de GCE et les animaux contrôles après 20 jours de traitement. D'autre part, la réduction des taux de TG à jeun est plus tardive puisqu'elle n'a été détectée qu'au terme de l'étude. Cette réduction des taux de TG à jeun concorde avec l'observation de la diminution de sécrétion de VLDL mise en évidence par la littérature lors de l'inhibition d'ACL (Wang, Q., *et al.*, 2010).

Nos résultats rejoignent ceux de la littérature concernant la réduction des taux de triglycérides lors d'une administration de GCE chez les souris. Toutefois, la plupart des

études de la littérature n'ont porté que sur des dosages d'échantillons plasmatiques à jeun des animaux. Or, LSR est impliqué dans la clairance des lipoprotéines riches en triglycérides (en particulier les chylomicrons) en phase postprandiale, c'est pourquoi les dosages plasmatiques ont été réalisés sur les échantillons plasmatiques postprandiaux et à jeun. Il apparaît que les taux de triglycérides postprandiaux sont aussi affectés par l'administration de GCE, ce qui suggère un effet de GCE sur LSR.

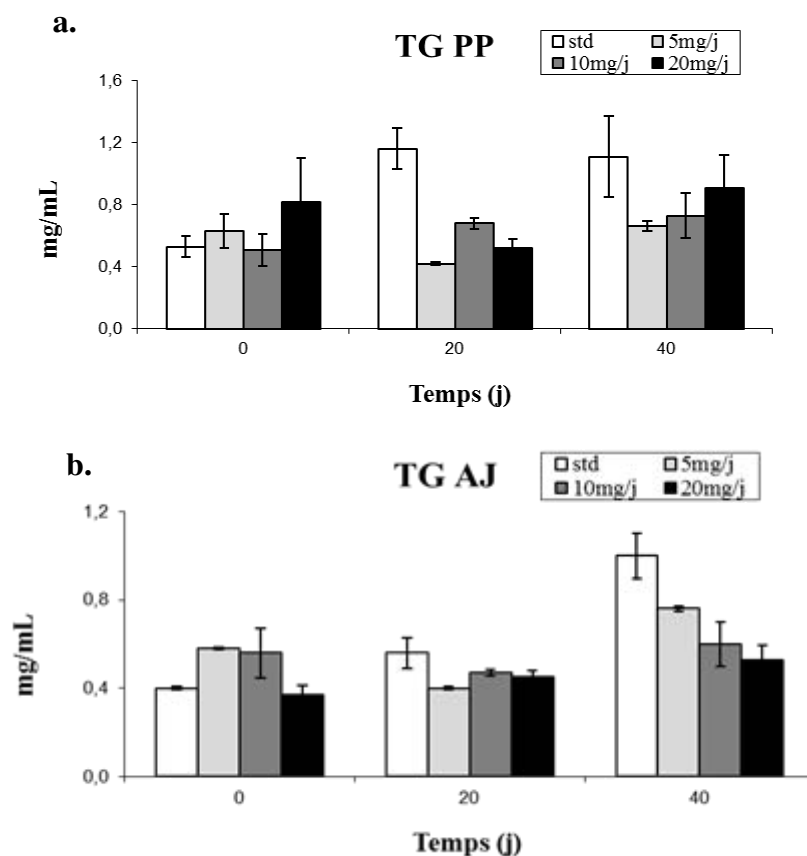


Figure 33 a et b: Dosages plasmatiques de TG postprandiaux (a) et à jeun (b) à T0, 20 jours et 40 jours de traitement (n=2 pour les souris sous 0 mg/j et 5 mg/j de GCE, n=3 pour les souris sous 10 mg/j et 20 mg/j de GCE)

Cette diminution plasmatique des TG est accompagnée par une augmentation du glucose à jeun (figure 35 b) dépendante des doses de GCE administrées aux souris. La différence a été très importante principalement entre les souris contrôles et celles traitées avec la dose de 20 mg/j de GCE. Cependant, aucune différence n'a pu être observée concernant les concentrations postprandiales (figure 35 a) de glucose des souris soumises aux différents traitements.

Ces modifications de glycémie à jeun n'apparaissent qu'au terme de l'étude et semblent être une conséquence tardive de la suppression de la lipogenèse. En effet, comme il

a été expliqué auparavant, la transcription des enzymes impliquées dans la lipogenèse nécessite la présence de glucose et d'insuline pour être induite (Puigserver, P., *et al.*, 2003). En cas de suppression de la lipogenèse, les taux plasmatiques de glucose semblent être perturbés. La lipogenèse ayant comme substrat premier le glucose, la suppression de cette voie de lipogenèse pourrait entraîner une accumulation du glucose, qui se retrouverait en partie dans la circulation générale.

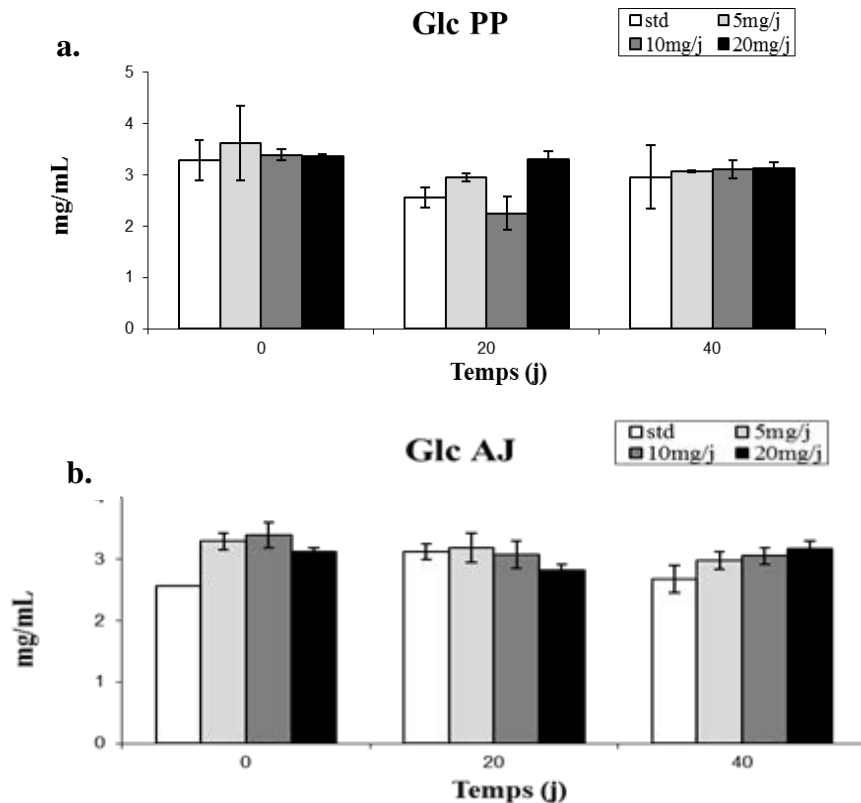


Figure 34 a et b: Dosages plasmatiques de glucose postprandial (a) et à jeun (b) à T0, 20 jours et 40 jours de traitement (n=2 pour les souris sous 0 mg/j et 5 mg/j de GCE, n=3 pour les souris sous 10 mg/j et 20 mg/j de GCE)

Aucune différence de taux de cholestérol total plasmatique (figure 36 a et b) n'a été observée lors du traitement GCE. Cette absence de différence est en désaccord avec certains articles observant une réduction d'environ 40% de taux de cholestérol plasmatique (Pearce et al. 1998) lors de l'inhibition d'ACL par l'inhibiteur SB-204990, inhibiteur plus puissant que HCA. En effet, une partie de l'acétyl-CoA cytosolique, produit par l'activité d'ACL, est converti en 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA (HMG-CoA), substrat essentiel de la synthèse de cholestérol. Cette absence de différence pourrait être expliquée par la différence d'inhibiteur utilisé car SB-204990 a été montré comme étant un inhibiteur plus fort d'ACL que HCA (Pearce, N. J., *et al.*, 1998).

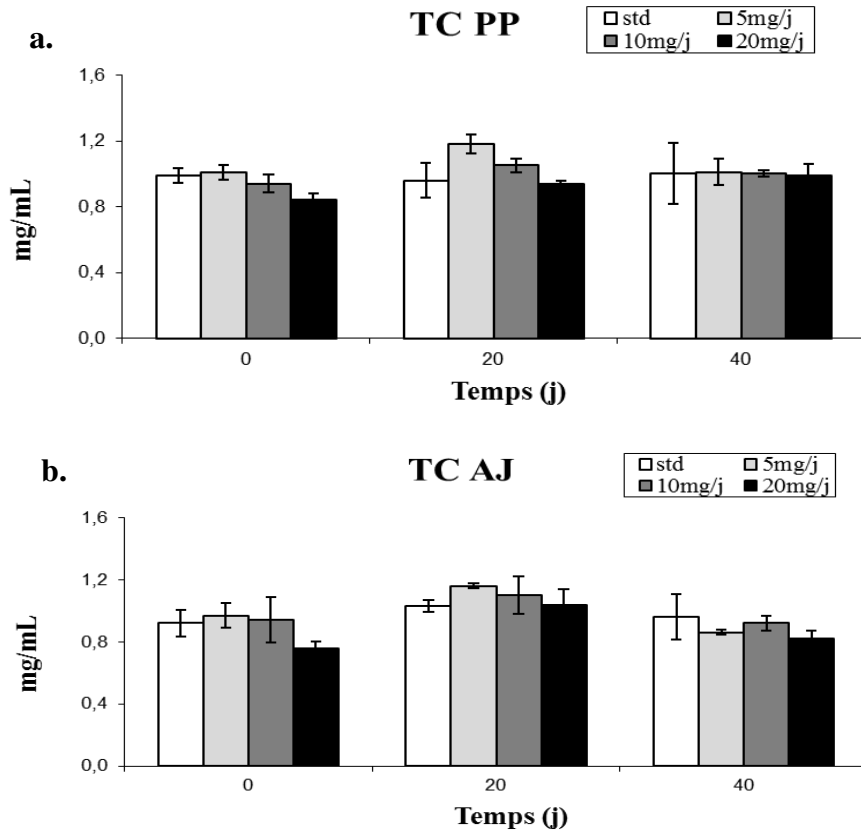


Figure 35 a et b: Dosages plasmatiques de TC postprandiaux (a) et à jeun (b) à T0, 20 jours et 40 jours de traitement (n=2 pour les souris sous 0 mg/j et 5 mg/j de GCE, n=3 pour les souris sous 10 mg/j et 20 mg/j de GCE)

2) Analyses protéiques par immunoblots

Les westerns blots réalisés sur le contenu cytosolique hépatique ont révélé une légère diminution de l'expression de l'*ATP citrate lyase* (ACL) ainsi que de *Fatty Acid Synthase* (FAS) (figure 37 a et b). La diminution de l'expression d'ACL ne nous permet pas de conclure sur la possible régulation de l'expression d'ACL par la suppression de son activité. Cependant, l'enzyme FAS, qui exerce son activité en aval de celle d'ACL, en convertissant l'acétyl-CoA, le produit d'ACL, en malonyl-CoA voit son expression diminuer lors du gavage avec la plus élevée des concentrations de GCE utilisée dans cette étude. Son action semble donc dépendante de la production d'acétyl-CoA, réduite lors de la diminution de la lipogenèse selon notre hypothèse.

Wang et al ont mis en évidence un phénomène compensatoire de la voie de synthèse *de novo* des triglycérides en observant l'augmentation de l'expression de FAS lors de la suppression de l'activité d'ACL sous régime standard. Or, notre expérience montre une tendance contraire (sans significativité). Une réponse différente peut être due à la différence

de protocole utilisé. En effet, leur étude a porté sur la suppression de la lipogenèse lors d'une infection par i.v. d'adénovirus contrôle Ad-shLacZ ou d'adénovirus ciblé Ad-shACL.

L'effectif apparaît trop faible (n=2 pour les animaux témoins et traités à 5 mg/j de GCE et n=3 pour les animaux traités à 10 et 20 mg/j de GCE) pour pouvoir conclure à une différence significative. Néanmoins, la différence de prise de poids observée lors de l'étude ainsi que la diminution des TG et l'augmentation du glucose plasmatiques nous ont incités à poursuivre l'analyse sur la modification du statut lipidique au niveau hépatique résultant du gavage avec GCE.

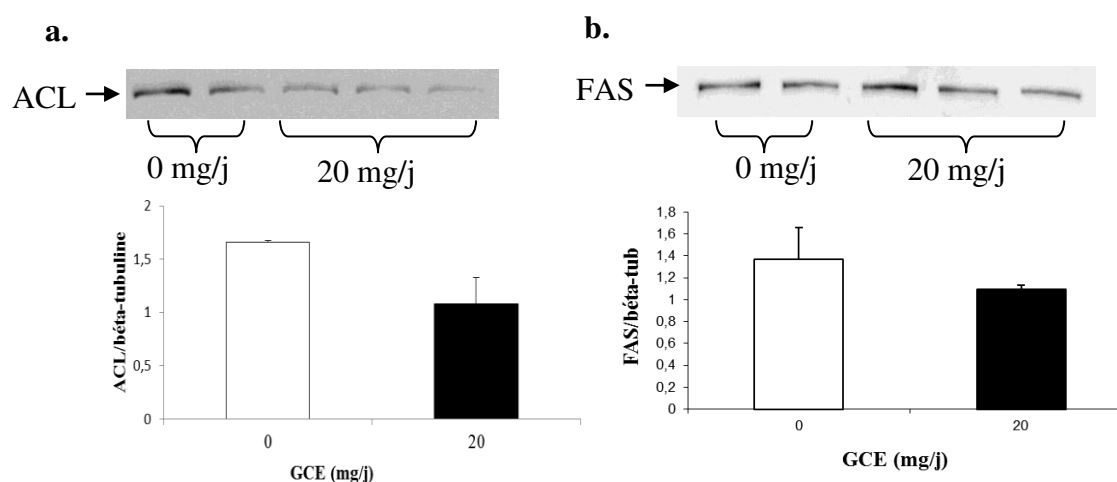


Figure 36 a et b: Eexpression d'ACL (a) et FAS (b) dans le contenu cytosolique des foies de souris gavées avec GCE durant 40 jours (n=2 pour les souris contrôles et n=3 pour les souris gavées avec 20 mg/j de GCE). Les immunoblots ont été réalisés sur les membranes totales de foies ainsi que sur le contenu cytosolique hépatique tel qu'expliqué dans le chapitre 2 "Matériels & Méthodes"

L'étude du statut des récepteurs lipoprotéiques a révélé une augmentation de l'expression de LSR proportionnelle à l'augmentation des concentrations en GCE (figure 38). De façon très intéressante, il a été observé une augmentation importante de 82% de l'expression de LSR dans les membranes totales des foies des souris gavées avec 20 mg/j d'extrait de *Garcinia cambogia*, comparée aux souris contrôles. L'augmentation de l'expression de LSR semblait être dépendante des doses de GCE administrées quotidiennement.

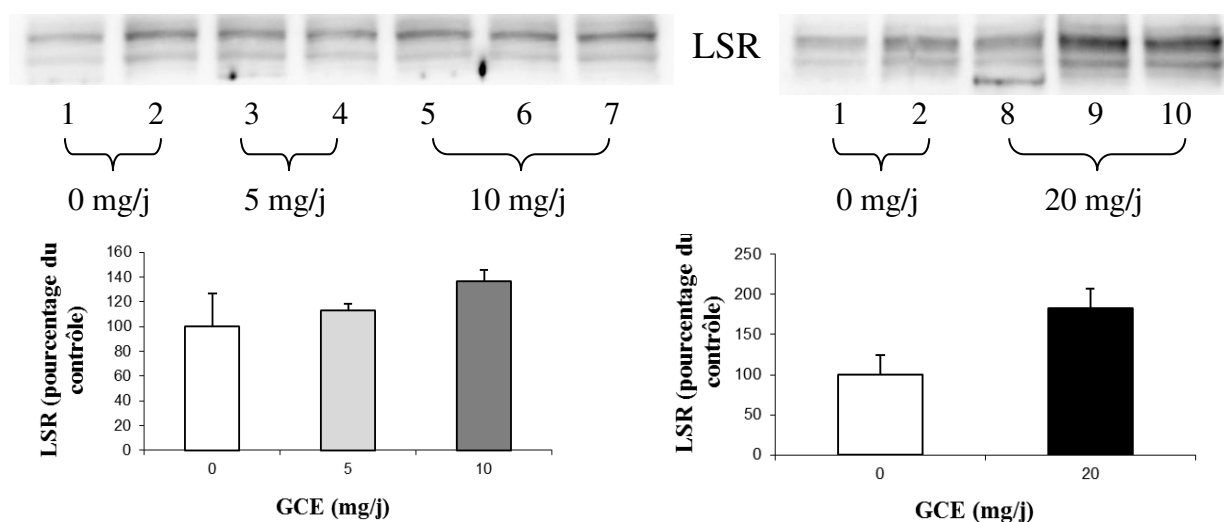


Figure 37: Expression de LSR dans les membranes totales de foie de souris gavées avec 0; 5; 10 et 20 mg/j de GCE durant 40 jours (n=2 pour les souris sous 0 mg/j et 5 mg/j de GCE, n=3 pour les souris sous 10 mg/j et 20 mg/j de GCE)

Cette augmentation d'expression de LSR est accompagnée par une diminution importante de l'expression des lipases de la paroi endothéliale (figure 39 a et b), la lipoprotéine lipase (LpL) et la lipase hépatique (HL), principalement chez les souris traitées à 20 mg/jour durant 40 jours, comparée aux souris contrôles. Cette modification d'expression de ces deux lipases pourrait être le résultat d'un rétrocontrôle afin de compenser la surexpression de LSR. En effet, les lipases de la paroi endothéliale libèrent des acides gras libres essentiels pour l'activité de LSR comme récepteur lipoprotéique. En l'absence de ces acides gras libérés par hydrolyse des TG contenus dans les lipoprotéines riches en TG (VLDL et chylomicrons), LSR redevient inactif.

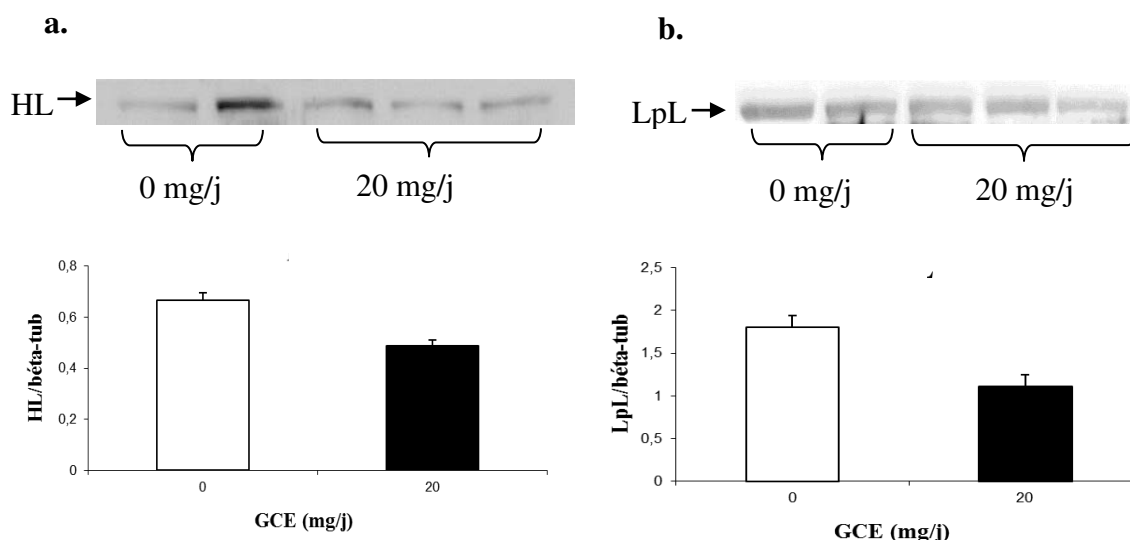


Figure 38 a et b: Expression des lipases de la paroi endothéliale HL (a) et LpL (b) dans le contenu cytosolique des foies de souris gavées avec GCE durant 40 jours (n=2 pour les souris contrôles et n=3 pour les souris gavées avec 20 mg/j de GCE)

3) Dosages lipidiques tissulaires

Nous avons ensuite déterminé si la distribution tissulaire des lipides était modifiée suite au traitement de GCE.

Les dosages de cholestérol et de triglycérides ont révélé un enrichissement important du foie en triglycérides sans changement spécifique des taux de cholestérol hépatique (figure 40 a et b). L'absence de modification du contenu en cholestérol pourrait refléter l'absence de perturbation du transport des lipoprotéines riches en cholestérol telles que les LDL et les HDL, comme nous avons pu le constater par l'absence de modification du cholestérol plasmatique.

Cet enrichissement hépatique en triglycérides confirme les résultats de la littérature lors de la suppression de la lipogenèse et de ce fait démontre l'effet de GCE (Wang, Q., *et al.*, 2010). Bien que la lipogenèse soit réduite, les triglycérides exogènes (apportés par l'alimentation et transportés sous forme de chylomicrons) sont épurés de la circulation sanguine par LSR qui les fait entrer dans le foie par endocytose. La forte diminution de sécrétion de VLDL consécutive à la suppression de la lipogenèse les empêche alors d'être redistribués et transportés sous la forme de lipoprotéines, ce qui pourrait expliquer l'accumulation de TG hépatiques.

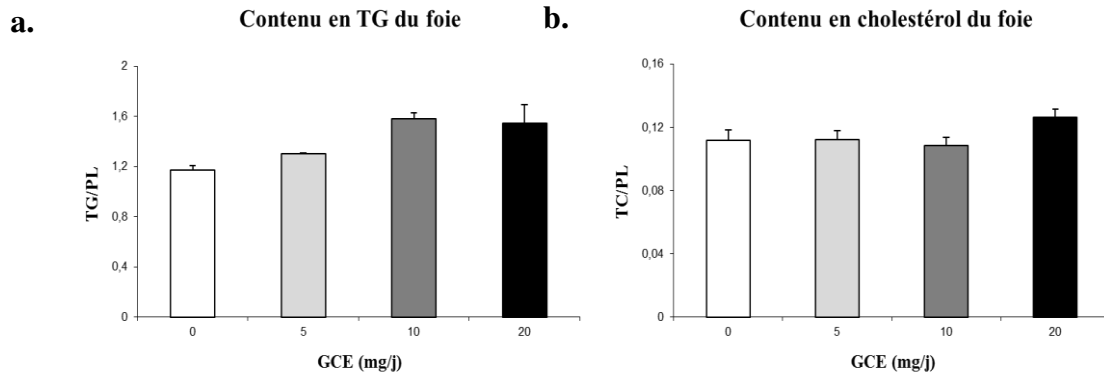


Figure 39 a et b: Dosages  patiques de TG (a) et cholestérol (b) des souris gavées avec GCE après 40 jours de traitement (n=2 pour les souris sous 0 mg/j et 5 mg/j de GCE, n=3 pour les souris sous 10 mg/j et 20 mg/j de GCE)

Les dosages lipidiques du muscle révèlent un enrichissement surprenant en triglycérides ainsi qu'en cholestérol musculaire (figure 41 a et b). L'enrichissement du muscle squelettique en triglycérides n'est pas bénin. En effet, il pourrait provoquer la formation de gouttelettes lipidiques intramyocytaires relatives à un phénomène d'insulinorésistance musculaire (Pan, D. A., *et al.*, 1997, Storlien, L. H., *et al.*, 1991). Cela amène l'hypothèse de l'influence de l'insuline rejoint par l'hyperglycémie observée chez les animaux ayant reçu le GCE. L'insuline pourrait être à l'origine de multiples perturbations lipidiques périphériques en absence de lipog nese.

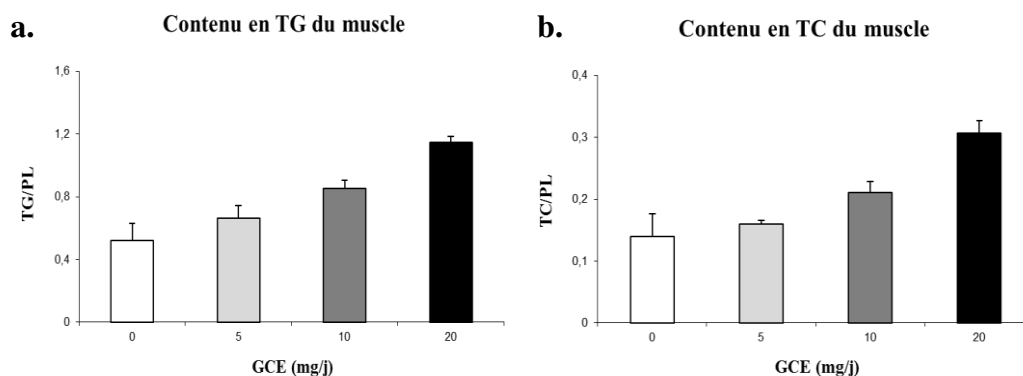


Figure 40 a et b: Dosages musculaires de TG (a) et cholestérol (b) des souris gavées avec GCE après 40 jours de traitement (n=2 pour les souris sous 0 mg/j et 5 mg/j de GCE, n=3 pour les souris sous 10 mg/j et 20 mg/j de GCE)

Cependant, aucune différence n'a été observée au niveau du contenu en triglycérides du tissu adipeux (figure 42).

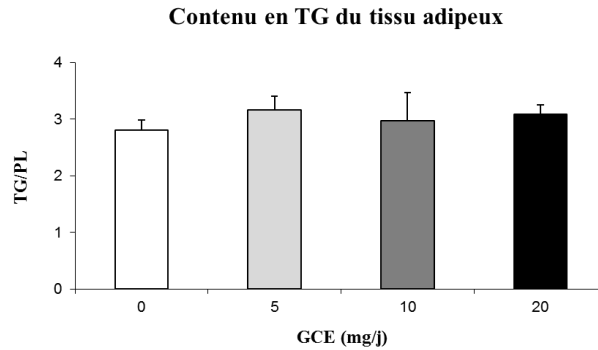


Figure 41: Dosage adipocytaire de TG des souris gavées avec GCE après 40 jours de traitement (n=2 pour les souris sous 0 mg/j et 5 mg/j de GCE, n=3 pour les souris sous 10 mg/j et 20 mg/j de GCE)

Les résultats montrant un enrichissement lipidique du muscle chez les animaux gavés avec le GCE ont amené l'hypothèse d'une modification de l'expression de la lipoprotéine lipase au niveau musculaire. Les immunoblots n'ont révélé aucune modification de l'expression de la lipoprotéine lipase dans les homogénats de muscle, comme le montre la figure 43. L'enrichissement musculaire en triglycérides n'est pas la conséquence d'une modification de l'expression de la LpL. L'implication de l'insuline dans cette accumulation musculaire reste donc la principale hypothèse et reste à être vérifiée par d'autres analyses.

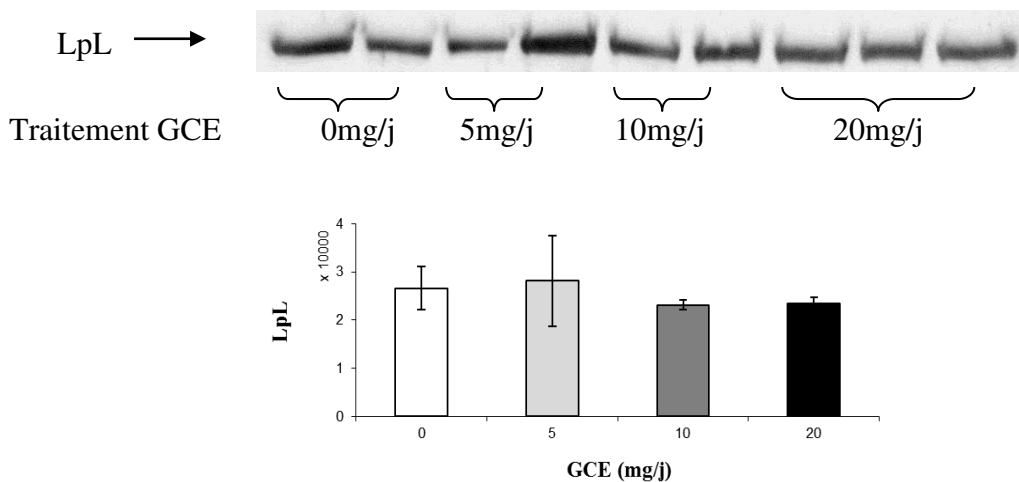


Figure 42: Expression de la LpL musculaire des souris gavées avec GCE après 40 jours de traitement (n=2 pour les souris sous 0; 5 et 10 mg/j de GCE, n=3 pour les souris sous 20 mg/j de GCE)

4. Conclusion de l'étude

Les effets modulateurs de l'expression de LSR par la suppression de la lipogenèse ont permis de définir la dose de 20 mg/j de GCE comme étant la dose optimale soluble ayant le plus d'effet sur le métabolisme lipidique par l'action de HCA. Cependant, l'augmentation de 80% de l'expression de LSR et les conséquences observées sur le métabolisme lipidique périphérique dans cette étude, sur un petit échantillon de 10 animaux au total, doivent être confirmées par l'augmentation de la taille de l'échantillon d'animaux traités.

III. ÉTUDE DE L'EFFET DE L'EXTRAIT DE *GARCINIA CAMBOGIA* SUR L'EXPRESSION DE LSR : CHOIX DE LA DOSE 20 MG/J

1. Objectif de l'étude

Après avoir identifié la dose de 20 mg/j de GCE comme étant la dose optimale permettant la suppression de la lipogenèse chez les souris C57Bl6/J, et après avoir détecté les troubles de l'homéostasie conséquents à cette suppression de la lipogenèse, il a été important de consolider ces résultats en augmentant l'effectif des animaux impliqués dans l'étude. De plus, l'huile de maïs utilisée comme véhicule, avec l'eau physiologique, contient principalement de l'acide oléique (27,33%), connu pour augmenter l'activité de LSR *in vitro* (Bihain, B. E. and Yen, F. T., 1992). Les souris qui ont été gavées dans l'étude précédente avec uniquement le véhicule (ne contenant pas d'HCA mais composé d'eau physiologique et d'huile de maïs) ont sans doute déjà subi une modification de leur état métabolique en comparaison avec des souris non traitées. Il a donc été intéressant pour cette l'étude d'observer les effets du véhicule seul sur le métabolisme lipidique des souris afin d'isoler le rôle du traitement à l'extrait de *Garcinia cambogia*.

2. Mise en place de l'étude

Une faible remontée du poids des animaux traités à 20 mg/j de HCA a été observée après 30 jours de traitement dans la première expérience, signe d'une compensation potentielle au niveau du métabolisme lipidique. Il a donc été décidé pour cette nouvelle étude

de ne traiter que 30 jours les animaux par gavage afin de s'affranchir de cette compensation éventuelle. Cette étude a été réalisée sur 3 groupes de 10 souris durant 30 jours en administration par gavage de 300µL de solution (groupe « Contrôle », groupe « Huile de maïs » et groupe « GCE ») (Voir le chapitre « Matériels et Méthodes »).

Nous avons traité les souris de la manière suivante :

- Groupe « Contrôle » : 10 souris ont été gavées 300 µL/j avec uniquement de l'eau physiologique
- Groupe « Huile de maïs » : 10 souris ont été gavées 300 µL/j avec une solution contenant 50% d'eau physiologique et 50% d'huile de maïs
- Groupe « GCE » : 10 souris ont été gavées 300 µL/j avec la solution du deuxième groupe dans laquelle est incorporé l'extrait de *Garcinia Cambogia* (GCE) contenant le HCA. Cette solution a pour concentration 67 g/L de GCE afin d'obtenir 20 mg dans un volume de 300µL de gavage quotidien.

Durant cette période, le poids a été mesuré 2 fois par semaine alors que la prise alimentaire a été mesurée chaque semaine. Les dosages sanguins ont été réalisés au début et au terme de l'étude afin, d'une part de mesurer les taux lipidiques plasmatiques (triglycérides, cholestérol total et glucose) postprandiaux (le matin à 9h) et à jeun (à 12h, après 3h de jeûne), d'autre part de doser la leptine et l'insuline sur les échantillons plasmatiques à jeun. Les échantillons plasmatiques à jeun ont aussi été utilisés afin de réaliser les profils lipoprotéiques sur un pool de 3 échantillons de chaque groupe. Le 40^{ème} jour, les souris ont été mises à jeun à 9h puis sacrifiées à 12h après anesthésie gazeuse à l'halothane. La récupération de 4 structures périphériques (foie, muscle squelettique, cœur et tissu adipeux) a permis l'évaluation biochimique du statut des récepteurs lipoprotéiques et du statut lipidique.

3. Résultats et discussion

La courbe de prise de poids des souris du groupe « GCE » a montré une stabilité à partir de 2 semaines de traitement contrairement aux souris du groupe « Huile de maïs », qui ont vu leur courbe de prise de poids inchangée (figure 44 a). Cette stabilité observée concernant la prise de poids des animaux du groupe « GCE » est arrivée plus tardivement que lors de la première étude, certainement due au changement de produit. C'est pourquoi, au

terme de l'étude, le traitement GCE a révélé une différence non significative de 0,5 g entre le groupe « Huile de maïs » et le groupe gavé avec 20 mg/j d'extrait de *Garcinia cambogia* « GCE » (figure 44 b). Cette différence de prise de poids a été inférieure à celle observée lors de la première expérience mais confirme cependant l'effet de perte de poids lors du gavage de GCE. Une légère augmentation non significative de la prise de poids a été observée entre le groupe « Contrôle » et « Huile de maïs » indiquant sans doute l'implication de l'huile de maïs dans la prise de poids des souris lors des traitements.

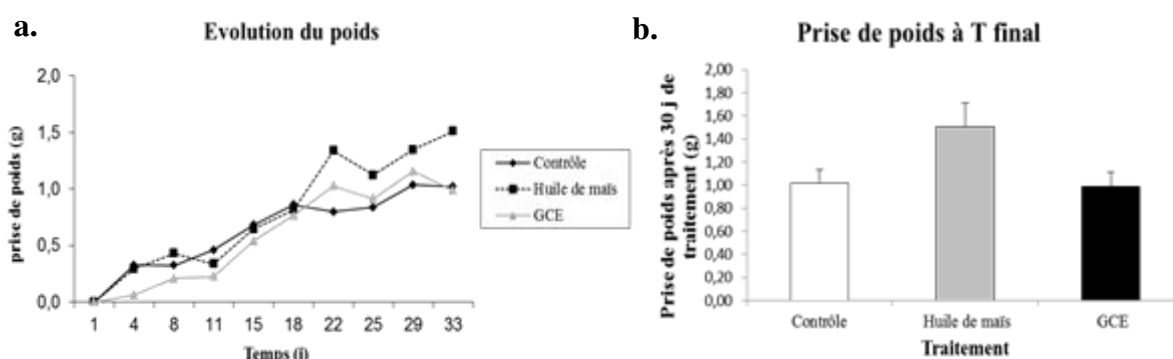


Figure 43 a et b: Évolution de la prise de poids (a) et prise de poids au terme de l'étude (b) des souris gavées avec GCE durant 30 jours (n=8 souris par groupe)

La prise alimentaire des souris a révélé une légère différence entre les groupes, qui restant cependant non significative (figure 45).

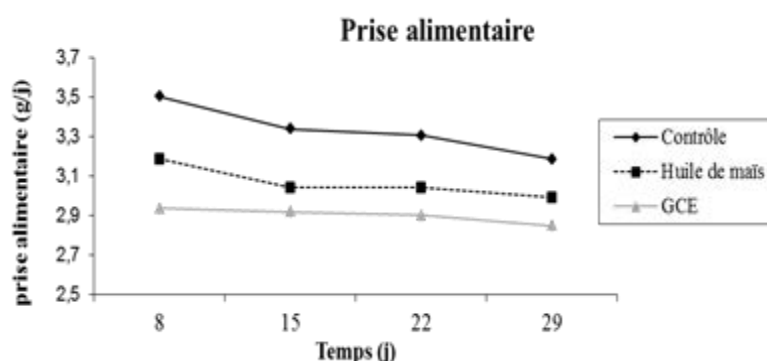


Figure 44: Évolution de la prise alimentaire des souris sous gavage GCE durant 30 jours (n=8 souris par groupe)

1) Dosages lipidiques plasmatiques

Lors d'études précédentes, nous avons constaté une variation importante des concentrations basales de lipides plasmatiques chez les animaux avant traitement. C'est

pourquoi les dosages plasmatiques ont été réalisés avant le début de l'expérience pour composer des groupes homogènes au niveau du poids et de leur contenu lipidique plasmatique. Puis, des dosages plasmatiques finaux ont été réalisés afin d'observer les effets des différents traitements. Partant du principe de la totale homogénéité des différents groupes au début de l'expérience, nous nous sommes intéressés aux différences observées entre les groupes à T final sans comparaison avec les dosages à T0.

Les dosages plasmatiques finaux ont confirmé la réduction importante des taux de triglycérides postprandiaux et à jeun lors d'un traitement au GCE, comparé au traitement à l'huile de maïs uniquement (figure 46 a et b). Les données de la littérature ont donc été validées dans notre modèle et confirment l'action de l'extrait sur nos souris.

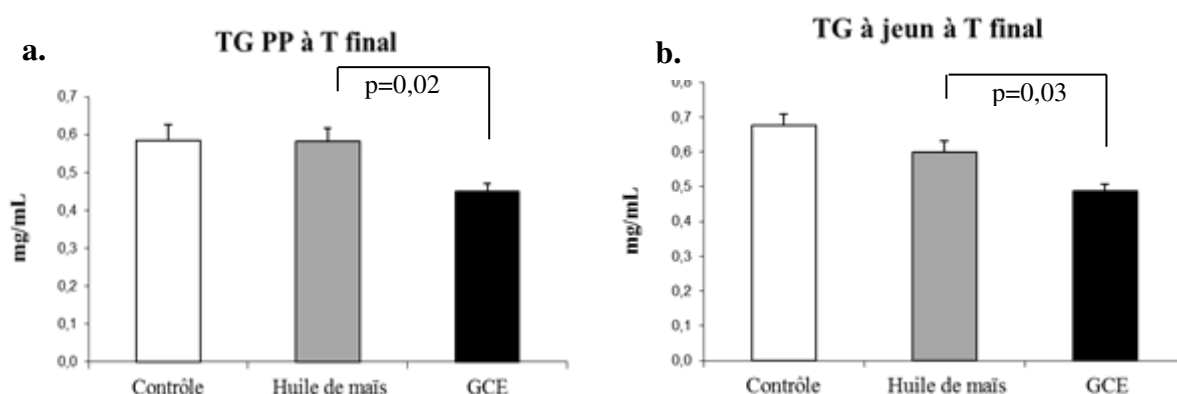


Figure 45 a et b: Dosages plasmatiques des TG postprandiaux (a) et à jeun (b) des souris gavées GCE durant 30 jours (n=8 souris par groupe)

D'autre part, les dosages plasmatiques finaux ont confirmé l'augmentation des concentrations de glucose postprandiales et à moindre mesure à jeun lors du traitement au GCE, comparée aux souris gavées avec l'huile de maïs uniquement (figure 47 a et b).

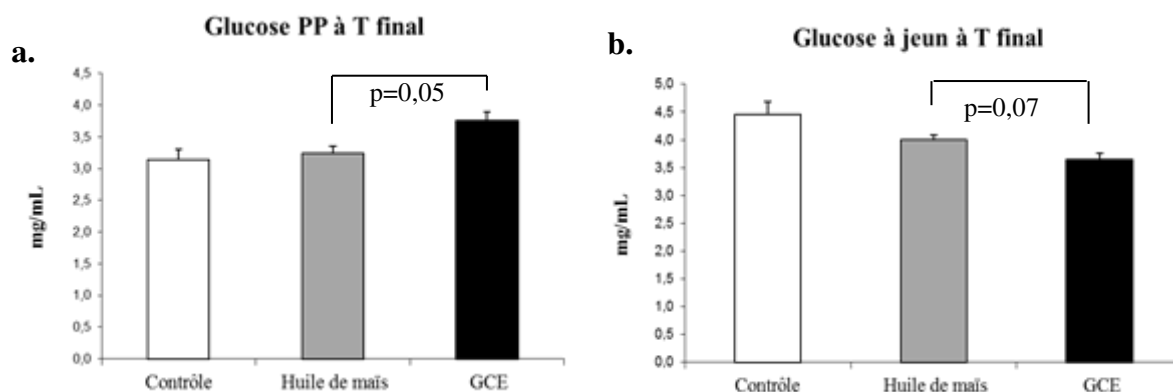


Figure 46 a et b: Dosages plasmatiques du glucose postprandial (a) et à jeun (b) chez les souris gavées GCE durant 30 jours (n=8 souris par groupe)

Les dosages plasmatiques ont aussi révélé un effet du traitement à l'huile de maïs sur les taux de cholestérol postprandiaux et à jeun, ceci comparé au traitement des animaux contrôles (figure 48 a et b). Cependant, aucune différence significative de taux de cholestérol n'a été observée entre les animaux traités HCA et ceux gavés avec l'huile de maïs uniquement.

L'huile de maïs composée de 59,6 % d'acides gras polyinsaturés, 27,4 % d'acides gras monoinsaturés et 12,9 % d'acides gras saturés dont 3 % sont sous forme d'acides gras libres a une forte teneur en acide linoléique ω -6 (53,52 %) et acide oléique (27,33 %) comme cité auparavant. Les acides gras de la famille des ω -6 sont largement connus pour leur action anti-cholestérolémique (Mensink, R. P., *et al.*, 1992, Mensink, R. P., *et al.*, 2003, Nichaman, M. Z., *et al.*, 1967, Shepherd, J., *et al.*, 1980), c'est pourquoi l'administration orale par gavage d'huile de maïs riche en acide gras ω -6 menant à une diminution modérée mais significative de la cholestérolémie correspond aux résultats déjà publiés dans la littérature.

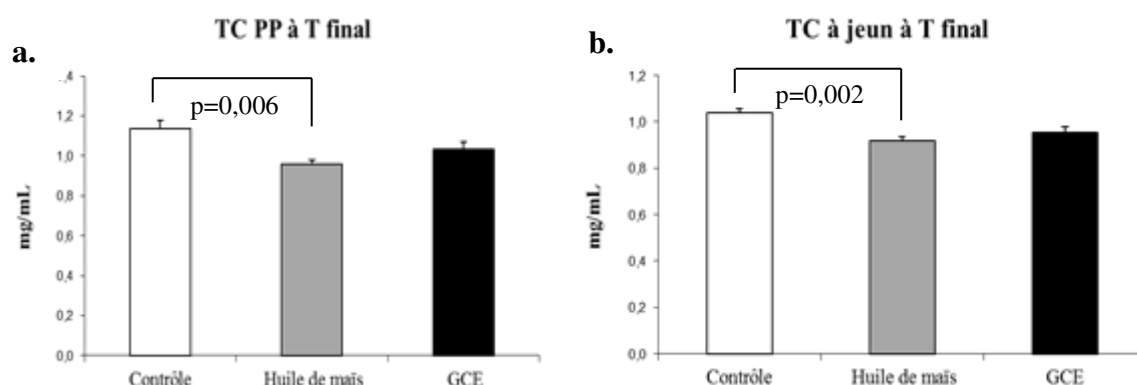


Figure 47 a et b: Dosages plasmatiques du cholestérol postprandial (a) et à jeun (b) chez les souris gavées GCE durant 30 jours (n=8 souris par groupe)

2) Analyses protéiques par immunoblots

Nous avons ensuite focalisé nos études sur les groupes « Huile de maïs » et « HCA ».

Les immunoblots réalisés sur le contenu cytosolique hépatique ont montré une augmentation significative de l'expression d'ACL (figure 49 a). L'hypothèse émise est que la réduction de l'activité ACL lors du traitement « HCA » a semblé avoir pour conséquence l'accumulation de citrate cytosolique. En réponse à cette accumulation, l'expression d'ACL a semblé être augmentée afin de compenser ce déséquilibre. De plus, le traitement « HCA » a eu pour conséquence une augmentation significative de l'expression de FAS (figure 49 b), telle que l'avait montré la littérature en réponse à la suppression de l'activité d'ACL, révélant l'activité de l'extrait sur la lipogenèse (Wang, Q., *et al.*, 2010).

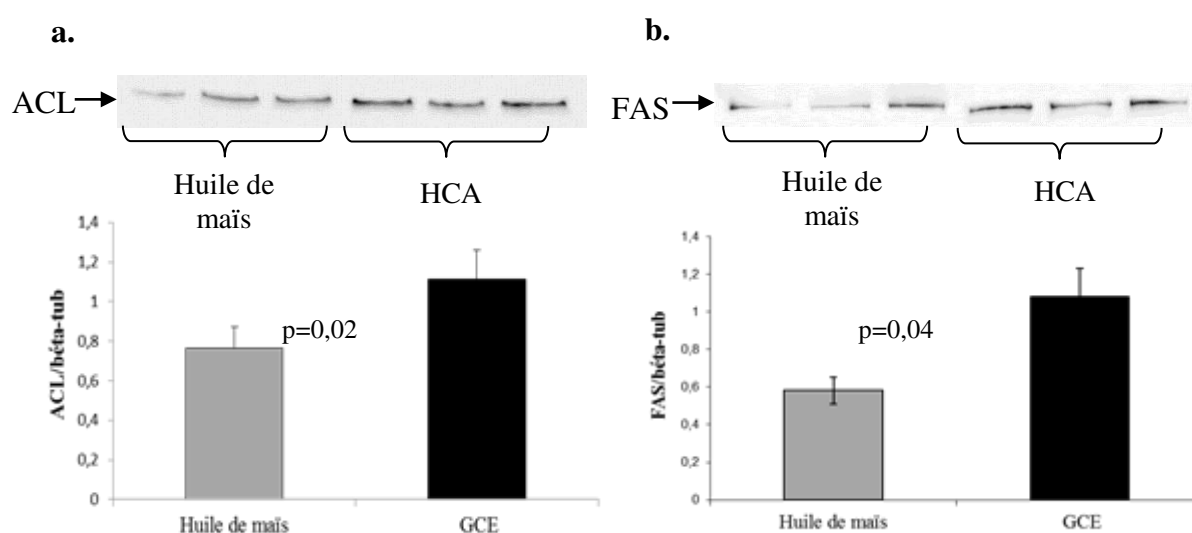


Figure 48 a et b: Immunoblots (n=3 souris représentées par groupe) de l'expression d'ACL (a) et de FAS (b) dans le contenu cytosolique de foie des souris sous gavage GCE durant 30 jours (histogramme : n=8 souris par groupe)

Les immunoblots réalisés sur les membranes totales de foie des souris ont montré une régulation de l'expression des récepteurs lipoprotéiques lors du traitement « GCE ». En effet, il a été observé une augmentation significative de l'expression de LSR de 67% lors du gavage des souris avec l'extrait de *Garcinia cambogia* (figure 50 a) ainsi qu'une tendance à l'augmentation de l'expression de LDLr de l'ordre de 38% (figure 50 b). La surexpression de LSR retrouvée dans cette étude confirme l'effet de l'inhibition de la lipogenèse sur l'expression de LSR dont l'hypothèse avait été établie lors de l'étude de dose.

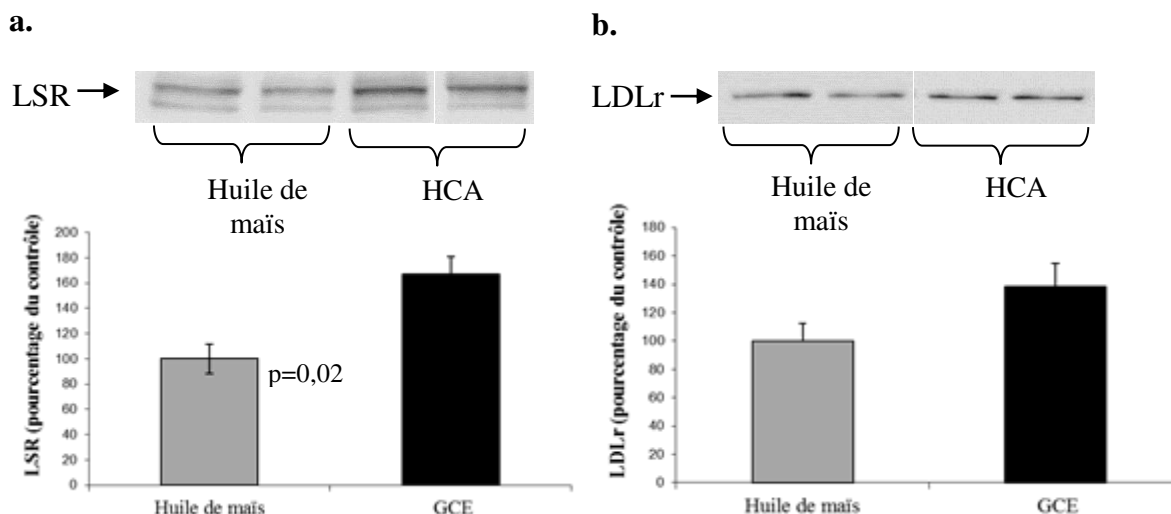


Figure 49 a et b: Immunoblots (n=2 souris représentées par groupe) de l'expression de LSR (a) et de LDLr (b) dans les membranes de foie des souris sous gavage GCE durant 30 jours (histogramme : n=8 souris par groupe)

Cette augmentation de l'expression des récepteurs lipoprotéiques et principalement celle de LSR est accompagnée d'une diminution de l'expression protéique des lipases endothéliales telles que la lipase hépatique (HL) et la lipoprotéine lipase (LpL) (figure 51 a et b). Cependant, cette réduction d'expression n'a pas été aussi importante que celle retrouvée lors de la première étude et reste non significative. Deux hypothèses peuvent être avancées face à cette constatation. Tout d'abord, la diminution importante des lipases hépatiques observées lors de la première étude de 40 jours semblait être une réponse à la surexpression de LSR et à l'accumulation des TG hépatiques. Or, cette dernière étude a été réalisée sur 30 jours, soit 10 jours de moins pouvant être responsables de la mise en place de ce rétrocontrôle. D'autre part, l'extrait de *Garcinia cambogia* étant différent, nous pouvons imaginer que le calcium présent modifie la biodisponibilité de HCA entraînant des perturbations lipidiques moins importantes.

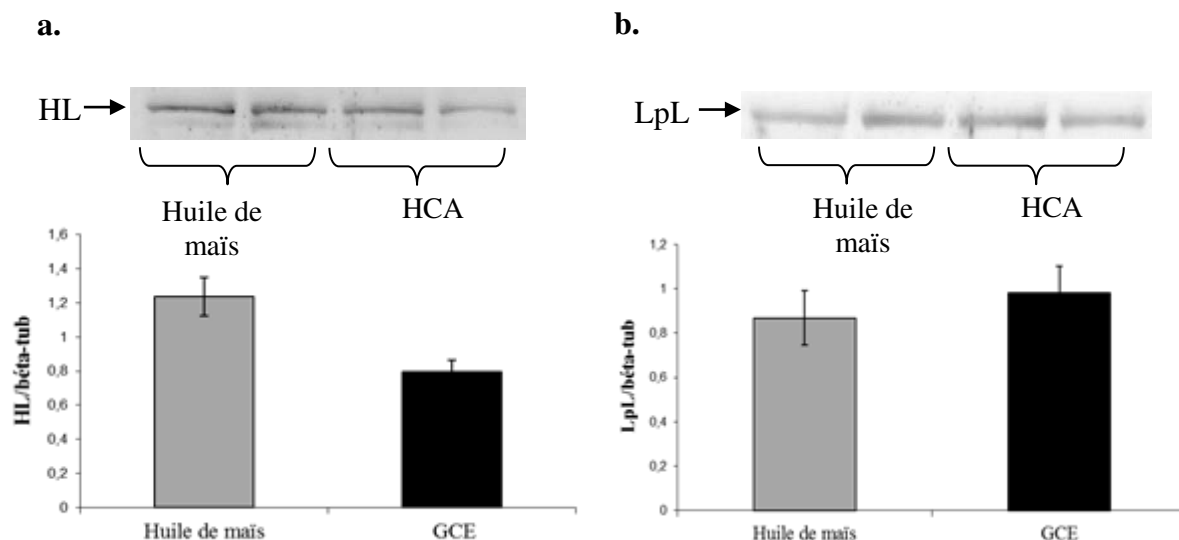


Figure 50 a et b: Immunoblots (n=2 souris représentées par groupe) de l'expression de HL (a) et de LpL (b) dans le contenu cytosolique de foie des souris sous gavage GCE durant 30 jours (histogramme : n=8 souris par groupe)

3) Dosages lipidiques tissulaires

Les dosages lipidiques réalisés sur le foie ont révélé une augmentation significative des TG et du cholestérol (figure 52 a et b). Au cours de la première expérience, une différence importante n'avait été découverte que pour les triglycérides et non le cholestérol total.

Cette différence de contenu en cholestérol hépatique observée n'étant pas décrite par la littérature détectant uniquement des modifications au niveau du contenu en TG, il serait intéressant de savoir qu'elle est l'origine de cette accumulation. Toutefois, la tendance à l'augmentation de l'expression de LDLr hépatique pourrait être étroitement liée à cet enrichissement en cholestérol hépatique. En effet, la réduction de la lipogénèse entraîne une diminution du substrat de HMG-CoA, réduisant la synthèse de cholestérol, qui mène à l'augmentation de l'expression de LDLr dans le but de pallier cette diminution de synthèse endogène.

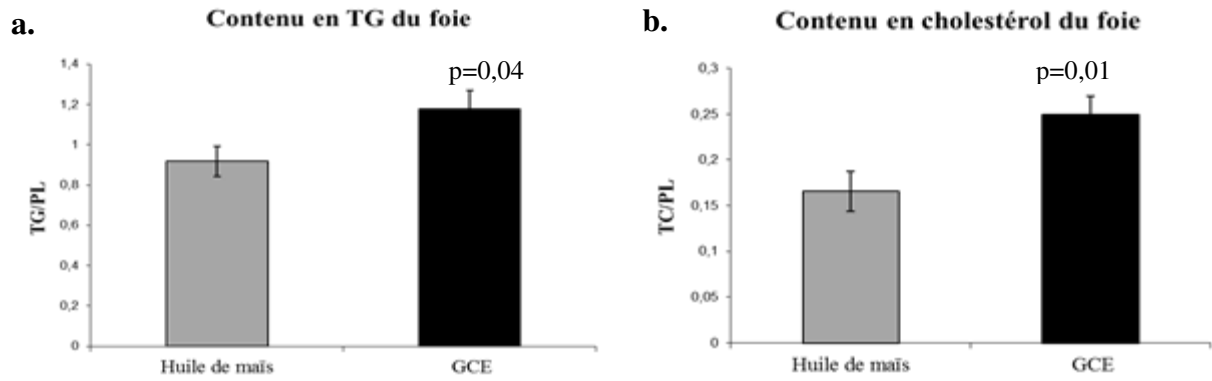


Figure 51 a et b: Contenu hépatique en TG (a) et en cholestérol (b) chez les souris gavées par GCE durant 30 jours (n=8 souris par groupe)

Cet enrichissement lipidique du foie est aussi accompagné par un enrichissement en triglycérides du muscle confirmant les résultats de la première étude (figure 53 a et b). Cependant, aucune différence de contenu en cholestérol musculaire n'est retrouvée.

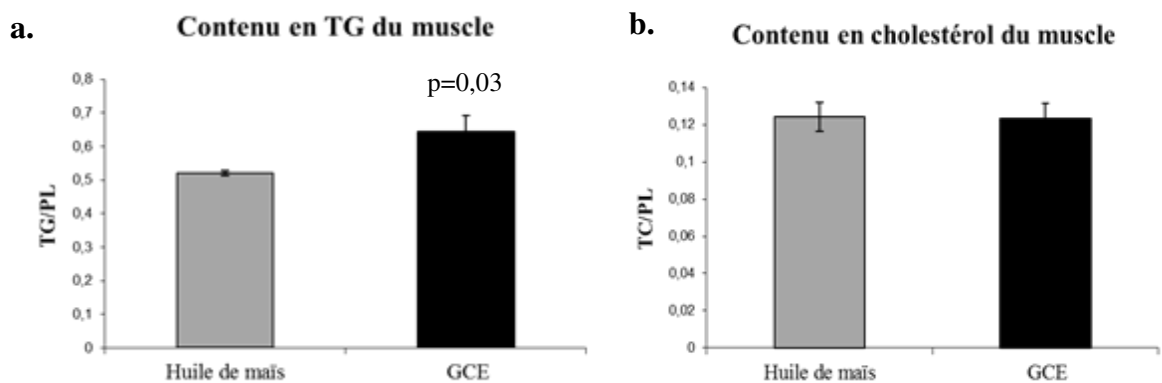


Figure 52 a et b: Contenu musculaire en TG (a) et en cholestérol (b) chez les souris gavées GCE durant 30 jours (n=8 souris par groupe)

Suite à l'observation d'une accumulation lipidique dans le muscle des animaux gavés avec GCE, l'hypothèse d'une accumulation lipidique cardiaque augmentant les risques de maladies cardiovasculaires a été élaborée. Afin de tester cette hypothèse, les cœurs des animaux ont été récupérés lors de la dissection et coupés en 2 parties, congelées séparément. Une partie des échantillons de cœurs récupérés a servi aux dosages lipidiques et l'autre partie a été gardée pour des études immunohistologiques potentielles, c'est pourquoi seulement 5 échantillons d'animaux de chaque groupe ont été dosés, révélant des différences importantes mais non significatives.

C'est ainsi que les résultats des dosages réalisés dans les échantillons de cœur des animaux des groupes « Huile de maïs » et « HCA » ont semblé tendre vers une diminution du contenu en TG et en cholestérol du cœur lors d'un traitement avec HCA (figure 54 a et b).

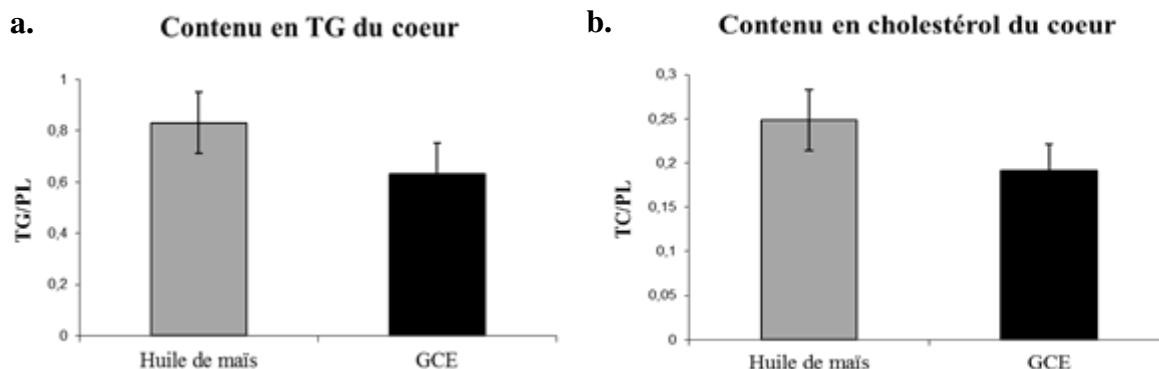


Figure 53 a et b: Contenu en TG (a) et en cholestérol (b) du cœur chez les souris gavées GCE durant 30 jours (n=8 souris par groupe)

D'autre part, aucune différence n'a été observée concernant le contenu en triglycérides du tissu adipeux (figure 55) ce qui confirme les résultats obtenus lors de la première étude.

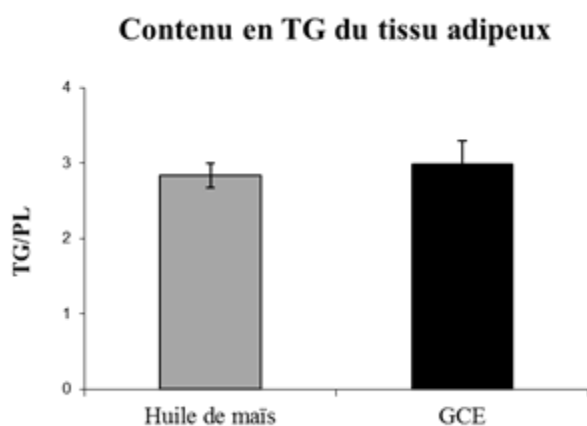


Figure 54: Contenu adipocytaire en TG des souris gavées GCE durant 30 jours (n=8 souris par groupe)

4) Profil lipoprotéique

Un profil lipoprotéique a été réalisé sur un pool de 3 échantillons de chaque groupe afin d'étudier la répartition des lipoprotéines plasmatiques lors de chaque traitement.

Le profil lipoprotéique ayant été réalisé sur des échantillons plasmatiques à jeun, il est normal d'obtenir une très faible quantité de TG lors des dosages (figure 56 a). Le bruit de fond

estimé à 0,15 mg/mL de TG pour 75 μ L d'échantillon a été supprimé du graphique par clarté. Les fractions 4 à 7 sont celles où l'on retrouve les VLDL. Les IDL sont retrouvées dans les fractions 7 à 10. Les LDL sont retrouvées dans les fractions 10 à 13 et les HDL sont retrouvées dans les fractions 13 à 19.

Aucune différence n'est observée entre la répartition du cholestérol dans les lipoprotéines (figure 56 b). Seule une différence de sécrétion de VLDL est observée, comme indique la littérature (Wang, Q., *et al.*, 2010). La réduction de sécrétion des VLDL décrite par la littérature, en réponse à la suppression de la synthèse de TG endogène, est responsable en partie de l'hypotriglycémie observée. Au vu des résultats obtenus, il semblerait que l'hypotriglycémie observée soit le résultat d'une part de la réduction de sécrétion des VLDL et d'autre part de la surexpression du récepteur LSR, ce qui engendrerait une accumulation de triglycérides hépatiques sans possibilité de les éliminer par la formation de lipoprotéines (VLDL).

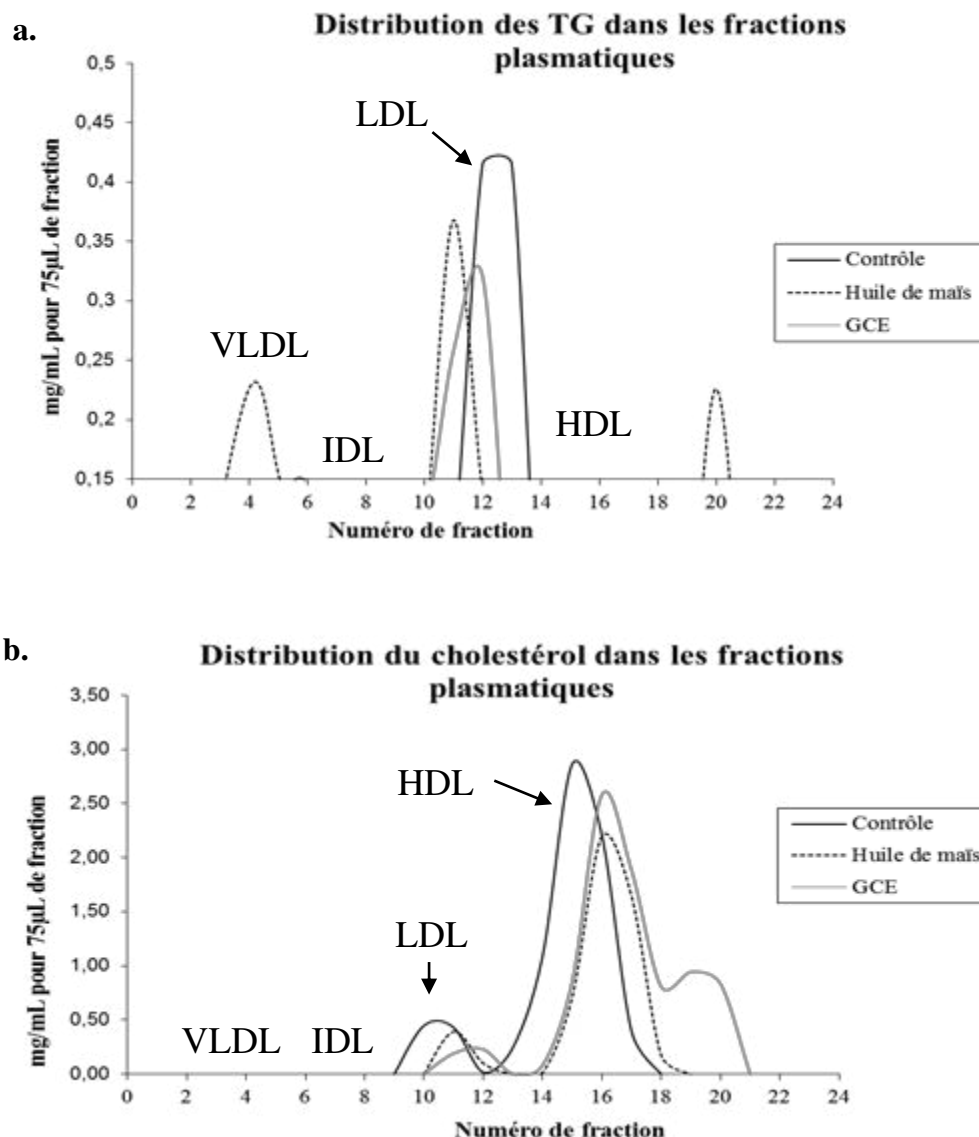


Figure 55 a et b: Profil lipoprotéique de TG (a) et de cholestérol (b) réalisé par HPLC sur un pool de 3 échantillons plasmatiques à jeun de chaque groupe au terme de l'étude

5) Dosages des taux de leptine et d'insuline plasmatiques

Une étude en particulier s'est intéressée aux variations de leptine et d'insuline lors d'un traitement au GCE en présence d'une alimentation riche en sucre (10% de sucre dans la boisson des souris) (Hayamizu, K., *et al.*, 2003). Il apparaît que le traitement au GCE, intégré dans l'alimentation des souris durant 4 semaines, induit une diminution significative des taux d'insuline et une tendance à la diminution des taux de leptine plasmatique. Cependant, ces résultats ont été montrés chez des souris sous stress glucidique, il a donc été intéressant de s'interroger sur les régulations insulinémiques et leptinémiques de GCE sous régime standard.

De nombreux résultats obtenus au cours de nos études (glycémie élevée, enrichissement en cholestérol musculaire, ...) laissent penser que l'insuline joue un rôle important dans les perturbations lipidiques dues à la réduction de la lipogenèse.

Les dosages ELISA ont été réalisés sur les échantillons plasmatiques à jeun des souris sans dilution pour le dosage d'insuline et dilué 5 fois pour le dosage de leptine. Les dosages d'insuline et de leptine ne révèlent aucune différence significative entre les souris gavées avec le véhicule (« Huile de maïs ») et les souris gavées avec l'extrait (« GCE ») malgré une légère augmentation des taux de leptine plasmatique chez les animaux traités avec l'extrait.

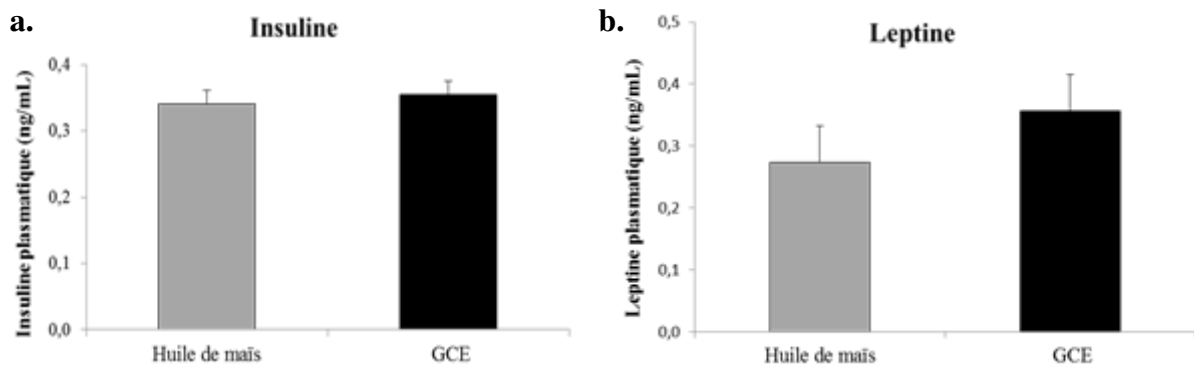


Figure 56 a et b: Dosages des concentrations d'insuline (a) et de leptine (b) plasmatiques par kit de dosage ELISA (n=8 souris par groupe)

Les taux d'insuline et de leptine plasmatiques n'étant pas modifiés lors du traitement à l'extrait, les modifications de glycémie observées ne semblent donc pas être dues à ces hormones (figure 57 a et b). Ces résultats ne rejoignent pas la littérature. Cependant, sous régime standard, les effets sont sans doute différents que ceux observés sous stress glucidique. Cela ne nous permet pas d'expliquer les variations de glycémie ainsi que les enrichissements lipidiques musculaires observés.

4. Analyses statistiques

L'étude statistique a été réalisée sur un échantillon de 11 animaux (5 animaux dans le groupe « Huile de maïs » et 6 animaux dans le groupe « GCE »). Les échantillons ont été considérés comme ayant une distribution normale et pouvant faire l'objet de tests statistiques paramétriques.

1) Facteurs impliqués dans les perturbations de l'homéostasie lipidique périphérique: Corrélations

Tableau 13: Matrice de corrélation entre tous les facteurs étudiés de tous les animaux de notre étude. TG : triglycérides ; TC : cholestérol total ; Glc : glucose ; PP : postprandiaux ; AJ : à jeun ; TG F : triglycérides hépatiques ; TC F : cholestérol total hépatique ; TG M : triglycérides musculaires ; TC M : cholestérol total musculaire ; TG TA : triglycérides adipocytaires

	TG PP	TG AJ	TC PP	TC AJ	Glc PP	Glc AJ	Delta poids	LSR	LpL	LDLr	ACL	FAS	TG F	TC F	TG M	TC M	TG TA
TG PP	1,000	,629	,147	,310	-,079	,624	-,327	-,356	-,302	-,466	-,096	-,006	-,772	-,553	,245	,094	-,380
TG AJ	,629	1,000	,200	,245	-,012	,302	,031	-,458	,011	-,478	-,407	-,090	-,709	-,771	,337	-,094	-,197
TC PP	,147	,200	1,000	,729	-,043	,015	-,091	,520	-,028	,573	,165	,212	,130	,285	-,065	,367	-,376
TC AJ	,310	,245	,729	1,000	,014	,132	-,506	,426	-,041	,498	,179	,243	,037	,268	-,256	-,079	-,320
Glc PP	-,079	-,012	-,043	,014	1,000	-,221	,274	,278	-,046	,426	,234	,068	,290	,685	,298	,388	
Glc AJ	,624	,302	,015	,132	-,221	1,000	-,420	-,076	-,496	-,212	,192	-,240	-,559	-,392	-,022	-,144	-,282
Delta poids	-,327	,031	-,091	-,506	,274	-,420	1,000	-,128	,618	-,045	-,066	,462	,336	,024	,302	,347	,595
LSR	-,356	-,458	,520	,426	,278	-,076	-,128	1,000	,071	,813	,471	,165	,495	,732	-,223	,064	,116
LpL	-,302	,011	-,028	-,041	,680	-,496	,618	,071	1,000	,004	,149	,605	,398	,232	,391	,067	,665
LDLr	-,466	-,478	,573	,498	-,046	-,212	-,045	,813	,004	1,000	,415	,255	,755	,797	-,582	,115	-,011
ACL	-,096	-,407	-,165	,179	,426	,192	-,066	,471	,149	,415	1,000	,354	,363	,571	-,172	-,072	,407
FAS	-,006	-,090	,212	,243	,234	-,240	,462	,165	,605	,255	,354	1,000	,445	,407	,003	,047	,641
TG F	-,772	-,709	,130	,037	,068	-,559	,336	,495	,398	,755	,363	,445	1,000	,826	-,451	,106	,363
TC F	-,553	-,771	,285	,268	,290	-,392	,024	,732	,232	,797	,571	,407	,826	1,000	-,250	,260	,205
TG M	,245	,337	-,065	-,256	,685	-,022	,302	-,223	,391	-,582	-,172	,003	-,451	-,250	1,000	,421	,124
TC M	,094	-,094	,367	-,079	,298	-,144	,347	,064	,067	,115	-,072	,047	,106	,260	,421	1,000	-,327
TG TA	-,380	-,197	-,376	-,320	,388	-,282	,595	,116	,665	-,011	,407	,641	,363	,205	,124	-,327	1,000

11 observations ont été utilisées dans ce calcul.

La matrice de corrélation de tous les facteurs étudiés nous informe de certaines interactions intéressantes, en nous donnant les coefficients de corrélation (R) entre 2 paramètres étudiés. Ces corrélations révèlent peu de significativité, due à la complexité du métabolisme lipidique périphérique (tableau 13).

D'après nos analyses réalisées sur 11 échantillons avec un risque d'erreur de 5%, les corrélations nécessitent un coefficient de corrélation (R) supérieur à 0,602 afin d'être considérées comme intéressantes (table de R de Bravais Pearson voir le chapitre Matériels & Méthodes).

Tout d'abord, l'expression d'ACL semble être quelque peu corrélée avec les lipides plasmatiques tels que les triglycérides et la glycémie ainsi qu'avec les contenus lipidiques du foie et du tissu adipeux. ACL, enzyme clef de la lipogenèse, régule la synthèse de lipides (triglycérides et cholestérol) hépatiques. Les lipides synthétisés lors de la lipogenèse sont ensuite sécrétés par le foie sous forme de lipoprotéines (VLDL) dans la circulation sanguine, afin de fournir les tissus périphériques en lipides. De plus, le glucose est connu pour son effet sur la lipogenèse puisqu'il est le précurseur du substrat essentiel du cycle de Krebs, le pyruvate, duquel est produit le citrate, substrat d'ACL. D'autre part, l'expression d'ACL

semble aussi être corrélée avec les expressions de FAS, LDLr et LSR. La modification des taux de lipides plasmatiques et tissulaires due à la perturbation de la lipogenèse semble avoir un impact sur l'expression des récepteurs lipoprotéiques. De plus, l'expression d'ACL (exerçant son activité en amont de celle de FAS) semble interagir avec l'expression de FAS, afin de compenser la faible activité d'ACL.

Un autre facteur, largement modulé par la diminution de la lipogenèse est la régulation des lipases. Il semblerait que l'expression de la LpL soit corrélée avec celle de FAS par un mécanisme qui reste encore à être éclairci. De plus, son expression semble aussi être corrélée avec la glycémie et le contenu en triglycérides du tissu adipeux, ce qui semble interagir avec la prise de poids.

2) Facteurs régulant l'expression de LSR : Corrélations

Lors de nos études, nous avons observé une modification de l'expression de LSR par la suppression de la lipogenèse, suivie de multiples modifications du métabolisme lipidique périphérique. Afin de comprendre les mécanismes mis en jeu et d'identifier les principaux facteurs impliqués dans cette régulation, liés ou non au traitement à l'extrait de *Garcinia cambogia*, nous avons réalisé des corrélations entre tous les facteurs étudiés afin de mettre en évidence les interactions avec LSR ainsi que l'effet du traitement à l'extrait.

Les graphiques de corrélations ont été réalisés en deux fois pour chaque corrélation. Le premier graphique a pris en compte tous les animaux afin d'identifier la corrélation possible entre deux facteurs indépendamment du traitement à l'extrait de *Garcinia cambogia*. Le second graphique a permis d'identifier les 2 groupes afin de déterminer s'il existe un effet du traitement sur la corrélation entre deux facteurs.

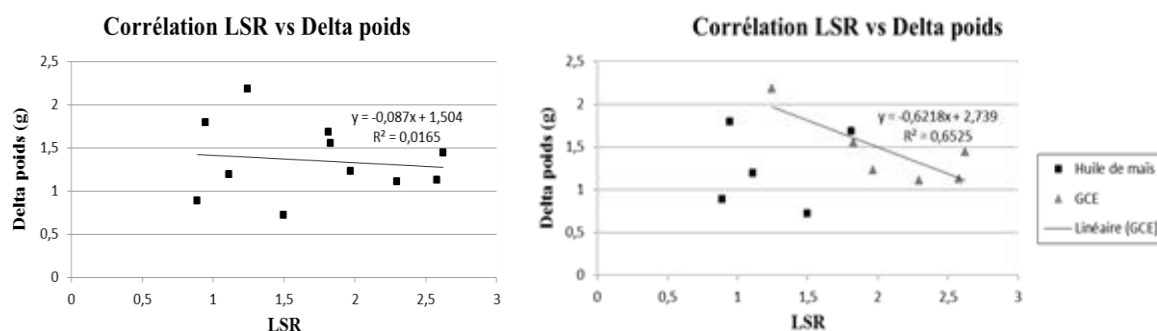


Figure 57: Corrélation entre l'expression de LSR et la prise de poids des souris

Sans tenir compte du traitement à l'extrait de *Garcinia cambogia*, la prise de poids n'est pas corrélée avec l'expression de LSR. Cependant, le traitement semble avoir un effet sur la mise en place d'une corrélation entre ces deux facteurs (figure 58). En effet, les animaux gavés avec l'extrait montrent une corrélation négative importante entre leur prise de poids et l'expression de LSR avec un R^2 de 0,6525, non suffisant pour être significatif mais très proche ($R > 0,8114$ pour un groupe de 6 animaux soit $R^2 > 0,6583$). Or, en l'absence de traitement, aucune corrélation n'est observée. La surexpression de LSR est donc liée à la prise de poids des souris lors de la suppression de la lipogenèse.

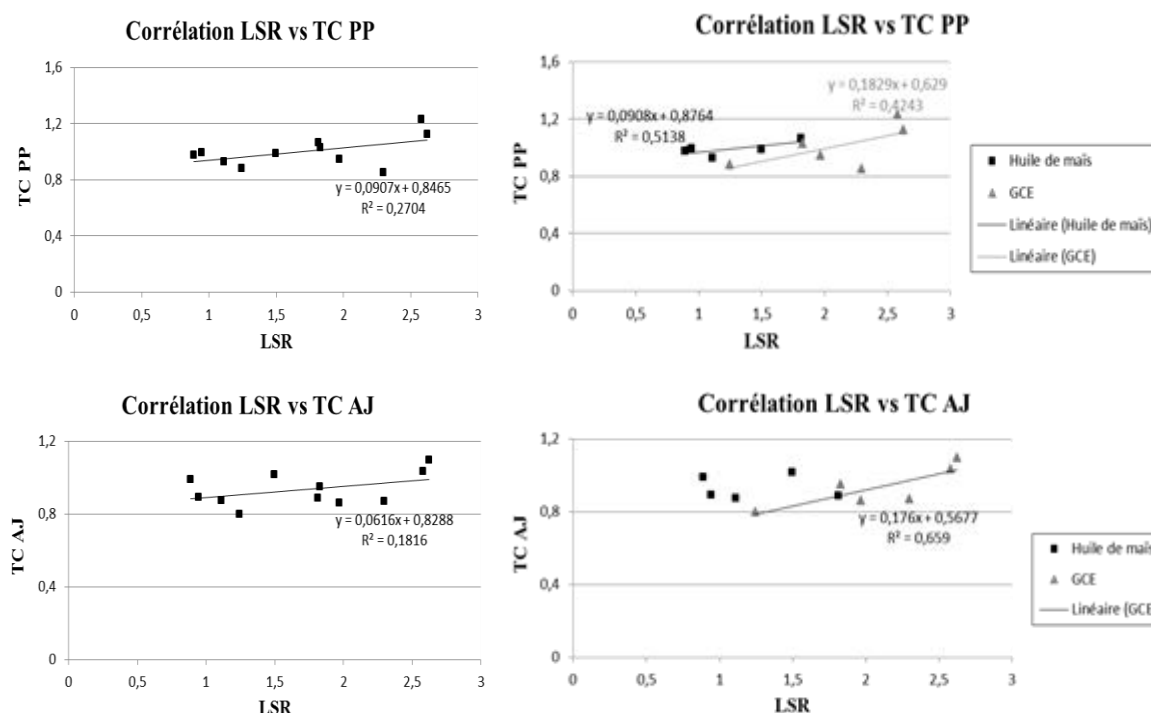


Figure 58: Corrélation entre l'expression de LSR et les taux de lipides plasmatiques

Curieusement, seuls les taux de cholestérol postprandiaux et à jeun semblent interagir avec l'expression de LSR avec un coefficient de corrélation proche de la significativité (figure 59). De plus, ces facteurs montrent un effet du traitement avec une corrélation significative uniquement pour le cholestérol à jeun des animaux gavés avec l'extrait, due certainement à un faible nombre d'animaux dans chaque groupe.

D'autre part, aucune corrélation n'a pu être observée entre LSR et la glycémie indépendamment ou non du traitement. LSR n'étant pas impliqué dans la régulation de la glycémie, il n'est pas surprenant que son expression ne soit pas corrélée avec les taux de

glucose plasmatiques, que les souris soient gavées avec l'extrait ou non. Les modifications de glycémie observées sont donc indépendantes de la surexpression de LSR, mais bien dépendantes du traitement à l'extrait lui-même sans interaction avec LSR.

L'expression de LSR semble ne pas être corrélée avec celle de la lipase LpL indépendamment ou non du traitement. L'expression lipasique diminuée lors du traitement à l'extrait n'est donc pas liée à la surexpression de LSR dans ce même cas, mais bien la conséquence du traitement en lui-même.

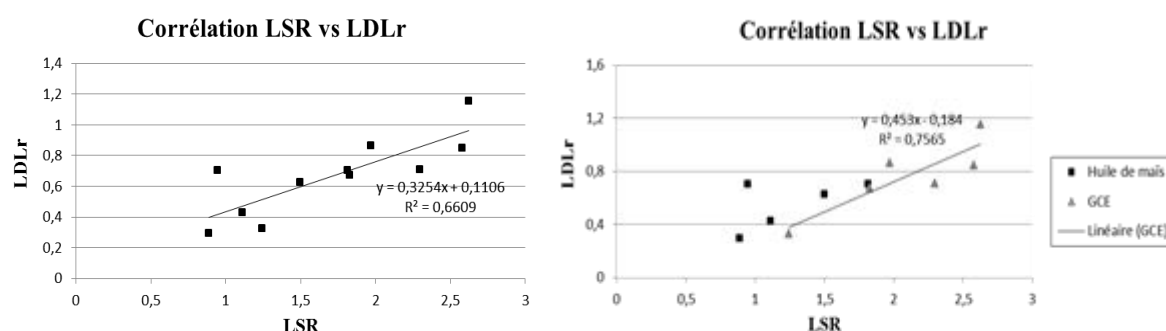


Figure 59: Corrélation entre les expressions de LSR et de LDLr

Bien que l'expression de LDLr ne varie pas d'une manière significative avec le traitement, il apparaît que l'expression de LDLr soit fortement liée à l'expression de LSR, (figure 60). Le traitement à l'extrait de *Garcinia cambogia*, menant à la surexpression de LSR, régule en fait l'expression de plusieurs types de récepteurs lipoprotéiques, intimement liés, LSR et LDLr, qui n'ont cependant pas les mêmes fonctions biologiques principales. En effet, LSR est principalement impliqué dans la clairance des lipoprotéines riches en triglycérides en phase postprandiale (chylomicrons) alors que LDLr est le récepteur principal des LDL riches en cholestérol. Cependant, lors d'une déficience en LDLr ou lors de la présence très importante de LDL dans la circulation sanguine, LSR en tant que récepteur secondaire des LDL permet la clairance de ce type de lipoprotéines (Yen, F. T., *et al.*, 2008).

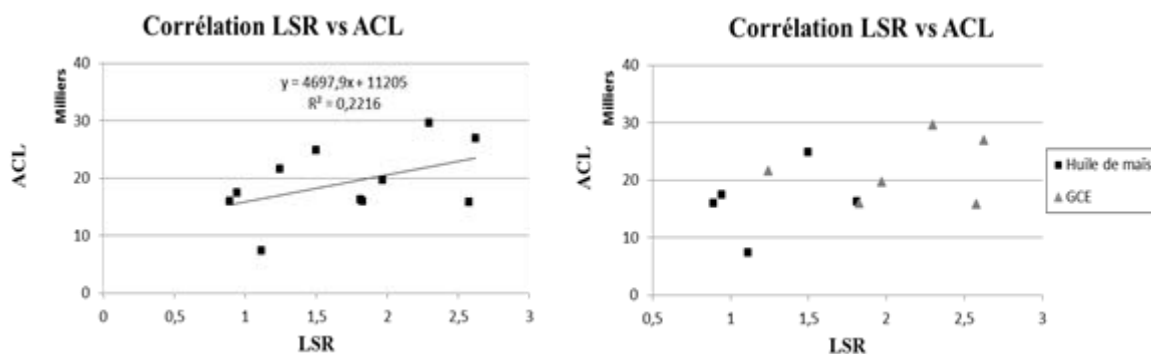


Figure 60: Corrélation entre les expressions de LSR et ACL

Comme nous l'avons vu lors de la matrice de corrélations, les graphiques montrent une corrélation modérée entre les expressions de LSR et ACL, laissant penser à une interaction entre la lipogénèse et l'expression des récepteurs lipoprotéiques en particulier LSR, indépendamment du traitement (figure 61). Le faible effectif des groupes « Huile de maïs » et « HCA » pris s par ement, empêche d'établir une corrélation au sein des groupes. Nous avons vu que la réduction de la lipogénèse par l'inhibiteur HCA avait pour conséquence l'augmentation de l'expression de l'enzyme ACL ainsi que l'augmentation de l'expression de LSR hépatique. Il a été amené l'hypothèse d'une interaction entre ces deux paramètres afin de compenser la réduction de synthèse de TG endogènes. Cependant, cette interaction n'est pas significative, certainement due à la complexité du système de régulation du métabolisme lipidique périphérique, qui implique d'autres facteurs non étudiés ici.

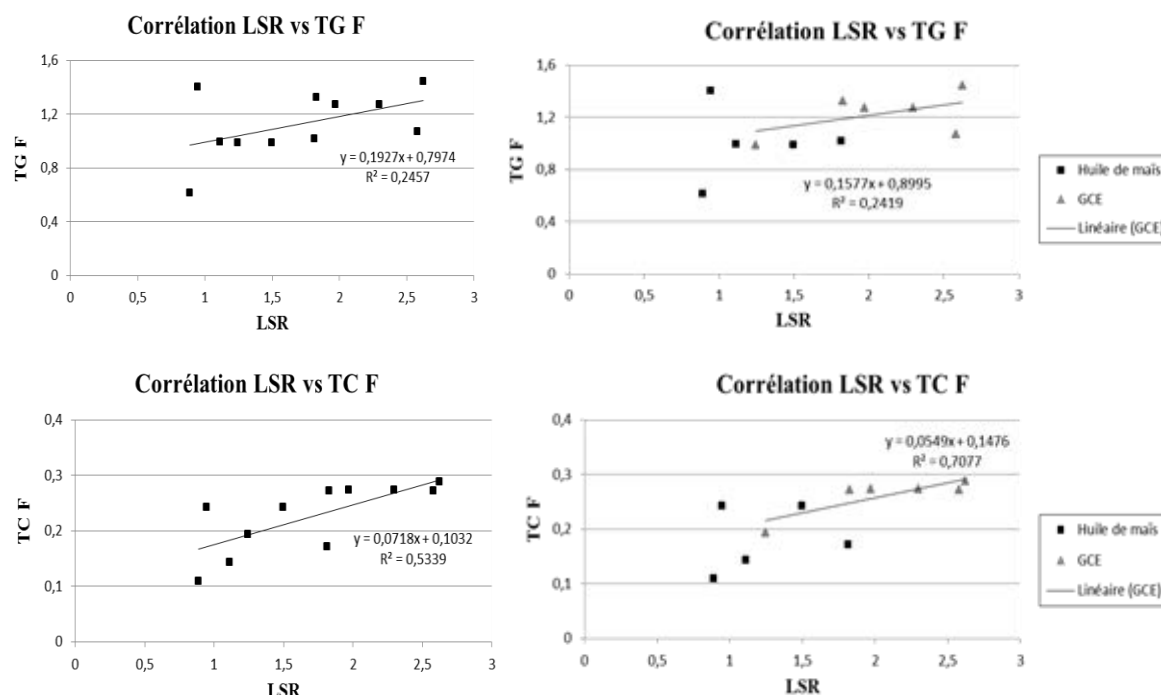


Figure 61: Corrélation entre l'expression de LSR et le contenu lipidique hépatique

Les graphiques révèlent une corrélation importante entre LSR et le contenu en cholestérol hépatique et d'une manière moins importante entre LSR et le contenu en triglycérides hépatiques, indépendamment du traitement (figure 62). Les expressions de LSR et de LDLr sont fortement corrélées, or LDLr est principalement impliqué dans la clairance des LDL riches en cholestérol tandis que LSR est fortement impliqué dans la clairance des lipoprotéines riches en triglycérides. C'est pourquoi, les contenus en cholestérol et en triglycérides hépatiques sont corrélés avec l'expression des récepteurs lipoprotéiques en général ($R=0,755$ et $R=0,797$ pour les corrélations entre LDLr et les TG et TC hépatiques respectivement). Ces corrélations suivent la logique d'une augmentation d'expression des récepteurs lipoprotéiques puisqu'ils sont impliqués dans l'apport lipidique exogène du foie alors que la lipogenèse est liée à l'apport endogène de lipides hépatiques.

Ces corrélations deviennent encore plus importantes lors du traitement à l'extrait. En effet, en absence de lipogenèse, le contenu lipidique hépatique est uniquement constitué de lipides exogènes, intégrés au foie par les récepteurs lipoprotéiques tels que LSR et LDLr ; ils deviennent les uniques facteurs pouvant réguler cet apport.

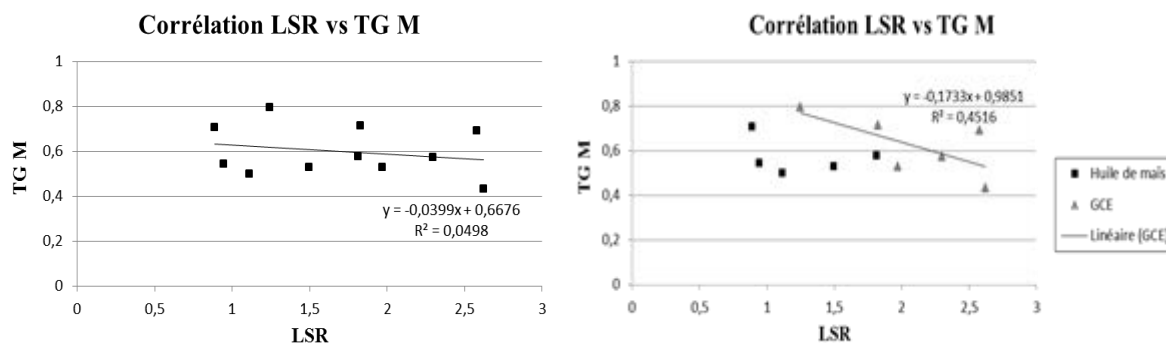


Figure 62: Corrélation entre l'expression de LSR et le contenu en TG musculaire

Aucune corrélation significative n'a été mise en évidence entre LSR et le contenu lipidique musculaire et adipocytaire. Seul un faible effet du traitement sur les triglycérides musculaires a été observé (figure 63) mettant en évidence la corrélation avec LSR (R^2 de 0,45 proche de la significativité).

Afin d'effectuer une analyse plus approfondie sur la régulation de LSR, nous avons réalisé une matrice de corrélation avec les facteurs les plus fortement corrélés avec LSR. Pour cela, nous nous sommes focalisés sur les 7 facteurs intéressants. Il en est ressorti que l'expression de LSR interagissait avec les 7 facteurs d'une manière plus ou moins importante (tableau 14). Le facteur le plus étroitement corrélé avec LSR est l'expression de LDLr avec un R de 0,813 puis le contenu en cholestérol du foie avec un R de 0,732.

Tableau 14: Matrice de corrélation avec 7 facteurs interagissant avec LSR

	TG PP	TG AJ	TC PP	LSR	LDLr	ACL	TG F	TC F
TG PP	1,000	,629	,147	-,356	-,466	-,096	-,772	-,553
TG AJ	,629	1,000	,200	-,458	-,478	-,407	-,709	-,771
TC PP	,147	,200	1,000	,520	,573	-,165	,130	,285
LSR	-,356	-,458	,520	1,000	,813	,471	,495	,732
LDLr	-,466	-,478	,573	,813	1,000	,415	,755	,797
ACL	-,096	-,407	-,165	,471	,415	1,000	,363	,571
TG F	-,772	-,709	,130	,495	,755	,363	1,000	,826
TC F	-,553	-,771	,285	,732	,797	,571	,826	1,000

11 observations ont été utilisées dans ce calcul.

Afin de vérifier l'implication de tous ces facteurs dans la régulation de LSR, nous avons réalisé une régression multiple puis une régression pas à pas afin de déterminer l'implication de chaque facteur ainsi que leur force d'interaction avec LSR (annexe #).

Après LDLr, le facteur le plus impliqué dans l'interaction avec LSR est le contenu en cholestérol hépatique. Afin de déterminer l'impact des autres facteurs sur LSR, nous avons réalisé une régression multiple avec les 5 autres facteurs restants, gardant à l'esprit l'importance de l'implication de LDLr puis du contenu en cholestérol hépatique (tableau 15).

Tableau 15: Régression multiple entre LSR et 5 facteurs

	Coefficient	Erreur standardisée	Coeff. standardisé	Valeur de t	Valeur de p
Terme cst.	,335	1,638	,335	,205	,8460
TG PP	-3,081	1,424	-,679	-2,163	,0828
TG AJ	-2,607	1,524	-,444	-1,710	,1479
TC PP	5,160	1,175	,900	4,391	,0071
ACL	6,239E-5	2,052E-5	,623	3,040	,0287
TG F	-1,765	,955	-,687	-1,849	,1238

Cette régression multiple (tableau #) nous donne le résultat final de notre étude, nous informant de la force d'implication de 7 facteurs dans l'interaction avec LSR. Chaque facteur joue un rôle dans la régulation de l'expression de LSR avec une valeur de p inférieur à 0,15. Tout d'abord, LDLr est le facteur interagissant le plus avec l'expression de LSR, tous deux étant des récepteurs lipoprotéiques. Puis, le contenu en cholestérol hépatique interagit étroitement avec l'expression de LSR. L'interaction de LSR avec le contenu en cholestérol hépatique est certainement liée au fait que LSR soit étroitement corrélé avec l'expression de LDLr (récepteurs aux LDL riches en cholestérol) comme nous l'avons dit auparavant. D'autre part, les taux de triglycérides postprandiaux et à jeun ainsi que le contenu en triglycérides du foie semblent eux aussi étroitement corrélés avec l'expression de LSR. Ces interactions sont dues à la capacité de clairance des lipoprotéines riches en triglycérides plasmatiques par LSR et donc son rôle d'intégration des triglycérides dans le foie. De plus, d'une manière intéressante, il apparaît que l'expression de LSR soit liée à l'expression d'ACL par une corrélation positive qui renforce notre hypothèse d'un lien entre l'expression de LSR et la lipogenèse.

5. Conclusion de l'étude

Cette deuxième étude a permis de confirmer les hypothèses émises lors du test de doses qui sont l'implication de la lipogenèse dans la régulation de l'expression du récepteur LSR et dans la

régulation du métabolisme lipidique. Elle a de plus permis d'identifier les facteurs mis en jeu dans l'interaction avec LSR et les conséquences lipidiques associées à la réduction de la lipogenèse.

IV. CONCLUSION DE L'EFFET DE L'INHIBITION DE L'ATP CITRATE LYASE SUR L'EXPRESSION DE LSR ET LE MÉTABOLISME LIPIDIQUE

La réduction de la lipogenèse lors de l'administration par gavage des souris avec l'extrait de *Garcinia cambogia* contenant le principe actif HCA a été vérifiée par la différence de prise de poids ainsi que par les modifications des taux de lipides plasmatiques et tissulaires. Nos résultats démontrent que la suppression de la lipogenèse a entraîné la surexpression du récepteur LSR, accompagnée d'une réduction de l'expression des lipases hépatiques (LpL et HL), comme l'ont démontrées les corrélations. Ces modifications d'expression lipasique ont un effet certain sur l'expression de LSR dont l'activité dépend de la libération d'acides gras libres par celles-ci. Il semble exister un équilibre entre la lipogenèse et l'utilisation des lipides par la régulation de l'expression de certaines cibles telles que LpL, HL et LSR afin de compenser les effets d'une suppression de lipogenèse. De plus, les taux de TG plasmatiques ont été significativement diminués en corrélation avec l'enrichissement hépatique en TG. Tout semble tendre vers un effet régulateur de la suppression de TG endogènes qui induirait l'augmentation de la capture des TG exogènes afin de compenser le déficit en acides gras dû à l'inhibition de la synthèse endogène. La surexpression de LSR permettrait de ce fait une entrée très importante de TG exogènes, menant à une diminution des taux plasmatiques de TG et une accumulation hépatique. L'hypotriglycérémie étant accrue par la réduction de sécrétion de VLDL, les lipases sembleraient avoir une action régulatrice. En effet, la réduction de leur expression diminuerait la libération d'acides gras libres lors de la lipolyse des lipoprotéines, essentielle pour l'activation de LSR. Toutes les modifications lipidiques observées semblent représenter une réaction régulatrice de maintien de l'homéostasie lipidique.

D'après tous les résultats obtenus lors de ces deux études, la suppression de la lipogenèse semble surexprimer LSR accompagnée d'une hypotriglycérémie, une hyperglycémie ainsi qu'une accumulation hépatique en triglycérides. L'hypothèse retenue par

la littérature repose sur l'implication de la suppression des TG endogènes dans la réduction de la sécrétion de VLDL, résultant en une hypotriglycémie et un enrichissement hépatique en TG. Cependant, les études portant sur les effets de l'acide hydroxycitrique sur le métabolisme lipidique périphérique nous mène à penser que le récepteur LSR joue un rôle important dans l'accumulation des TG hépatiques ainsi que dans la régulation de la triglycémie plasmatique (figure 64).

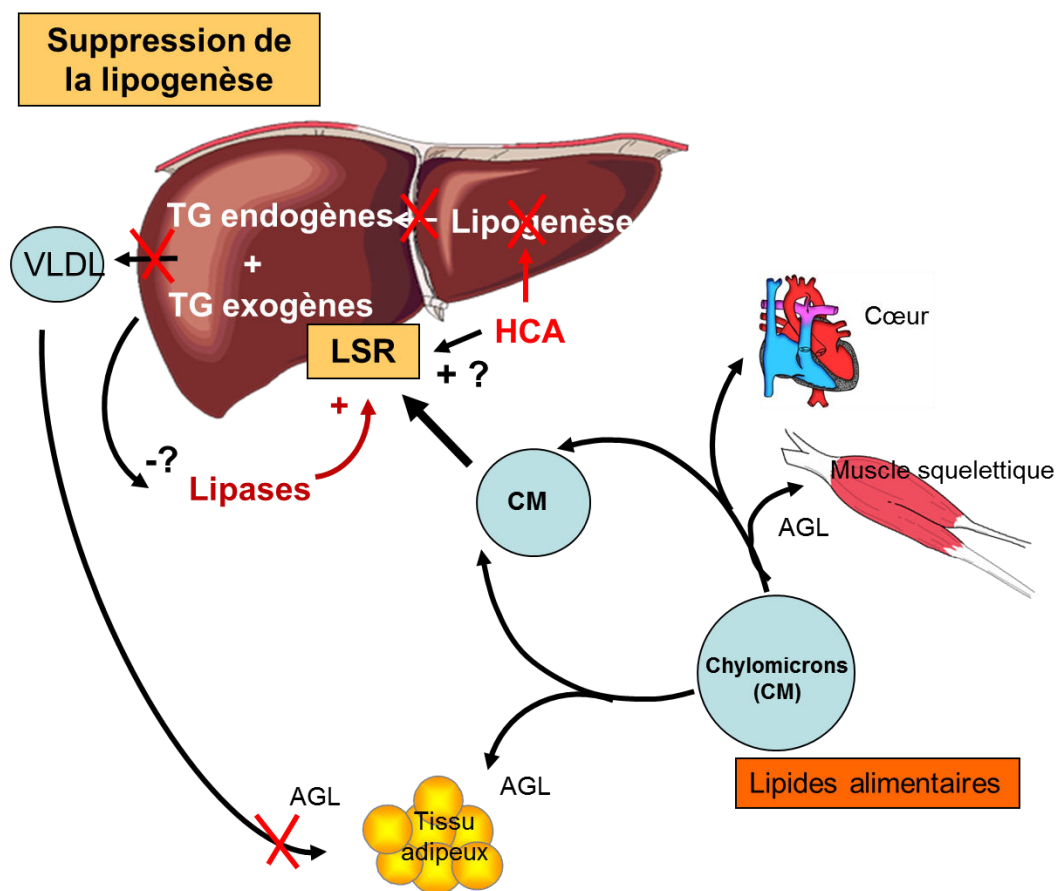


Figure 63: Effet de la suppression de la lipogenèse sur le métabolisme lipidique hépatique. L'acide hydroxycitrique bloque la synthèse des TG endogènes en supprimant l'action d'ACL qui mène à la suppression de la sécrétion des VLDL. L'expression de LSR est augmentée et l'entrée de TG exogène accrue. En réponse à l'accumulation de TG hépatiques, l'expression des lipases sur la paroi endothéliale est diminuée réduisant la quantité de LSR actif, ce qui diminue la capture des chylomicrons par LSR dans le foie.

Chapitre 5 :
Effet d'un régime hyperlipidique sur
la régulation du métabolisme
lipoprotéique et de LSR

I. INTRODUCTION

Durant cette thèse, différentes études ont été menées sur le métabolisme lipidique des souris à l'état physiologique normal (régime standard). Ayant établi les différents régulateurs de l'expression de LSR sous alimentation standard, il a été intéressant de connaître les mécanismes de régulation de ce récepteur ainsi que les conséquences lipidiques associées lors de la présence d'un trouble du métabolisme lipidique tel que l'obésité ou l'absence d'un allèle de LSR.

Dans le premier chapitre, le récepteur *lipolysis stimulated lipoprotein receptor* (LSR) a été montré comme étant modulé par la leptine, hormone de satiété intensément impliquée dans la régulation de la prise alimentaire au niveau cérébral ainsi que dans la régulation du métabolisme périphérique en modulant l'ARNm et l'expression protéique du récepteur LSR. D'après la littérature (Narvekar, P., *et al.*, 2009), les souris obèses (*db/db* et *ob/ob*) expriment moins de LSR que les souris contrôles ce qui rend le modèle d'obésité intéressant à étudier afin de comprendre les mécanismes impliqués dans la modulation de l'expression de LSR.

L'obésité est un des problèmes de santé publique les plus répandus dans les pays industrialisés et les traitements utilisés nécessitent une meilleure compréhension de cette pathologie pour être le plus efficace possible. De nombreuses études ont montré les bénéfices du DHA au niveau du métabolisme lipidique. En effet, notre laboratoire a dernièrement confirmé ces bénéfices *in vivo* après supplémentation nutritionnelle de souris en DHA [données non publiées]. Avec une prise alimentaire inchangée, les souris supplémentées en DHA sont apparues comme prenant moins de poids que les souris témoins, avec une diminution significative de la cholestérolémie, ce qui confirme la littérature sur les propriétés du DHA à corriger les dyslipidémies, de plus en plus identifiées dans la littérature (Abeywardena, M. Y. and Patten, G. S., 2011, Lu, J., *et al.*, 2011, Sagara, M., *et al.*, 2011).

Une collaboration avec l'un industriel LESIEUR a permis une étude approfondie sur les conséquences métaboliques et lipidiques d'un régime hyperlipidique supplémenté ou non en DHA en comparaison à une alimentation standard, afin de mettre en évidence les acteurs impliqués dans la pathologie de l'obésité ainsi que l'implication de LSR dans ces troubles lipidiques. De plus, cette étude a permis de tester la possible réversion des atteintes métaboliques engendrées par un régime hyperlipidique lors d'une supplémentation de ce régime avec du DHA.

D'autre part, les souris ayant une expression réduite en LSR (suite à la perte d'un allèle du gène *lsr*) diminuent la clairance des lipoprotéines riches en triglycérides menant à une augmentation des triglycérides et du cholestérol plasmatiques au cours du vieillissement ou sous stress lipidique (Yen, F. T., *et al.*, 2008). Lors du premier chapitre, l'étude de l'effet d'un régime hyperlipidique sur les souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} a mis en évidence certaines perturbations dues au génotype hétérozygote telles qu'une prise de poids et de masse grasse accrues accompagnées d'une augmentation de leptine plasmatique. Cependant, certains critères n'ont pas été étudiés, tels que le statut des autres récepteurs lipoprotéiques ainsi que les conséquences lipidiques liées à ce génotype.

De plus, lors du chapitre précédent, nous avons observé une modification de l'expression de LSR ainsi que de nombreuses perturbations du statut lipidique périphérique lors de la réduction de la lipogenèse en utilisant un composé inhibiteur de l'activité d'une enzyme clef impliquée dans la synthèse *de novo* des triglycérides, l'*ATP Citrate Lyase* (ACL), sous régime standard. Une hypothèse a été établie puis validée selon laquelle il y aurait une relation entre la lipogenèse et l'expression de LSR. Après avoir étudié les effets de la suppression de la lipogenèse sur l'expression de LSR et les conséquences sur le métabolisme lipidique sous alimentation standard, nous avons voulu étudier l'expression de ces enzymes ainsi que les perturbations engendrées lors d'un changement de régime tel qu'une alimentation enrichie en DHA, hyperlipidique ou hyperlipidique enrichie en DHA ou bien lors d'une perturbation génétique telle qu'un déficit en LSR.

Il a déjà été établi que l'impact d'un régime hyperlipidique sur l'expression des enzymes ACL et FAS différait suivant les régimes (Wang, Q., *et al.*, 2010). En effet, sous régime standard, l'inhibition par adénovirus d'ACL entraîne une surexpression des enzymes présentes en aval de la voie de synthèse des triglycérides endogènes tels que FAS et *Acetyl-CoA Carboxylase* (ACC). Toutefois, lors d'un régime hyperlipidique, certaines enzymes telles que ACL, FAS et ACC, impliquées dans la lipogenèse, semblent être affectées (figure 65). L'apport important de lipides exogènes joue un rôle régulateur de la lipogenèse.

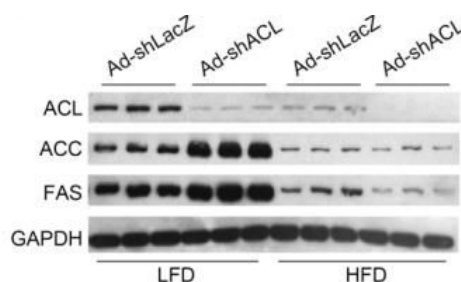


Figure 64: Effet de la suppression d'ACL sur l'expression des enzymes lipogéniques lors d'infection par i.v. d'adénovirus contrôle Ad-shLacZ ou d'adénovirus ciblé Ad-shACL (bloquant l'activité d'ACL) chez des souris mâles C57Bl6/J de 8 semaines. Immunoblots montrant l'expression protéique d'ACL, FAS et ACC à partir d'extraction de foie (Wang, Q., *et al.*, 2010).

Connaissant l'impact d'un régime hyperlipidique sur LSR, nous avons voulu approfondir nos connaissances sur les conséquences lipidiques de ce régime pouvant interagir avec LSR et les acteurs impliqués dans la régulation de ce récepteur tels que les enzymes lipogéniques ou les facteurs alimentaires tels que le DHA.

S'il est possible de comprendre quels sont les mécanismes mis en jeu lors d'une pathologie telle que l'obésité, il sera plus aisé de trouver des cibles permettant la prévention ou le traitement de ce problème de santé publique.

II. OBJECTIF DE L'ÉTUDE

Cette étude, réalisée en collaboration avec LESIEUR, nous a permis d'établir les conséquences lipidiques d'un régime induisant une obésité ainsi que d'étudier l'impact d'un régime enrichi en DHA sur l'expression de LSR et les conséquences lipidiques. De plus, il nous a été permis d'identifier les possibles réversions des perturbations métaboliques engendrées par un régime induisant une obésité lorsqu'il est enrichi en DHA.

III. MISE EN PLACE DE L'ÉTUDE

Durant 6 mois, 80 souris C57Bl6/J mâles initialement âgées de 9 mois ont été placées sous 4 régimes différents, à 2 souris par cage. La composition des régimes est la suivante :

- Régime A : Régime standard (n=20).
- Régime B : Composé du régime A supplémenté en acides gras polyinsaturés ω 3 riche en DHA afin d'avoir un pourcentage final de 0,2% de DHA dans le régime (n=20).
- Régime C : Régime hyperlipidique et contenant du cholestérol, composé de 21% de lipides (n=20).
- Régime D : Composé du régime C supplémenté en acides gras polyinsaturés ω 3 riche en DHA afin d'avoir un pourcentage final de 0,2% de DHA dans le régime (n=20).

Au cours de ces 6 mois, différentes analyses ont permis de réaliser le suivi métabolique et l'étude du statut lipidique des animaux. Tout d'abord, le poids et la prise alimentaire ont été relevés chaque semaine. Les dosages plasmatiques après prélèvement rétro-orbitaire ont été réalisés tous les 2 mois (0 ; 2 ; 4 et 6 mois) alors que la masse grasse a été évaluée tous les 3 mois (0 ; 3 et 6 mois) par le système EM-Scan modèle SA-3000 (EM-SCAN Inc, Springfield, MA). Au terme des 6 mois, les souris ont été mises à jeun à 9h puis sacrifiées à 12h. Après sacrifice et échantillonnage tissulaire, l'évaluation biochimique du statut des récepteurs lipoprotéiques et de l'équilibre lipidique a été réalisée grâce à l'étude de 3 structures périphériques (foie, muscle strié squelettique et tissu adipeux) sur 8 souris de chaque groupe. Le choix des 8 souris parmi les 20 de chaque groupe a été établi à partir des valeurs de poids, de masse grasse et des lipides plasmatiques. Ces 8 souris sont un échantillon représentatif des 20 souris du groupe.

Le régime enrichi en acides gras ω -3 dont DHA (B) a été comparé au régime standard (A) afin de déterminer les bénéfices d'une supplémentation en DHA d'un régime standard. Le régime hyperlipidique (C), induisant un surpoids, a été aussi comparé au régime A, afin d'identifier les acteurs impliqués dans cette pathologie. Pour finir, le régime hyperlipidique enrichi en DHA (D) a été comparé au régime C afin de déterminer si les

atteintes métaboliques du régime C peuvent être prévenues par une supplémentation de ce régime avec du DHA.

IV. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Après 6 mois de régime, une différence de prise de poids significative a pu être observée entre les animaux sous régime induisant une obésité (C) et les animaux sous régime standard (A). Cependant, aucune différence significative n'a été démontrée entre la supplémentation en DHA et le régime standard, ni entre le régime C et le régime hyperlipidique supplémenté avec du DHA (D) (figure 66).

D'une manière intéressante, l'adaptation des souris aux régimes spécifiques s'est manifestée par une faible perte de poids durant les 2 premières semaines pour tous les régimes, suivie d'une stabilisation durant 6 semaines pour les souris soumises aux régimes A et B. Les souris sous régime induisant une obésité (C) ont vu leur poids immédiatement augmenter avec une pente relativement constante au cours des 6 mois, en dehors de la première semaine qui a semblé être une semaine d'adaptation. Les souris soumises au régime induisant une obésité et enrichi en DHA (D) ont gardé un poids stable durant les 12 premières semaines avec une évolution comparable à celle des souris sous régimes A et B. Après ce délai, les souris sous régimes A, B et D ont vu leur poids augmenter.

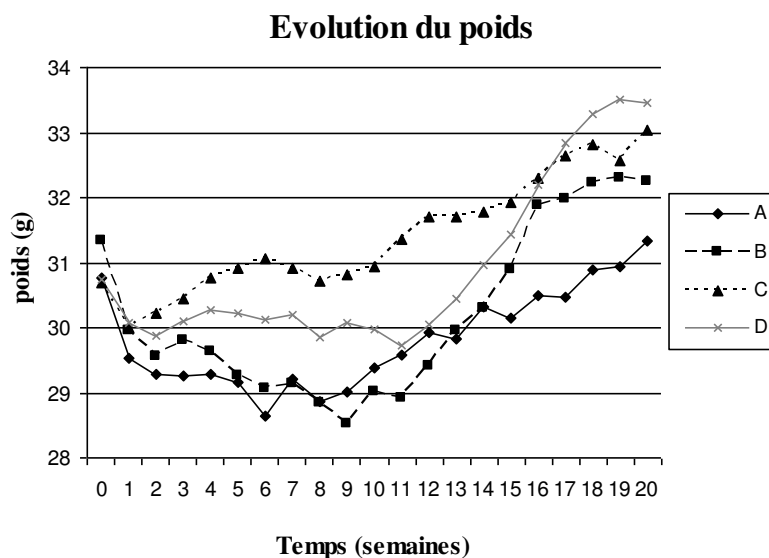


Figure 65: Evolution du poids des souris (losange pour le régime A standard , carré pour le régime B riche en DHA, triangle pour le régime C hyperlipidique et croix pour le régime D hyperlipidique riche en DHA) sous régime différent durant 6 mois (n=20 souris par groupe). Le poids des souris sous régime C est significativement différent ($p < 0,05$) à partir de la 4^{ème} semaine, comparé au poids des souris sous régime A. Le poids des souris sous régime D a été significativement différent durant les semaines 12, 13 et 14, comparé au poids des souris sous régime C, puis est redevenu non significatif.

Il est intéressant de remarquer qu'au bout de 3 mois, l'étude aurait conduit à une toute autre interprétation que celle réalisée au terme de l'étude (figure 67). En effet, si nous nous intéressons au statut des souris après 3 mois de régime (soit 12 semaines), il apparaît que les souris sous régime A et B n'ont montré aucune différence de prise de poids entre ces deux régimes alors que les souris sous régime C se sont révélées avoir un poids supérieur à ces souris de 2 g en moyenne. D'autre part, il semblerait que les souris sous régime D auraient eues une prise de poids moins élevée que les souris sous régime C, différence qui a disparu après 6 mois de régime. Un phénomène s'est passé après 3 mois de traitement ressemblant à une adaptation aux régimes.

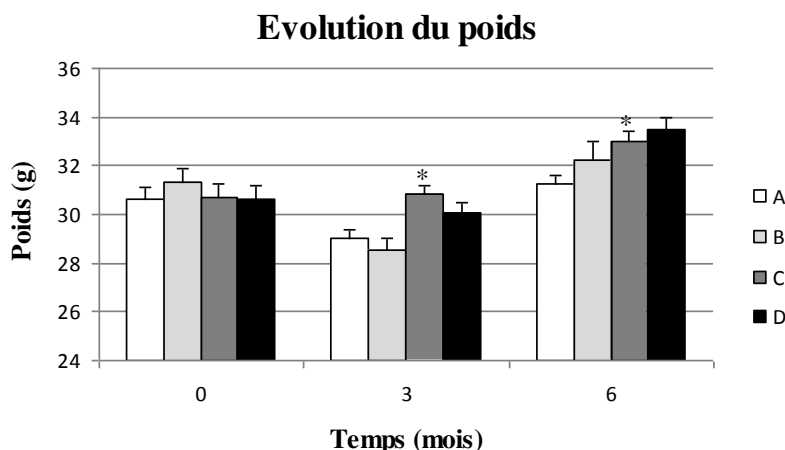


Figure 66: Évolution de poids au cours du temps des souris sous régimes différents. (*) représente la significativité de $p < 0,05$ par rapport au régime standard du même moment (n=20 souris par groupe)

D'autre part, l'étude de la masse grasse de ces souris au terme de l'étude a mis en évidence une différence significative entre les souris sous régime induisant une obésité (C) et les souris sous régime standard (A) (figure 68). Cependant, après 3 mois de traitement, la masse grasse des souris sous régime D semblait significativement diminuée en comparaison aux souris sous régime C. Cette significativité a été perdue durant les 3 derniers mois de régime, en corrélation avec la prise de poids qui augmente singulièrement durant les 3 derniers mois pour les souris sous régime D. L'augmentation de masse grasse sous régime hyperlipidique est expliquée par un stockage accru de lipides dans les organes périphériques tels que le tissu adipeux.

Après 3 mois de régime, le DHA ajouté au régime hyperlipidique a semblé avoir un effet réducteur de la prise de poids et de masse grasse, comparé à un régime hyperlipidique simple. Cet effet semble avoir été perdu au terme des 6 mois de régime, ce qui pourrait être expliqué par une perte de la réponse au DHA. Le mécanisme par lequel le DHA permet une réversion de la prise de poids et de masse grasse des souris sous régime hyperlipidique au bout de 3 mois de régime reste à expliquer mais pourrait être lié à l'âge avancé des souris ou une réponse métabolique au régime.

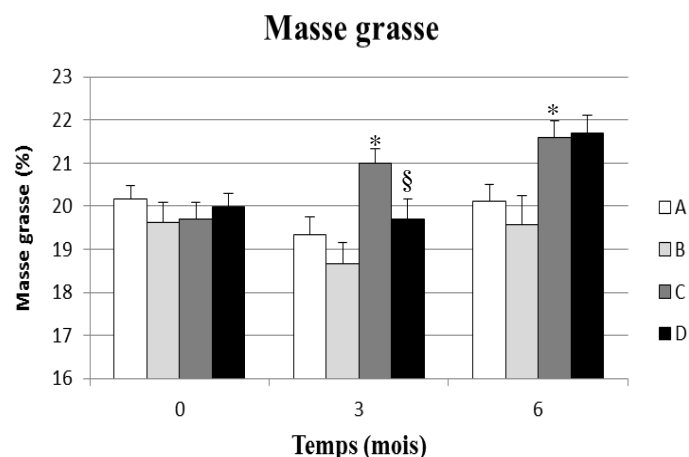


Figure 67: Évolution de la masse grasse pour tous les animaux sous régimes différents durant 6 mois. (*) représente la significativité de $p < 0,05$ par rapport au régime standard au même moment. (§) représente la significativité de $p < 0,05$ par rapport au régime hyperlipidique au même moment (n=20 souris par groupe)

1. Dosages lipidiques plasmatiques

Les variations des taux de triglycérides plasmatiques n'ont révélé aucune différence significative entre les régimes au cours du temps (figure 69 a).

D'autre part, la cholestérolémie des souris sous régime hyperlipidique (C) s'est révélée significativement différente de celle des souris sous régime standard (A) (figure 69 b), expliquée par la présence de cholestérol dans les régimes C et D à hauteur de 0,1%. Les souris sous régime hyperlipidique enrichi en acides gras ω -3 dont DHA (D) ont développé une hypercholestérolémie significative, comparée aux souris sous régime B n'apportant pas de cholestérol. Cependant, cette hypercholestérolémie arrive plus tardivement que chez les souris sous régime C. Nous avons donc proposé l'hypothèse que le DHA pouvait retarder l'accumulation plasmatique de cholestérol lors d'un régime hyperlipidique enrichi en DHA. Cet effet bénéfique du DHA s'ajoute au retard de la prise de poids et de masse grasse observé dans notre étude après 3 mois de régimes, tous perdus au terme de l'étude.

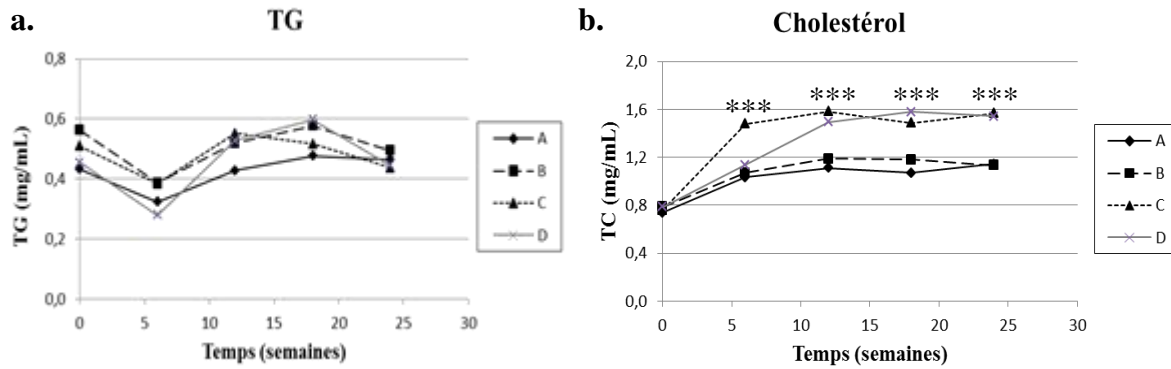


Figure 68 a et b: Évolution des taux de triglycérides (a) et de cholestérol total (b) plasmatiques des souris sous différents régimes durant 6 mois (n=20 souris par groupe)

La glycémie des souris n'a pas semblé être affectée par les différents régimes car aucune différence significative n'a été détectée entre les régimes ni au cours du temps (figure 70).

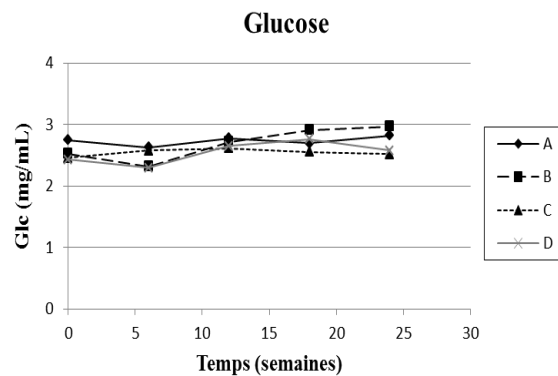


Figure 69: Évolution de la glycémie à jeun des souris sous différents régimes durant 6 mois (n=20 souris par groupe)

2. Analyse protéique par immunoblots

Les immunoblots ont été réalisés sur un échantillon représentatif de 8 souris de chaque groupe, basé sur l'étude du poids, de la masse grasse et des dosages lipidiques plasmatiques.

Les analyses par immunoblots réalisées sur les membranes totales de foie ont révélé une diminution significative de l'expression de LSR chez les souris soumises au régime C durant 6 mois, comparée aux souris sous régime standard de l'ordre de 70% (figure 71). En outre, aucune différence significative d'expression de LSR n'a été observée entre les autres régimes. La réduction de l'expression de LRS observée est en accord avec le peu d'expression

de LSR chez les modèles murins d'obésité (Narvekar, P., et al., 2009). D'une manière intéressante, une diminution non significative est observée concernant l'expression de LSR chez les souris sous régime enrichi en DHA (B) en comparaison avec les souris sous régime standard (A). D'autre part, l'expression de LSR des souris sous régime D semble faiblement augmentée en comparaison avec les souris sous régime C révélant sans doute une possible réversion des atteintes métaboliques due au régime hyperlipidique. D'une manière intéressante, le régime enrichi en DHA (B) semble avoir eu peu d'effet sur l'expression de LSR mais ajouté à un régime hyperlipidique, l'expression de LSR semble faiblement plus élevée que celle trouvée pour les souris sous régime hyperlipidique simple. Le DHA n'aurait donc pas d'effet seul mais pourrait réduire les perturbations observées lors d'un régime hyperlipidique. Ces résultats restent non significatifs mais nous donnent une idée sur une possible action du DHA.

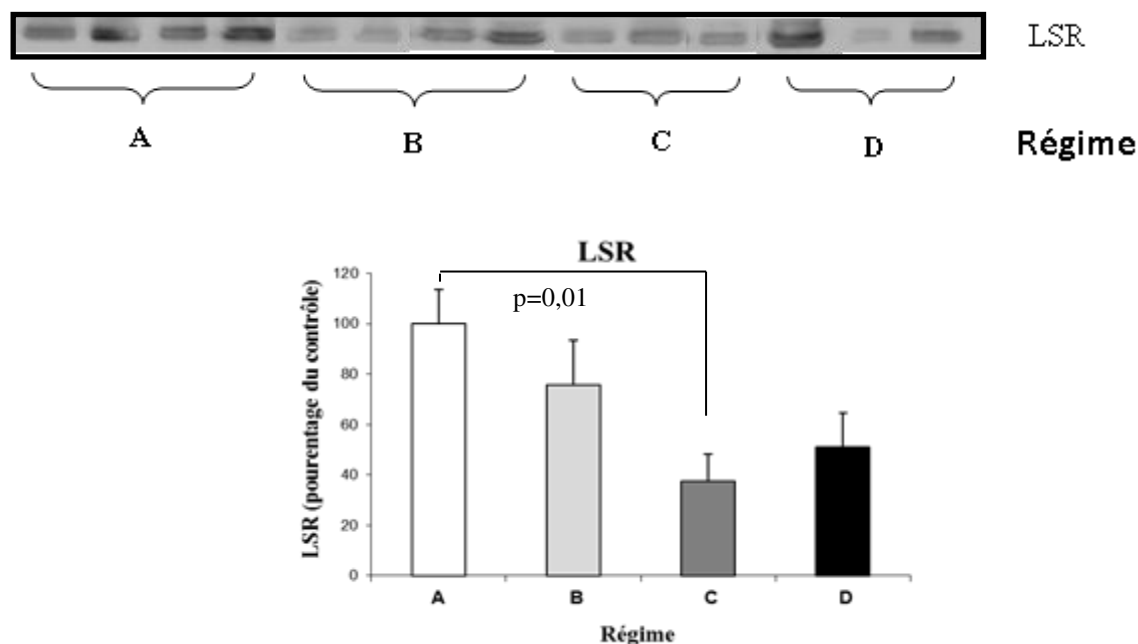


Figure 70: Expression de LSR dans les membranes de foie de souris sous régimes différents durant 6 mois (n=8 souris par régime). Les immunoblots ont été réalisés sur les membranes de foie des souris comme expliqué dans le chapitre "Matériels & Méthodes". Les quantifications ont été réalisées avec le logiciel ImageJ et rapportées au pourcentage de la valeur de LSR trouvée pour les souris sous régime A.

Ces résultats sont en corrélation intéressante avec le poids des souris sans tenir compte de l'effet des régimes (figure 72). Nous pouvons donc nous demander quelle aurait été cette expression si notre étude s'était terminée à 3 mois de traitement sachant que le poids était totalement différent de celui retrouvé au terme de l'étude. En effet, le poids des souris sous régime B, moins élevé que celui des souris sous régime A au bout de 3 mois de régime, aurait

sans doute eu un impact sur l'expression de LSR. Les variations de l'expression de notre récepteur ne peuvent donc être attribuées aux régimes qu'avec beaucoup de prudence.

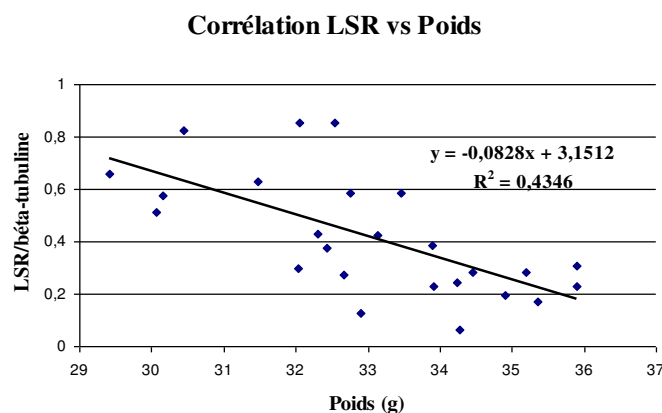


Figure 71: Corrélation entre l'expression de LSR et le poids des souris sous régimes différents durant 6 mois (n=24). Afin d'être significatif, le R^2 doit être supérieur à 0,145 en référence au table de Bravais Pearson (n=25 ; $\alpha=0,05$; $R>0,3809$ soit $R^2>0,1451$).

D'autre part, la supplémentation en DHA avec le régime hyperlipidique semble stimuler l'expression du récepteur aux LDL (LDLr) car une augmentation significative a pu être observée pour l'expression de LDLr dans les membranes de foie de souris sous régime D en comparaison avec les souris sous régime C (figure 73). Cependant, aucune modification de l'expression de LDLr n'a été mise en évidence pour les souris sous régime C ou B en comparaison avec le régime standard. L'implication du DHA dans la réversion des effets du régime hyperlipidique semble donc passer par l'augmentation de l'expression de LDLr impliqué dans la clairance des lipoprotéines riches en cholestérol (LDL), afin de diminuer leur présence dans la circulation générale et donc diminuer la distribution des lipides aux organes périphériques.

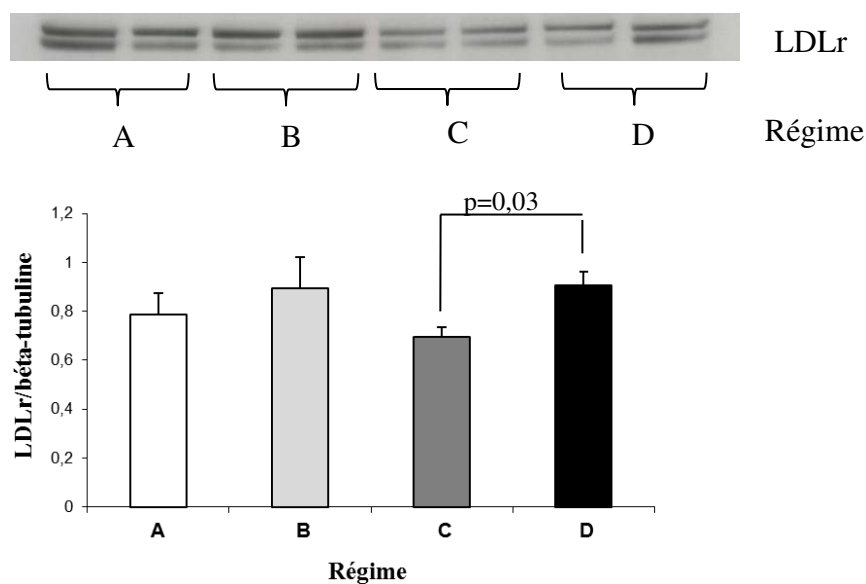


Figure 72: Expression de LDLr dans les membranes de foie de souris sous régimes différents durant 6 mois (n=8 souris par régime). Les immunoblots ont été réalisés sur les membranes de foie des souris comme expliqué dans le chapitre “Matériels et Méthodes”. Les quantifications ont été réalisées avec le logiciel ImageJ et normalisées avec une protéine représentative de la quantité de protéines globale de l’échantillon, la β -tubuline.

D’autre part, aucune différence significative n’a été observée concernant l’expression du récepteur à la leptine (Ob-R) quels que soient les régimes (figure 74). Ces résultats indiquent que les régimes n’ont apparemment pas eu d’effet sur la sensibilité à la leptine.

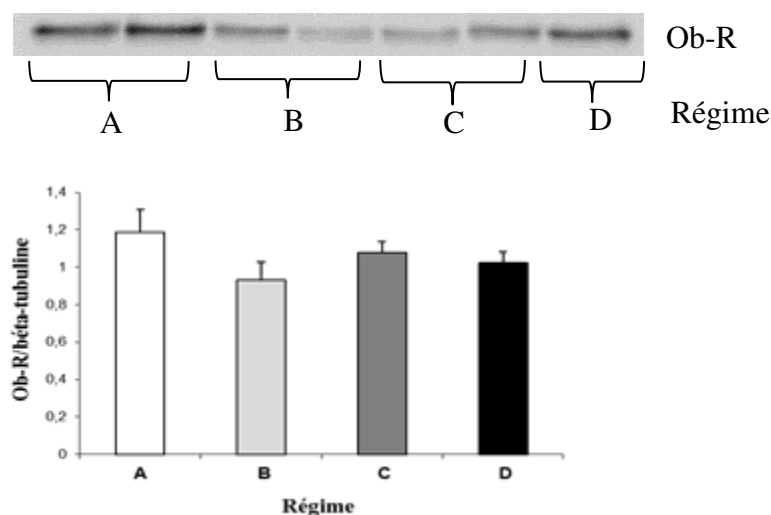


Figure 73: Expression de Ob-R dans les membranes de foie de souris sous régimes différents durant 6 mois (n=8 souris par régime). Les immunoblots ont été réalisés sur les membranes de foies des souris comme expliqué dans le chapitre “Matériels et Méthodes”. Les quantifications ont été réalisées avec le logiciel ImageJ et normalisées avec une protéine représentative de la quantité de protéines globale de l’échantillon, la β -tubuline.

Les immunoblots réalisés sur le contenu cytosolique des membranes de foie ont mis en évidence les diminutions d'expression des enzymes clefs de la lipogenèse, ACL et FAS, principalement entre les régimes C et A (figure 5 a et b).

La diminution de l'expression d'ACL et FAS lors d'un régime hyperlipidique étant déjà démontrée par la littérature (Wang, Q., et al., 2010), ces résultats confirment aussi l'effet du DHA sur la suppression de l'expression de ces 2 enzymes (Jump, D. B., et al., 1994) bien que la diminution d'expression des enzymes lipogéniques par le DHA observée reste non significative. Les effets du DHA sur la réduction de l'expression des enzymes lipogéniques s'ajoutent à la diminution de l'expression de ces enzymes en présence d'un régime hyperlipidique. Le DHA aurait donc un effet hypolipémiant par la suppression de la lipogenèse. D'autre part, la réduction de l'expression d'ACL et FAS lors d'un régime hyperlipidique a été expliquée comme étant un phénomène compensatoire d'un apport important de lipides exogènes (Wang, Q., et al., 2010) ce qui semblerait être aussi le cas lors d'un apport d'acides gras ω -3 tel que dans les régimes B et D.

Les réductions d'expression des enzymes lipogéniques auraient permis un équilibre pour que l'impact sur la lipémie plasmatique ne soit pas visible à jeun. Cependant, la réduction d'expression de LSR ne se serait pas répercutée par une augmentation visible des taux de triglycérides plasmatiques à jeun. En effet, les dosages plasmatiques étant réalisés à jeun, il est difficile de voir l'impact de la réduction de l'expression de LSR sur la lipémie plasmatique sachant que sa capacité de clairance des lipoprotéines riches en TG est principalement activée en période postprandiale. Il a donc été intéressant d'étudier l'enrichissement lipidique des tissus périphériques approvisionnés en lipides par le plasma. Si les taux plasmatiques de triglycérides à jeun n'ont pas révélé de différence, cela a pu être dû à un apport plus important de lipides aux organes périphériques tels que le tissu adipeux et le muscle.

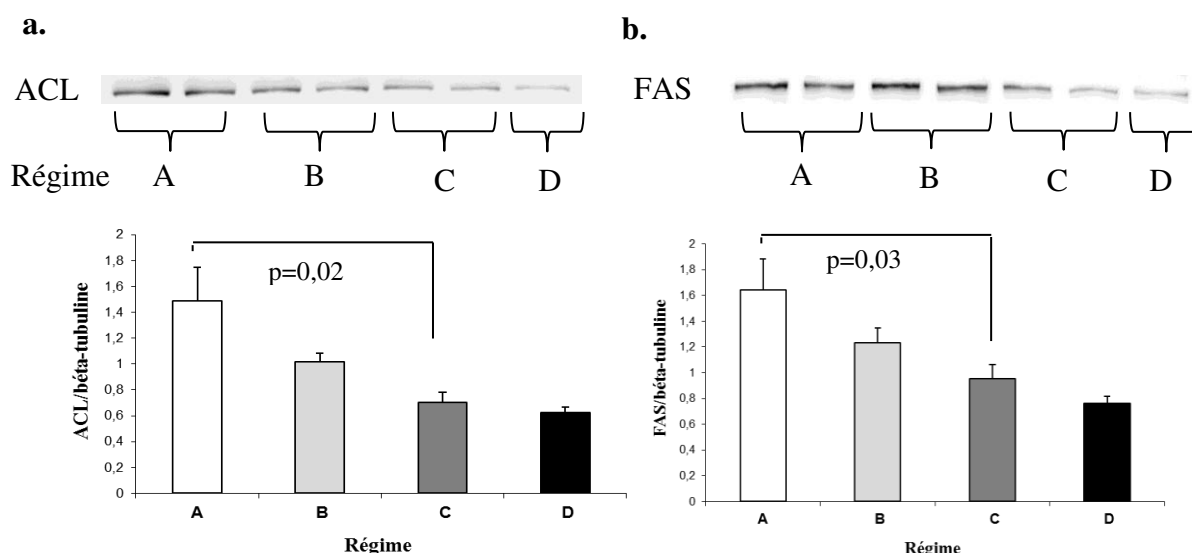


Figure 74 a et b: Expression d'ACL (a) et FAS (b) dans les contenus cytosoliques de foie de souris sous régime différents durant 6 mois (n=8 souris par groupe). Les immunoblots ont été réalisés sur le contenu cytosolique des membranes de foie des souris comme expliqué dans le chapitre "Matériels et Méthodes". Les quantifications ont été réalisées avec le logiciel ImageJ et normalisées avec une protéine représentative de la quantité de protéines globale de l'échantillon, la β -tubuline.

Au cours de nos différentes études, nous nous sommes aperçus que le comportement des enzymes lipogéniques variait selon les conditions d'alimentation, mais restait fortement corrélé avec l'expression de LSR. En effet, sous régime standard, l'inhibition de l'activité d'ACL (voir chapitre II) semblait augmenter sa propre expression ayant pour conséquence l'augmentation de l'expression de LSR. Cependant, il apparaît que lors de cette étude, les expressions de LSR et d'ACL soient négativement corrélées quels que soient les régimes. Cette différence d'interaction observée peut être expliquée par la différence d'âge des souris (10 semaines dans l'étude de la suppression de la lipogenèse et 9 mois dans l'étude de l'effet des régimes hyperlipidiques), ainsi que par l'absence de significativité de la corrélation entre les expressions de LSR et ACL lors de l'étude de la suppression de la lipogenèse. Il semblerait que les souris jeunes n'aient pas encore mis en place toutes les interactions entre les paramètres métaboliques nécessaires dans leur organisme. Une autre hypothèse émise serait la présence d'un lien entre l'expression de LSR et l'activité d'ACL et non son expression, ce qui expliquerait la corrélation positive obtenue entre les expressions de LSR et ACL lors de la réduction de l'activité d'ACL par HCA.

En présence d'un apport accru en lipides exogènes (régime hyperlipidique ou enrichi en acides gras ω -3 dont DHA), l'expression d'ACL diminue, accompagnée d'une réduction de l'expression de LSR. L'étude de la corrélation entre les expressions de LSR et ACL a montré que seul le régime enrichi en DHA ne révélait que peu d'interaction significative entre

les expressions de LSR et d'ACL (figure 76). L'effet des régimes sur les expressions de LSR et ACL étant très clair, les corrélations restent très fortement significatives au sein des groupes entre ces deux facteurs. La présence du DHA dans les régimes perturbe l'interaction observée entre les expressions de LSR et ACL, comme nous pouvons le constater avec la diminution du R^2 des graphiques de corrélation chez les souris sous régime B et D moins important que les R^2 pour les souris sous régime A et C.

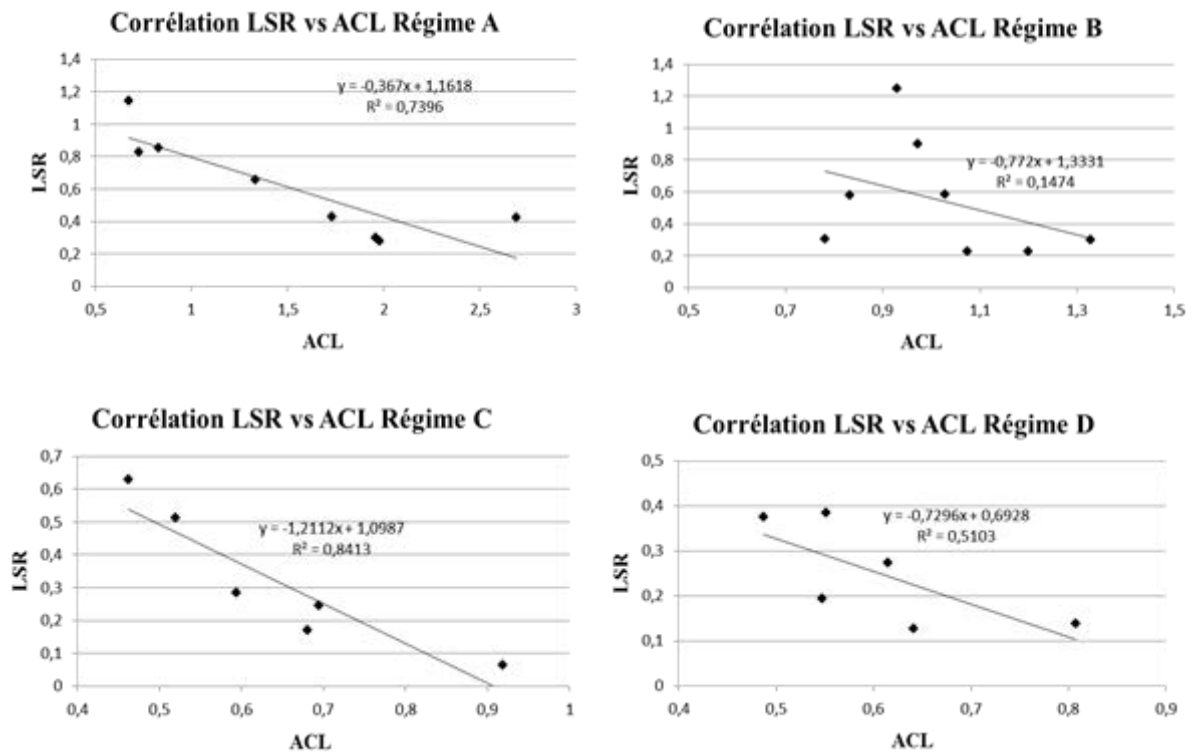


Figure 75: Corrélations entre les expressions de LSR et ACL pour les animaux de chaque régime (n=8 souris par groupe)

Toutefois, aucune différence d'expression n'a été détectée concernant la lipoprotéine lipase quels que soient les régimes (figure 77). Cela suggère que l'effet observé sur l'expression des lipases endothéliales lors de l'étude de réduction de la lipogenèse n'est pas un effet direct lié aux expressions de LSR ou ACL.

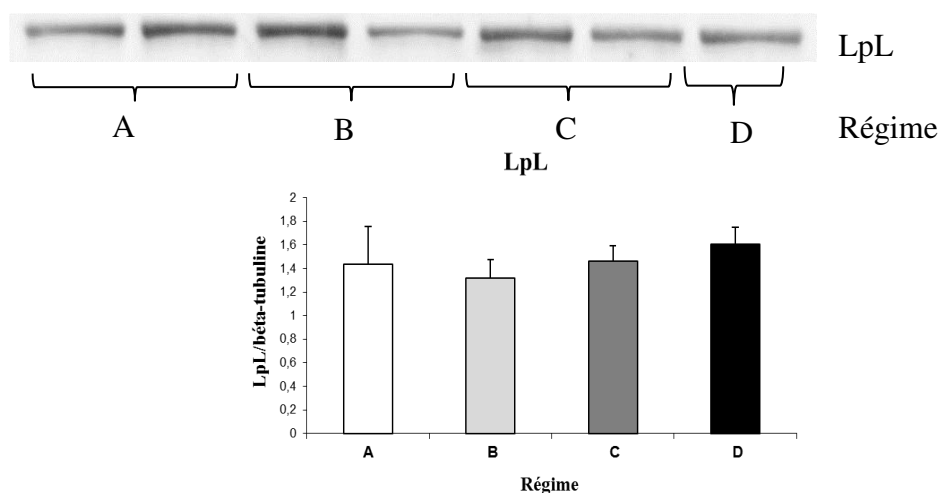


Figure 76: Expression de la lipoprotéine lipase dans les contenus cytosoliques des souris sous régimes différents durant 6 mois (n=8 souris par groupe)

3. Dosages lipidiques tissulaires

Suite à la mise en évidence des modifications de la lipémie plasmatique, les dosages lipidiques tissulaires ont permis de détecter certaines anomalies. En effet, le régime hyperlipidique C a entraîné une augmentation significative du contenu en TG et en cholestérol total (TC) du foie comparé au régime standard A (figure 78 a et b). Aucune différence n'a cependant été détectée entre les régimes A et B ainsi qu'entre les régimes C et D.

L'apport important de lipides alimentaires par les régimes C et D a entraîné l'enrichissement lipidique du foie. La diminution de l'expression de LSR observée chez les souris sous ces régimes n'a pas permis de réduire cette accumulation hépatique de lipides. De plus, la réduction de la lipogenèse a comme conséquence la diminution de la synthèse et de la sécrétion de VLDL comme nous l'avons dit lors du chapitre précédent. Or, nous avons observé une réduction de la lipogenèse par la diminution d'expression des enzymes lipogéniques chez les souris sous régimes hyperlipidiques (C et D). Un apport important de lipides exogènes, ainsi que la clairance lipidique postprandiale réalisée par LSR et l'absence de sécrétion de VLDL (Sato, A., et al., 2010, Wang, Q., et al., 2010) ont donc pu expliquer cet enrichissement hépatique en triglycérides et en cholestérol exogènes chez les souris sous régimes hyperlipidiques.

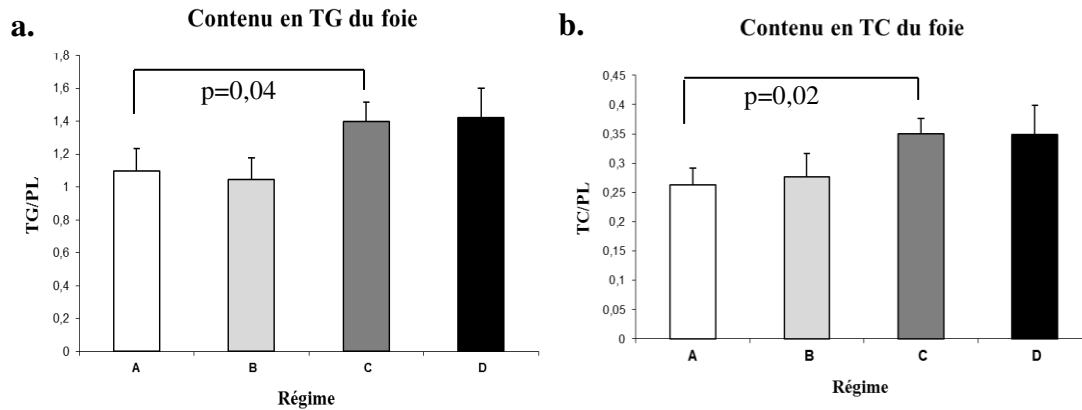


Figure 77 a et b: Contenu en triglycérides (a) et en cholestérol (b) hépatiques des souris sous régimes A, B, C et D après 6 mois de régimes (n=8 souris par groupe)

Aucune différence significative n'a été détectée concernant le contenu lipidique du muscle strié squelettique et du tissu adipeux entre les régimes hyperlipidiques ou enrichis en DHA, comparés au régime standard (figure 79 a, b et c) lorsqu'on regarde le rapport TG/PL bien que nous sachions qu'il y a plus de masse grasse chez les souris sous régime hyperlipidique. Les régimes hyperlipidiques n'auraient pas eu d'impact sur l'enrichissement lipidique des muscles, au détriment du foie lorsqu'on étudie ces organes au terme de l'étude. La triglycéridémie à jeun étant normale, comme nous l'avons vu auparavant, nous avons émis l'hypothèse que l'absence de lipogenèse et de sécrétion de VLDL pourraient permettre la compensation de l'apport important de lipides exogènes afin de limiter le stockage lipidique dans les organes périphériques.

Cependant, une augmentation significative du contenu en cholestérol du muscle a été détectée entre le régime C et D (figure 79 b). Le DHA présent dans le régime D a semblé promouvoir l'accumulation de TC dans le muscle. Si l'augmentation de l'expression de LDLr au niveau des membranes de foie est aussi présente au niveau des membranes du muscle, cela pourrait expliquer l'entrée massive du cholestérol au niveau musculaire.

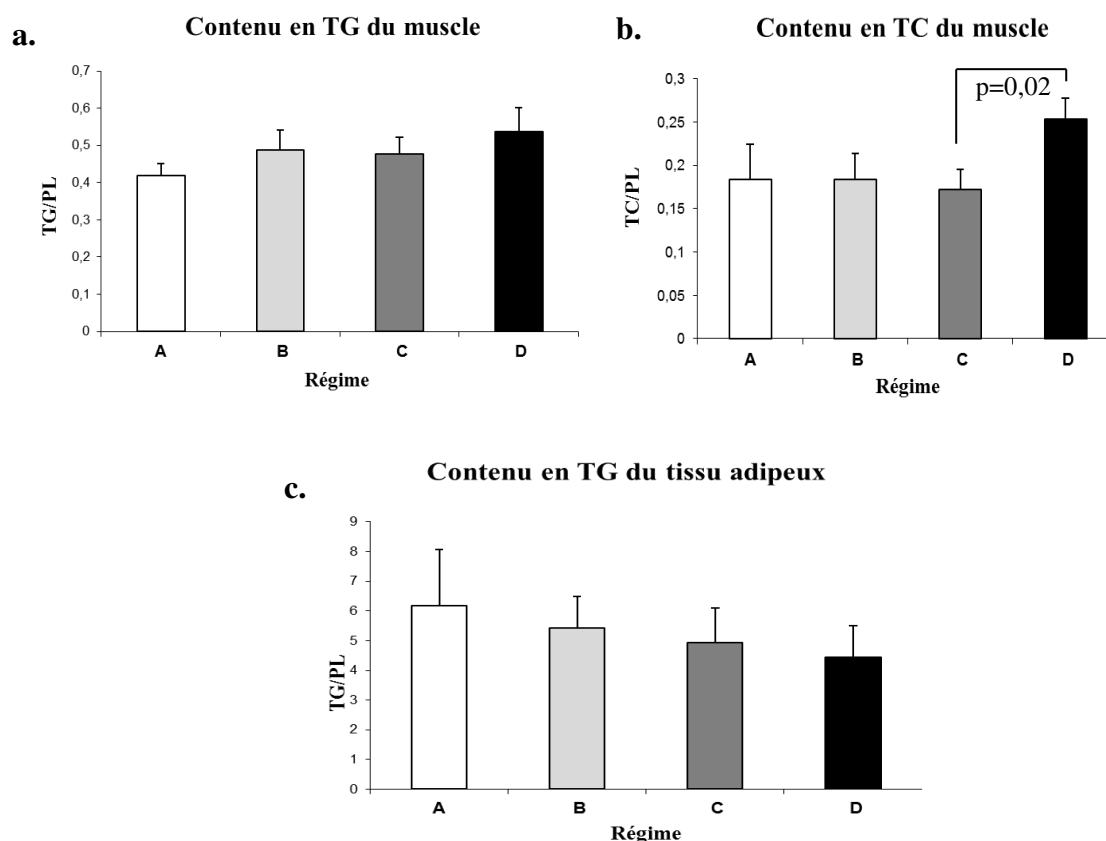


Figure 78 a, b et c: Contenu en triglycérides (a) et en cholestérol (b) musculaires et contenu en triglycérides adipocytaires (c) des souris sous régimes A, B, C et D après 6 mois de régime (n=8 souris par groupe)

V. CONCLUSION DE L'ÉTUDE

Cette étude a permis de cibler les acteurs impliqués dans la mise en place de la surcharge de poids et de déterminer si une supplémentation en DHA était un bénéfice pour la prévention ou la thérapie de cette pathologie. Les résultats obtenus sur le régime B ne supportent ni la littérature, ni les résultats précédemment trouvés au sein du laboratoire. En effet, la littérature montrait un effet hypocholestérolémiant du DHA ainsi qu'un effet hypotriglycéridémiant (tableau 16) (Abeywardena, M. Y. and Patten, G. S., 2011, Lu, J., et al., 2011, Sagara, M., et al., 2011). Cependant, il est important de noter que les souris utilisées lors de notre étude étaient âgées de 15 mois au terme de l'expérience, la réponse différente obtenue lors des différents traitements pourrait donc être attribuée à ce facteur vieillesse, très peu étudié par la littérature.

Tableau 16: Actions principales des acides gras polyinsaturés (spécialement les acides gras ω -3 dont le DHA) qui comptent dans leurs actions bénéfiques sur l'inflammation, l'athérosclérose, les hyperlipidémies et le diabète de type 2. D'après Das 2008.

Cibles	Effets
TG plasmatiques a jeun et postprandial	↓↓
Cholestérol plasmatique	↓
HDL cholestérol	↑
LDL cholestérol	↓
Activité HMG-CoA	↓
Sensibilité à l'insuline	↑

De plus, les résultats obtenus ne confirment pas les résultats non publiés au sein du laboratoire révélant que les animaux soumis à un régime riche en DHA ont une prise de poids moins importante que les souris contrôles sur des périodes courtes, comme ici après 3 mois. Très peu d'études ont porté sur des régimes aussi longs, laissant penser à un phénomène d'adaptation aux régimes après 12 semaines menant à la perte des bénéfices du DHA, visibles durant les 12 premières semaines de traitement.

Cependant, la comparaison entre le régime C et le régime standard A a confirmé l'implication du récepteur LSR dans la pathologie de l'obésité. C'est pourquoi, il a été intéressant de poursuivre cette thèse en étudiant les conséquences d'un déficit en ce récepteur chez un modèle murin.

Chapitre 6 :

Étude de l'effet de la perte d'un allèle LSR chez un modèle murin lors d'un régime hyperlipidique

I. OBJECTIF DE L'ÉTUDE

Le récepteur LSR a été identifié comme étant un acteur majeur de l'homéostasie lipidique. Expression diminuée lors des phénomènes d'obésité et augmentée lors de la suppression de la synthèse endogène des TG, LSR semble jouer un rôle de maintien de l'équilibre lipidique. Afin de mieux comprendre le rôle de LSR dans l'homéostasie lipidique et son interaction avec la lipogenèse, nous avons utilisé le modèle LSR^{+/-}, où un allèle a été supprimé puisque le génotype homozygote LSR^{-/-} est létal. Nous avons vu lors du premier chapitre que sous stress lipidique, les souris LSR^{+/-} montraient une prise de poids et de masse grasse supérieure aux souris LSR^{+/+}. De plus, les souris LSR^{+/-} développaient une augmentation critique de leur taux de leptine plasmatique, accompagnée par une diminution de l'expression de Ob-R uniquement sous régime hyperlipidique. Au cours du vieillissement ou sous stress lipidique, les souris partiellement déficientes en LSR développent de sérieux troubles lipidiques assimilables à une dyslipidémie.

De plus, au cours de ces différentes études, nous avons évalué les variations de la lipogenèse en présence de régimes différents, d'injection de leptine et défini une forte interaction entre les expressions des enzymes lipogéniques et LSR. Or, un régime hyperlipidique a pour conséquence une diminution de la lipogenèse, palliant ainsi l'apport augmenté de lipides exogènes.

Cette étude a donc eu pour objectif de compléter les résultats obtenus lors de la première étude de cette thèse en étudiant les conséquences d'un génotype LSR^{+/-} lors d'une perturbation lipidique tel qu'un régime hyperlipidique induisant une dyslipidémie sur le statut des autres récepteurs lipoprotéiques (LDLr, LRP) ainsi que sur les conséquences lipidiques périphériques (lipides plasmatiques et tissulaires, statut de la lipogenèse et des lipases endothéliales).

II. MISE EN PLACE DE L'ÉTUDE

Dans le but d'étudier les conséquences lipidiques d'un régime hyperlipidique ainsi que les conséquences sur le statut de la lipogenèse, 18 souris femelles (11 souris LSR^{+/-} et 7 souris LSR^{+/+} contrôles issues des mêmes portées) âgées de 7 mois ont été soumises à un régime

hyperlipidique contenant 60% de lipides en kcal apportés principalement par du lard (Dietex, Saint Gratien, France) durant 6 semaines (tableau 17).

Tableau 17: Composition du régime hyperlipidique

Ingrédient	pour 100 g
Caséine	29,94
Bitartrate choline	0,33
L-cystine	0,45
Lard	29,25
Amidon de riz	10,08
Cellulose	6,96
Huile de soja	4,86
Sucre	11,84
Mix minéral	4,88
Mix vitamines	1,39

Composition	% (w/w)	kcal /g	% kcal
Lipides	34,3	3,09	60
Protéines	25,9	1,04	20
Glucides	25,2	1,01	20
Fibres	5	/	/
Autres	4,5	/	/
Total		5,13	100

Lors du chapitre I, des souris femelles avaient été mises sous régime hyperlipidique durant 10 semaines et l'absence de significativité de la prise alimentaire avait été perdue lors de la dernière semaine de l'étude, représentant certainement l'apparition d'une résistance à la leptine pour les souris LSR^{+/-} au vu de leurs taux de leptine plasmatique. Afin d'éviter ce phénomène, nous avons voulu nous situer en amont de cette supposée adaptation. C'est pourquoi, les souris ont été placées sous ce régime hyperlipidique durant 6 semaines et non 10.

Durant cette période, le poids et la prise alimentaire ont été mesurés chaque semaine. La masse grasse a été mesurée au début et à la fin de l'étude. Les dosages plasmatiques ont été réalisés après prélèvements sanguins dans la cavité rétro-orbitaire au début et au terme de l'expérience. Au terme de l'expérience, le foie, le muscle squelettique et le tissu adipeux ont été récupérés en vue d'analyser le statut protéique des autres récepteurs lipoprotéiques par

immunoblots de membranes totales et contenu cytosolique de foie et de déterminer le contenu lipidique de chaque structure (voir Matériels et Méthodes).

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les souris $LSR^{+/-}$ sous régime hyperlipidique ont montré une courbe de prise de poids plus forte que les souris $LSR^{+/+}$ dès la deuxième semaine et cette différence est devenue significative dès la 4^{ème} semaine (figure 80 a). La différence de prise de poids finale s'élève à 2,16 g (figure 80 b) sans changement significatif de la prise alimentaire (figure 81). Le régime hyperlipidique a donc des conséquences plus importantes chez les souris $LSR^{+/-}$ comme nous l'avions montré dans le chapitre I. On peut imaginer que l'apport lipidique alimentaire est moins rapidement éliminé de la circulation sanguine par les animaux $LSR^{+/-}$ en phase postprandiale du fait de la déficience en LSR.

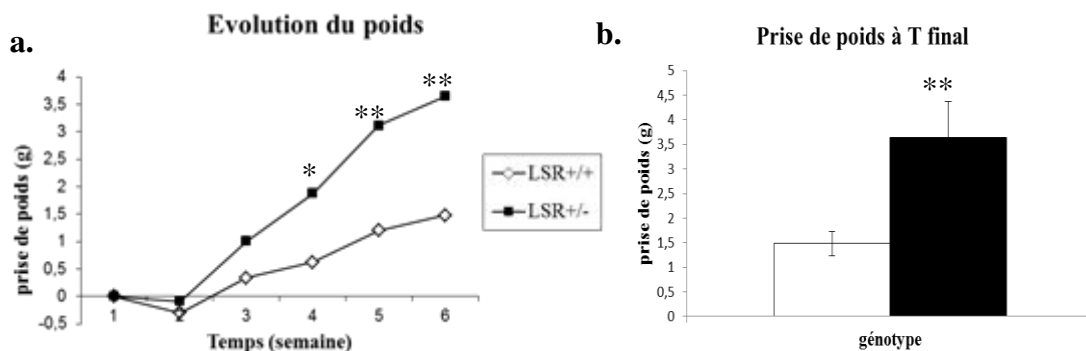


Figure 79 a et b: Évolution de la prise de poids des souris $LSR^{+/+}$ (losange blanc, n=7) et $LSR^{+/-}$ (carré noir, n=11) (a) et prise de poids finale des souris $LSR^{+/+}$ (blanc, n=7) et $LSR^{+/-}$ (noir, n=11) (b) sous régime hyperlipidique pendant 6 semaines. Le poids de chaque souris a été établi chaque lundi à 9h et la prise de poids a été calculée en soustrayant le poids de la semaine au poids à T0. (*) représente une valeur de $p < 0,05$ et () représente une valeur de $p < 0,01$**

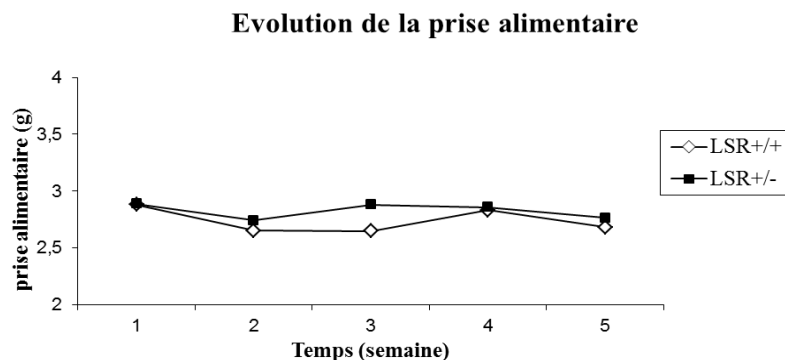


Figure 80:  volution de la prise alimentaire des souris LSR^{+/+} (losange blanc, n=7) et LSR^{+/-} (carré noir, n=11) sous régime hyperlipidique pendant 6 semaines. La prise alimentaire de chaque souris a été établie chaque lundi à 9h en pesant les croquettes dans les grilles en en soustrayant cette quantité à celle pesée la semaine précédente.

De plus, le suivi de la masse grasse de chaque souris révèle que les souris LSR^{+/-} ont une prise de masse grasse significativement plus importante que les souris LSR^{+/+} sous régime hyperlipidique (figure 82) alors qu'aucune différence n'est observée avant l'étude, révélant l'effet du régime hyperlipidique sur la masse grasse des souris. Le régime hyperlipidique apparaît comme un facteur aggravant de la d fici nce en LSR puisqu'il mène à l'augmentation critique de la masse grasse des souris LSR^{+/-} comparée aux souris LSR^{+/+}.

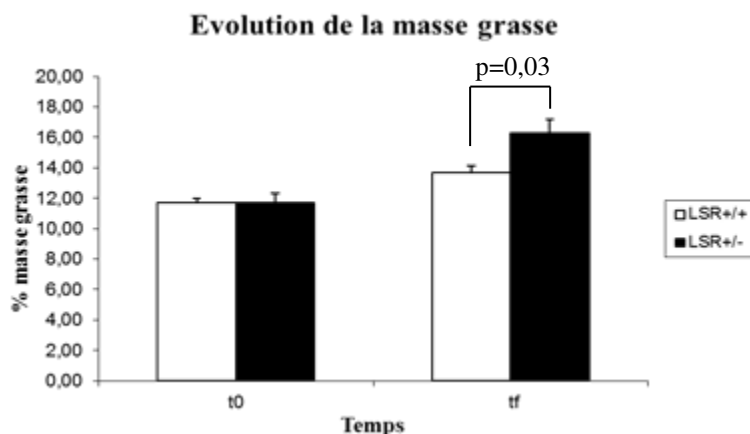


Figure 81:  volution de la masse grasse des souris LSR^{+/+} (blanc, n=7) et LSR^{+/-} (noir, n=11) sous régime hyperlipidique durant 6 semaines. La masse grasse a été mesurée à l'aide d'un EM-SCAN (voir Matériels et Méthodes) sous faible anesthésie gazeuse. Chaque analyse a été répétée 2 fois afin d'obtenir une moyenne pour chaque animal.

1. Dosages lipidiques plasmatiques

Les dosages plasmatiques postprandiaux (PP) et à jeun (AJ) viennent confirmer les résultats de l'impact du génotype LSR sur le métabolisme lipidique lors d'un stress hyperlipidique. En effet, les TG postprandiaux déjà augmentés significativement avant l'étude

chez les souris $LSR^{+/-}$, conséquence de la perte d'un allèle de LSR diminuant la clairance des chylomicrons en phase postprandiale, ont gardé leur augmentation au fil de l'étude (figure 83 a). La différence observée entre les taux de triglycérides PP des souris $LSR^{+/+}$ et $LSR^{+/-}$ au terme de l'étude semble un peu plus faible, bien que significative, comparée à celle observée à T0. La possibilité de mise en place d'une compensation paraît la meilleure hypothèse pour expliquer la réduction de cette différence.

Le régime hyperlipidique a significativement augmenté les TG à jeun sans réelles différences entre les génotypes (figure 83 b) montrant que principalement la clairance des TG postprandiaux est affectée par le génotype $LSR^{+/-}$.

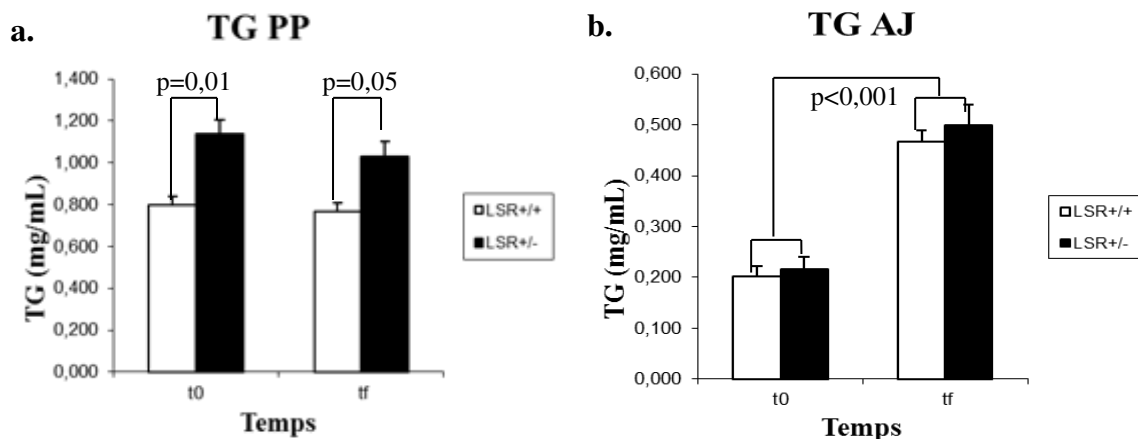
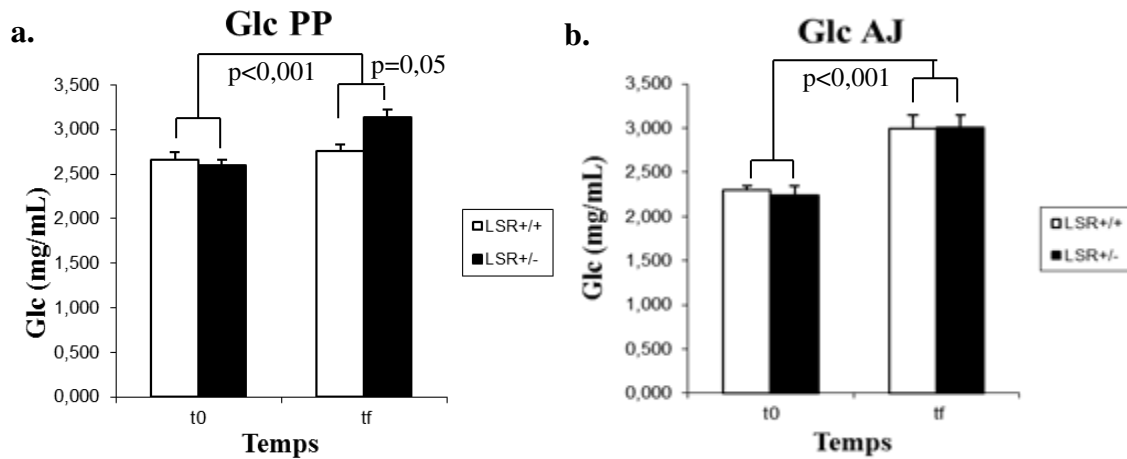


Figure 82 a et b: Dosages plasmatiques des TG postprandiaux (PP) (a) et à jeun (AJ) (b) des souris $LSR^{+/+}$ (blanc, n=7) et $LSR^{+/-}$ (noir, n=11) sous régime hyperlipidique durant 6 semaines. Les prélèvements sanguins ont été réalisés dans la cavité rétro orbitaire des souris sous anesthésie gazeuse à 9h pour les prélèvements postprandiaux et à 12h après 3h de jeûne pour les prélèvements à jeun. Les dosages ont été réalisés sur les plasmas isolés par des kits biochimiques (Biomerieux, Craaponne, France).

D'une manière intéressante, le génotype LSR semble aussi avoir un impact sur la glycémie des souris puisque le glucose PP est significativement augmenté chez les souris $LSR^{+/-}$ à la fin de l'étude (figure 84 a). Le stress hyperlipidique a, quant à lui, augmenté significativement les taux de glucose postprandiaux et à jeun de toutes les souris (figure 84 a et b). L'augmentation de la glycémie chez les souris $LSR^{+/-}$ pourrait refléter un trouble leptinémique. En effet, il est important de rappeler que la leptine module les flux intra-hépatiques de glucose à travers la néoglucogénèse et la glycogénolyse : l'injection cérébrale intraventriculaire de leptine provoque une forte inhibition de la glycogénolyse et une intensification de la néoglucogénèse. Il semblerait que 80 % du glucose formé provienne alors de cette voie (Morton, G. J. and Schwartz, M. W., 2011). Cependant, la néoglucogénèse et la

glycogénolyse interviennent à des moments où le substrat énergétique glucose fait défaut, donc en phase post-absorb tive et non en phase postprandiale. Les raisons pour lesquelles la glycémie semble élevée restent encore à être éclaircies.



Aucune différence significative du taux de cholestérol postprandial ou à jeun n' st observée entre les souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} durant l'expérience (figure 85 a et b). Toutefois, le régime hyperlipidique augmente significativement les taux de cholestérol que ce soit postprandial ou à jeun.

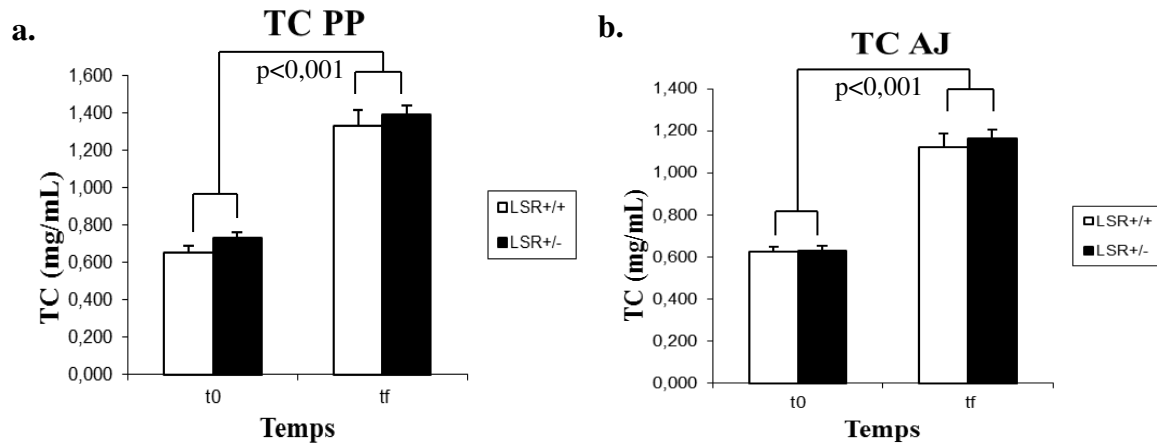


Figure 84 a et b: Dosages plasmatiques de cholestérol postprandial (PP) (a) et à jeun (AJ) (b) des souris LSR^{+/+} (blanc, n=7) et LSR^{+/-} (noir, n=11) sous régime hyperlipidique durant 6 semaines. Les prélèvements sanguins ont été réalisés dans la cavité rétro orbitaire des souris sous anesthésie gazeuse à 9h pour les prélèvements postprandiaux et à 12h après 3h de jeûne pour les prélèvements à jeun. Les dosages ont été réalisés sur les plasmas isolés par des kits biochimiques (Biomerieux, Craponne, France).

2. Analyses protéiques par immunoblots

Les immunoblots des membranes de foies des souris confirment la réduction de l'ordre de 50% de l'expression de LSR chez les souris LSR^{+/-} en comparaison avec les souris LSR^{+/+} avec une valeur de p de 0,03 validant le modèle murin hétérozygote pour le gène *lsr* (figure 86).

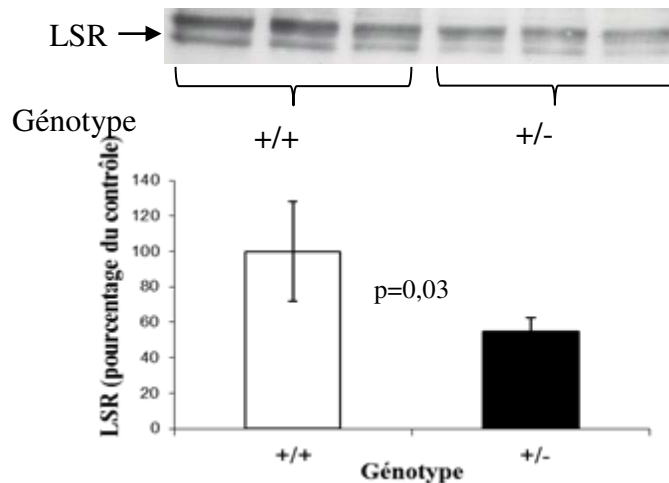


Figure 85: Immunoblots (n=3 souris représentées par génotype) de l'expression de LSR dans les membranes totales de foie des souris LSR^{+/+} (blanc, n=7) et LSR^{+/-} (noir, n=11). Les membranes de foies ont été réalisées telles qu'expliqué dans le chapitre "Matériels et Méthodes" et ont été normalisées avec la quantité de β -tubuline (indicatrice de la quantité de protéine totale de l'échantillon) et exprimées en terme de pourcentage du contrôle (de la moyenne des valeurs de LSR des souris LSR^{+/+}). Les immunoblots ont été quantifiés en utilisant le logiciel ImageJ.

Le génotype hétérozygote semble n'avoir aucun impact sur l'expression du récepteur à la leptine (Ob-R) lors d'un régime hyperlipidique dont l'augmentation légère chez les souris $LSR^{+/-}$ reste non significative (figure 87). Lors du premier chapitre, nous avons observé une diminution de l'expression du récepteur Ob-R au terme des 10 semaines d'étude, suggérant l'apparition d'une résistance périphérique à la leptine. Cette étude n'a été réalisée que sur 6 semaines, ce qui pourrait suggérer que la résistance à la leptine n'apparaîtrait que plus tardivement.

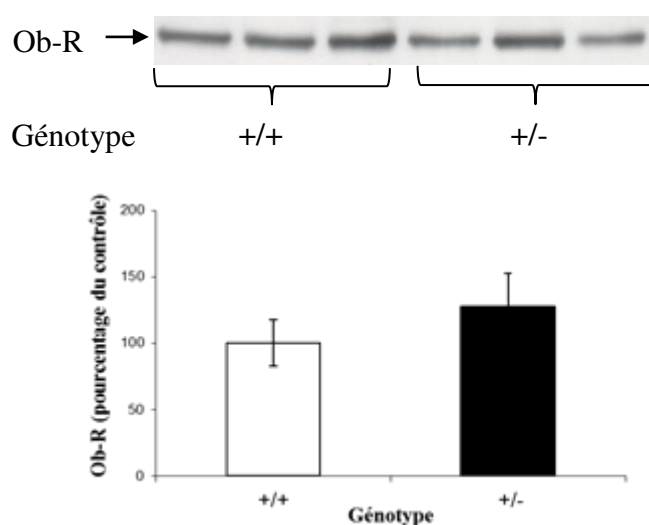


Figure 86: Immunoblots (n=3 souris représentées par génotype) de l'expression du récepteur à la leptine (Ob-R) dans les membranes totales de foie des souris $LSR^{+/+}$ (blanc, n=7) et $LSR^{+/-}$ (noir, n=11) sous régime hyperlipidique durant 6 semaines. Les valeurs obtenues après quantification des immunoblots par ImageJ ont été normalisées avec la quantité de β -tubuline de l'échantillon.

De plus, l'évaluation de l'expression des autres récepteurs lipoprotéiques (figure 88 a et b) montrent qu'il n'y a aucune compensation significative ni chute d'expression du récepteur LDLr ou de LRP malgré une légère augmentation de l'expression de LRP.

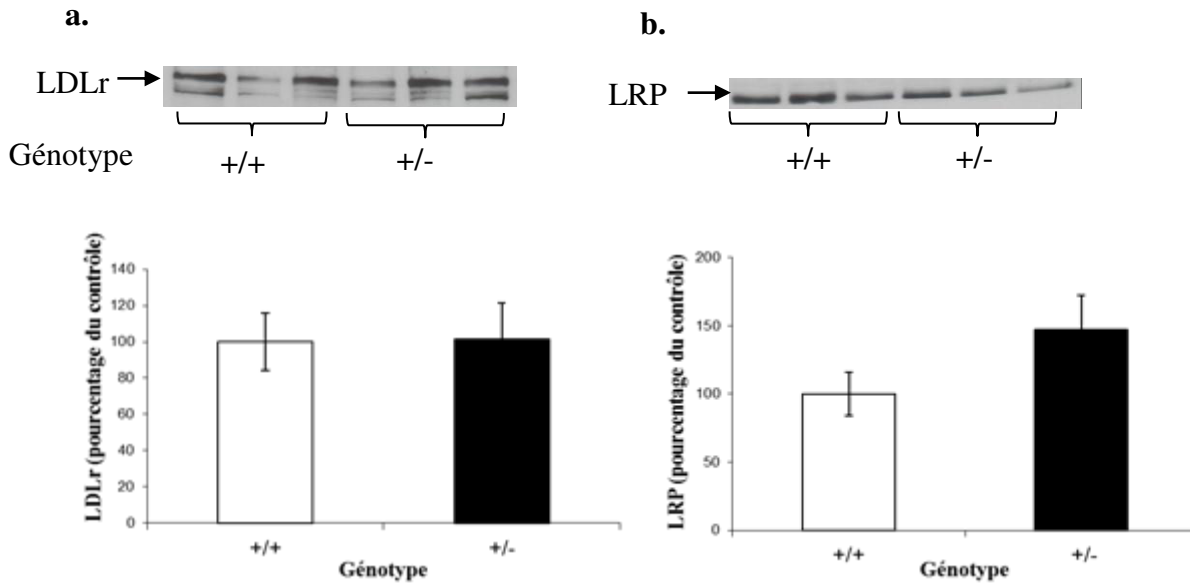


Figure 87 a et b: Immunoblots (n=3 souris représentées par génotype) de l'expression de LDLr (a) et de LRP (b) dans les membranes de foie des souris LSR^{+/+} (blanc, n=7) et LSR^{+/-} (noir, n=11) sous régime hyperlipidique durant 6 semaines. Les valeurs obtenues après quantification des immunoblots par ImageJ ont été normalisées avec la quantité de β -tubuline de l'échantillon

D'autre part, le génotype LSR aurait aussi un impact sur l'expression des lipases hépatiques, principalement la lipoprotéine lipase, dont l'expression semblerait significativement augmentée chez les souris LSR^{+/-} lors d'un régime hyperlipidique, comparée aux souris LSR^{+/+} (figure 89 a). Aucune différence significative n'a été détectée concernant l'expression de la lipase hépatique (figure 89 b).

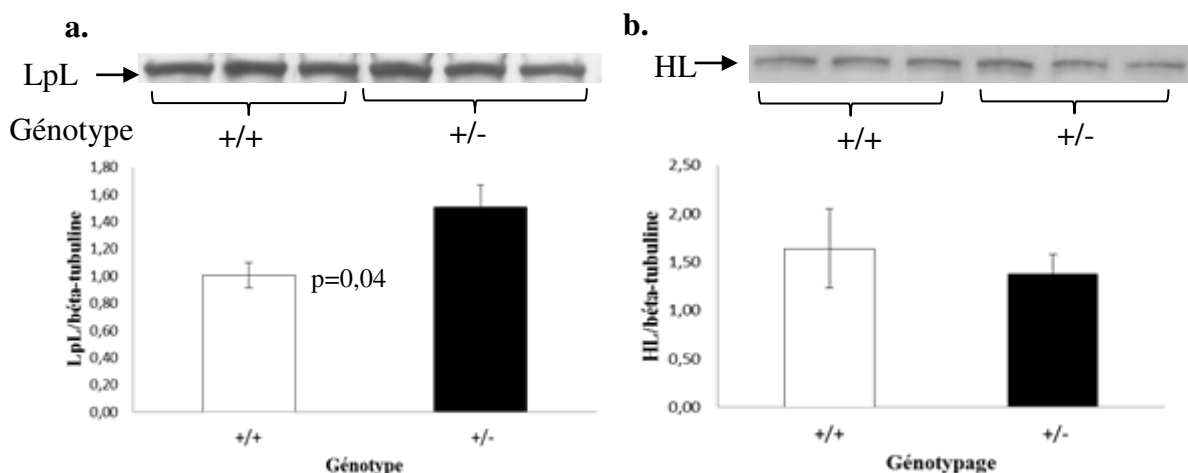


Figure 88 a et b: Immunoblots (n=3 souris représentées par génotype) de l'expression de la LpL (a) et de la HL (b) dans le contenu cytosolique de foie des souris LSR^{+/+} (blanc, n=7) et LSR^{+/-} (noir, n=11) sous régime hyperlipidique durant 6 semaines. Les valeurs obtenues après quantification des immunoblots par ImageJ ont été normalisées avec la quantité de β -tubuline de l'échantillon

D'autre part, il semblerait que la lipogenèse soit affectée par le génotype hétérozygote $LSR^{+/-}$ puisqu'une forte diminution de l'expression d'ACL a été observée (figure 90 a) chez les souris $LSR^{+/-}$, ceci comparé aux souris $LSR^{+/+}$. Cependant, aucune modification de l'expression de FAS n'a pu être observée (figure 90 b). Il semblerait que le génotype n'ait d'impact que sur l'expression d'ACL, renforçant le lien entre LSR et ACL évoqué dans les précédents chapitres de cette thèse.

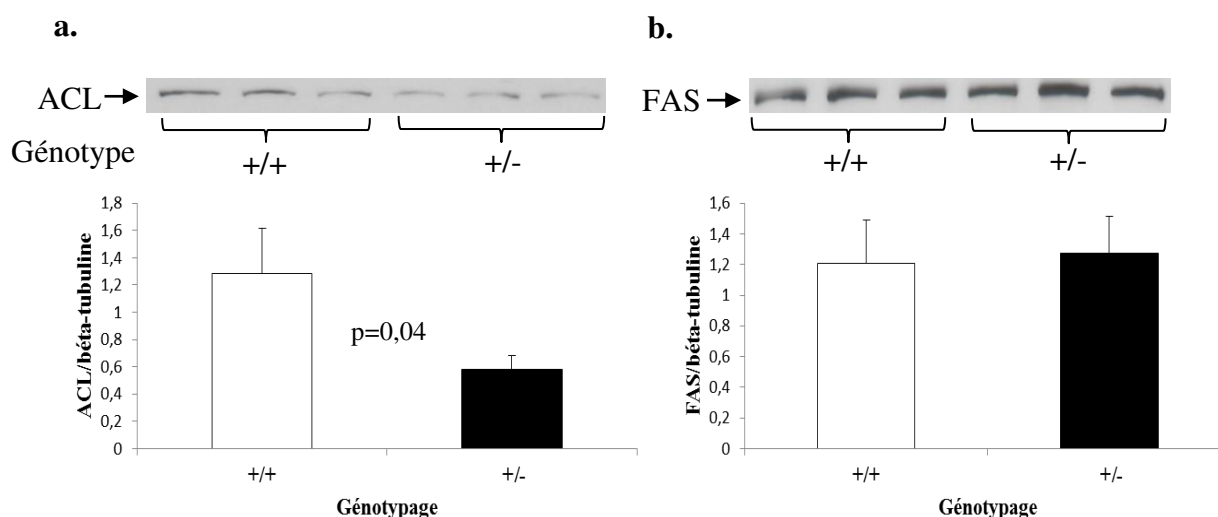


Figure 89 a et b: Immunoblots (n=3 souris représentées par génotype) de l'expression d'ACL et de FAS dans les contenus cytosoliques de foie des souris $LSR^{+/+}$ (blanc, n=7) et $LSR^{+/-}$ (noir, n=11) sous régime hyperlipidique durant 6 semaines. Les valeurs obtenues après quantification des immunoblots par ImageJ ont été normalisées avec la quantité de β -tubuline de l'échantillon

Afin de vérifier si l'interaction observée entre les expressions de LSR et ACL au cours des différentes expériences de cette thèse est maintenue lors d'une perturbation génétique telle que la déficience en LSR, nous avons réalisé une corrélation accompagnée par une courbe de tendance (graphique # a). Les souris $LSR^{+/+}$ ne semblent pas montrer de corrélation entre les expressions de LSR et ACL alors que les souris $LSR^{+/-}$ ont une interaction très importante avec un facteur de détermination (R^2) de 0,53 (figure 91 a et b). D'après la table de Bravais Pearson, il est nécessaire d'avoir un coefficient de corrélation (R) de 0,6664 soit un coefficient de détermination (R^2) de 0,4441 (pour n=9 et $\alpha=0,05$). L'association entre ces deux facteurs est donc présente lors d'un génotype $LSR^{+/-}$.

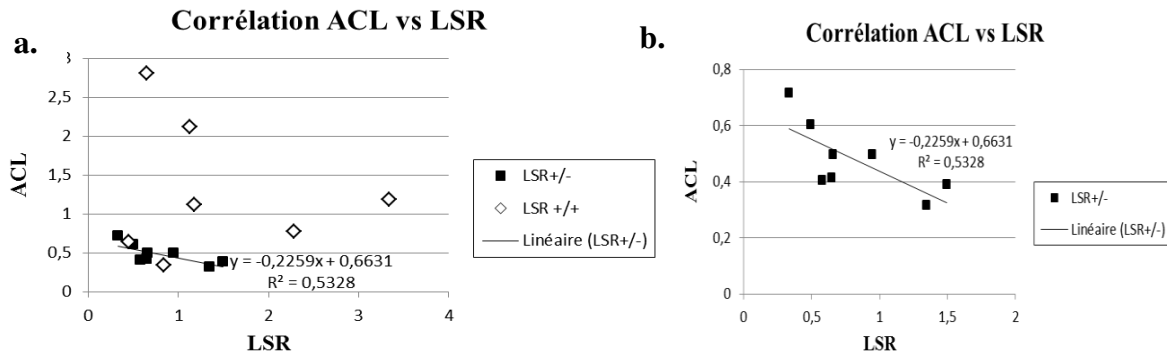


Figure 90a et b: Corrélation entre les expressions de LSR et d'ACL dans les foies des souris LSR^{+/+} (blanc, n=7) et LSR^{+/-} (noir, n=9) (a) et uniquement chez les souris LSR^{+/-} (noir, n=9) (b) sous régime hyperlipidique durant 6 semaines.

Cependant, il est intéressant de remarquer que l'interaction observée chez les souris sauvages a été perdue, révélant une plus forte disparité de valeurs des expressions de LSR et ACL (figure 91 a). Ce n'est que lorsque 2 souris sont enlevées du graphique que nous retrouvons cette interaction qui reste néanmoins non significative (graphique 12).

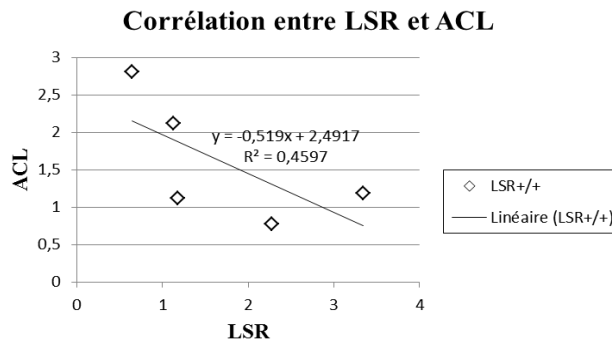


Figure 91: Corrélation entre les expressions de LSR et ACL chez les souris LSR^{+/+} (blanc, n=5) sous régime hyperlipidique durant 6 semaines

3. Dosages lipidiques tissulaires

Au-delà des troubles plasmatiques, les dosages lipidiques tissulaires révèlent des troubles du contenu lipidique détectés dans le foie avec une augmentation significative des TG et du cholestérol hépatiques chez les souris LSR^{+/-}, en comparaison aux souris LSR^{+/+} (figure 93 a et b). Cet enrichissement lipidique hépatique des souris LSR^{+/-} malgré leur déficience en LSR pourrait être expliqué par la diminution de l'expression d'ACL, réduisant la lipogenèse. La lipogenèse réduite, cela inhibe une partie de la synthèse de VLDL qui empêche donc la sortie des lipides exogènes intégrés au foie par les récepteurs lipoprotéiques.

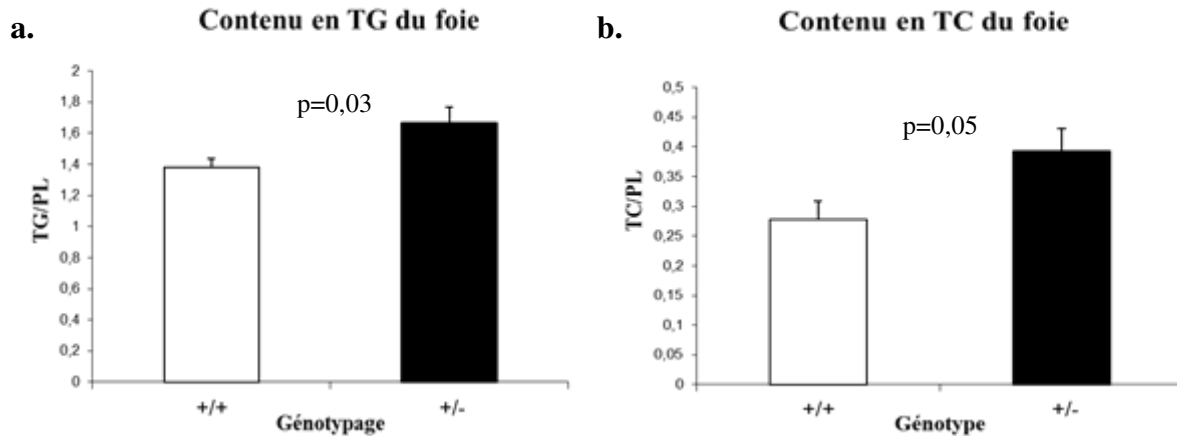


Figure 92 a et b: Contenu en TG (a) et cholestérol (TC) (b) hépatique des souris LSR^{+/+} (blanc, n=7) et LSR^{+/-} (noir, n=11) sous régime hyperlipidique durant 6 semaines. Les dosages lipidiques ont été réalisés sur des lyophilisats d'échantillons de foies, comme expliqué dans le chapitre "Matériels et Méthodes"

De plus, les TG du muscle des souris LSR^{+/-} sont significativement augmentés lors d'un stress lipidique alors qu'aucune différence n'est observée pour le contenu en cholestérol (figure 94 a et b). Cela peut être expliqué par la réduction d'expression de LSR et donc la faible clairance des résidus de chylomicrons qui continuent à distribuer leur contenu en TG aux organes périphériques tels que le muscle squelettique.

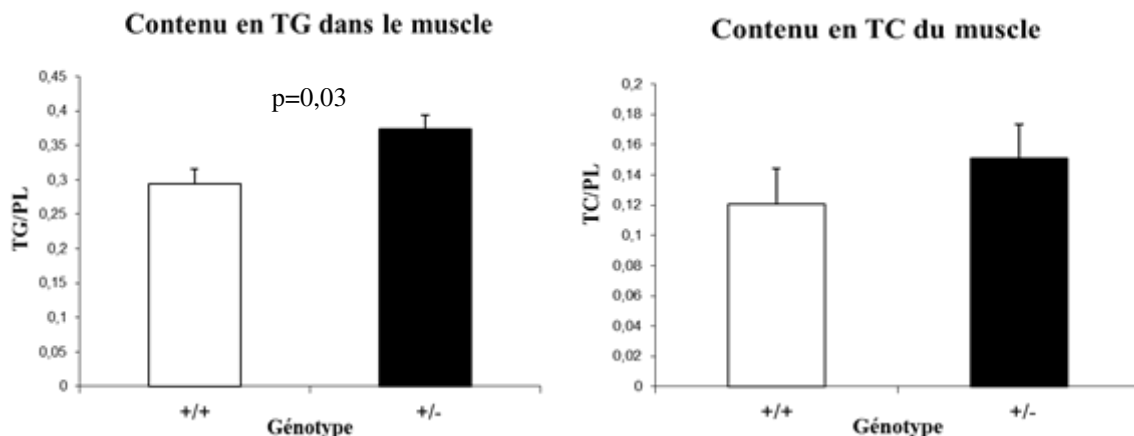


Figure 93 a et b: Contenu en TG (a) et en cholestérol (b) musculaire des souris LSR^{+/+} (blanc, n=7) et LSR^{+/-} (noir, n=11) sous régime hyperlipidique durant 6 semaines. Les dosages lipidiques ont été réalisés sur des lyophilisats d'échantillons de muscle squelettique comme expliqué dans le chapitre "Matériels et Méthodes"

Pour finir, aucune différence de contenu en TG dans le tissu adipeux n'a pu être observée entre les souris LSR^{+/+} et les souris LSR^{+/-} sous régime hyperlipidique (figure 95 a et b). Le contenu en TG adipocytaire reste inchangé quel que soit le génotype, cependant la

masse grasse des souris LSR^{+/-} est plus importante que celle des souris LSR^{+/+} ; c'est pourquoi la quantité de TG a été plus élevée chez les souris LSR^{+/-}.

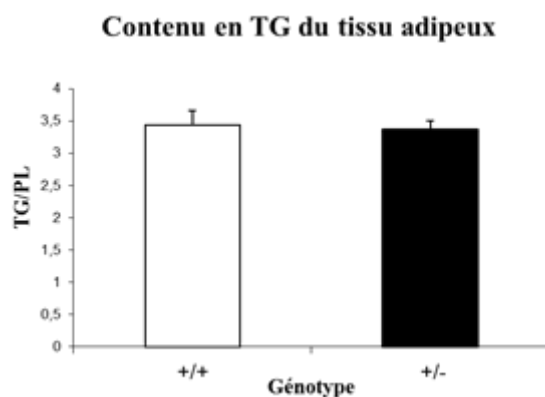


Figure 94 a et b: Contenu en TG (a) et en cholestérol (b) adipocytaire des souris LSR^{+/+} (blanc, n=7) et LSR^{+/-} (noir, n=11) sous régime hyperlipidique durant 6 semaines. Les dosages lipidiques ont été réalisés sur des lyophilisats d'échantillons de tissu adipeux comme expliqué dans le chapitre "Matériels et Méthodes".

4. Dosage des taux de leptine plasmatique

Nous avons dosé les taux de leptine plasmatique à jeun par un kit ELISA. Nous avons observé une augmentation non significative de la concentration de leptine plasmatique chez les souris LSR^{+/-} mais conséquente, ceci comparé aux souris LSR^{+/+} (figure 96). Cela semble être due à une sécrétion plus importante de leptine par le tissu adipeux sachant que la masse grasse des souris LSR^{+/-} est plus importante que celle des souris LSR^{+/+}. L'expression du récepteur Ob-R n'étant pas significativement modifiée après 6 semaines de régime hyperlipidique, il ne peut s'agir de la présence d'une résistance périphérique à la leptine menant à l'accumulation de leptine plasmatique. De plus, aucune modification de la prise alimentaire n'a été observée durant ce traitement renforçant l'hypothèse d'une plus grande sécrétion de leptine par le tissu adipeux des souris LSR^{+/-} comparé aux souris LSR^{+/+}.

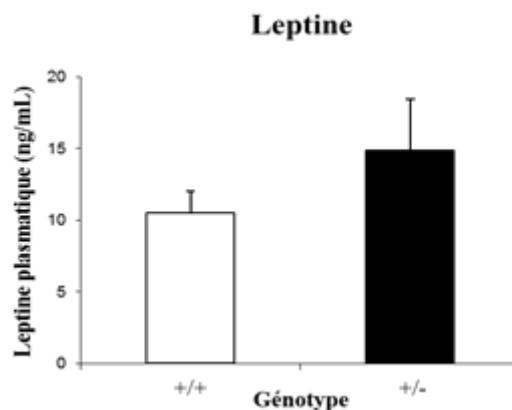


Figure 95: Taux de leptine plasmatique des souris LSR^{+/+} (blanc, n=6) et LSR^{+/-} (noir, n=9) sous régime hyperlipidique durant 6 semaines. Les dosages de leptine ont été réalisés sur les échantillons plasmatiques des souris à jeun au terme de l'étude.

Il a été largement montré par la littérature que la leptine avait un effet régulateur de la lipogenèse, principalement à travers le contrôle des facteurs de transcription des enzymes lipogéniques (SREBP-1c en particulier) (Dridi, S., *et al.*, 2005, Nogalska, A., *et al.*, 2005). En effet, l'augmentation de l'expression du gène de la leptine (*lep*) pourrait expliquer en partie la réduction de l'expression du gène SREBP-1c et par conséquent la diminution d'activité lipogénique. Cela nous a donc permis d'établir une hypothèse selon laquelle l'augmentation de la sécrétion de leptine chez les souris LSR^{+/-} pouvait avoir un effet régulateur de la lipogenèse en réduisant la transcription des enzymes lipogéniques.

5. Analyse comportementale

Les souris ont été placées dans le labyrinthe en Y afin de tester leur capacité cognitive immédiate. Les souris LSR^{+/+} et les souris LSR^{+/-} ont effectué le même nombre d'entrées malgré leur prise de poids différente ce qui indique que la différence observée de pourcentage d'alternance ne vient pas d'un problème de mobilité dû à un surpoids des souris LSR^{+/-}. Nous avons observé que les souris LSR^{+/-} sous stress lipidique ont réalisé un score plus faible que les souris LSR^{+/+} en terme de pourcentage d'alternance (figure 97). Cela nous indique que la déficience en LSR est liée à la capacité cognitive des souris, mise en évidence lorsque les souris sont soumises au régime hyperlipidique.

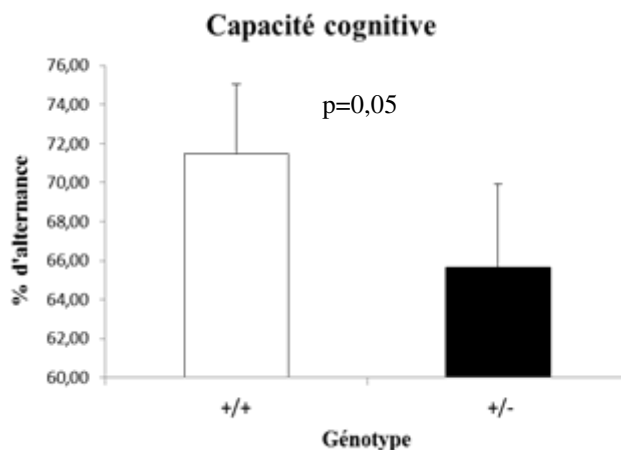


Figure 96: Évaluation de la capacité cognitive immédiate par le labyrinthe en Y qui détermine le pourcentage d'alternance des souris $LSR^{+/+}$ (blanc, n=7) et $LSR^{+/-}$ (noir, n=11) sous régime hyperlipidique durant 6 semaines. Le labyrinthe en Y est composé de 3 bras différenciés uniquement par le marquage au sol. Le pourcentage d'alternance calculé dans ce labyrinthe reflète la capacité cognitive immédiate des souris (voir chapitre "Matériels et Méthodes").

6. Tests statistiques

Des tests statistiques ont été réalisées afin d'identifier les interactions significatives entre les paramètres analysés. Lors d'une déficience en LSR, des troubles de l'homéostasie lipidique apparaissent révélant le rôle de LSR dans ce maintien. Il reste à estimer quels sont les facteurs les plus impliqués dans ce maintien du statut lipidique. Pour cela, nous avons réalisé une matrice de corrélation avec tous les animaux (tableau 18) puis une matrice de corrélation séparant les souris $LSR^{+/+}$ des souris $LSR^{+/-}$ (tableau 19 et 20) afin de définir si les facteurs interagissant entre eux chez les souris $LSR^{+/+}$ sont les mêmes lors d'une déficience en LSR.

Tableau 18: Matrice de corrélation entre les paramètres étudiés de toutes les souris

	poids	delta poids	% MG	TC PP	TG PP	TC AJ	TG AJ	LSR	LRP	LDLr	LpL	HL	ACL	FAS	Y maze
poids	1,000	,974	,890	,427	-,244	,487	-,039	-,041	-,003	,205	,102	-,098	-,031	,232	-,052
delta poids	,974	1,000	,909	,477	-,092	,493	-,002	-,104	,093	,196	,228	-,062	-,013	,279	-,058
% MG	,890	,909	1,000	,377	-,070	,550	,135	-,062	,227	,276	,283	,086	,225	,450	-,040
TC PP	,427	,477	,377	1,000	,113	,679	,356	,184	,226	-,086	,565	,168	-,004	,196	-,185
TG PP	-,244	-,092	-,070	,113	1,000	,098	,152	-,124	,356	-,104	,236	-,094	,043	,007	-,248
TC AJ	,487	,493	,550	,679	,098	1,000	,360	,212	,100	,233	,496	,302	,351	,537	-,142
TG AJ	-,039	-,002	,135	,356	,152	,360	1,000	,043	,073	,035	,186	,279	,193	,309	,123
LSR	-,041	-,104	-,062	,184	-,124	,212	,043	1,000	-,161	,547	,001	,420	,500	,252	,263
LRP	-,003	,093	,227	,226	,356	,100	,073	-,161	1,000	-,087	,506	,107	,171	,316	-,216
LDLr	,205	,196	,276	-,086	-,104	,233	,035	,547	-,087	1,000	,219	,736	,695	,595	,536
LpL	,102	,228	,283	,565	,236	,496	,186	,001	,506	,219	1,000	,527	,285	,548	,067
HL	-,098	-,062	,086	,168	-,094	,302	,279	,420	,107	,736	,527	1,000	,738	,685	,488
ACL	-,031	-,013	,225	-,004	,043	,351	,193	,500	,171	,695	,285	,738	1,000	,728	,437
FAS	,232	,279	,450	,196	,007	,537	,309	,252	,316	,595	,548	,685	,728	1,000	,369
Y maze	-,052	-,058	-,040	-,185	-,248	-,142	,123	,263	-,216	,536	,067	,488	,437	,369	1,000

18 observations ont été utilisées dans ce calcul.

D'après le tableau de R de Bravais Pearson, les corrélations doivent avoir une valeur de coefficient de corrélation R supérieure à 0,468 ($n=18$; $\alpha<0,05$) afin d'être considérées comme intéressantes et significatives. Il semblerait que LSR interagisse significativement avec LDLr ($R=0,547$), l'enzyme lipogénique ACL ($R=0,500$) et modérément avec HL ($R=0,420$) (tableau 18). Nous avons déjà montré qu'il y avait une interaction très forte entre les deux récepteurs lipoprotéiques LSR et LDLr lors du deuxième chapitre, cette interaction semble être toujours présente dans cette étude. De plus, il apparaît que l'expression de LSR soit corrélée avec la lipogenèse à travers l'expression de l'enzyme lipogénique ACL, comme nous l'avons vu lors du deuxième chapitre et lors de l'analyse des immunoblots. Cependant, une interaction positive non significative avait été détectée entre ces 2 paramètres alors que dans ce dernier chapitre, nous avons détecté une corrélation négative significative entre les expressions de LSR et ACL sans changement de technique. Les souris utilisées dans le chapitre 4 étaient âgées de 3 mois alors que les souris utilisées dans cette étude étaient âgées de 9 mois. Il semblerait que la différence d'âge des souris soit impliquée dans l'interaction entre les expressions de LSR et ACL, laissant penser que les souris jeunes n'ont pas encore mis en place toutes les interactions nécessaires à leur organisme.

D'autre part, l'expression de LSR semble aussi interagir plus faiblement avec l'expression de la lipase hépatique (HL) qui est impliquée aussi dans la libération des acides gras libres lors de l'hydrolyse des lipoprotéines, bien que son substrat préférentiel soit les HDL. Toutefois, l'expression de la lipoprotéine lipase (LpL) ne semble pas interagir avec l'expression de LSR mais plutôt avec les autres récepteurs lipoprotéiques LRP et plus faiblement LDLr ($R=0,506$ avec LRP et $R=0,219$ avec LDLr). Cela nous informe d'une

régulation différente entre les lipases endothéliales, à savoir que LSR interagit avec HL alors que LRP interagit avec la LpL. Pour finir, le pourcentage d'alternance semble très intimement corrélé avec les expressions des récepteurs lipoprotéiques, principalement LDLr ($R=0,923$) et plus faiblement avec LSR hépatique ($R=0,240$). Cette partie de l'étude nous a permis d'entamer des expériences visant à étudier l'impact d'un déficit en LSR sur le système nerveux central lors d'un contrat post-doctoral avec Christophe STENGER au sein du laboratoire.

Tableau 19: Matrice de corrélation entre les paramètres des animaux LSR^{+/+}

	poids	delta poids	% MG	TC PP	TG PP	TC AJ	TG AJ	LSR	LRP	LDLr	LpL	HL	ACL	FAS	Y maze
poids	1,000	,953	,425	-,024	-,162	,232	,003	,185	-,695	,251	-,290	-,154	-,117	,089	,283
delta poids	,953	1,000	,500	,052	,029	,133	,223	,177	-,484	,271	-,222	-,088	-,073	,105	,215
% MG	,425	,500	1,000	-,181	,380	,110	,362	,521	-,134	,780	,254	,599	,732	,743	,661
TC PP	-,024	,052	-,181	1,000	,665	,602	,527	,432	,408	-,297	,543	-,016	-,130	-,133	-,585
TG PP	-,162	,029	,380	,665	1,000	,387	,920	,666	,559	,317	,620	,536	,462	,337	-,055
TC AJ	,232	,133	,110	,602	,387	1,000	,245	,527	-,095	,305	,604	,430	,337	,436	,161
TG AJ	,003	,223	,362	,527	,920	,245	1,000	,562	,414	,380	,340	,455	,334	,225	,031
LSR	,185	,177	,521	,432	,666	,527	,562	1,000	-,149	,421	,280	,344	,398	,305	,240
LRP	-,695	-,484	-,134	,408	,559	-,095	,414	-,149	1,000	-,187	,629	,298	,216	,092	-,442
LDLr	,251	,271	,780	-,297	,317	,305	,380	,421	-,187	1,000	,243	,845	,851	,856	,923
LpL	-,290	-,222	,254	,543	,620	,604	,340	,280	,629	,243	1,000	,672	,635	,635	-,016
HL	-,154	-,088	,599	-,016	,536	,430	,455	,344	,298	,845	,672	1,000	,959	,925	,665
ACL	-,117	-,073	,732	-,130	,462	,337	,334	,398	,216	,851	,635	,959	1,000	,958	,712
FAS	,089	,105	,743	-,133	,337	,436	,225	,305	,092	,856	,635	,925	,958	1,000	,743
Y maze	,283	,215	,661	-,585	-,055	,161	,031	,240	-,442	,923	-,016	,665	,712	,743	1,000

7 observations ont été utilisées dans ce calcul.

La matrice de corrélation entre tous les facteurs des souris LSR^{+/+} révèle certaines interactions intéressantes avec LSR (tableau 19). Cependant, le faible effectif rend la significativité des statistiques difficiles ($R>0,755$ pour $n=7$, $\alpha<0,05$). L'élément le plus intéressant de cette matrice est l'expression de LDLr qui semble significativement interagir avec certains facteurs tels que la masse grasse des souris, l'expression de HL, les enzymes lipogéniques et principalement le pourcentage d'alternance à l'Y-maze représentatif de la capacité cognitive immédiate des souris ($R=0,923$). Cette interaction significative et surprenante renforce définitivement le lien qui relie les récepteurs lipoprotéiques et le statut lipidique avec les démences.

Tableau 20: Matrice de corrélation entre les paramètres des animaux LSR^{+/-}

	poids	delta poids	% MG	TC PP	TG PP	TC AJ	TG AJ	LSR	LRP	LDLr	LpL	HL	ACL	FAS	Y maze
poids	1,000	,986	,956	,650	-,417	,619	-,078	,155	,167	,499	,093	-,039	,092	,260	-,051
delta poids	,986	1,000	,950	,706	-,337	,648	-,094	,223	,198	,580	,195	,046	,182	,310	-,013
% MG	,956	,950	1,000	,628	-,412	,752	,048	,219	,264	,490	,127	,029	,322	,373	-,055
TC PP	,650	,706	,628	1,000	-,281	,747	,294	,232	-,141	,500	,590	,510	,249	,462	,073
TG PP	-,417	-,337	-,412	-,281	1,000	-,176	-,079	-,220	,094	-,238	-,112	-,361	,078	-,221	-,198
TC AJ	,619	,648	,752	,747	-,176	1,000	,425	,319	,214	,377	,373	,263	,552	,603	-,244
TG AJ	-,078	-,094	,048	,294	-,079	,425	1,000	-,170	-,199	-,158	,089	,285	,227	,336	,189
LSR	,155	,223	,219	,232	-,220	,319	-,170	1,000	,680	,743	,573	,569	,554	,800	,155
LRP	,167	,198	,264	-,141	,094	,214	-,199	,680	1,000	,540	,285	-,009	,426	,525	,021
LDLr	,499	,580	,490	,500	-,238	,377	-,158	,743	,540	1,000	,701	,483	,371	,549	,312
LpL	,093	,195	,127	,590	-,112	,373	,089	,573	,285	,701	1,000	,721	,351	,490	,253
HL	-,039	,046	,029	,510	-,361	,263	,285	,569	-,009	,483	,721	1,000	,429	,571	,410
ACL	,092	,182	,322	,249	,078	,552	,227	,554	,426	,371	,351	,429	1,000	,705	,261
FAS	,260	,310	,373	,462	-,221	,603	,336	,800	,525	,549	,490	,571	,705	1,000	,293
Y maze	-,051	-,013	-,055	,073	-,198	-,244	,189	,155	,021	,312	,253	,410	,261	,293	1,000

11 observations ont été utilisées dans ce calcul.

Les corrélations obtenues lors de la matrice de corrélation réalisée sur les souris LSR^{+/-} nécessitent un $R > 0,602$ afin d'être considérées comme significatives (tableau 20). Lors d'une d fici nce en LSR, la corrélation détectée entre les expressions de LSR et ACL semble moins importante. Cependant une corrélation a été trouvée entre les expressions de LSR et FAS, révélant toujours une interaction forte entre les enzymes lipogéniques (qu'il s'agisse d'ACL ou FAS) et l'expression de LSR. De plus, l'interaction entre les expressions de LSR et les autres récepteurs lipoprotéiques semble toujours importante même lors d'une d fici nce en LSR.

Toutefois, le pourcentage d'alternance à l'Y-maze ne semble plus corréler avec aucun paramètre de notre étude. Il serait intéressant d'étudier quels sont les facteurs interagissant avec la capacité cognitive lors d'un génotype LSR^{+/-} afin de déterminer la cause de la perte cognitive des souris.

L'expression du récepteur lipoprotéique LDLr semble avoir perdu toute interaction significative avec les enzymes lipogéniques et la capacité cognitive. En présence de troubles lipidiques tels qu'une d fici nce génétique en un récepteur lipoprotéique, il apparaît que l'interaction entre plusieurs facteurs permettant le maintien de l'homéostasie lipidique soit perdue.

IV. CONCLUSION DE L'EFFET D'UN RÉGIME HYPERLIPIDIQUE SUR LA RÉGULATION DU MÉTABOLISME LIPOPROTÉIQUE ET DE LSR

Les troubles du métabolisme lipidique, induits par un régime hyperlipidique ou une déficience en LSR conduisant à une dyslipidémie, ont montré l'importance du récepteur LSR dans le transport et la distribution des lipoprotéines ainsi que la forte interaction entre l'expression de LSR et les enzymes lipogéniques. En effet, lors d'un régime hyperlipidique, nous avons montré la diminution d'expression du récepteur LSR, accompagnée d'une diminution de l'expression des enzymes lipogéniques ACL et FAS, certainement afin de compenser l'apport important de lipides exogènes. Ces modifications d'expression ont pour conséquence une accumulation lipidique hépatique (TG et cholestérol). La forte interaction retrouvée entre les expressions de LSR et les enzymes lipogéniques (principalement avec ACL) est maintenue en présence de troubles du métabolisme lipidique, indiquant la mise en place d'une régulation suite à l'apport de lipides exogènes en grande quantité (figure 98 et 99).

Lors de cette étude, nous n'avons pu mettre en évidence aucun effet réellement bénéfique de l'enrichissement d'un régime standard en acides gras ω -3 contenant du DHA qui, d'après la littérature, aurait un effet hypocholestérolémiant et hypotriglycéridémiant (Abeywardena, M. Y. and Patten, G. S., 2011, Lu, J., *et al.*, 2011, Sagara, M., *et al.*, 2011). Cependant, lors de l'enrichissement d'un régime hyperlipidique avec ces mêmes acides gras, certains effets délétères, engendrés par le régime, peuvent être prévenus, principalement concernant l'hypercholestérolémie, l'expression du récepteur LDLr hépatique et beaucoup plus modérément l'expression de LSR. Ces résultats seraient à confirmer avec une étude portant sur les mêmes régimes mais durant seulement 3 mois.

Les mêmes perturbations lipidiques ont été observées lors d'une déficience en LSR (LSR^{+/-}) sous stress lipidique conduisant à une prise de poids et de masse grasse plus importante que les souris contrôles (LSR^{+/+}) ou sous régime standard. Cela traduit une clairance moins importante des lipoprotéines en phase postprandiale et donc un enrichissement lipidique des tissus périphériques tels que le tissu adipeux et le muscle squelettique. L'expression d'ACL a aussi été inhibée par la déficience en LSR, comparée aux souris contrôles renforçant l'hypothèse d'une interaction forte entre ces deux paramètres. L'hypothèse qui a été établie est la synthèse plus abondante de leptine par le tissu adipeux des

souris LSR^{+/-} ou des souris sauvages sous stress lipidique (la masse grasse étant augmentée), qui entraîne une réduction de la lipogenèse à travers la régulation des facteurs de transcription. Malgré la diminution de l'expression de LSR, une forte accumulation de TG hépatique est observée, laissant penser que la réduction de la lipogenèse conduit à la réduction de la sécrétion de VLDL et donc l'enrichissement en TG du foie, comme l'indique la littérature (Wang, Q., *et al.*, 2010). Cependant, aucun test n'ayant été réalisé concernant la sécrétion des VLDL, il est impossible d'être certain de l'origine de cette accumulation, dépendante de LSR puisque les souris LSR^{+/-} ont une accumulation plus importante de lipides hépatiques que les souris LSR^{+/+} sous régime hyperlipidique.

De plus, l'implication de LSR dans le maintien de l'homéostasie lipidique a été vérifiée par les matrices de corrélation qui ont révélé que les interactions mises en place chez les animaux contrôles permettant le maintien du statut lipidique n'existent pas chez les souris de génotype LSR^{+/-}, révélant le rôle crucial de LSR.

Ces résultats viennent compléter ceux obtenus en présence d'un régime standard concernant le rôle de LSR dans le transport et la distribution des lipides alimentaires ainsi que son importance dans les troubles lipidiques tels qu'un régime riche en lipides ou une déficience génétique réduisant la clairance des lipides alimentaires.

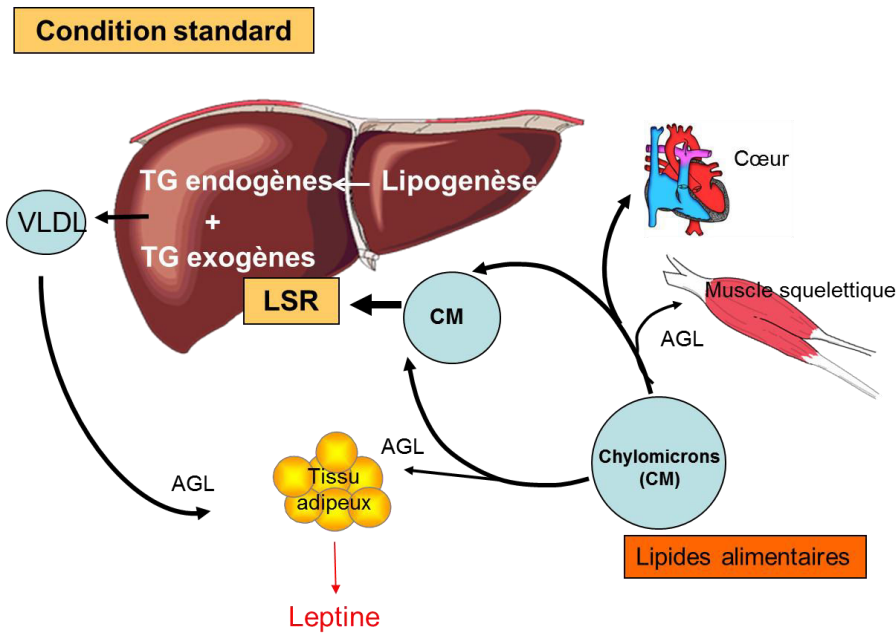


Figure 97: Distribution des lipoprotéines chez une souris en condition standard. Les chylomicrons transportant les lipides alimentaires distribuent leur contenu aux organes périphériques puis sont captés par le foie grâce à LSR. La lipogenèse synthétise des TG endogènes qui, associés aux TG exogènes captés par LSR, seront sécrétés à nouveau en tant que VLDL dans la circulation générale. La leptine, faiblement sécrétée par un tissu adipeux normalement approvisionné, régule la lipogenèse d'une manière normale.

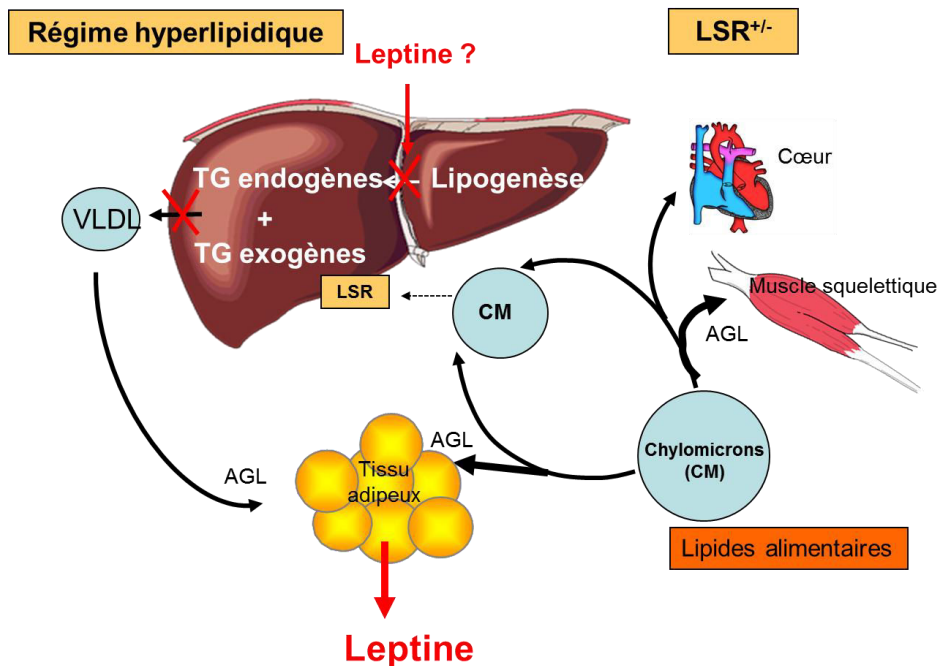


Figure 98: Distribution des lipoprotéines chez une souris sous régime hyperlipidique ou une souris LSR^{+/-}. Les chylomicrons transportant les lipides alimentaires sont plus faiblement captés par LSR, diminués par le régime hyperlipidique ou présent à seulement 50% chez les souris LSR^{+/-}. Les chylomicrons continuent donc à enrichir les tissus périphériques en TG. Le tissu adipeux, plus important que chez les souris sous condition standard sécrète plus de leptine. La leptine va avoir un effet régulateur plus important et inhiber la synthèse de TG endogènes à travers la régulation des facteurs de transcription. La lipogenèse supprimée, elle réduit la sécrétion de VLDL et participe à l'enrichissement hépatique en lipides.

Chapitre 7 :

Discussion générale

Le maintien de l'homéostasie lipidique périphérique semble être un mécanisme très complexe et il reste de nombreux paramètres à étudier pour comprendre son fonctionnement global. Néanmoins, nous avons pu mettre en évidence des pistes concernant certaines interactions intéressantes et certains paramètres régulateurs d'un récepteur pour les lipoprotéines.

Le récepteur hépatique *lipolysis stimulated lipoprotein receptor* (LSR) est impliqué dans la clairance des lipoprotéines riches en ApoB telles que les résidus de chylomicrons transportant les lipides alimentaires, importante pour la lipémie postprandiale. Le récepteur LSR semble crucial puisque l'absence totale de ce récepteur est létale au stade embryonnaire. Le génotype hétérozygote entraîne l'apparition d'une dyslipidémie au cours du vieillissement ou sous régime hyperlipidique. En effet, en absence d'une clairance adéquate, les résidus de chylomicrons sembleraient continuer la distribution de leur contenu lipidique aux organes périphériques tels que le tissu adipeux et le muscle squelettique.

Nos résultats démontrent que les facteurs alimentaires et endogènes pouvant réguler l'expression de LSR sont multiples. Tout d'abord, la leptine, cytokine sécrétée par le tissu adipeux, joue un rôle reconnu au niveau du système nerveux central en tant qu'hormone de satiété. Cependant, nous avons montré que cette hormone était impliquée dans la régulation du récepteur LSR. En effet, l'hypothèse a été émise lors de la découverte de la faible présence du récepteur LSR chez les souris obèses et déficientes en leptine ou en récepteur à la leptine (*ob/ob* et *db/db*). L'étude a donc porté en premier lieu *in vitro*, sur l'incubation de cellules de lignées avec des doses physiologiques de leptine (1-10 ng/mL) qui a montré une surexpression protéique et de l'ARNm de LSR avec les doses les plus élevées (avec un effet à partir de 1 ng/mL) de leptine (Stenger, C., *et al.*, 2010). Ces études *in vitro* ont aussi révélé que l'effet de la leptine était assuré au moins en partie à travers l'augmentation de la transcription du gène *lsr*. Les études *in vivo* d'injection de leptine à des souris pendant 8 jours ont démontré une diminution de poids accompagnée par une augmentation de l'expression protéique et de l'ARNm de LSR significative, comparée aux souris contrôles. Cette augmentation de l'expression de LSR est accompagnée par une diminution du contenu en triglycérides hépatiques. Afin de connaître les mécanismes de réduction du contenu en triglycérides hépatiques, une injection d'inhibiteur de la lipoprotéine lipase (Tyloxapol) a révélé la forte sécrétion de VLDL par les souris injectées avec de la leptine sans changement significatif de la lipogénèse. Pour finir, l'implication de la leptine dans le métabolisme lipidique périphérique à travers LSR a aussi pu être étudiée lors de la mise sous stress lipidique de

souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} femelles âgées de 10 semaines durant 10 semaines. Les souris LSR^{+/-} sous régime hyperlipidique ont montré une augmentation significative de la prise de poids et de la masse grasse, accompagnée par une augmentation des taux plasmatiques de leptine, ceci comparé aux souris LSR^{+/+}.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la relation possible entre la lipogénèse et l'expression de LSR. En effet, la leptine est connue pour moduler la lipogénèse à travers son action sur SREBP-1 et a été montrée comme pouvant moduler l'expression de LSR. L'expression de LSR étant étroitement corrélée avec les taux de leptine plasmatique, l'hypothèse émise lors de notre étude est la relation entre la lipogénèse et l'utilisation lipidique hépatique à travers le récepteur LSR. Pour cela, la lipogénèse a été inhibée par l'utilisation d'un inhibiteur d'une enzyme clef de la lipogénèse, l'*ATP citrate lyase* (ACL) appelé l'acide hydroxycitrique (HCA). L'inhibition de l'activité d'ACL suite un traitement de 30 jours avec l'extrait de *Garcinia cambogia* entraîne une surexpression de LSR, accompagnée d'une diminution des TG plasmatiques et d'une augmentation du contenu en TG hépatiques. Ces modifications sont accompagnées d'une réduction importante de l'expression des lipases endothéliales. Ces résultats suggèrent la mise en place d'une compensation de la réduction de la synthèse de TG endogènes par l'augmentation de la possibilité d'apport de TG exogènes en augmentant l'expression de LSR hépatique. La réduction de la lipogénèse bloquant la sécrétion de VLDL, il s'en suit une accumulation hépatique de triglycérides, aggravée par l'entrée plus importante de TG exogènes par l'augmentation de l'expression de LSR. De ce fait, il semblerait qu'un rétrocontrôle se mette en place par la réduction de l'expression des lipases endothéliales libérant les acides gras libres issus de l'hydrolyse des lipoprotéines et réduisant ainsi l'activation de LSR afin de réduire cet apport important en TG exogènes dans le foie. Ces résultats indiquent que la lipogénèse à travers les enzymes lipogéniques et en particulier ACL est fortement impliquée dans la régulation de l'expression des récepteurs lipoprotéiques, dans le but d'assurer un équilibre lipidique au sein de l'organisme.

Toutes ces précédentes études ont porté sur des régimes standards n'induisant aucune situation pathologique afin de comprendre les mécanismes mis en jeu en situation normale. Suite à cela, il a été intéressant de mieux comprendre la mise en place des problèmes de santé publique, tels que l'obésité et les dyslipidémies afin d'établir des actions préventives ou

thérapeutiques contre ces troubles lipidiques périphériques. C'est pourquoi, nous avons étudié les effets d'un régime hyperlipidique sur le statut lipogénique (enzymes lipogéniques) et lipidique (lipides plasmatiques et tissulaires, récepteurs lipoprotéiques et statut des lipases endothéliales) des souris ainsi que la possible réversion des atteintes métaboliques dues au régime hyperlipidique par la supplémentation de ce régime avec des acides gras ω -3 contenant principalement du DHA. De plus, nous avons étudié les atteintes métaboliques et les conséquences sur le statut lipidique et lipogénique d'une déficience génétique en LSR (LSR^{+/-}) lors d'un stress lipidique.

Le régime hyperlipidique contenant du cholestérol (régime de type « Western » ou athérogénique) a eu pour conséquence une diminution de l'expression de LSR significative, accompagnée par une diminution de l'expression des enzymes lipogéniques, afin de compenser l'apport très important de lipides exogènes. Les souris sous ce régime hyperlipidique ont eu une prise de poids et de masse grasse ainsi qu'un enrichissement lipidique hépatique plus important que les souris sous régime standard, sans changement significatif au niveau de l'expression des lipases de la paroi endothéliale. L'effet du DHA seul n'a pas eu un impact significatif sur l'expression du récepteur LSR, mais lorsqu'il est ajouté au régime hyperlipidique, il a permis d'atténuer la diminution importante de l'expression de LSR et de LDLr induit par le régime hyperlipidique et a retardé l'apparition de l'hypercholestérolémie observée chez les souris sous régime hyperlipidique.

D'autre part, le génotype LSR^{+/-} chez les souris femelles de 10 semaines, sous stress lipidique durant 6 semaines, a été associé avec une prise de poids et de masse grasse significativement plus importante que chez les souris LSR^{+/+}. Ces perturbations métaboliques ont été accompagnées par une augmentation importante du contenu en lipides (TG et cholestérol) hépatique et musculaire.

Régulation de LSR et résistance à la leptine

Lors de l'étude de l'effet de la leptine sur le récepteur LSR (chapitre I), nous avons mis en évidence une diminution de l'expression de récepteur à la leptine (Ob-R) hépatique, accompagnée par une augmentation importante des taux de leptine plasmatique et de la prise alimentaire chez les souris LSR^{+/-} sous régime hyperlipidique durant 10 semaines, comparées aux souris LSR^{+/+}. Ces observations laissent penser à un phénomène de résistance à la leptine menant à la perte de la réponse à la présence de leptine plasmatique, due à la réduction de l'expression de son propre récepteur. Il s'en suit par conséquent une accumulation

plasmatique de leptine représentative des modèles d'obésité. L'augmentation de leptine peut aussi être une conséquence de la diminution du passage de cette adipokine au niveau de la barrière hémato-encéphalique (BHE) empêchant le contrôle de la satiété. C'est alors qu'il est possible d'observer une augmentation de la prise alimentaire, représentative d'une perte de la sensation de satiété tel que nous l'avons observé chez les souris LSR^{+/-} sous régime hyperlipidique au terme des 10 semaines. Or, lors d'un même régime durant un temps plus court (6 semaines) (chapitre III), aucune diminution significative n'a pu être observée concernant l'expression du récepteur à la leptine hépatique et aucune différence de prise alimentaire n'a été détectée chez les souris LSR^{+/-}, comparée aux souris LSR^{+/+}. Cette différence peut être expliquée par l'apparition tardive de la réduction d'expression du récepteur Ob-R menant à la résistance à la leptine, mise en place entre 6 et 10 semaines de régime hyperlipidique.

De plus, lors d'un régime hyperlipidique ou d'une déficience en LSR, l'augmentation de masse grasse observée entraîne une sécrétion plus importante de leptine menant à une concentration de leptine plasmatique au-delà des concentrations physiologiques ($15,87 \pm 3,61$ ng/mL et $10,47 \pm 1,52$ pour les souris LSR^{+/-} et LSR^{+/+} sous régime hyperlipidique respectivement). Ces fortes concentrations de leptine plasmatique mènent à la réduction de la lipogénèse comme l'explique la littérature (Dridi, S., *et al.*, 2005, Lopez-Soriano, J., *et al.*, 1998, Nogalska, A., *et al.*, 2005, Wang, M. Y., *et al.*, 1999). Cependant, aucune surexpression de LSR n'est observée lors de ce phénomène. En effet, nous avons observé que l'administration de leptine en doses plus importantes (80-100 ng/mL) diminuait l'expression de LSR (données non publiées). Cet effet contradictoire de la leptine sur l'expression de LSR serait un effet dépendant des doses de leptine, pour lequel les mécanismes moléculaires impliqués restent à expliquer. La diminution de l'expression protéique du LSR en présence des concentrations élevées de la leptine pourrait contribuer la dyslipidémie observée chez les obèses.

Interaction entre l'expression protéique de LSR et la lipogénèse

Au cours des 3 chapitres de cette thèse, nous avons mis en évidence l'interaction forte entre l'expression de LSR et les expressions des enzymes lipogéniques ACL et FAS, enzymes clefs de la synthèse *de novo* des TG. En condition normale ou en présence de troubles du métabolisme lipidique, les expressions des enzymes lipogéniques sont régulées en conséquence afin de compenser soit l'apport important de lipides exogènes soit les problèmes

de clairance lipidique plasmatique. Sous régime standard, une matrice de corrélation et la régression multiple pas à pas (chapitre II) ont pu mettre en évidence l'interaction entre les expressions de LSR et ACL. Lors de la réduction de la lipogénèse par l'inhibiteur d'ACL, HCA, l'expression des enzymes lipogéniques a été augmentée pour palier à la réduction d'activité d'ACL, et a eu pour conséquence la surexpression de LSR afin d'assurer un apport constant de lipides au niveau hépatique. Sous régime hyperlipidique (chapitre III), les lipides exogènes arrivaient en grande quantité au niveau hépatique et l'expression de LSR a été significativement diminuée. Il est possible que moins de lipides exogènes en phase postprandiale soient captés au niveau hépatique à cause de l'expression réduite du LSR aboutissant à l'augmentation de la masse grasse et l'enrichissement lipidique musculaire des souris. L'augmentation de la masse grasse de ces souris entraîne une sécrétion plus importante de leptine, qui mène à la réduction de la lipogénèse par la diminution de la transcription des enzymes lipogéniques ACL et FAS (Dridi, S., *et al.*, 2005, Lopez-Soriano, J., *et al.*, 1998). De plus, l'apport important de lipides exogènes a pour conséquence la diminution de l'expression de LSR afin de compenser l'apport important de lipides hépatiques. Pour finir, lors d'une déficience en LSR (génotype LSR^{+/-}) sous régime hyperlipidique (chapitre III), l'augmentation de la masse grasse observée entraîne l'inhibition de la lipogénèse par la leptine sécrétée, d'après le même principe que les souris sauvages sous régime hyperlipidique, avec un effet encore plus marqué dû à la diminution encore plus importante de LSR.

La régulation de l'expression des enzymes lipogéniques ainsi que certaines conséquences sur le métabolisme lors d'un déficit en lipogénèse ont été déjà montré par la littérature (Baker, N., *et al.*, 1978, Clarke, S. D., *et al.*, 1977, Sullivan, A. C., *et al.*, 1972, Sullivan, A. C., *et al.*, 1977, Wang, Q., *et al.*, 2009). Cependant, dans le cadre de l'étude des paramètres pouvant réguler l'ARNm et l'expression de LSR, nous voulions savoir quelle était le degré d'implication de ce récepteur lipoprotéique dans la régulation de la voie métabolique de la lipogénèse. Nous avons alors découvert un système très complexe dans lequel les régulations d'expression des enzymes lipogéniques sont dépendantes des conditions d'alimentation ainsi que des statuts d'autres paramètres tels que les lipases de la paroi endothéliale et surtout les récepteurs lipoprotéiques (LSR et LDLr).

L'expression des lipases de la paroi endothéliale (LpL et HL) est contrôlée par de nombreux facteurs de transcriptions tels que CREB, IRS, SREBP-1c et PPAR γ (Catalano, P. M., *et al.*, 2002, Kim, S. J., *et al.*, 2010, Schoonjans, K., *et al.*, 2000, Yang, W. S. and Deeb, S. S., 1998) et semble être diminuée par la suppression de la lipogénèse. En effet, certains

facteurs de transcription sont impliqués dans la transcription des enzymes lipogéniques ainsi que dans celle des lipases hépatiques comme SREBP-1c (Briggs, M. R., *et al.*, 1993, Dentin, R., *et al.*, 2005, Ribot, J., *et al.*, 2001, Schoonjans, K., *et al.*, 2000, Wagner, E. M., *et al.*, 2004), ce qui pourrait expliquer l'interaction entre ces paramètres.

L'extrait de plante *Garcinia cambogia* contenant HCA utilisé lors de l'étude de l'inhibition de la lipogenèse est commercialisé librement en tant que complément alimentaire. Certaines conséquences au niveau de l'enrichissement lipidique des tissus périphériques (foie et muscle strié squelettique) observées lors de notre étude laissent un doute sur la sécurité sanitaire de ce produit. En effet, il semblerait que l'extrait de *Garcinia cambogia* soit au cœur d'une polémique qui opposerait les scientifiques affirmant l'effet hépatotoxique (stéatose) et musculaire (gouttelettes lipidiques) de l'extrait (Li, M., *et al.*, 2011, Lobb, A., 2009, Mazzali, G., *et al.*, 2006) et ceux qui tentent de démontrer sa sécurité sanitaire (Soni, M. G., *et al.*, 2004, Stohs, S. J., *et al.*, 2009). Toutefois, plusieurs pays de l'union européenne (la Finlande, l'Angleterre et l'Irlande) ainsi que le Canada ont été informés des effets hépatotoxiques de HCA et auraient retiré du marché les compléments alimentaires à base de cette substance.

Rôle de LSR dans la dyslipidémie

Les souris de génotype LSR^{+/-} âgées ou sous stress lipidique tel qu'un régime hyperlipidique développent une dyslipidémie alors qu'aucune modification n'est observée chez les jeunes souris LSR^{+/-} (Stenger, C., *et al.*, 2010, Yen, F. T., *et al.*, 2008). Cette dyslipidémie se traduit par une augmentation du poids et de la masse grasse, accompagnée par l'augmentation des TG plasmatiques et du contenu lipidique hépatique. D'autre part, le statut des lipases de la paroi endothéliale semble être affecté par ce génotype dont les expressions sont augmentées chez les souris LSR^{+/-} sous régime hyperlipidique, pouvant être une compensation pour palier à la faible expression de LSR hépatique. L'activation de LSR nécessite la présence d'acides gras libres libérés par l'hydrolyse des lipoprotéines grâce à l'action des lipases de la paroi endothéliale au niveau de l'espace de Disse.

La lipogenèse semble aussi être affectée lors de ce génotype menant à la réduction de l'expression d'ACL chez les souris LSR^{+/-} sous régime hyperlipidique. La réduction de la lipogenèse est connue pour inhiber la sécrétion de VLDL (Wang, Q., *et al.*, 2010) et pourrait être la cause de l'enrichissement lipidique hépatique observé chez les souris LSR^{+/-} ayant pourtant une capacité de clairance des lipoprotéines riches en TG plus faible que les souris LSR^{+/+}. Avec ce génotype, nous nous attendions à avoir une quantité de TG hépatiques moins

élevée chez les souris LSR^{+/-}, comparée aux souris LSR^{+/+} et un enrichissement en TG important dans les autres tissus périphériques (principalement le tissu adipeux) approvisionnés par les lipoprotéines riches en TG qui n'auraient pas été captées par LSR. Or, nous avons effectivement observé une masse grasse plus importante chez les souris LSR^{+/-} mais accompagnée d'un enrichissement en TG hépatiques ainsi que de la réduction d'expression d'ACL. L'hypothèse émise lors de cette observation est l'inhibition de la lipogenèse par la leptine (plus abondante car sécrétée en plus grande quantité par le tissu adipeux) induisant la suppression de la sécrétion de VLDL qui aurait eu un effet sur l'enrichissement lipidique hépatique, cependant aucune diminution des TG plasmatiques à jeun (reflétant en partie la circulation des VLDL) n'a été observée. Des études plus approfondies sont nécessaire afin de distinguer la distribution des lipides exogènes et endogènes permettront une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués.

Les matrices de corrélation réalisées sur les souris LSR^{+/+} et les souris LSR^{+/-} sous régime hyperlipidique (chapitre III) ont révélé une perturbation de l'homéostasie lipidique des souris LSR^{+/-}, menant à la perte des interactions importantes entre les paramètres du métabolisme lipidique tels que les récepteurs lipoprotéiques ou les lipases de la paroi endothéliale. De plus, la capacité cognitive a été montrée comme ayant une forte interaction avec le récepteur lipoprotéique LDLr ainsi qu'avec les enzymes lipogéniques chez les souris LSR^{+/+}. Les récepteurs lipoprotéiques LSR et LDLr ont été montrés comme étant intimement liés (Yen, F. T., *et al.*, 2008). De plus, en absence de LDLr, et malgré une affinité plus faible que les lipoprotéines riches en ApoB, LSR participerait à la clairance des particules LDL, ce qui expliquerait les corrélations que nous avons obtenues lors de nos différentes études. Cette interaction nous informe de l'importance de la présence de ces deux récepteurs lipoprotéiques dans le maintien de l'homéostasie lipidique périphérique. La capacité cognitive étant liée au récepteur LDLr, il semblerait qu'une interaction forte soit présente entre la capacité cognitive et les récepteurs lipoprotéiques (qu'il s'agisse de LDLr ou de LSR). Or, toutes ces interactions sont inexistantes chez les souris LSR^{+/-} indiquant la perturbation du métabolisme lipidique lors d'une déficience en LSR chez un modèle murin.

Il a été montré auparavant que l'inactivation de LRP dans le tissu adipeux entraînait une diminution de la clairance des lipides postprandiaux, accompagnée par une diminution de l'adiposité malgré une forte activité de la LpL (Hofmann, S. M., *et al.*, 2007), prévenant ainsi la prise de poids et l'insulinorésistance. Les données ont montré que LRP était nécessaire dans le processus fonctionnel de la LpL car en son absence, l'enzyme LpL présente ne permet pas

de délivrer les lipides au tissu adipeux d'une manière optimale. Cela montre l'interaction qu'il peut exister entre LRP et la LpL dans le tissu adipeux. Il est possible d'imaginer que cette interaction se retrouve dans le foie, ce qui expliquerait les corrélations trouvées entre ces deux paramètres dans notre étude.

Chapitre 8 :

Conclusions et perspectives

Le récepteur lipoprotéique hépatique LSR semble crucial dans le maintien de l'homéostasie lipidique périphérique puisque l'absence totale de ce récepteur est létale. De plus, le génotype hétérozygote entraîne l'apparition d'une dyslipidémie au cours du vieillissement ou sous régime hyperlipidique. Les facteurs alimentaires et endogènes pouvant réguler son expression sont multiples. La leptine, hormone sécrétée par le tissu adipeux et connue pour son action d'hormone de satiété au niveau du système nerveux central module l'expression de LSR par la régulation de la transcription du gène *Lsr*. La leptine étant impliquée dans la régulation de la lipogénèse à travers SREBP-1, il a été montré une interaction importante entre les enzymes lipogéniques et l'expression de LSR et des récepteurs lipoprotéiques en général dans le but d'assurer un équilibre entre la synthèse de lipides endogènes et l'apport alimentaires de lipides exogènes. Pour finir, lors de troubles de l'homéostasie lipidique (régime hyperlipidique ou déficience du récepteur LSR), les souris montrent une diminution de l'expression des enzymes lipogéniques afin d'éviter l'accumulation de lipides plasmatiques et tissulaires. Cette compensation suggère qu'il existe un mécanisme de maintien de l'équilibre entre la lipogénèse (synthèse endogène de lipides) et la lipolyse (utilisation lipidique comme substrat énergétique ou stockage) à travers entre autre une forte interaction entre les enzymes lipogéniques et LSR.

Il serait intéressant de poursuivre ces études sur les perturbations lipidiques périphériques à l'aide des souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-}. Par exemple, un test de sécrétion de VLDL n'a pu être fait lors de cette thèse par manque d'effectif. En effet, les étapes de reproduction de ces animaux étant fastidieuses, il est difficile d'obtenir un groupe d'animaux LSR^{+/-} et LSR^{+/+} contrôle du même âge pouvant faire l'objet d'un régime hyperlipidique. L'analyse de sécrétion de VLDL, passant par l'injection de Tyloxapol[®] en i.v., ne permet pas l'utilisation ultérieure des animaux et donc réduit l'effectif d'animaux pour les analyses biochimiques. Lors de cette thèse, nous avons privilégié l'étude d'un grand nombre d'animaux afin d'obtenir des données statistiquement exploitables dans le but de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans ces troubles du métabolisme lipidique. Il serait intéressant pour l'avenir de renforcer l'hypothèse de l'implication de la leptine dans la suppression de la lipogénèse chez les souris déficientes en LSR en effectuant, sur quelques souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} ou des souris sauvages sous régime hyperlipidique, une analyse de sécrétion de VLDL. De plus, nous avons observé un enrichissement lipidique hépatique malgré une diminution d'expression de LSR

(souris sauvages sous régime hyperlipidique ou souris LSR^{+/-}). Il serait intéressant de pouvoir distinguer la distribution des TG exogènes et endogènes hépatiques afin de déterminer si l'accumulation de TG hépatiques observée est une conséquence de l'apport de TG exogènes important ou de la synthèse de TG endogènes incapables d'être sécrétés sous forme de VLDL.

Il a été démontré durant cette thèse les modifications d'expression de nombreux paramètres tels que les enzymes lipogéniques ou les lipases de la paroi endothéliale. Les facteurs régulant la transcription de ces paramètres sont multiples (CREB, SREBP-1c, PPAR γ , ...) et il est important d'identifier les rôles de chacun de ces facteurs de transcription dans la régulation de ces paramètres. La littérature a déjà établi l'implication de SREBP-1c dans la régulation de la transcription de LDLr (Karasawa, T., *et al.*, 2011) permettant le contrôle du métabolisme du cholestérol. Les expressions de LDLr et LSR étant étroitement liées, les mécanismes contrôlant la transcription de LSR passent-ils aussi par SREBP-1c ? De plus, il a été démontré que PPAR α et SREBP-1c étaient impliqués dans la transcription de l'enzyme LpL (Duncan, J. G., *et al.*, 2010, Ruby, M. A., *et al.*, 2010, Schoonjans, K., *et al.*, 2000). Cela pourrait nous permettre, entre autres, de déterminer si la réduction de l'expression des enzymes lipogéniques est directement reliée à l'augmentation de l'expression de la LpL chez les souris LSR^{+/-} sous régime hyperlipidique, régulée par le même facteur de transcription ou non.

Nous avons étudié l'impact d'une alimentation riche en acides gras ω -3 dont du DHA sur l'expression du récepteur LSR (chapitre III). Notre étude a porté sur des souris âgées, durant 6 mois pour les besoins d'une étude en collaboration avec l'industriel Lesieur. D'une manière intéressante, les souris sous régime enrichi en DHA ont pris moins de poids et de masse grasse durant les 3 premiers mois que les souris sous régime standard, puis ont inversé leur courbe de prise de poids, indiquant une potentielle adaptation et perte des bénéfices métaboliques du DHA après 3 mois de traitement. Tous les tests biochimiques ayant porté sur les structures des souris sacrifiées à 6 mois, il a été très difficile d'interpréter l'effet quasi inexistant du DHA au terme des 6 mois sur les expressions des récepteurs lipoprotéiques, des lipases de la paroi endothéliale et des enzymes lipogéniques. Il est ressorti de ces analyses la possibilité de retarder l'hypercholestérolémie observée lors d'un régime hyperlipidique lorsqu'il est supplémenté avec du DHA. Toutefois, seules des tendances sont ressorties des analyses du régime standard supplémenté avec du DHA. Il aurait été intéressant de recommencer cette expérience durant seulement 3 mois afin d'évaluer les modifications

métaboliques avant une potentielle adaptation au régime mais l'étude ayant été réalisée en collaboration avec un industriel, cela n'a pu être fait durant la période de ma thèse.

Suite à la découverte des troubles cognitifs chez les souris LSR^{+/-} sous régime hyperlipidique (chapitre III) révélant l'implication de LSR dans le processus cognitif, des études du laboratoire ont démontré la présence de LSR au niveau du système nerveux central (données non publiées) et des études sont en cours afin de caractériser son rôle dans le métabolisme lipidique central.

Tous nos résultats montrent que le récepteur LSR est impliqué dans le maintien de l'homéostasie lipidique périphérique. D'autres études plus approfondies sont nécessaires afin de mieux caractériser ce rôle, principalement au niveau de l'interaction avec les lipases de la paroi endothéliale (LpL et HL) et les enzymes lipogéniques (ACL et FAS) concernant les facteurs de transcriptions (SREBP-1c, PPAR γ et PPAR α).

Annexe

Annexe : Analyse statistique HCA

Afin de vérifier l'implication de certains facteurs dans la régulation de LSR, nous avons réalisé une régression multiple puis une régression pas à pas afin de déterminer l'implication de chaque facteur ainsi que leur force d'interaction avec LSR. La régression multiple nous a informé sur la force d'interaction de ces 7 facteurs avec LSR qui représentent 94% de l'interaction avec LSR (tableau 21).

Tableau 21: Régression multiple entre LSR et 7 facteurs

Résumé régression

LSR vs 7 Indépend.

Nombre	11
Manquants	0
R	,940
R carré	,883
R carré ajusté	,610
Ec. type résiduel	,390

Tableau d'ANOVA

LSR vs 7 Indépend.

	DDL	Somme des carrés	Carré moyen	Valeur de F	Valeur de p
Régression	7	3,444	,492	3,231	,1819
Résidu	3	,457	,152		
Total	10	3,901			

Coeff. de régression

LSR vs 7 Indépend.

	Coefficient	Erreur standardisée	Coeff. standardisé	Valeur de t	Valeur de p
Terme cst.	,773	2,595	,773	,298	,7851
TG PP	-3,215	2,087	-,709	-1,540	,2211
TG AJ	-3,852	3,591	-,656	-1,073	,3620
TC PP	5,921	4,674	1,033	1,267	,2946
ACL	7,507E-5	5,785E-5	,749	1,298	,2852
LDLr	,236	1,802	,094	,131	,9041
TG F	-1,607	1,419	-,625	-1,132	,3398
TC F	-4,551	9,628	-,447	-,473	,6687

La régression pas à pas nous indique le facteur le plus impliqué dans l'interaction avec LSR d'une manière hiérarchique (tableau 22).

Tableau 22: Régression multiple pas à pas entre LSR et 7 facteurs**Variables du Modèle****LSR vs 7 Indépend.****Pas : 1**

	Coefficient	Erreur Std	Coeff. Std	F pour sortir
Terme cst.	,355	,343	,355	1,069
LDLr	2,030	,485	,813	17,508

Variables hors Modèle**LSR vs 7 Indépend.****Pas : 1**

	Cor. partielle	F pour entrer
TG PP	,044	,016
TG AJ	-,136	,151
TC PP	,114	,105
ACL	,253	,545
TG F	-,309	,844
TC F	,239	,483

L'interaction entre LSR et LDLr étant tellement forte, elle masque les autres interactions possibles. Nous avons donc recommencé cette régression pas à pas en enlevant ce facteur, gardant à l'esprit l'importance de LDLr dans l'interaction avec LSR (tableau 23).

Tableau 23: Régression multiple pas à pas entre LSR et 6 facteurs**Variables du Modèle****LSR vs 6 Indépend.****Pas : 1**

	Coefficient	Erreur Std	Coeff. Std	F pour sortir
Terme cst.	,026	,540	,026	,002
TC F	7,453	2,315	,732	10,367

Variables hors Modèle**LSR vs 6 Indépend.****Pas : 1**

	Cor. partielle	F pour entrer
TG PP	,085	,059
TG AJ	,244	,506
TC PP	,477	2,351
ACL	,095	,072
TG F	-,284	,705

Après LDLr, le facteur le plus impliqué dans l'interaction avec LSR est le contenu en cholestérol hépatique. Afin de déterminer l'impact des autres facteurs sur LSR, nous avons

réalisé une régression multiple avec les 5 facteurs restants, gardant à l'esprit l'importance de l'implication de LDLr puis du contenu en cholestérol hépatique (tableau 24).

Tableau 24: Régression multiple entre LSR et 5 facteurs

**Coeff. de régression
LSR vs 5 Indépend.**

	Coefficient	Erreur standardisée	Coeff. standardisé	Valeur de t	Valeur de p
Terme cst.	,335	1,638	,335	,205	,8460
TG PP	-3,081	1,424	-,679	-2,163	,0828
TG AJ	-2,607	1,524	-,444	-1,710	,1479
TC PP	5,160	1,175	,900	4,391	,0071
ACL	6,239E-5	2,052E-5	,623	3,040	,0287
TG F	-1,765	,955	-,687	-1,849	,1238

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. **Abeywardena, M. Y., and Patten, G. S.** 2011. Role of omega3 Longchain Polyunsaturated Fatty Acids in Reducing Cardio-Metabolic Risk Factors. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets* **11**:232-246.
2. **Abumrad, N. A., el-Maghrabi, M. R., Amri, E. Z., Lopez, E., and Grimaldi, P. A.** 1993. Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *The Journal of biological chemistry* **268**:17665-17668.
3. **Ahima, R. S., Prabakaran, D., Mantzoros, C., Qu, D., Lowell, B., Maratos-Flier, E., and Flier, J. S.** 1996. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* **382**:250-252.
4. **Alberti, K. G., and Zimmet, P. Z.** 1998. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* **15**:539-553.
5. **Albrink, M. J., and Meigs, J. W.** 1964. INTERRELATIONSHIP BETWEEN SKINFOLD THICKNESS, SERUM LIPIDS AND BLOOD SUGAR IN NORMAL MEN. *The American journal of clinical nutrition* **15**:255-261.
6. **Amran, A. A., Zaiton, Z., Faizah, O., and Morat, P.** 2009. Effects of *Garcinia atroviridis* on serum profiles and atherosclerotic lesions in the aorta of guinea pigs fed a high cholesterol diet. *Singapore medical journal* **50**:295-299.
7. **André-Fouët, X., Ben lian, P., Baereziat, G., Bernard, S., and Farnier, M.** 2004. Métabolisme des lipides dans l'organisme, p. 30-56. *In Elsevier (ed.), Dyslipidémie et athérogenèse.*
8. **Arner, P.** 1988. Control of lipolysis and its relevance to development of obesity in man. *Diabetes/metabolism reviews* **4**:507-515.
9. **Bai, Y., Zhang, S., Kim, K. S., Lee, J. K., and Kim, K. H.** 1996. Obese gene expression alters the ability of 30A5 preadipocytes to respond to lipogenic hormones. *The Journal of biological chemistry* **271**:13939-13942.
10. **Baker, N., Learn, D. B., and Bruckdorfer, K. R.** 1978. Re-evaluation of lipogenesis from dietary glucose carbon in liver and carcass of mice. *Journal of lipid research* **19**:879-893.
11. **Balkau, B., and Charles, M. A.** 1999. Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* **16**:442-443.
12. **Banks, A. S., Davis, S. M., Bates, S. H., and Myers, M. G., Jr.** 2000. Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *The Journal of biological chemistry* **275**:14563-14572.
13. **Banks, W. A., Kastin, A. J., Huang, W., Jaspan, J. B., and Maness, L. M.** 1996. Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides* **17**:305-311.
14. **Bansal, S., Buring, J. E., Rifai, N., Mora, S., Sacks, F. M., and Ridker, P. M.** 2007. Fasting compared with nonfasting triglycerides and risk of cardiovascular events in women. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **298**:309-316.

15. **Bastard, J. P., Jardel, C., Bruckert, E., Blondy, P., Capeau, J., Laville, M., Vidal, H., and Hainque, B.** 2000. Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **85**:3338-3342.
16. **Bastard, J. P., Maachi, M., Van Nhieu, J. T., Jardel, C., Bruckert, E., Grimaldi, A., Robert, J. J., Capeau, J., and Hainque, B.** 2002. Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **87**:2084-2089.
17. **Bates, S. H., and Myers, M. G., Jr.** 2003. The role of leptin receptor signaling in feeding and neuroendocrine function. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **14**:447-452.
18. **Baumann, H., Morella, K. K., White, D. W., Dembski, M., Bailon, P. S., Kim, H., Lai, C. F., and Tartaglia, L. A.** 1996. The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**:8374-8378.
19. **Beffert, U., and Poirier, J.** 1996. Apolipoprotein E, plaques, tangles and cholinergic dysfunction in Alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* **777**:166-174.
20. **Bernotiene, E., Palmer, G., and Gabay, C.** 2006. The role of leptin in innate and adaptive immune responses. *Arthritis research & therapy* **8**:217.
21. **Bihain, B. E., and Yen, F. T.** 1992. Free fatty acids activate a high-affinity saturable pathway for degradation of low-density lipoproteins in fibroblasts from a subject homozygous for familial hypercholesterolemia. *Biochemistry* **31**:4628-4636.
22. **Bjorbaek, C., Elmquist, J. K., Michl, P., Ahima, R. S., van Bueren, A., McCall, A. L., and Flier, J. S.** 1998. Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels. *Endocrinology* **139**:3485-3491.
23. **Bjorbaek, C., and Kahn, B. B.** 2004. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent progress in hormone research* **59**:305-331.
24. **Bjorbaek, C., Uotani, S., da Silva, B., and Flier, J. S.** 1997. Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *The Journal of biological chemistry* **272**:32686-32695.
25. **Boden, G., Chen, X., Mozzoli, M., and Ryan, I.** 1996. Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **81**:3419-3423.
26. **Bonin-Guillaume, S., Herrmann, F. R., Boillat, D., Szanto, I., Michel, J. P., Rohner-Jeanrenaud, F., and Vischer, U. M.** 2006. Insulinemia and leptinemia in geriatric patients: markers of the metabolic syndrome or of undernutrition? *Diabetes & metabolism* **32**:236-243.
27. **Boquist, S., Ruotolo, G., Tang, R., Bjorkegren, J., Bond, M. G., de Faire, U., Karpe, F., and Hamsten, A.** 1999. Alimentary lipemia, postprandial triglyceride-rich lipoproteins, and common carotid intima-media thickness in healthy, middle-aged men. *Circulation* **100**:723-728.
28. **Boulogne, A., and Vantyghem, M. C.** 2004. [Insulin resistance physiopathology]. *Presse medicale (Paris, France : 1983)* **33**:666-672, 681.
29. **Boulware, S. D., Tamborlane, W. V., Matthews, L. S., and Sherwin, R. S.** 1992. Diverse effects of insulin-like growth factor I on glucose, lipid, and amino acid metabolism. *The American journal of physiology* **262**:E130-133.
30. **Brayne, C., Gill, C., Huppert, F. A., Barkley, C., Gehlhaar, E., Girling, D. M., O'Connor, D. W., and Paykel, E. S.** 1998. Vascular risks and incident dementia:

- results from a cohort study of the very old. *Dementia and geriatric cognitive disorders* **9**:175-180.
31. **Briggs, M. R., Yokoyama, C., Wang, X., Brown, M. S., and Goldstein, J. L.** 1993. Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. I. Identification of the protein and delineation of its target nucleotide sequence. *The Journal of biological chemistry* **268**:14490-14496.
32. **Bucht, G., Adolfsson, R., Lithner, F., and Winblad, B.** 1983. Changes in blood glucose and insulin secretion in patients with senile dementia of Alzheimer type. *Acta medica Scandinavica* **213**:387-392.
33. **Burns, T. W., Terry, B. E., Langley, P. E., and Robison, G. A.** 1979. Insulin inhibition of lipolysis of human adipocytes: the role of cyclic adenosine monophosphate. *Diabetes* **28**:957-961.
34. **Calop, J., Limat, S., and Fernandez, C.** 2008. Traitement des dyslipidémies, p. 444-462. In Elsevier (ed.), *Pharmacie clinique et thérapeutique*, 3 ed. Masson.
35. **Campfield, L. A., Smith, F. J., and Burn, P.** 1996. The OB protein (leptin) pathway-a link between adipose tissue mass and central neural networks. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme* **28**:619-632.
36. **Campfield, L. A., Smith, F. J., Guisez, Y., Devos, R., and Burn, P.** 1995. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science (New York, N.Y.)* **269**:546-549.
37. **Canavan, B., Salem, R. O., Schurgin, S., Koutkia, P., Lipinska, I., Laposata, M., and Grinspoon, S.** 2005. Effects of physiological leptin administration on markers of inflammation, platelet activation, and platelet aggregation during caloric deprivation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **90**:5779-5785.
38. **Carlson, M. G., Snead, W. L., and Campbell, P. J.** 1993. Regulation of free fatty acid metabolism by glucagon. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **77**:11-15.
39. **Caro, J. F., Sinha, M. K., Kolaczynski, J. W., Zhang, P. L., and Considine, R. V.** 1996. Leptin: the tale of an obesity gene. *Diabetes* **45**:1455-1462.
40. **Catalano, P. M., Nizielski, S. E., Shao, J., Preston, L., Qiao, L., and Friedman, J. E.** 2002. Downregulated IRS-1 and PPARgamma in obese women with gestational diabetes: relationship to FFA during pregnancy. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **282**:E522-533.
41. **Chan, J. L., Heist, K., DePaoli, A. M., Veldhuis, J. D., and Mantzoros, C. S.** 2003. The role of falling leptin levels in the neuroendocrine and metabolic adaptation to short-term starvation in healthy men. *The Journal of clinical investigation* **111**:1409-1421.
42. **Cheema-Dhadli, S., Halperin, M. L., and Leznoff, C. C.** 1973. Inhibition of enzymes which interact with citrate by (--)hydroxycitrate and 1,2,3-tricarboxybenzene. *European journal of biochemistry / FEBS* **38**:98-102.
43. **Chen, G. C., and Kane, J. P.** 1979. Secondary structure in very low density and intermediate density lipoproteins of human serum. *Journal of lipid research* **20**:481-488.
44. **Chen, S. C., Kochan, J. P., Campfield, L. A., Burn, P., and Smeyne, R. J.** 1999. Splice variants of the OB receptor gene are differentially expressed in brain and peripheral tissues of mice. *Journal of receptor and signal transduction research* **19**:245-266.
45. **Chua, S. C., Jr., Koutras, I. K., Han, L., Liu, S. M., Kay, J., Young, S. J., Chung, W. K., and Leibel, R. L.** 1997. Fine structure of the murine leptin receptor gene:

- splice site suppression is required to form two alternatively spliced transcripts. *Genomics* **45**:264-270.
46. **Clarke, S. D., Romsos, D. R., and Leveille, G. A.** 1977. Influence of dietary fatty acids on liver and adipose tissue lipogenesis and on liver metabolites in meal-fed rats. *The Journal of nutrition* **107**:1277-1287.
47. **Clement, K., Vaisse, C., Lahlou, N., Cabrol, S., Pelloux, V., Cassuto, D., Gormelen, M., Dina, C., Chambaz, J., Lacorte, J. M., Basdevant, A., Bougneres, P., Lebouc, Y., Froguel, P., and Guy-Grand, B.** 1998. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* **392**:398-401.
48. **Considine, R. V., Sinha, M. K., Heiman, M. L., Kriauciunas, A., Stephens, T. W., Nyce, M. R., Ohannesian, J. P., Marco, C. C., McKee, L. J., Bauer, T. L., and et al.** 1996. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *The New England journal of medicine* **334**:292-295.
49. **Coppack, S. W., Frayn, K. N., Humphreys, S. M., Dhar, H., and Hockaday, T. D.** 1989. Effects of insulin on human adipose tissue metabolism in vivo. *Clinical science (London, England : 1979)* **77**:663-670.
50. **Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. W., Roses, A. D., Haines, J. L., and Pericak-Vance, M. A.** 1993. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science (New York, N.Y.)* **261**:921-923.
51. **Couillard, C., Bergeron, N., Prud'homme, D., Bergeron, J., Tremblay, A., Bouchard, C., Mauriege, P., and Despres, J. P.** 1998. Postprandial triglyceride response in visceral obesity in men. *Diabetes* **47**:953-960.
52. **Craft, S., Zallen, G., and Baker, L. D.** 1992. Glucose and memory in mild senile dementia of the Alzheimer type. *Journal of clinical and experimental neuropsychology* **14**:253-267.
53. **Cummings, J. L.** 2004. Alzheimer's disease. *The New England journal of medicine* **351**:56-67.
54. **Curb, J. D., Rodriguez, B. L., Abbott, R. D., Petrovitch, H., Ross, G. W., Masaki, K. H., Foley, D., Blanchette, P. L., Harris, T., Chen, R., and White, L. R.** 1999. Longitudinal association of vascular and Alzheimer's dementias, diabetes, and glucose tolerance. *Neurology* **52**:971-975.
55. **Cusi, K., Maezono, K., Osman, A., Pendergrass, M., Patti, M. E., Pratipanawatr, T., DeFronzo, R. A., Kahn, C. R., and Mandarino, L. J.** 2000. Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *The Journal of clinical investigation* **105**:311-320.
56. **Cusin, I., Zakrzewska, K. E., Boss, O., Muzzin, P., Giacobino, J. P., Ricquier, D., Jeanrenaud, B., and Rohner-Jeanrenaud, F.** 1998. Chronic central leptin infusion enhances insulin-stimulated glucose metabolism and favors the expression of uncoupling proteins. *Diabetes* **47**:1014-1019.
57. **da Silva, B. A., Bjorbaek, C., Uotani, S., and Flier, J. S.** 1998. Functional properties of leptin receptor isoforms containing the gln-->pro extracellular domain mutation of the fatty rat. *Endocrinology* **139**:3681-3690.
58. **Dallinga-Thie, G. M., Franssen, R., Mooij, H. L., Visser, M. E., Hassing, H. C., Peelman, F., Kastelein, J. J., Peterfy, M., and Nieuwdorp, M.** 2010. The metabolism of triglyceride-rich lipoproteins revisited: new players, new insight. *Atherosclerosis* **211**:1-8.
59. **de Winther, M. P., and Hofker, M. H.** 2000. Scavenging new insights into atherogenesis. *The Journal of clinical investigation* **105**:1039-1041.

60. **Degerman, E., Belfrage, P., and Manganiello, V. C.** 1997. Structure, localization, and regulation of cGMP-inhibited phosphodiesterase (PDE3). *The Journal of biological chemistry* **272**:6823-6826.
61. **Dentin, R., Girard, J., and Postic, C.** 2005. Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver. *Biochimie* **87**:81-86.
62. **Dietrich, M. F., van der Weyden, L., Prosser, H. M., Bradley, A., Herz, J., and Adams, D. J.** 2010. Ectodomains of the LDL receptor-related proteins LRPb and LRP4 have anchorage independent functions in vivo. *PloS one* **5**:e9960.
63. **Downs, B. W., Bagchi, M., Subbaraju, G. V., Shara, M. A., Preuss, H. G., and Bagchi, D.** 2005. Bioefficacy of a novel calcium-potassium salt of (-)-hydroxycitric acid. *Mutation research* **579**:149-162.
64. **Dridi, S., Buyse, J., Decuypere, E., and Taouis, M.** 2005. Potential role of leptin in increase of fatty acid synthase gene expression in chicken liver. *Domestic animal endocrinology* **29**:646-660.
65. **Duncan, J. G., Bharadwaj, K. G., Fong, J. L., Mitra, R., Sambandam, N., Courtois, M. R., Lavine, K. J., Goldberg, I. J., and Kelly, D. P.** 2010. Rescue of cardiomyopathy in peroxisome proliferator-activated receptor-alpha transgenic mice by deletion of lipoprotein lipase identifies sources of cardiac lipids and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators. *Circulation* **121**:426-435.
66. **Eaton, R. P., and Kipnis, D. M.** 1969. Radioimmunoassay of beta lipoprotein-protein of rat serum. *The Journal of clinical investigation* **48**:1387-1396.
67. **Ebara, T., Ramakrishnan, R., Steiner, G., and Shachter, N. S.** 1997. Chylomicronemia due to apolipoprotein CIII overexpression in apolipoprotein E-null mice. Apolipoprotein CIII-induced hypertriglyceridemia is not mediated by effects on apolipoprotein E. *The Journal of clinical investigation* **99**:2672-2681.
68. **Einhorn, D., Reaven, G. M., Cobin, R. H., Ford, E., Ganda, O. P., Handelsman, Y., Hellman, R., Jellinger, P. S., Kendall, D., Krauss, R. M., Neufeld, N. D., Petak, S. M., Rodbard, H. W., Seibel, J. A., Smith, D. A., and Wilson, P. W.** 2003. American College of Endocrinology position statement on the insulin resistance syndrome. *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists* **9**:237-252.
69. **Elmqvist, J. K., Maratos-Flier, E., Saper, C. B., and Flier, J. S.** 1998. Unraveling the central nervous system pathways underlying responses to leptin. *Nature neuroscience* **1**:445-450.
70. **Enocksson, S., Shimizu, M., Lonnqvist, F., Nordenstrom, J., and Arner, P.** 1995. Demonstration of an in vivo functional beta 3-adrenoceptor in man. *The Journal of clinical investigation* **95**:2239-2245.
71. **Etherton, T. D.** 2000. The biology of somatotropin in adipose tissue growth and nutrient partitioning. *The Journal of nutrition* **130**:2623-2625.
72. **Farooqi, I. S., Bullmore, E., Keogh, J., Gillard, J., O'Rahilly, S., and Fletcher, P. C.** 2007. Leptin regulates striatal regions and human eating behavior. *Science (New York, N.Y.)* **317**:1355.
73. **Farooqi, I. S., Jebb, S. A., Langmack, G., Lawrence, E., Cheetham, C. H., Prentice, A. M., Hughes, I. A., McCamish, M. A., and O'Rahilly, S.** 1999. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *The New England journal of medicine* **341**:879-884.
74. **Farooqi, I. S., Matarese, G., Lord, G. M., Keogh, J. M., Lawrence, E., Agwu, C., Sanna, V., Jebb, S. A., Perna, F., Fontana, S., Lechler, R. I., DePaoli, A. M., and**

- O'Rahilly, S.** 2002. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *The Journal of clinical investigation* **110**:1093-1103.
75. **Farooqi, I. S., Wangensteen, T., Collins, S., Kimber, W., Matarese, G., Keogh, J. M., Lank, E., Bottomley, B., Lopez-Fernandez, J., Ferraz-Amaro, I., Dattani, M. T., Ercan, O., Myhre, A. G., Retterstol, L., Stanhope, R., Edge, J. A., McKenzie, S., Lessan, N., Ghodsi, M., De Rosa, V., Perna, F., Fontana, S., Barroso, I., Undlien, D. E., and O'Rahilly, S.** 2007. Clinical and molecular genetic spectrum of congenital deficiency of the leptin receptor. *The New England journal of medicine* **356**:237-247.
76. **Fehmman, H. C., Peiser, C., Bode, H. P., Stamm, M., Staats, P., Hedetoft, C., Lang, R. E., and Goke, B.** 1997. Leptin: a potent inhibitor of insulin secretion. *Peptides* **18**:1267-1273.
77. **Fei, H., Okano, H. J., Li, C., Lee, G. H., Zhao, C., Darnell, R., and Friedman, J. M.** 1997. Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**:7001-7005.
78. **Feingold, K. R., Doerrler, W., Dinarello, C. A., Fiers, W., and Grunfeld, C.** 1992. Stimulation of lipolysis in cultured fat cells by tumor necrosis factor, interleukin-1, and the interferons is blocked by inhibition of prostaglandin synthesis. *Endocrinology* **130**:10-16.
79. **Fisman, M., Gordon, B., Feleki, V., Helmes, E., McDonald, T., and Dupre, J.** 1988. Metabolic changes in Alzheimer's disease. *Journal of the American Geriatrics Society* **36**:298-300.
80. **Flier, J. S.** 1997. Leptin expression and action: new experimental paradigms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**:4242-4245.
81. **Florent-Bechard, S., Desbene, C., Garcia, P., Allouche, A., Youssef, I., Escanye, M. C., Koziel, V., Hanse, M., Malaplate-Armand, C., Stenger, C., Kriem, B., Yen-Potin, F. T., Olivier, J. L., Pillot, T., and Oster, T.** 2009. The essential role of lipids in Alzheimer's disease. *Biochimie* **91**:804-809.
82. **Foretz, M., Pacot, C., Dugail, I., Lemarchand, P., Guichard, C., Le Liepvre, X., Berthelie-Lubrano, C., Spiegelman, B., Kim, J. B., Ferre, P., and Foulle, F.** 1999. ADD1/SREBP-1c is required in the activation of hepatic lipogenic gene expression by glucose. *Molecular and cellular biology* **19**:3760-3768.
83. **Friedman, J. M.** 2011. Leptin and the regulation of body weigh. *The Keio journal of medicine* **60**:1-9.
84. **Friedman, J. M., and Halaas, J. L.** 1998. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* **395**:763-770.
85. **Fruhbeck, G., Gomez-Ambrosi, J., and Martinez, J. A.** 1999. Pre- and postprandial expression of the leptin receptor splice variants OB-Ra and OB-Rb in murine peripheral tissues. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* **48**:189-195.
86. **Fujisawa, Y., Sasaki, K., and Akiyama, K.** 1991. Increased insulin levels after OGTT load in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with dementia of Alzheimer type. *Biological psychiatry* **30**:1219-1228.
87. **Garber, A. J., Menzel, P. H., Boden, G., and Owen, O. E.** 1974. Hepatic ketogenesis and gluconeogenesis in humans. *The Journal of clinical investigation* **54**:981-989.

88. **Gavrilova, O., Marcus-Samuels, B., Leon, L. R., Vinson, C., and Reitman, M. L.** 2000. Leptin and diabetes in lipotrophic mice. *Nature* **403**:850; discussion 850-851.
89. **Ge, H., Huang, L., Pourbahrami, T., and Li, C.** 2002. Generation of soluble leptin receptor by ectodomain shedding of membrane-spanning receptors in vitro and in vivo. *The Journal of biological chemistry* **277**:45898-45903.
90. **Gentile, M., Panico, S., Jossa, F., Mattiello, A., Ubaldi, S., Marotta, G., Pauciullo, P., and Rubba, P.** 2008. Small dense LDL particles and metabolic syndrome in a sample of middle-aged women. Findings from Progetto Atena. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **388**:179-183.
91. **Ghilardi, N., and Skoda, R. C.** 1997. The leptin receptor activates janus kinase 2 and signals for proliferation in a factor-dependent cell line. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* **11**:393-399.
92. **Ginsberg, H. N.** 2000. Insulin resistance and cardiovascular disease. *The Journal of clinical investigation* **106**:453-458.
93. **Ginsberg, H. N., Zhang, Y. L., and Hernandez-Ono, A.** 2006. Metabolic syndrome: focus on dyslipidemia. *Obesity (Silver Spring, Md.)* **14 Suppl 1**:41S-49S.
94. **Gofman, J. W., Lindgren, F. T., and Elliott, H.** 1949. Ultracentrifugal studies of lipoproteins of human serum. *The Journal of biological chemistry* **179**:973-979.
95. **Goldberg, I. J.** 2001. Clinical review 124: Diabetic dyslipidemia: causes and consequences. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **86**:965-971.
96. **Golden, P. L., Maccagnan, T. J., and Pardridge, W. M.** 1997. Human blood-brain barrier leptin receptor. Binding and endocytosis in isolated human brain microvessels. *The Journal of clinical investigation* **99**:14-18.
97. **Goldstein, J. L., and Brown, M. S.** 2009. The LDL receptor. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **29**:431-438.
98. **Gorska, E., Popko, K., Stelmazczyk-Emmel, A., Ciepiela, O., Kucharska, A., and Wasik, M.** 2010. Leptin receptors. *European journal of medical research* **15 Suppl 2**:50-54.
99. **Green, P. H., Tall, A. R., and Glickman, R. M.** 1978. Rat intestine secretes discoid high density lipoprotein. *The Journal of clinical investigation* **61**:528-534.
100. **Greenberg, A. S., Shen, W. J., Muliro, K., Patel, S., Souza, S. C., Roth, R. A., and Kraemer, F. B.** 2001. Stimulation of lipolysis and hormone-sensitive lipase via the extracellular signal-regulated kinase pathway. *The Journal of biological chemistry* **276**:45456-45461.
101. **Groot, P. H., van Stiphout, W. A., Krauss, X. H., Jansen, H., van Tol, A., van Ramshorst, E., Chin-On, S., Hofman, A., Cresswell, S. R., and Havekes, L.** 1991. Postprandial lipoprotein metabolism in normolipidemic men with and without coronary artery disease. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology / American Heart Association* **11**:653-662.
102. **Guerci, B., Verges, B., Durlach, V., Hadjadj, S., Drouin, P., and Paul, J. L.** 2000. Relationship between altered postprandial lipemia and insulin resistance in normolipidemic and normogluucose tolerant obese patients. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* **24**:468-478.
103. **Haffner, S. M., Alexander, C. M., Cook, T. J., Boccuzzi, S. J., Musliner, T. A., Pedersen, T. R., Kjekshus, J., and Pyorala, K.** 1999. Reduced coronary events in simvastatin-treated patients with coronary heart disease and diabetes or impaired fasting glucose levels: subgroup analyses in the Scandinavian Simvastatin Survival Study. *Archives of internal medicine* **159**:2661-2667.

104. **Halaas, J. L., Boozer, C., Blair-West, J., Fidahusein, N., Denton, D. A., and Friedman, J. M.** 1997. Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**:8878-8883.
105. **Hansen, O., Johansson, B. W., and Nilsson-Ehle, P.** 1990. Metabolic, electrocardiographic, and hemodynamic responses to increased circulating adrenaline: effects of selective and nonselective beta adrenoceptor blockade. *Angiology* **41**:175-188.
106. **Haque, M. S., Minokoshi, Y., Hamai, M., Iwai, M., Horiuchi, M., and Shimazu, T.** 1999. Role of the sympathetic nervous system and insulin in enhancing glucose uptake in peripheral tissues after intrahypothalamic injection of leptin in rats. *Diabetes* **48**:1706-1712.
107. **Harris, R. B., Zhou, J., Youngblood, B. D., Rybkin, II, Smagin, G. N., and Ryan, D. H.** 1998. Effect of repeated stress on body weight and body composition of rats fed low- and high-fat diets. *The American journal of physiology* **275**:R1928-1938.
108. **Hayamizu, K., Hirakawa, H., Oikawa, D., Nakanishi, T., Takagi, T., Tachibana, T., and Furuse, M.** 2003. Effect of *Garcinia cambogia* extract on serum leptin and insulin in mice. *Fitoterapia* **74**:267-273.
109. **Haynes, W. G., Morgan, D. A., Walsh, S. A., Mark, A. L., and Sivitz, W. I.** 1997. Receptor-mediated regional sympathetic nerve activation by leptin. *The Journal of clinical investigation* **100**:270-278.
110. **Heitner, J., and Dickson, D.** 1997. Diabetics do not have increased Alzheimer-type pathology compared with age-matched control subjects. A retrospective postmortem immunocytochemical and histofluorescent study. *Neurology* **49**:1306-1311.
111. **Hermann, M., and Sloniewski, P.** 2000. The new proposed magnetic resonance areas of the cavernous sinus and their relation to the neurosurgical triangles. *Skull base surgery* **10**:119-123.
112. **Herz, J., Goldstein, J. L., Strickland, D. K., Ho, Y. K., and Brown, M. S.** 1991. 39-kDa protein modulates binding of ligands to low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor. *The Journal of biological chemistry* **266**:21232-21238.
113. **Heymsfield, S. B., Allison, D. B., Vasselli, J. R., Pietrobelli, A., Greenfield, D., and Nunez, C.** 1998. *Garcinia cambogia* (hydroxycitric acid) as a potential antiobesity agent: a randomized controlled trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **280**:1596-1600.
114. **Higashi, Y., Sasaki, S., Nakagawa, K., Matsuura, H., Chayama, K., and Oshima, T.** 2001. Effect of obesity on endothelium-dependent, nitric oxide-mediated vasodilation in normotensive individuals and patients with essential hypertension. *American journal of hypertension* **14**:1038-1045.
115. **Hileman, S. M., Tornoe, J., Flier, J. S., and Bjorbaek, C.** 2000. Transcellular transport of leptin by the short leptin receptor isoform ObRa in Madin-Darby Canine Kidney cells. *Endocrinology* **141**:1955-1961.
116. **Hillgartner, F. B., Salati, L. M., and Goodridge, A. G.** 1995. Physiological and molecular mechanisms involved in nutritional regulation of fatty acid synthesis. *Physiological reviews* **75**:47-76.
117. **Hofmann, S. M., Zhou, L., Perez-Tilve, D., Greer, T., Grant, E., Wancata, L., Thomas, A., Pfluger, P. T., Basford, J. E., Gilham, D., Herz, J., Tschop, M. H., and Hui, D. Y.** 2007. Adipocyte LDL receptor-related protein-1 expression modulates postprandial lipid transport and glucose homeostasis in mice. *The Journal of clinical investigation* **117**:3271-3282.

118. **Hoggard, N., Hunter, L., Duncan, J. S., Williams, L. M., Trayhurn, P., and Mercer, J. G.** 1997. Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**:11073-11078.
119. **Horton, J. D., Goldstein, J. L., and Brown, M. S.** 2002. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *The Journal of clinical investigation* **109**:1125-1131.
120. **Horton, J. D., and Shimomura, I.** 1999. Sterol regulatory element-binding proteins: activators of cholesterol and fatty acid biosynthesis. *Current opinion in lipidology* **10**:143-150.
121. **Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S., and Spiegelman, B. M.** 1993. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science (New York, N.Y.)* **259**:87-91.
122. **Houseknecht, K. L., and Portocarrero, C. P.** 1998. Leptin and its receptors: regulators of whole-body energy homeostasis. *Domestic animal endocrinology* **15**:457-475.
123. **Hovingh, G. K., Van Wijland, M. J., Brownlie, A., Bisoendial, R. J., Hayden, M. R., Kastelein, J. J., and Groen, A. K.** 2003. The role of the ABCA1 transporter and cholesterol efflux in familial hypoalphalipoproteinemia. *Journal of lipid research* **44**:1251-1255.
124. **Howard, J. K., and Flier, J. S.** 2006. Attenuation of leptin and insulin signaling by SOCS proteins. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **17**:365-371.
125. **Iqbal, J., Rudel, L. L., and Hussain, M. M.** 2008. Microsomal triglyceride transfer protein enhances cellular cholesteryl esterification by relieving product inhibition. *The Journal of biological chemistry* **283**:19967-19980.
126. **Isola, L. M., Zhou, S. L., Kiang, C. L., Stump, D. D., Bradbury, M. W., and Berk, P. D.** 1995. 3T3 fibroblasts transfected with a cDNA for mitochondrial aspartate aminotransferase express plasma membrane fatty acid-binding protein and saturable fatty acid uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**:9866-9870.
127. **Jiang, L., Wang, Q., Yu, Y., Zhao, F., Huang, P., Zeng, R., Qi, R. Z., Li, W., and Liu, Y.** 2009. Leptin contributes to the adaptive responses of mice to high-fat diet intake through suppressing the lipogenic pathway. *PloS one* **4**:e6884.
128. **Jump, D. B., Clarke, S. D., Thelen, A., and Liimatta, M.** 1994. Coordinate regulation of glycolytic and lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids. *Journal of lipid research* **35**:1076-1084.
129. **Kahn, B. B., Alquier, T., Carling, D., and Hardie, D. G.** 2005. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell metabolism* **1**:15-25.
130. **Kakuma, T., Wang, Z. W., Pan, W., Unger, R. H., and Zhou, Y. T.** 2000. Role of leptin in peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 expression. *Endocrinology* **141**:4576-4582.
131. **Kalmijn, S., Foley, D., White, L., Burchfiel, C. M., Curb, J. D., Petrovitch, H., Ross, G. W., Havlik, R. J., and Launer, L. J.** 2000. Metabolic cardiovascular syndrome and risk of dementia in Japanese-American elderly men. The Honolulu-Asia aging study. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **20**:2255-2260.
132. **Karasawa, T., Takahashi, A., Saito, R., Sekiya, M., Igarashi, M., Iwasaki, H., Miyahara, S., Koyasu, S., Nakagawa, Y., Ishii, K., Matsuzaka, T., Kobayashi, K., Yahagi, N., Takekoshi, K., Sone, H., Yatoh, S., Suzuki, H., Yamada, N., and Shimano, H.** 2011. Sterol regulatory element-binding protein-1 determines plasma

- remnant lipoproteins and accelerates atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **31**:1788-1795.
133. **Karlsson, M., Tornqvist, H., and Holm, C.** 2000. Expression, purification, and characterization of histidine-tagged mouse monoglyceride lipase from baculovirus-infected insect cells. *Protein expression and purification* **18**:286-292.
134. **Kawamoto, S., Nozaki, C., Tanaka, A., and Fukui, S.** 1978. Fatty acid beta-oxidation system in microbodies of n-alkane-grown *Candida tropicalis*. *European journal of biochemistry / FEBS* **83**:609-613.
135. **Keen, H., Thomas, B. J., Jarrett, R. J., and Fuller, J. H.** 1979. Nutrient intake, adiposity, and diabetes. *British medical journal* **1**:655-658.
136. **Kelesidis, T., Kelesidis, I., Chou, S., and Mantzoros, C. S.** 2010. Narrative review: the role of leptin in human physiology: emerging clinical applications. *Annals of internal medicine* **152**:93-100.
137. **Kelley, D. E., and Mandarino, L. J.** 2000. Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination. *Diabetes* **49**:677-683.
138. **Kersten, S., Seydoux, J., Peters, J. M., Gonzalez, F. J., Desvergne, B., and Wahli, W.** 1999. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *The Journal of clinical investigation* **103**:1489-1498.
139. **Kielar, D., Clark, J. S., Ciechanowicz, A., Kurzawski, G., Sulikowski, T., and Naruszewicz, M.** 1998. Leptin receptor isoforms expressed in human adipose tissue. *Metabolism: clinical and experimental* **47**:844-847.
140. **Kilander, L., Boberg, M., and Lithell, H.** 1993. Peripheral glucose metabolism and insulin sensitivity in Alzheimer's disease. *Acta neurologica Scandinavica* **87**:294-298.
141. **Kim, H. J., Takahashi, M., and Ezaki, O.** 1999. Fish oil feeding decreases mature sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1) by down-regulation of SREBP-1c mRNA in mouse liver. A possible mechanism for down-regulation of lipogenic enzyme mRNAs. *The Journal of biological chemistry* **274**:25892-25898.
142. **Kim, J. B., Sarraf, P., Wright, M., Yao, K. M., Mueller, E., Solanes, G., Lowell, B. B., and Spiegelman, B. M.** 1998. Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. *The Journal of clinical investigation* **101**:1-9.
143. **Kim, S. J., Nian, C., and McIntosh, C. H.** 2010. GIP increases human adipocyte LPL expression through CREB and TORC2-mediated trans-activation of the LPL gene. *Journal of lipid research* **51**:3145-3157.
144. **Koga, S., Horwitz, D. L., and Scanu, A. M.** 1969. Isolation and properties of lipoproteins from normal rat serum. *Journal of lipid research* **10**:577-588.
145. **Kowal, R. C., Herz, J., Goldstein, J. L., Esser, V., and Brown, M. S.** 1989. Low density lipoprotein receptor-related protein mediates uptake of cholesteryl esters derived from apoprotein E-enriched lipoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**:5810-5814.
146. **Kroder, G., Bossenmaier, B., Kellerer, M., Capp, E., Stoyanov, B., Muhlhofer, A., Berti, L., Horikoshi, H., Ullrich, A., and Haring, H.** 1996. Tumor necrosis factor-alpha- and hyperglycemia-induced insulin resistance. Evidence for different mechanisms and different effects on insulin signaling. *The Journal of clinical investigation* **97**:1471-1477.
147. **Krotkiewski, M., Bjorntorp, P., Sjostrom, L., and Smith, U.** 1983. Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution. *The Journal of clinical investigation* **72**:1150-1162.

148. **Kuczmarski, R. J., Carroll, M. D., Flegal, K. M., and Troiano, R. P.** 1997. Varying body mass index cutoff points to describe overweight prevalence among U.S. adults: NHANES III (1988 to 1994). *Obesity research* **5**:542-548.
149. **Lafontan, M., and Berlan, M.** 1993. Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *Journal of lipid research* **34**:1057-1091.
150. **Landin, K., Blennow, K., Wallin, A., and Gottfries, C. G.** 1993. Low blood pressure and blood glucose levels in Alzheimer's disease. Evidence for a hypometabolic disorder? *Journal of internal medicine* **233**:357-363.
151. **Large, V., Peroni, O., Letexier, D., Ray, H., and Beylot, M.** 2004. Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes & metabolism* **30**:294-309.
152. **Le Roith, D., and Zick, Y.** 2001. Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. *Diabetes care* **24**:588-597.
153. **Lee, G. H., Proenca, R., Montez, J. M., Carroll, K. M., Darvishzadeh, J. G., Lee, J. I., and Friedman, J. M.** 1996. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* **379**:632-635.
154. **Lee, S. J., Grosskopf, I., Choi, S. Y., and Cooper, A. D.** 2004. Chylomicron remnant uptake in the livers of mice expressing human apolipoproteins E3, E2 (Arg158-->Cys), and E3-Leiden. *Journal of lipid research* **45**:2199-2210.
155. **Lehrke, M., Reilly, M. P., Millington, S. C., Iqbal, N., Rader, D. J., and Lazar, M. A.** 2004. An inflammatory cascade leading to hyperresistinemia in humans. *PLoS medicine* **1**:e45.
156. **Leibson, C. L., Rocca, W. A., Hanson, V. A., Cha, R., Kokmen, E., O'Brien, P. C., and Palumbo, P. J.** 1997. Risk of dementia among persons with diabetes mellitus: a population-based cohort study. *American journal of epidemiology* **145**:301-308.
157. **Leonhardt, M., Hrupka, B., and Langhans, W.** 2001. Effect of hydroxycitrate on food intake and body weight regain after a period of restrictive feeding in male rats. *Physiology & behavior* **74**:191-196.
158. **Leshan, R. L., Bjornholm, M., Munzberg, H., and Myers, M. G., Jr.** 2006. Leptin receptor signaling and action in the central nervous system. *Obesity (Silver Spring, Md.)* **14 Suppl 5**:208S-212S.
159. **Levin, M. C., Monetti, M., Watt, M. J., Sajan, M. P., Stevens, R. D., Bain, J. R., Newgard, C. B., Farese, R. V., Sr., and Farese, R. V., Jr.** 2007. Increased lipid accumulation and insulin resistance in transgenic mice expressing DGAT2 in glycolytic (type II) muscle. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **293**:E1772-1781.
160. **Lewis, G. F., O'Meara, N. M., Soltys, P. A., Blackman, J. D., Iverius, P. H., Druetzler, A. F., Getz, G. S., and Polonsky, K. S.** 1990. Postprandial lipoprotein metabolism in normal and obese subjects: comparison after the vitamin A fat-loading test. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **71**:1041-1050.
161. **Li, M., Paran, C., Wolins, N. E., and Horowitz, J. F.** 2011. High muscle lipid content in obesity is not due to enhanced activation of key triglyceride esterification enzymes or the suppression of lipolytic proteins. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **300**:E699-707.
162. **Li, T., Matozel, M., Boehme, S., Kong, B., Nilsson, L. M., Guo, G., Ellis, E., and Chiang, J. Y.** 2011. Overexpression of cholesterol 7alpha-hydroxylase promotes hepatic bile acid synthesis and secretion and maintains cholesterol homeostasis. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **53**:996-1006.
163. **Lobb, A.** 2009. Hepatotoxicity associated with weight-loss supplements: a case for better post-marketing surveillance. *World journal of gastroenterology : WJG* **15**:1786-1787.

164. **Loffreda, S., Yang, S. Q., Lin, H. Z., Karp, C. L., Brengman, M. L., Wang, D. J., Klein, A. S., Bulkley, G. B., Bao, C., Noble, P. W., Lane, M. D., and Diehl, A. M.** 1998. Leptin regulates proinflammatory immune responses. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **12**:57-65.
165. **Lopez-Soriano, J., Carbo, N., Lopez-Soriano, F. J., and Argiles, J. M.** 1998. Short-term effects of leptin on lipid metabolism in the rat. *FEBS letters* **431**:371-374.
166. **Lowenstein, J. M.** 1971. Effect of (-)-hydroxycitrate on fatty acid synthesis by rat liver in vivo. *The Journal of biological chemistry* **246**:629-632.
167. **Lu, J., Borthwick, F., Hassanali, Z., Wang, Y., Mangat, R., Ruth, M., Shi, D., Jaeschke, A., Russell, J. C., Field, C. J., Proctor, S. D., and Vine, D. F.** 2011. Chronic dietary n-3 PUFA intervention improves dyslipidaemia and subsequent cardiovascular complications in the JCR:LA- cp rat model of the metabolic syndrome. *The British journal of nutrition* **105**:1572-1582.
168. **Luchsinger, J. A., Tang, M. X., Stern, Y., Shea, S., and Mayeux, R.** 2001. Diabetes mellitus and risk of Alzheimer's disease and dementia with stroke in a multiethnic cohort. *American journal of epidemiology* **154**:635-641.
169. **Luiken, J. J., Arumugam, Y., Dyck, D. J., Bell, R. C., Pelsers, M. M., Turcotte, L. P., Tandon, N. N., Glatz, J. F., and Bonen, A.** 2001. Increased rates of fatty acid uptake and plasmalemmal fatty acid transporters in obese Zucker rats. *The Journal of biological chemistry* **276**:40567-40573.
170. **Lusis, A. J., and Pajukanta, P.** 2008. A treasure trove for lipoprotein biology. *Nature genetics* **40**:129-130.
171. **Maachi, M., Pieroni, L., Bruckert, E., Jardel, C., Fellahi, S., Hainque, B., Capeau, J., and Bastard, J. P.** 2004. Systemic low-grade inflammation is related to both circulating and adipose tissue TNFalpha, leptin and IL-6 levels in obese women. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* **28**:993-997.
172. **Madeira, I. R., Carvalho, C. N., Gazolla, F. M., Pinto, L. W., Borges, M. A., and Bordallo, M. A.** 2009. Impact of obesity on metabolic syndrome components and adipokines in prepubertal children. *Jornal de pediatria* **85**:261-268.
173. **Maffei, M., Fei, H., Lee, G. H., Dani, C., Leroy, P., Zhang, Y., Proenca, R., Negrel, R., Ailhaud, G., and Friedman, J. M.** 1995. Increased expression in adipocytes of ob RNA in mice with lesions of the hypothalamus and with mutations at the db locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**:6957-6960.
174. **Mahley, R. W., Innerarity, T. L., Rall, S. C., Jr., and Weisgraber, K. H.** 1984. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *Journal of lipid research* **25**:1277-1294.
175. **Mai, X. M., Chen, Y., and Krewski, D.** 2009. Does leptin play a role in obesity-asthma relationship? *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* **20**:207-212.
176. **Mann, C. J., Khallou, J., Chevreuil, O., Troussard, A. A., Guermani, L. M., Launay, K., Delplanque, B., Yen, F. T., and Bihain, B. E.** 1995. Mechanism of activation and functional significance of the lipolysis-stimulated receptor. Evidence for a role as chylomicron remnant receptor. *Biochemistry* **34**:10421-10431.
177. **Mann, C. J., Troussard, A. A., Yen, F. T., Hannouche, N., Najib, J., Fruchart, J. C., Lotteau, V., Andre, P., and Bihain, B. E.** 1997. Inhibitory effects of specific apolipoprotein C-III isoforms on the binding of triglyceride-rich lipoproteins to the lipolysis-stimulated receptor. *The Journal of biological chemistry* **272**:31348-31354.

178. **Marcus, C., Ehren, H., Bolme, P., and Arner, P.** 1988. Regulation of lipolysis during the neonatal period. Importance of thyrotropin. *The Journal of clinical investigation* **82**:1793-1797.
179. **Martins, I. J., Hone, E., Chi, C., Seydel, U., Martins, R. N., and Redgrave, T. G.** 2000. Relative roles of LDLr and LRP in the metabolism of chylomicron remnants in genetically manipulated mice. *Journal of lipid research* **41**:205-213.
180. **Mathias, M. M., Sullivan, A. C., and Hamilton, J. G.** 1981. Fatty acid and cholesterol synthesis from specifically labeled leucine by isolated rat hepatocytes. *Lipids* **16**:739-743.
181. **Matsubara, M., Maruoka, S., and Katayose, S.** 2002. Inverse relationship between plasma adiponectin and leptin concentrations in normal-weight and obese women. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* **147**:173-180.
182. **Mazzali, G., Di Francesco, V., Zoico, E., Fantin, F., Zamboni, G., Benati, C., Bambara, V., Negri, M., Bosello, O., and Zamboni, M.** 2006. Interrelations between fat distribution, muscle lipid content, adipocytokines, and insulin resistance: effect of moderate weight loss in older women. *The American journal of clinical nutrition* **84**:1193-1199.
183. **McDowell, I.** 2001. Alzheimer's disease: insights from epidemiology. *Aging (Milan, Italy)* **13**:143-162.
184. **McIntosh, C. H., Bremsak, I., Lynn, F. C., Gill, R., Hinke, S. A., Gelling, R., Nian, C., McKnight, G., Jaspers, S., and Pederson, R. A.** 1999. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide stimulation of lipolysis in differentiated 3T3-L1 cells: wortmannin-sensitive inhibition by insulin. *Endocrinology* **140**:398-404.
185. **Meneilly, G. S., and Hill, A.** 1993. Alterations in glucose metabolism in patients with Alzheimer's disease. *Journal of the American Geriatrics Society* **41**:710-714.
186. **Mensink, R. P., Zock, P. L., Katan, M. B., and Hornstra, G.** 1992. Effect of dietary cis and trans fatty acids on serum lipoprotein[a] levels in humans. *Journal of lipid research* **33**:1493-1501.
187. **Mensink, R. P., Zock, P. L., Kester, A. D., and Katan, M. B.** 2003. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *The American journal of clinical nutrition* **77**:1146-1155.
188. **Merkel, M., Heeren, J., Dudeck, W., Rinninger, F., Radner, H., Breslow, J. L., Goldberg, I. J., Zechner, R., and Greten, H.** 2002. Inactive lipoprotein lipase (LPL) alone increases selective cholesterol ester uptake in vivo, whereas in the presence of active LPL it also increases triglyceride hydrolysis and whole particle lipoprotein uptake. *The Journal of biological chemistry* **277**:7405-7411.
189. **Mesli, S., Javorschi, S., Berard, A. M., Landry, M., Priddle, H., Kivlichan, D., Smith, A. J., Yen, F. T., Bihain, B. E., and Darmon, M.** 2004. Distribution of the lipolysis stimulated receptor in adult and embryonic murine tissues and lethality of LSR^{-/-} embryos at 12.5 to 14.5 days of gestation. *European journal of biochemistry / FEBS* **271**:3103-3114.
190. **Miranda, P. J., DeFronzo, R. A., Califf, R. M., and Guyton, J. R.** 2005. Metabolic syndrome: definition, pathophysiology, and mechanisms. *American heart journal* **149**:33-45.
191. **Mondola, P., and Reichl, D.** 1982. Apoprotein B of lipoprotein(a) of human plasma. *The Biochemical journal* **208**:393-398.

192. **Montalto, M. B., and Bensadoun, A.** 1993. Lipoprotein lipase synthesis and secretion: effects of concentration and type of fatty acids in adipocyte cell culture. *Journal of lipid research* **34**:397-407.
193. **Mooney, R. A., Senn, J., Cameron, S., Inamdar, N., Boivin, L. M., Shang, Y., and Furlanetto, R. W.** 2001. Suppressors of cytokine signaling-1 and -6 associate with and inhibit the insulin receptor. A potential mechanism for cytokine-mediated insulin resistance. *The Journal of biological chemistry* **276**:25889-25893.
194. **Mooradian, A. D.** 1997. Pathophysiology of central nervous system complications in diabetes mellitus. *Clinical neuroscience (New York, N.Y.)* **4**:322-326.
195. **Morioka, T., Asilmaz, E., Hu, J., Dishinger, J. F., Kurpad, A. J., Elias, C. F., Li, H., Elmquist, J. K., Kennedy, R. T., and Kulkarni, R. N.** 2007. Disruption of leptin receptor expression in the pancreas directly affects beta cell growth and function in mice. *The Journal of clinical investigation* **117**:2860-2868.
196. **Morton, G. J., and Schwartz, M. W.** 2011. Leptin and the central nervous system control of glucose metabolism. *Physiological reviews* **91**:389-411.
197. **Muller, M., Tang, M. X., Schupf, N., Manly, J. J., Mayeux, R., and Luchsinger, J. A.** 2007. Metabolic syndrome and dementia risk in a multiethnic elderly cohort. *Dementia and geriatric cognitive disorders* **24**:185-192.
198. **Murakami, T., Yamashita, T., Iida, M., Kuwajima, M., and Shima, K.** 1997. A short form of leptin receptor performs signal transduction. *Biochemical and biophysical research communications* **231**:26-29.
199. **Narvekar, P., Berriel Diaz, M., Krones-Herzig, A., Hardeland, U., Strzoda, D., Stohr, S., Frohme, M., and Herzig, S.** 2009. Liver-specific loss of lipolysis-stimulated lipoprotein receptor triggers systemic hyperlipidemia in mice. *Diabetes* **58**:1040-1049.
200. **Naslund, J., Thyberg, J., Tjernberg, L. O., Wernstedt, C., Karlstrom, A. R., Bogdanovic, N., Gandy, S. E., Lannfelt, L., Terenius, L., and Nordstedt, C.** 1995. Characterization of stable complexes involving apolipoprotein E and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease brain. *Neuron* **15**:219-228.
201. **National Diabetes Data Group.** 1995. Diabetes in America. National Institutes of Health.
202. **National Institutes of Health.** 2001. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III).
203. **Nichaman, M. Z., Sweeley, C. C., and Olson, R. E.** 1967. Plasma fatty acids in normolipemic and hyperlipemic subjects during fasting and after linoleate feeding. *The American journal of clinical nutrition* **20**:1057-1069.
204. **Nielson, K. A., Nolan, J. H., Berchtold, N. C., Sandman, C. A., Mulnard, R. A., and Cotman, C. W.** 1996. Apolipoprotein-E genotyping of diabetic dementia patients: is diabetes rare in Alzheimer's disease? *Journal of the American Geriatrics Society* **44**:897-904.
205. **Niswender, K. D., Morton, G. J., Stearns, W. H., Rhodes, C. J., Myers, M. G., Jr., and Schwartz, M. W.** 2001. Intracellular signalling. Key enzyme in leptin-induced anorexia. *Nature* **413**:794-795.
206. **Nogalska, A., Sucajtyś-Szulc, E., and Swierczynski, J.** 2005. Leptin decreases lipogenic enzyme gene expression through modification of SREBP-1c gene expression in white adipose tissue of aging rats. *Metabolism: clinical and experimental* **54**:1041-1047.

-
207. **Nordestgaard, B. G., Benn, M., Schnohr, P., and Tybjaerg-Hansen, A.** 2007. [Non-fasting triglycerides and risk of for myocardial infarction and death among women and men]. *Ugeskrift for laeger* **169**:3865-3868.
208. **O'Rourke, L., Gronning, L. M., Yeaman, S. J., and Shepherd, P. R.** 2002. Glucose-dependent regulation of cholesterol ester metabolism in macrophages by insulin and leptin. *The Journal of biological chemistry* **277**:42557-42562.
209. **Onakpoya, I., Hung, S. K., Perry, R., Wider, B., and Ernst, E.** 2011. The Use of Garcinia Extract (Hydroxycitric Acid) as a Weight loss Supplement: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomised Clinical Trials. *Journal of obesity* **2011**:509038.
210. **Oppert, J.-M., and Rolland-Cachera, M.-F.** 1998. PREVALENCE, EVOLUTION DANS LE TEMPS ET CONSEQUENCES ECONOMIQUES DE L'OBESITE = PREVALENCE, TIME TRENDS, AND ECONOMIC COST OF OBESITY. *MS. Médecine sciences* **14**:939-943.
211. **Ott, A., Stolk, R. P., Hofman, A., van Harskamp, F., Grobbee, D. E., and Breteler, M. M.** 1996. Association of diabetes mellitus and dementia: the Rotterdam Study. *Diabetologia* **39**:1392-1397.
212. **Ott, A., Stolk, R. P., van Harskamp, F., Pols, H. A., Hofman, A., and Breteler, M. M.** 1999. Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study. *Neurology* **53**:1937-1942.
213. **Ouchi, N., Kihara, S., Arita, Y., Maeda, K., Kuriyama, H., Okamoto, Y., Hotta, K., Nishida, M., Takahashi, M., Nakamura, T., Yamashita, S., Funahashi, T., and Matsuzawa, Y.** 1999. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* **100**:2473-2476.
214. **Ouchi, N., Kihara, S., Arita, Y., Nishida, M., Matsuyama, A., Okamoto, Y., Ishigami, M., Kuriyama, H., Kishida, K., Nishizawa, H., Hotta, K., Muraguchi, M., Ohmoto, Y., Yamashita, S., Funahashi, T., and Matsuzawa, Y.** 2001. Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation* **103**:1057-1063.
215. **Ouchi, N., Kihara, S., Arita, Y., Okamoto, Y., Maeda, K., Kuriyama, H., Hotta, K., Nishida, M., Takahashi, M., Muraguchi, M., Ohmoto, Y., Nakamura, T., Yamashita, S., Funahashi, T., and Matsuzawa, Y.** 2000. Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation* **102**:1296-1301.
216. **Ozata, M., Ozdemir, I. C., and Licinio, J.** 1999. Human leptin deficiency caused by a missense mutation: multiple endocrine defects, decreased sympathetic tone, and immune system dysfunction indicate new targets for leptin action, greater central than peripheral resistance to the effects of leptin, and spontaneous correction of leptin-mediated defects. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **84**:3686-3695.
217. **Pan, D. A., Lillioja, S., Kriketos, A. D., Milner, M. R., Baur, L. A., Bogardus, C., Jenkins, A. B., and Storlien, L. H.** 1997. Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action. *Diabetes* **46**:983-988.
218. **Pearce, N. J., Yates, J. W., Berkhout, T. A., Jackson, B., Tew, D., Boyd, H., Camilleri, P., Sweeney, P., Gribble, A. D., Shaw, A., and Groot, P. H.** 1998. The role of ATP citrate-lyase in the metabolic regulation of plasma lipids. Hypolipidaemic effects of SB-204990, a lactone prodrug of the potent ATP citrate-lyase inhibitor SB-201076. *The Biochemical journal* **334 (Pt 1)**:113-119.

219. **Peila, R., Rodriguez, B. L., and Launer, L. J.** 2002. Type 2 diabetes, APOE gene, and the risk for dementia and related pathologies: The Honolulu-Asia Aging Study. *Diabetes* **51**:1256-1262.
220. **Pelleymounter, M. A., Cullen, M. J., Baker, M. B., Hecht, R., Winters, D., Boone, T., and Collins, F.** 1995. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science (New York, N.Y.)* **269**:540-543.
221. **Peng, Y., Akmentin, W., Connelly, M. A., Lund-Katz, S., Phillips, M. C., and Williams, D. L.** 2004. Scavenger receptor BI (SR-BI) clustered on microvillar extensions suggests that this plasma membrane domain is a way station for cholesterol trafficking between cells and high-density lipoprotein. *Molecular biology of the cell* **15**:384-396.
222. **Pi-Sunyer, X.** 2007. The metabolic syndrome: how to approach differing definitions. *The Medical clinics of North America* **91**:1025-1040, vii.
223. **Pinto, S., Roseberry, A. G., Liu, H., Diano, S., Shanabrough, M., Cai, X., Friedman, J. M., and Horvath, T. L.** 2004. Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science (New York, N.Y.)* **304**:110-115.
224. **Pocai, A., Morgan, K., Buettner, C., Gutierrez-Juarez, R., Obici, S., and Rossetti, L.** 2005. Central leptin acutely reverses diet-induced hepatic insulin resistance. *Diabetes* **54**:3182-3189.
225. **Postic, C., and Girard, J.** 2008. The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis. *Diabetes & metabolism* **34**:643-648.
226. **Puigserver, P., Rhee, J., Donovan, J., Walkey, C. J., Yoon, J. C., Oriente, F., Kitamura, Y., Altomonte, J., Dong, H., Accili, D., and Spiegelman, B. M.** 2003. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature* **423**:550-555.
227. **Qiu, Z., Strickland, D. K., Hyman, B. T., and Rebeck, G. W.** 2002. alpha 2-Macroglobulin exposure reduces calcium responses to N-methyl-D-aspartate via low density lipoprotein receptor-related protein in cultured hippocampal neurons. *The Journal of biological chemistry* **277**:14458-14466.
228. **Reaven, G. M., Lerner, R. L., Stern, M. P., and Farquhar, J. W.** 1967. Role of insulin in endogenous hypertriglyceridemia. *The Journal of clinical investigation* **46**:1756-1767.
229. **Redgrave, T. G., and Small, D. M.** 1979. Quantitation of the transfer of surface phospholipid of chylomicrons to the high density lipoprotein fraction during the catabolism of chylomicrons in the rat. *The Journal of clinical investigation* **64**:162-171.
230. **Ribot, J., Rantala, M., Kesaniemi, Y. A., Palou, A., and Savolainen, M. J.** 2001. Weight loss reduces expression of SREBP1c/ADD1 and PPARgamma2 in adipose tissue of obese women. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **441**:498-505.
231. **Richelsen, B., Eriksen, E. F., Beck-Nielsen, H., and Pedersen, O.** 1984. Prostaglandin E2 receptor binding and action in human fat cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **59**:7-12.
232. **Ridker, P. M., and Morrow, D. A.** 2003. C-reactive protein, inflammation, and coronary risk. *Cardiology clinics* **21**:315-325.
233. **Ritchie, K., and Lovestone, S.** 2002. The dementias. *Lancet* **360**:1759-1766.
234. **Robertson, S. A., Leininger, G. M., and Myers, M. G., Jr.** 2008. Molecular and neural mediators of leptin action. *Physiology & behavior* **94**:637-642.
235. **Rohmann, A., Gotthardt, M., Hammer, R. E., and Herz, J.** 1998. Inducible inactivation of hepatic LRP gene by cre-mediated recombination confirms role of LRP

- in clearance of chylomicron remnants. *The Journal of clinical investigation* **101**:689-695.
236. **Roth, G., Kotzka, J., Kremer, L., Lehr, S., Lohaus, C., Meyer, H. E., Krone, W., and Muller-Wieland, D.** 2000. MAP kinases Erk1/2 phosphorylate sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1a at serine 117 in vitro. *The Journal of biological chemistry* **275**:33302-33307.
 237. **Ruby, M. A., Goldenson, B., Orasanu, G., Johnston, T. P., Plutzky, J., and Krauss, R. M.** 2010. VLDL hydrolysis by LPL activates PPAR-alpha through generation of unbound fatty acids. *Journal of lipid research* **51**:2275-2281.
 238. **Sagara, M., Njelekela, M., Teramoto, T., Taguchi, T., Mori, M., Armitage, L., Birt, N., Birt, C., and Yamori, Y.** 2011. Effects of docosahexaenoic Acid supplementation on blood pressure, heart rate, and serum lipids in Scottish men with hypertension and hypercholesterolemia. *International journal of hypertension* **2011**:809198.
 239. **Sanan, D. A., Weisgraber, K. H., Russell, S. J., Mahley, R. W., Huang, D., Saunders, A., Schmechel, D., Wisniewski, T., Frangione, B., Roses, A. D., and et al.** 1994. Apolipoprotein E associates with beta amyloid peptide of Alzheimer's disease to form novel monofibrils. Isoform apoE4 associates more efficiently than apoE3. *The Journal of clinical investigation* **94**:860-869.
 240. **Sato, A., Kawano, H., Notsu, T., Ohta, M., Nakakuki, M., Mizuguchi, K., Itoh, M., Suganami, T., and Ogawa, Y.** 2010. Antiobesity effect of eicosapentaenoic acid in high-fat/high-sucrose diet-induced obesity: importance of hepatic lipogenesis. *Diabetes* **59**:2495-2504.
 241. **Scanu, A.** 1966. Forms of human serum high density lipoprotein protein. *Journal of lipid research* **7**:295-306.
 242. **Scanu, A., and Page, I. H.** 1959. Separation and characterization of human serum chylomicrons. *The Journal of experimental medicine* **109**:239-256.
 243. **Schaffer, J. E., and Lodish, H. F.** 1994. Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell* **79**:427-436.
 244. **Schmechel, D. E., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Crain, B. J., Hulette, C. M., Joo, S. H., Pericak-Vance, M. A., Goldgaber, D., and Roses, A. D.** 1993. Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**:9649-9653.
 245. **Schoonjans, K., Gelman, L., Haby, C., Briggs, M., and Auwerx, J.** 2000. Induction of LPL gene expression by sterols is mediated by a sterol regulatory element and is independent of the presence of multiple E boxes. *Journal of molecular biology* **304**:323-334.
 246. **Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D., Jr., Seeley, R. J., and Baskin, D. G.** 2000. Central nervous system control of food intake. *Nature* **404**:661-671.
 247. **Schwenk, R. W., Holloway, G. P., Luiken, J. J., Bonen, A., and Glatz, J. F.** 2010. Fatty acid transport across the cell membrane: regulation by fatty acid transporters. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids **82**:149-154.
 248. **Scott, M. M., Lachey, J. L., Sternson, S. M., Lee, C. E., Elias, C. F., Friedman, J. M., and Elmquist, J. K.** 2009. Leptin targets in the mouse brain. *The Journal of comparative neurology* **514**:518-532.
 249. **Scriver, Charles R., Beaudet, Arthur L., Sly, William S., and Valle, David.** 1995. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 7 ed, vol. 2 partie 8.
 250. **Selkoe, D. J.** 1997. Alzheimer's disease: genotypes, phenotypes, and treatments. *Science (New York, N.Y.)* **275**:630-631.

251. **Semplicini, A., Ceolotto, G., Massimino, M., Valle, R., Serena, L., De Toni, R., Pessina, A. C., and Dal Palu, C.** 1994. Interactions between insulin and sodium homeostasis in essential hypertension. *The American journal of the medical sciences* **307 Suppl 1**:S43-46.
252. **Shachter, N. S., Hayek, T., Leff, T., Smith, J. D., Rosenberg, D. W., Walsh, A., Ramakrishnan, R., Goldberg, I. J., Ginsberg, H. N., and Breslow, J. L.** 1994. Overexpression of apolipoprotein CII causes hypertriglyceridemia in transgenic mice. *The Journal of clinical investigation* **93**:1683-1690.
253. **Shen, M. M., Krauss, R. M., Lindgren, F. T., and Forte, T. M.** 1981. Heterogeneity of serum low density lipoproteins in normal human subjects. *Journal of lipid research* **22**:236-244.
254. **Shepherd, J.** 1994. Lipoprotein metabolism. An overview. *Drugs* **47 Suppl 2**:1-10.
255. **Shepherd, J., Packard, C. J., Grundy, S. M., Yeshurun, D., Gotto, A. M., Jr., and Taunton, O. D.** 1980. Effects of saturated and polyunsaturated fat diets on the chemical composition and metabolism of low density lipoproteins in man. *Journal of lipid research* **21**:91-99.
256. **Shimabukuro, M., Koyama, K., Chen, G., Wang, M. Y., Trieu, F., Lee, Y., Newgard, C. B., and Unger, R. H.** 1997. Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**:4637-4641.
257. **Shobab, L. A., Hsiung, G. Y., and Feldman, H. H.** 2005. Cholesterol in Alzheimer's disease. *Lancet neurology* **4**:841-852.
258. **Shrago, E., Glennon, J. A., and Gordon, E. S.** 1971. Comparative aspects of lipogenesis in mammalian tissues. *Metabolism: clinical and experimental* **20**:54-62.
259. **Siegrist-Kaiser, C. A., Pauli, V., Juge-Aubry, C. E., Boss, O., Pernin, A., Chin, W. W., Cusin, I., Rohner-Jeanrenaud, F., Burger, A. G., Zapf, J., and Meier, C. A.** 1997. Direct effects of leptin on brown and white adipose tissue. *The Journal of clinical investigation* **100**:2858-2864.
260. **Signore, A. P., Zhang, F., Weng, Z., Gao, Y., and Chen, J.** 2008. Leptin neuroprotection in the CNS: mechanisms and therapeutic potentials. *Journal of neurochemistry* **106**:1977-1990.
261. **Small, G. W., Ercoli, L. M., Silverman, D. H., Huang, S. C., Komo, S., Bookheimer, S. Y., Lavretsky, H., Miller, K., Siddarth, P., Rasgon, N. L., Mazziotta, J. C., Saxena, S., Wu, H. M., Mega, M. S., Cummings, J. L., Saunders, A. M., Pericak-Vance, M. A., Roses, A. D., Barrio, J. R., and Phelps, M. E.** 2000. Cerebral metabolic and cognitive decline in persons at genetic risk for Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**:6037-6042.
262. **Soni, M. G., Burdock, G. A., Preuss, H. G., Stohs, S. J., Ohia, S. E., and Bagchi, D.** 2004. Safety assessment of (-)-hydroxycitric acid and Super CitriMax, a novel calcium/potassium salt. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* **42**:1513-1529.
263. **Soukas, A., Cohen, P., Socci, N. D., and Friedman, J. M.** 2000. Leptin-specific patterns of gene expression in white adipose tissue. *Genes & development* **14**:963-980.
264. **Stenger, C., Hanse, M., Pratte, D., Mbala, M. L., Akbar, S., Koziel, V., Escanye, M. C., Kriem, B., Malaplate-Armand, C., Olivier, J. L., Oster, T., Pilot, T., and Yen, F. T.** 2010. Up-regulation of hepatic lipolysis stimulated lipoprotein receptor by leptin: a potential lever for controlling lipid clearance during the postprandial phase.

- The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **24**:4218-4228.
265. **Stich, V., Pelikanova, T., Wohl, P., Sengenès, C., Zakaroff-Girard, A., Lafontan, M., and Berlan, M.** 2003. Activation of α_2 -adrenergic receptors blunts epinephrine-induced lipolysis in subcutaneous adipose tissue during a hyperinsulinemic euglycemic clamp in men. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **285**:E599-607.
 266. **Stocks, J., and Miller, N. E.** 1999. Analysis of apolipoproteins and lipoproteins by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **20**:2118-2123.
 267. **Stohs, S. J., Preuss, H. G., Ohia, S. E., Kaats, G. R., Keen, C. L., Williams, L. D., and Burdock, G. A.** 2009. No evidence demonstrating hepatotoxicity associated with hydroxycitric acid. *World journal of gastroenterology : WJG* **15**:4087-4089.
 268. **Storlien, L. H., Jenkins, A. B., Chisholm, D. J., Pascoe, W. S., Khouri, S., and Kraegen, E. W.** 1991. Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. Relationship to muscle triglyceride and omega-3 fatty acids in muscle phospholipid. *Diabetes* **40**:280-289.
 269. **Strittmatter, W. J., Saunders, A. M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G. S., and Roses, A. D.** 1993. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**:1977-1981.
 270. **Sugiyama, T., Kumagai, H., Morikawa, Y., Wada, Y., Sugiyama, A., Yasuda, K., Yokoi, N., Tamura, S., Kojima, T., Nosaka, T., Senba, E., Kimura, S., Kadowaki, T., Kodama, T., and Kitamura, T.** 2000. A novel low-density lipoprotein receptor-related protein mediating cellular uptake of apolipoprotein E-enriched beta-VLDL in vitro. *Biochemistry* **39**:15817-15825.
 271. **Sullivan, A. C., Hamilton, J. G., Miller, O. N., and Wheatley, V. R.** 1972. Inhibition of lipogenesis in rat liver by (-)-hydroxycitrate. *Archives of biochemistry and biophysics* **150**:183-190.
 272. **Sullivan, A. C., Singh, M., Srere, P. A., and Glusker, J. P.** 1977. Reactivity and inhibitor potential of hydroxycitrate isomers with citrate synthase, citrate lyase, and ATP citrate lyase. *The Journal of biological chemistry* **252**:7583-7590.
 273. **Sullivan, A. C., Triscari, J., and Spiegel, J. E.** 1977. Metabolic regulation as a control for lipid disorders. II. Influence of (-)-hydroxycitrate on genetically and experimentally induced hypertriglyceridemia in the rat. *The American journal of clinical nutrition* **30**:777-784.
 274. **Takeuchi, Y., Yahagi, N., Izumida, Y., Nishi, M., Kubota, M., Teraoka, Y., Yamamoto, T., Matsuzaka, T., Nakagawa, Y., Sekiya, M., Iizuka, Y., Ohashi, K., Osuga, J., Gotoda, T., Ishibashi, S., Itaka, K., Kataoka, K., Nagai, R., Yamada, N., Kadowaki, T., and Shimano, H.** 2010. Polyunsaturated fatty acids selectively suppress sterol regulatory element-binding protein-1 through proteolytic processing and autoloop regulatory circuit. *The Journal of biological chemistry* **285**:11681-11691.
 275. **Tanigawa, H., Billheimer, J. T., Tohyama, J., Fuki, I. V., Ng, D. S., Rothblat, G. H., and Rader, D. J.** 2009. Lecithin: cholesterol acyltransferase expression has minimal effects on macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation* **120**:160-169.
 276. **Tartaglia, L. A., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J., Devos, R., Richards, G. J., Campfield, L. A., Clark, F. T., Deeds, J., Muir, C., Sanker, S., Moriarty, A., Moore, K. J., Smutko, J. S., Mays, G. G., Wool, E. A., Monroe, C.**

- A., and Tepper, R. I.** 1995. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* **83**:1263-1271.
277. **Teglund, S., McKay, C., Schuetz, E., van Deursen, J. M., Stravopodis, D., Wang, D., Brown, M., Bodner, S., Grosveld, G., and Ihle, J. N.** 1998. Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell* **93**:841-850.
278. **Tessari, P., Coracina, A., Cosma, A., and Tiengo, A.** 2009. Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD* **19**:291-302.
279. **Tobe, K., Suzuki, R., Aoyama, M., Yamauchi, T., Kamon, J., Kubota, N., Terauchi, Y., Matsui, J., Akanuma, Y., Kimura, S., Tanaka, J., Abe, M., Ohsumi, J., Nagai, R., and Kadowaki, T.** 2001. Increased expression of the sterol regulatory element-binding protein-1 gene in insulin receptor substrate-2(-/-) mouse liver. *The Journal of biological chemistry* **276**:38337-38340.
280. **Toussaint, J-F, Jacob, M-P, Lagrost, L, and Chapman, J.** 2003. Lipoprotéines et métabolisme lipidique, p. 59-74. *In* Masson (ed.), *L'athérosclérose: Physiopathologie, diagnostics, thérapeutiques*, vol. 1.
281. **Triscari, J., and Sullivan, A. C.** 1977. Comparative effects of (--)hydroxycitrate and (+)-allo-hydroxycitrate on acetyl CoA carboxylase and fatty acid and cholesterol synthesis in vivo. *Lipids* **12**:357-363.
282. **Troussard, A. A., Khallou, J., Mann, C. J., Andre, P., Strickland, D. K., Bihain, B. E., and Yen, F. T.** 1995. Inhibitory effect on the lipolysis-stimulated receptor of the 39-kDa receptor-associated protein. *The Journal of biological chemistry* **270**:17068-17071.
283. **Uotani, S., Bjorbaek, C., Tornoe, J., and Flier, J. S.** 1999. Functional properties of leptin receptor isoforms: internalization and degradation of leptin and ligand-induced receptor downregulation. *Diabetes* **48**:279-286.
284. **Vaessen, S. F., Dallinga-Thie, G. M., Ross, C. J., Splint, L. J., Castellani, L. W., Rensen, P. C., Hayden, M. R., Schaap, F. G., and Kuivenhoven, J. A.** 2009. Plasma apolipoprotein AV levels in mice are positively associated with plasma triglyceride levels. *Journal of lipid research* **50**:880-884.
285. **Vague, J.** 1956. The degree of masculine differentiation of obesities: a factor determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout, and uric calculous disease. *The American journal of clinical nutrition* **4**:20-34.
286. **Valet, P., Berlan, M., Beauville, M., Crampes, F., Montastruc, J. L., and Lafontan, M.** 1990. Neuropeptide Y and peptide YY inhibit lipolysis in human and dog fat cells through a pertussis toxin-sensitive G protein. *The Journal of clinical investigation* **85**:291-295.
287. **van Berkel, T. J., Fluiter, K., van Velzen, A. G., Vogelezang, C. J., and Ziere, G. J.** 1995. LDL receptor-independent and -dependent uptake of lipoproteins. *Atherosclerosis* **118 Suppl**:S43-50.
288. **van der Vusse, G. J.** 2009. Albumin as fatty acid transporter. *Drug metabolism and pharmacokinetics* **24**:300-307.
289. **van Dijk, M. C., Kruijt, J. K., Boers, W., Linthorst, C., and van Berkel, T. J.** 1992. Distinct properties of the recognition sites for beta-very low density lipoprotein (remnant receptor) and alpha 2-macroglobulin (low density lipoprotein receptor-related protein) on rat parenchymal cells. *The Journal of biological chemistry* **267**:17732-17737.
290. **van Dijk, M. C., Ziere, G. J., Boers, W., Linthorst, C., Bijsterbosch, M. K., and van Berkel, T. J.** 1991. Recognition of chylomicron remnants and beta-migrating

- very-low-density lipoproteins by the remnant receptor of parenchymal liver cells is distinct from the liver alpha 2-macroglobulin-recognition site. *The Biochemical journal* **279** (Pt 3):863-870.
291. **Vanhanen, M., Koivisto, K., Moilanen, L., Helkala, E. L., Hanninen, T., Soininen, H., Kervinen, K., Kesaniemi, Y. A., Laakso, M., and Kuusisto, J.** 2006. Association of metabolic syndrome with Alzheimer disease: a population-based study. *Neurology* **67**:843-847.
 292. **Vaubourdolle, M.** 2007. Structure et métabolisme des lipoprotéines, p. 173-197. *In* L. m. d. pharmacies (ed.), *Biochimie Hématologie*, vol. 2.
 293. **Veniant, M. M., Zlot, C. H., Walzem, R. L., Pierotti, V., Driscoll, R., Dichek, D., Herz, J., and Young, S. G.** 1998. Lipoprotein clearance mechanisms in LDL receptor-deficient "Apo-B48-only" and "Apo-B100-only" mice. *The Journal of clinical investigation* **102**:1559-1568.
 294. **Wagner, E. M., Kratky, D., Haemmerle, G., Hrzenjak, A., Kostner, G. M., Steyrer, E., and Zechner, R.** 2004. Defective uptake of triglyceride-associated fatty acids in adipose tissue causes the SREBP-1c-mediated induction of lipogenesis. *Journal of lipid research* **45**:356-365.
 295. **Wang, M. Y., Lee, Y., and Unger, R. H.** 1999. Novel form of lipolysis induced by leptin. *The Journal of biological chemistry* **274**:17541-17544.
 296. **Wang, Q., Jiang, L., Wang, J., Li, S., Yu, Y., You, J., Zeng, R., Gao, X., Rui, L., Li, W., and Liu, Y.** 2009. Abrogation of hepatic ATP-citrate lyase protects against fatty liver and ameliorates hyperglycemia in leptin receptor-deficient mice. *Hepatology* (Baltimore, Md.) **49**:1166-1175.
 297. **Wang, Q., Li, S., Jiang, L., Zhou, Y., Li, Z., Shao, M., Li, W., and Liu, Y.** 2010. Deficiency in hepatic ATP-citrate lyase affects VLDL-triglyceride mobilization and liver fatty acid composition in mice. *Journal of lipid research* **51**:2516-2526.
 298. **Wang, X.** 2004. Lipid signaling. *Current opinion in plant biology* **7**:329-336.
 299. **Wang, X., Briggs, M. R., Hua, X., Yokoyama, C., Goldstein, J. L., and Brown, M. S.** 1993. Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. II. Purification and characterization. *The Journal of biological chemistry* **268**:14497-14504.
 300. **Watson, J. A., Fang, M., and Lowenstein, J. M.** 1969. Tricarballoylate and hydroxycitrate: substrate and inhibitor of ATP: citrate oxaloacetate lyase. *Archives of biochemistry and biophysics* **135**:209-217.
 301. **Weyer, C., Funahashi, T., Tanaka, S., Hotta, K., Matsuzawa, Y., Pratley, R. E., and Tataranni, P. A.** 2001. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **86**:1930-1935.
 302. **Winograd, C. H., Jacobson, D. H., Minkoff, J. R., Peabody, C. A., Taylor, B. S., Widrow, L., and Yesavage, J. A.** 1991. Blood glucose and insulin response in patients with senile dementia of the Alzheimer's type. *Biological psychiatry* **30**:507-511.
 303. **Wisniewski, T., Castano, E. M., Golabek, A., Vogel, T., and Frangione, B.** 1994. Acceleration of Alzheimer's fibril formation by apolipoprotein E in vitro. *The American journal of pathology* **145**:1030-1035.
 304. **Wisniewski, T., Golabek, A., Matsubara, E., Ghiso, J., and Frangione, B.** 1993. Apolipoprotein E: binding to soluble Alzheimer's beta-amyloid. *Biochemical and biophysical research communications* **192**:359-365.
 305. **Wolozin, B.** 2004. Cholesterol and the biology of Alzheimer's disease. *Neuron* **41**:7-10.

-
306. **Wood, S. L., Emmison, N., Borthwick, A. C., and Yeaman, S. J.** 1993. The protein phosphatases responsible for dephosphorylation of hormone-sensitive lipase in isolated rat adipocytes. *The Biochemical journal* **295** (Pt 2):531-535.
307. **Wu, Q., Ortegon, A. M., Tsang, B., Doege, H., Feingold, K. R., and Stahl, A.** 2006. FATP1 is an insulin-sensitive fatty acid transporter involved in diet-induced obesity. *Molecular and cellular biology* **26**:3455-3467.
308. **Yaffe, K., Kanaya, A., Lindquist, K., Simonsick, E. M., Harris, T., Shorr, R. I., Tylavsky, F. A., and Newman, A. B.** 2004. The metabolic syndrome, inflammation, and risk of cognitive decline. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **292**:2237-2242.
309. **Yamagishi, S. I., Edelstein, D., Du, X. L., Kaneda, Y., Guzman, M., and Brownlee, M.** 2001. Leptin induces mitochondrial superoxide production and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic endothelial cells by increasing fatty acid oxidation via protein kinase A. *The Journal of biological chemistry* **276**:25096-25100.
310. **Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y., Ito, Y., Waki, H., Uchida, S., Yamashita, S., Noda, M., Kita, S., Ueki, K., Eto, K., Akanuma, Y., Froguel, P., Foufelle, F., Ferre, P., Carling, D., Kimura, S., Nagai, R., Kahn, B. B., and Kadowaki, T.** 2002. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature medicine* **8**:1288-1295.
311. **Yang, W. S., and Deeb, S. S.** 1998. Sp1 and Sp3 transactivate the human lipoprotein lipase gene promoter through binding to a CT element: synergy with the sterol regulatory element binding protein and reduced transactivation of a naturally occurring promoter variant. *Journal of lipid research* **39**:2054-2064.
312. **Yasuda, T., Ishida, T., and Rader, D. J.** 2010. Update on the role of endothelial lipase in high-density lipoprotein metabolism, reverse cholesterol transport, and atherosclerosis. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* **74**:2263-2270.
313. **Yazdanyar, A., Yeang, C., and Jiang, X. C.** 2011. Role of phospholipid transfer protein in high-density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport. *Current atherosclerosis reports* **13**:242-248.
314. **Yen, F. T., Mann, C. J., Guermani, L. M., Hannouche, N. F., Hubert, N., Hornick, C. A., Bordeau, V. N., Agnani, G., and Bihain, B. E.** 1994. Identification of a lipolysis-stimulated receptor that is distinct from the LDL receptor and the LDL receptor-related protein. *Biochemistry* **33**:1172-1180.
315. **Yen, F. T., Masson, M., Clossais-Besnard, N., Andre, P., Grosset, J. M., Bougueleret, L., Dumas, J. B., Guerassimenko, O., and Bihain, B. E.** 1999. Molecular cloning of a lipolysis-stimulated remnant receptor expressed in the liver. *The Journal of biological chemistry* **274**:13390-13398.
316. **Yen, F. T., Roitel, O., Bonnard, L., Notet, V., Pratte, D., Stenger, C., Magueur, E., and Bihain, B. E.** 2008. Lipolysis stimulated lipoprotein receptor: a novel molecular link between hyperlipidemia, weight gain, and atherosclerosis in mice. *The Journal of biological chemistry* **283**:25650-25659.
317. **Yin, D., Clarke, S. D., Peters, J. L., and Etherton, T. D.** 1998. Somatotropin-dependent decrease in fatty acid synthase mRNA abundance in 3T3-F442A adipocytes is the result of a decrease in both gene transcription and mRNA stability. *The Biochemical journal* **331** (Pt 3):815-820.
318. **Yoshimura, N., Kinoshita, M., and Teramoto, T.** 2009. Isolation and characterization of apolipoprotein B48-containing lipoproteins with a monoclonal

- antibody against apolipoprotein B48. *Journal of atherosclerosis and thrombosis* **16**:740-747.
319. **Zambon, A., Hashimoto, S. I., and Brunzell, J. D.** 1993. Analysis of techniques to obtain plasma for measurement of levels of free fatty acids. *Journal of lipid research* **34**:1021-1028.
320. **Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J. M.** 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**:425-432.
321. **Zhou, Y. T., Shimabukuro, M., Koyama, K., Lee, Y., Wang, M. Y., Trieu, F., Newgard, C. B., and Unger, R. H.** 1997. Induction by leptin of uncoupling protein-2 and enzymes of fatty acid oxidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**:6386-6390.
322. **Zilversmit, D. B.** 1979. Atherogenesis: a postprandial phenomenon. *Circulation* **60**:473-485.
323. **Zimmet, P. Z., Alberti, K. G., and Shaw, J. E.** 2005. Mainstreaming the metabolic syndrome: a definitive definition. *The Medical journal of Australia* **183**:175-176.

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

oOo

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur Philippe CARDOT, Professeur, Université Pierre et Marie Curie, Paris

Monsieur John MCGREGOR, Directeur de Recherche, INSERM, Lyon

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame HANSE Marine

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Rôle du récepteur aux lipoprotéines, LSR, dans la régulation du transport et de la
distribution des lipides alimentaires."**

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Intitulé du doctorat : « **Procédés Biotechnologiques et Alimentaires** »

Fait à Vandœuvre, le 03 novembre 2011

Le Président de l'INPL,

F. LAURENT

Pour le Président en délégation
Le Directeur Général des Services
de l'INPL,

J.Y. RIVIERE



RÔLE DU RÉCEPTEUR AUX LIPOPROTÉINES, LSR, DANS LA RÉGULATION DU TRANSPORT ET DE LA DISTRIBUTION DES LIPIDES ALIMENTAIRES

Résumé : Le récepteur hépatique aux lipoprotéines LSR est impliqué dans la clairance des lipoprotéines riches en triglycérides telles que les résidus de chylomicrons pendant la phase postprandiale. La réduction de l'expression du LSR chez la souris (LSR^{+/-}) est associée à une dyslipidémie et une lipémie postprandiale élevée. Afin de mieux comprendre la régulation de la distribution des lipides alimentaires, nous avons cherché quels étaient les facteurs pouvant affecter le niveau protéique de LSR. La leptine, hormone sécrétée par le tissu adipeux et connue pour son action d'hormone de satiété au niveau du système nerveux central, a été démontrée dans cette thèse comme modulant l'expression de LSR par la régulation de la transcription du gène *lsr*. La leptine est impliquée dans la régulation de la lipogénèse à travers SREBP-1. Grâce à l'utilisation d'un extrait de *Garcinia cambogia* contenant un inhibiteur de l'ATP citrate lyase, nous avons démontré une interaction importante entre les enzymes lipogéniques, l'expression de LSR et d'autres récepteurs lipoprotéiques, afin de maintenir un équilibre entre la synthèse de lipides endogènes et l'apport alimentaire de lipides exogènes. Soumises à un régime hyperlipidique, les souris sauvages montrent une diminution de l'expression des enzymes lipogéniques hépatiques, aggravée chez les souris LSR^{+/-}. Ces résultats indiquent qu'il existe un mécanisme de maintien de l'équilibre entre la lipogénèse (synthèse endogène de lipides), la lipolyse (utilisation lipidique comme substrat énergétique) et le stockage de lipides à travers une forte interaction entre les enzymes lipogéniques et LSR.

Mots clefs : métabolisme lipidique, lipoprotéines, récepteur de lipoprotéines activé par la lipolyse, lipogénèse, leptine, ATP citrate lyase

ROLE OF LIPOPROTEIN RECEPTOR, LSR, IN THE REGULATION OF TRANSPORT AND DISTRIBUTION OF DIETARY LIPIDS

Abstract: The hepatic lipoprotein receptor LSR is involved in the clearance of triglyceride-rich lipoproteins including chylomicrons remnants during the post-prandial phase. Reduced LSR protein expression in mice (LSR^{+/-}) is associated with dyslipidemia and increased postprandial lipemia; these mice exhibit increased weight gain with aging or when placed under a high-fat diet. In order to better understand the regulation of the distribution of dietary lipids, we looked for factors that could regulate LSR protein levels. Leptin is a hormone secreted by the adipose tissue that is a centrally-acting satiety factor, and was demonstrated to modulate LSR mRNA and protein expression through the modulation of transcription of the gene *lsr*. Leptin has been reported to be involved in the control of lipogenesis through SREBP-1c. Using *Garcinia cambogia* extract containing an inhibitor of ATP citrate lyase, we demonstrated that there is an important link between lipogenic enzymes and LSR protein levels and with other lipoprotein receptors that provides the means to maintain a balance between endogenous lipid synthesis and dietary intake of exogenous lipids. When exogenous lipid intake is increased in the form of a high-fat diet, mice exhibited a decrease in hepatic lipogenic enzymes expression, but a deficiency of LSR led to increased lipid content in the peripheral tissues. These results suggest the presence of mechanisms for the maintenance for the balance between lipogenesis (*de novo* endogenous lipid synthesis), lipolysis (lipids used as energy substrate), and lipid storage through an important link between lipogenic enzymes and LSR.

Key words: lipid metabolism, lipoprotein, lipolysis stimulated lipoprotein receptor, lipogenesis, leptin, ATP citrate lyase.