

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE « HOUARI BOUMEDIENE »

FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES



THESE DE DOCTORAT

Présentée à l'USTHB pour l'obtention du grade de

DOCTEUR

Biologie et Physiologie Animale

Par Mlle HAMLAT Nadjiba

Sujet

**LIPOGENESE DE LA PAROI ARTERIELLE : REGULATION DE
SON EXPRESSION ET ANOMALIES DANS L'INSULINO-
RESISTANCE ET LE DIABETE.**

Soutenue publiquement le 06/06/2010, devant le jury composé de :

Mme BENAZZOUG Y : Professeur à l'USTHB. Présidente.
M. BEYLOT M : Docteur à l'Université Claude Bernard Lyon 1. Directeur de thèse.
Mme AOUICHAT-BOUGUERRA S: Professeur à l'USTHB.Directrice de thèse.
M. DELARUE J : Professeur à l'Université de Bretagne Occidentale Brest. . . . Examineur.
FEUGIER P : Professeur à l'Université Claude Bernard Lyon 1.Examineur.
Mme AMIRAT Z : Professeur à l'USTHB. Examinatrice.

REMERCIEMENTS

Ce travail aujourd'hui achevé, je dois donc me soumettre à l'exercice Ô combien important des remerciements. Daniel Pennac l'avait bien compris et en mesure toute la difficulté dans son roman « Merci » dont voici un extrait : (Le lauréat remercie d'abord le premier cercle : les notables, les importants, le jury, sans qui la récompense ne lui aurait pas été attribuée ; puis le deuxième cercle : le public, vous en l'occurrence, qui êtes ici à vous réjouir pour moi, ce soir, et c'est très gentil à vous, vraiment, je vous en remercie, ça me ... puis le troisième cercle : « l'équipe », sans laquelle son œuvre ne serait pas ce qu'elle est : « je tiens surtout à remercier mon équipe... », « tous ceux qui ... », « tous ceux grâce à qui mon ... », « tous ceux sans qui je n'aurais pas pu ... », je leur offre ce ...)

A mon tour de personnaliser le phrasé pour exprimer ma gratitude et l'amitié que je porte aux nombreuses personnes qui ont participé de près ou de loin à ce travail.

Ma thèse a avant tout été soutenue et financée par l'université Claude Bernard Lyon 1. Je tiens à exprimer ma gratitude et ma reconnaissance au président de l'université Monsieur Lionel COLLET ainsi qu'à son aimable personnel, je ne pourrais oublier la gentillesse et l'aide préciseuse de Madame Françoise COURT et Monsieur Jaques GORGERET. Au sein de l'université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene, je remercie le Recteur Monsieur Benali BENZAGHOU et la Doyenne de la faculté des sciences biologiques (FSB) Madame Fatima LARABA pour m'avoir facilité certaines démarches administratives ainsi que tous les membres du conseil scientifique et le personnel de de la FSB.

Il me faut au moins trois chapitres pour pouvoir exprimer, ma reconnaissance, mes remerciements et mon indéfectible attachement à mon directeur de thèse Monsieur Michel Beylot. Le premier chapitre je l'appellerai inscription : Je me rappelle toujours de sa réponse à mon premier mail quand je lui ai écrit pour demander de l'aide dans la réalisation de ma thèse, il m'a répondu en me disant « Il me faut 2-3 jours pour réfléchir à la meilleure solution, mais a priori, on doit pouvoir vous aider... », sa réponse était un vrai rayon de soleil pour moi, et c'est à partir de là qu'ont commencé nos échanges de mails qui ont abouti à l'obtention d'une bourse du ministère de l'enseignement et de la recherche français. Le deuxième chapitre est celui de l'encadrement scientifique, mon directeur m'a appris à ne jamais dire qu'on ne peut pas faire quelque chose sans avoir essayé. Il m'a permis de développer la rigueur et l'exigence scientifique indispensables au bien menée d'une thèse et plus généralement d'un projet de recherche. J'ajoute ma reconnaissance pour son suivi incisif qui a guidé patiemment ma démarche de recherche. Attentif et très exigeant vis-à-vis de mes idées, il m'a permis d'aller là où mes pas me portaient. Il m'a accompagné de sa longue expérience pour que je ne m'égare pas en chemin et m'a éclairé dans les recoins sombres de ma progression. J'en tire un grand apprentissage. Je lui dis également un grand MERCI pour le temps passé à me lire et me relire en particulier ces derniers temps pour les articles, pour la thèse... Le dernier chapitre, je l'ai appelé « Relations humaines » Monsieur Beylot était toujours très attentif et rassurant face à mes soucis avec l'administration Française ou Algérienne, il était ma famille d'accueil à Lyon.

J'exprime ma profonde reconnaissance à Madame Souhila AOUICHAT-BOUGUERRA, ma directrice depuis mon magister, je la remercie pour avoir suivi et encadré mes travaux de thèse depuis Alger. Merci d'avoir toujours été là, même quand ça n'allait pas. Merci d'avoir cru en moi, même dans les moments difficiles. Merci pour votre aide, pour votre soutien de tous les instants, pour votre grande, que dis-je, pour votre immense disponibilité et pour les coups de fil nocturne et vos mails noctambules. Je ne pourrais oublier de vous remercier pour votre savoir faire et votre aide précieuse dans toutes mes démarches administratives. Je vous remercie également pour la lecture et la relecture de mon manuscrit et toutes les corrections apportées malgré votre emploi du temps très occupé par la pédagogie et l'enseignement. Merci d'avoir autant contribué à la « construction » de la scientifique que je suis devenue.

Je remercie le jury de thèse d'avoir accepté d'examiner mes travaux : Jacques DELARUE et Zaina AMIRAT qui en sont les rapporteurs ainsi que Patrick FEUGIER et Yasmina BENAZZOUG.

A Madame Yasmina Benazzoug, je voudrais exprimer toute ma reconnaissance pour votre soutien moral et affectif, merci d'avoir été toujours présente pour alimenter la réflexion, débattre et écarter les doutes. Merci de m'avoir aidé de nombreuses fois à ne pas passer de l'autre côté du cheval ! par vos mails et sms réguliers. Je ne vous remercierai jamais assez pour vos orientations et votre aide dans toutes mes démarches administratives à Alger ou ici en France.

Cette thèse a été menée au sein du laboratoire de l'INSERM-ERI22/EA4173 « Aggressions Vasculaires et Réponses Tissulaires » dirigé par Monsieur Giampiero Bricca, qui m'a chaleureusement accueilli dans son laboratoire. Je voudrais également le remercier pour les réunions d'équipe régulières qui ont su dynamiser le travail de chacun. Au sein de cette équipe je tiens à remercier tous les membres pour leurs sympathiques encouragements et leurs gestes d'attention, je pense à Catherine CERUTTI, Claire BARDEL, Christian PAULTRE, Marie-Paule PAULTRE, Liliana LEGEDZ, Hanane AYARI, Dominique LANGLOIS, Jaques-Yuan LI, Lydie BAREK, Peggy DEL-CARMINE, Marie-Christine CHABLIN, Florence BOINET et les adorables secrétaires Martine MASCARAS et Juliette CAMPANA. Monsieur Jaques RANDON, j'ai eu de la chance d'avoir partagé avec vous le même bureau à Laennec ensuite à Rockefeller, merci pour vos attentions très touchantes, merci aussi de m'avoir inculqué les notions de génétique moléculaire notamment en ce qui concerne la RT-PCR ainsi que l'utilisation des logiciels pour le choix des amorces (Oligo6 et PrimerPremier) mais aussi pour votre aide inestimable dans le domaine de l'informatique, vous m'avez installé les logiciels dont j'avais extrêmement besoin (GraphPad Prism 5 et EndNote) sur mon ordinateur, chose qui n'était pas facile avec mon Windows Vista. Je tiens à témoigner ma reconnaissance et mon amitié à Olivier LOHEZ, pour ses conseils toujours enrichissants, son écoute, sa disponibilité et son aide pour l'utilisation d'EndNote. Depuis ton arrivée au labo, j'ai été très sensible à l'extrême courtoisie de ton contact et à ta bonne humeur.

Mes premiers pas dans la biologie moléculaire ont été guidés par Fabien Forcheron, son savoir faire, son dynamisme et son intelligence ont été pour moi un enrichissement quotidien. Sache que tu as été mon modèle de thésard au cours de ma thèse, j'espère avoir une autre occasion de travailler avec toi. J'ai une pensée particulière à Coralie Metais qui m'a accompagné dans les 1ères extractions d'ARNt et les PCR quantitatives.

Merci à toi Samia d'être une amie ou plutôt une sœur fidèle toujours à l'écoute, tes passages à Lyon ont été pour moi un vrai rayon de soleil. Je te souhaite une belle réussite pour ta thèse qui arrive à grands pas.

Merci également à tous les ami(e)s et étudiants qui ont croisé ma route durant ces dernières années de thèse. Certaines de ces rencontres ont été magiques et pleines de vie... mais on sait dès le début que c'est fait pour durer. Je pense à Houcine Dab, Ahmed Hodroge, Wassim Hodroj, Mohamed Hneino et Dandana Azza, merci pour vos mails et votre soutien régulier.

Je voudrais remercier à l'infini mes parents, mes frères et sœurs. Notre noyau familial correspond à une merveilleuse bulle d'oxygène et de bonheur. Sans eux rien de tout cela ne serait. C'est grâce à vous que j'ai pu faire mes études comme bon me semblait. Vos conseils m'ont aidé tout au long de ces étapes et petit à petit j'ai pu me construire. Grâce à vous j'ai pu gravir les pentes qui me semblaient infranchissables. Merci de m'avoir poussé dans les montées, de m'avoir freiné dans les descentes et de m'avoir tendu la main à plusieurs reprises pour franchir les obstacles rencontrés...Avoir une famille aussi géniale ce n'est pas donné à tout le monde.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	7
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	9
A. Voies de la lipogenèse	9
1- Structure et nomenclature des acides gras	9
2- Synthèse de <i>nov</i> o des acides gras	11
B. Régulation de la lipogenèse	17
B.1 Régulation à court terme de l'acétyl CoA carboxylase	17
B.1.1 Régulation par phosphorylation-déphosphorylation	17
B.1.2 Régulation allostérique	18
B.2 Régulation à long terme	
B.2.1 Les facteurs de transcription Sterol Regulatory Element Binding Protein (SREBP)	19
B.2.2 Le facteur de transcription Carbohydrate response element binding protein (ChREBP)	28
B.2.3 Liver X receptor	33
B.2.4 Pregnane X receptor	38
B.2.5 Régulation par les hormones thyroïdiennes	40
B.2.6 Les « Peroxisome Proliferator-activated Receptor » PPARs	43
C. La lipogenèse dans le tissu adipeux	48
D. La lipogenèse dans le muscle squelettique	50
E. La lipogenèse dans la paroi artérielle et les CMLV	52
MATERIEL & METHODES	57
I. MATERIEL BIOLOGIQUE	57
Animaux étudiés	57
1- Rats Zucker obèses	57
2- Rats Zucker diabétiques (ZDF)	57
3- <i>Psammomys obesus</i>	58
4- Souris traitées avec l'agoniste de LXR	60
II. TECHNIQUES OPERATOIRES ET ANALYTIQUES	60
III. ETUDE DANS LES PLAQUES ATHEROMATEUSES CHEZ L'HOMME	60
IV. CULTURE DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES VASCULAIRES	61
V. EXTRACTION TISSULAIRE ET CELLULAIRE DES LIPIDES	62
VI. MESURE DE LA LIPOGENESE DANS LES CMLV	62
VII. MESURE DES ARNm	64
A. EXTRACTION TISSULAIRE ET CELLULAIRE DES ARN TOTAUX	64
B. TRANSCRIPTION INVERSE	64
C. PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL	65
VIII. ANALYSE DES RESULTATS	67

RESULTATS

II	Données <i>in vivo</i>	68
	A. Paramètres biochimiques plasmatiques	68
	B. Expression hépatique des gènes de la lipogenèse	71
	C. Triglycérides et lipogenèse dans la paroi artérielle	73
	C.1 Rats Zucker diabétiques et obèses	73
	C.1.1 Triglycérides dans la paroi artérielle	73
	C.1 2 Expression des gènes de la lipogenèse dans la paroi artérielle de rat Zucker diabétique et obèse	73
	C.1 3 Expression des gènes responsables de la captation d'acides gras libres chez le rat Zucker diabétique et obèse	75
	D. Histologie et lipogenèse dans la paroi artérielle chez <i>Psammomys obesus</i>	76
	D.1 Etude structurale de l'aorte chez <i>Psammomys obesus</i> soumis au régime hyperlipidique	76
	D.2 Etude des gènes de la lipogenèse dans l'aorte de <i>Psammomys obesus</i>	78
	E. Expression des gènes de la lipogenèse dans la plaque athéromateuse humaine	78
II	Données <i>in vitro</i>	80
	1. Expression basale des gènes de la lipogenèse dans les cellules musculaires lisses vasculaires	80
	2. Régulation de la lipogenèse dans les CMLV	81
	2.1 Régulation par le glucose et les facteurs adipogéniques	81
	2.2 Régulation par l'insuline	87
	2.3 Régulation par la triiodothyronine et l'angiotensine II	91
	2.4 Régulation par les récepteurs nucléaires LXR et/ou PXR	93
	DISCUSSION	102
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	108
	ARTICLES PUBLIES	
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	110
	ANNEXES	118

ABREVIATIONS

ABCA1	ATP Binding Cassette A 1
ABCG1	ATP Binding Cassette G 1
ACC-1	Acétyl Co-A Carboxylase
ADM	Adipocytic differentiation medium
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AGNE	Acides gras non estérifiés
Ag II	Angiotensine II
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATR	Angiotensin type receptor
ChREBP	Carbohydrate response element binding protein
CMLV	Cellules musculaires lisses vasculaires
CO	Contrôles obèses
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
CZ	Contrôles Zucker diabétiques
dATP	Adénosine triphosphate
dCTP	Cytidine triphosphate
dGTP	Guanidine triphosphate
DNL	De novo lipogenesis
FAS	Fatty acid synthase
FAT	Fatty acid transporter
FATP	Fatty acid transfert protein
GK	Glucokinase
LDLr	Low density lipoprotein receptor
LPK	Liver protein kinase
LPL	Lipoprotein lipase
LXR	Liver X receptor
LXRE	Element de réponse de LXR
PCN	Pregnen-3B-OL-20-ONE-16A-Carbonitrile
PCR	Polymerase Chain Reaction
PUFA	Polyunsaturated fatty acid
PXR	Pregnane X receptor
SCD-1	Stearyl CoA desaturase
SREBP	Sterol response element binding protein
T3	Triiodothyronine
TG	Triglycérides
TR	Thyroid receptor
UPR	Unfolded protein response
VLDLr	Very low density lipoprotein receptor
ZDF	Zucker diabétiques
ZO	Zucker obèses

INTRODUCTION

L'accumulation excessive de substrats lipidiques dans des tissus non adipeux a de sérieux effets néfastes sur les fonctions cellulaires (lipotoxicité) et peut contribuer au développement de l'insulino-résistance. Plusieurs études ont montré une relation inverse entre l'accumulation tissulaire de lipides et la sensibilité à l'insuline du métabolisme du glucose dans le foie et le muscle squelettique. Dans des études similaires, l'accumulation tissulaire de lipides est souvent évaluée par la mesure du contenu en triglycérides (TG). Cependant des études récentes ont clairement montré que les effets délétères ne sont pas dus à l'accumulation des TG mais à d'autres métabolites de lipides comme le palmitate, le diacylglycérol et le céramide. La paroi artérielle des rats Zucker obèses est insulino-résistante. Cependant cette résistance est limitée à la voie PI3-kinase (Jiang *et al.*, 1999). De plus, cette voie a été également trouvée insulino-résistante dans les cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC) des patients diabétiques (Hodroj *et al.*, 2007). Les mécanismes responsables de cette résistance ne sont pas encore élucidés. Elle pourrait être le résultat de concentrations plasmatiques importantes de cytokines comme le TNF α , d'un taux élevé d'angiotensine II (AngII) ou d'une surexpression des composants du système rénine-angiotensine (Hodroj *et al.*, 2007). Cette résistance pourrait être due également à une accumulation excessive de substrats lipidiques. En effet, la paroi artérielle accumule des TG avec l'âge (Davies *et al.*, 2005). De plus, les cellules spumeuses des plaques athéromateuses accumulent non seulement du cholestérol mais aussi des quantités significatives de TG (8 – 10 % des lipides totaux). Ces TG cellulaires modifient l'état physique du cholestérol estérifié stocké et ceci pourrait affecter la voie par laquelle il est hydrolysé et éliminé. Ainsi, l'accumulation des TG pourrait jouer un rôle dans l'athérome. La synthèse des TG, ainsi que l'estérification du cholestérol nécessitent de longues chaînes d'acyl-CoA. L'acyl-CoA provient de la captation des lipides circulants (des acides gras non estérifiés plasmatiques (NEFA) ou des acides gras des TG des lipoprotéines) mais également de la synthèse *in situ*, la voie de la lipogenèse *de novo* (DNL). La paroi artérielle, les cellules spumeuses, les macrophages et les cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC) incorporent de l'acétate marqué dans les phospholipides et les TG. Les travaux de Davies *et al.* (2005) ont montré que les CMLV expriment les gènes de la lipogenèse comme SREBP1-c (sterol regulatory element binding protein 1-c), le facteur de transcription qui transmet les actions lipogéniques de l'insuline et l'acide gras synthase (FAS). Ces expressions et l'accumulation intracellulaire des TG, sont augmentées par la mise en culture des CMLV dans un milieu de différenciation adipocytaire (ADM). Par ailleurs, le TO901317, agoniste de LXR, stimule aussi l'expression de SREBP1-c et de FAS suggérant que l'action lipogénique de LXR décrite dans le foie, le tissu adipeux et le muscle squelettique est aussi présente dans les CMLV. Davies *et al.* (2005) ont observé que FAS et SREBP1-c sont exprimés dans les lésions athérosclérotiques chez l'homme et suggèrent qu'ils influent sur la lipogenèse dans les CMLV et que l'accumulation des lipides pourrait être impliquée dans le développement de l'athérome. Cette éventualité doit être prise en considération pour le développement des agonistes nucléaires dans le but du traitement de l'athérosclérose.

L'insulino-résistance et le diabète de type 2 sont des facteurs de risque de l'athérosclérose et sont caractérisés par des concentrations élevées d'insuline et/ou de glucose. L'expression de la lipogenèse étant stimulée dans le foie par l'insuline et le glucose et diminuée dans le muscle squelettique des sujets insulino-résistants et diabétiques de type 2, nous nous sommes intéressés à la lipogenèse dans la paroi artérielle dont la stimulation pourrait être à l'origine de l'accumulation tissulaire de lipides aggravant davantage la résistance locale à l'insuline et pourrait contribuer à l'accélération de l'athérosclérose.

Dans le cadre de cette étude nous nous sommes proposés de :

- Quantifier les TG dans la paroi artérielle chez des modèles expérimentaux d'insulino-résistance et du diabète puis d'analyser la lipogenèse par la mesure de l'expression des gènes (FAS, ACC-1) et des facteurs de transcription (ChREBP, SREBP1-c) impliqués.
- Etudier la réponse de la lipogenèse dans les CMLV en situation d'insulino-résistance et après stimulation par l'insuline et le glucose.
- En plus, l'agoniste de LXR (TO901317) utilisé par Davies *et al.* (2005) a été identifié récemment comme un agoniste mixte de LXR et de PXR (Mitro *et al.*, 2007b). PXR stimule la lipogenèse hépatique et il est exprimé au niveau vasculaire. Par conséquent, nous vérifions si les effets du TO901317 sont transmis par l'activation de LXR ou de PXR.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

Ces rappels bibliographiques portent d'abord sur la description biochimique des voies de la lipogenèse. Nous étudierons ensuite la régulation à court et à long terme de la lipogenèse en prenant comme modèle la régulation au niveau hépatique, qui est la mieux connue, avant d'envisager cette régulation au niveau du tissu adipeux, puis du muscle squelettique. Nous terminerons par les données connues au niveau de la paroi artérielle et des cellules musculaires lisses, tissu et cellules qui font l'objet de notre travail de thèse.

A. Voies de la lipogenèse

Les acides gras appartiennent à la classe des lipides et sont présents chez tous les êtres vivants. Les acides gras sont principalement estérifiés à des fonctions alcools présentes sur le glycérol (triglycérides, phospholipides) ou le cholestérol (cholestérol estérifié). Des petites quantités se retrouvent sous forme d'acides gras non estérifiés, désignés sous le terme d'acides gras libres.

Les acides gras ont au moins quatre rôles physiologiques majeurs :

- rôle structural : ils entrent dans la composition des membranes biologiques
- rôle énergétique : carburant énergétique essentiel pour de nombreux types cellulaires
- précurseurs des eicosanoïdes : prostaglandines et leucotriènes
- rôle de médiateur : régulation de la transmission des signaux à l'intérieur des cellules

Les acides gras peuvent être apportés par l'alimentation ou synthétisés par l'organisme par la voie de la lipogenèse

1- Structure et nomenclature des acides gras :

Les acides gras sont des acides organiques possédant une chaîne hydrocarbonée. Ils se distinguent par leur nombre de carbones et de doubles liaisons. Les acides gras trouvés dans les graisses naturelles sont des molécules à chaîne linéaire et contiennent un nombre pair d'atomes de carbone car ils sont synthétisés à partir d'éléments à deux carbones. La numérotation de la chaîne carbonée part du carbone du groupement carboxyle (carbone n°1). L'atome adjacent au carbone carboxylique (n°2) est aussi connu comme étant le carbone α . L'atome de carbone n°3 est le carbone β et le carbone méthylique terminal est connu sous le nom de carbone ω ou carbone n.

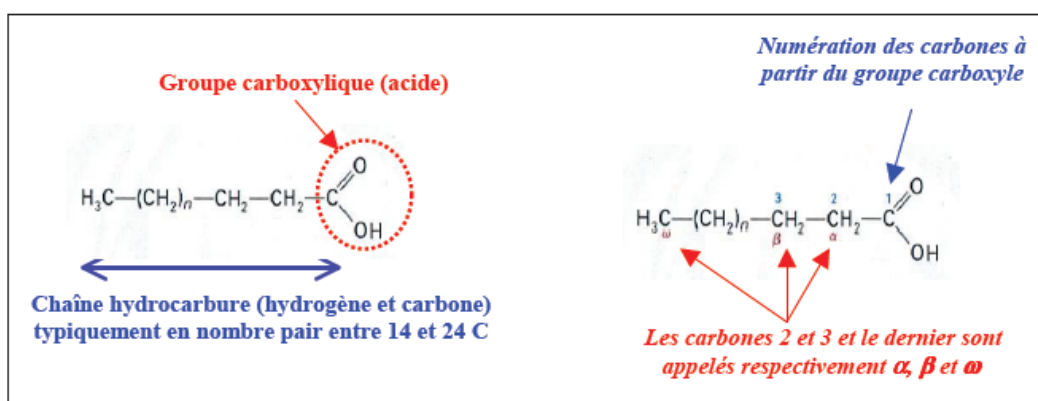


Fig. 1 Structure d'un acide gras.

Suivant la longueur de sa chaîne carbonée, un acide gras est dit à :

- courte chaîne si le nombre d'atomes de carbone est ≤ 6
- moyenne chaîne si le nombre d'atomes de carbone est entre 8 et 14

- longue chaîne si le nombre d'atomes de carbone est de 16 à 20
- très longue chaîne si le nombre d'atomes de carbones est ≥ 20 .

Le nom d'un acide gras est formé à partir du nom de l'hydrocarbure à même nombre d'atomes de carbone suivi du suffixe –anoïque pour les acides gras sans double liaison et par –énoïque pour les acides gras avec double(s) liaison(s).

Certains acides gras n'ont pas de double liaison, ils sont dits saturés. D'autres comportent une ou plusieurs doubles liaisons, ils sont alors dits acides gras monoinsaturés (AGMI) ou acides gras polyinsaturés (AGPI) respectivement (Fig.2).

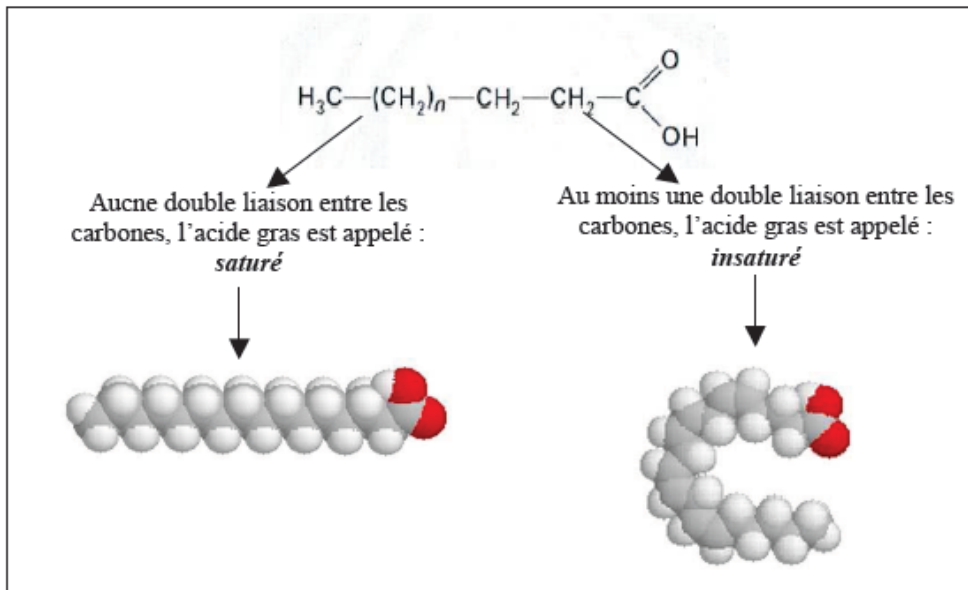


Fig.2 Structures des acides gras saturés et des acides gras insaturés.

La position de la première double liaison est toujours comptabilisée à partir de l'extrémité méthyle. Pour tout AGPI, les doubles liaisons sont toujours espacées d'un groupe méthylène et la désaturation est toujours réalisée en direction du groupe carboxyle. Diverses conventions sont utilisées pour indiquer le nombre et la position de la ou des doubles liaisons.

Comparés aux végétaux, l'homme et l'animal sont incapables d'insérer des doubles liaisons en position n-6 et n-3 sur des acides gras à 18 carbones. Autrement dit, le règne animal est incapable de synthétiser les précurseurs des séries n-6 et n-3. Ces acides gras sont alors considérés comme les acides gras essentiels et doivent donc être obligatoirement apportés par l'alimentation. Ces acides gras essentiels sont représentés par l'acide linoléique (LA, C18 :2 n-6) précurseur de la série ω 6 et l'acide linolénique (ALA, C18 :3 n-3) précurseur de la série ω 3. Toutefois, l'homme et l'animal peuvent ajouter des doubles liaisons et allonger les chaînes carbonées de ces acides gras essentiels. Ces réactions sont catalysées à partir de l'extrémité carboxyle à l'aide de désaturases et d'élongases. A noter cependant que les réactions de désaturation et d'élongation sont lentes et limitées et que l'activité de ces enzymes n'est pas toujours suffisante pour fournir à l'organisme, une quantité nécessaire en AGPI à longues chaînes. Il est donc souhaitable que l'alimentation fournisse des acides gras essentiels en quantité adaptée et ainsi que leurs dérivés à longues et très longues chaînes.

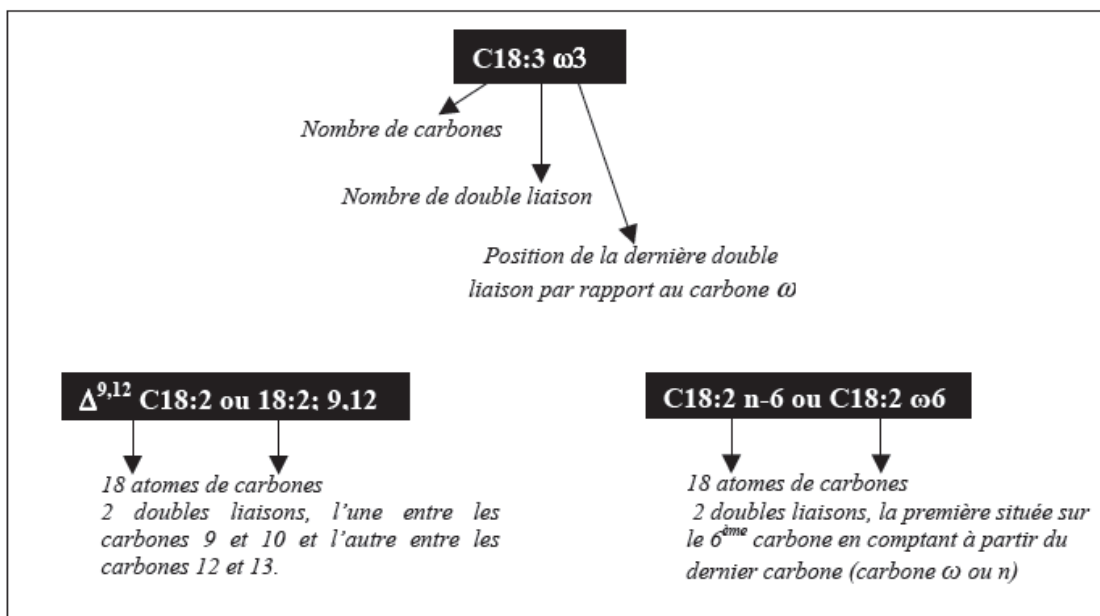


Fig. 3 Nomenclature des acides gras.

2- Synthèse de *novo* des acides gras :

Le foie et le tissu adipeux sont les principaux sites de synthèse des acides gras. La biosynthèse des acides gras saturés de 4 à 16 atomes de carbones se déroule dans le cytosol. Pour le reste des acides gras, la synthèse se poursuit dans le réticulum endoplasmique et le peroxysome.

Toute synthèse d'acides gras nécessite de l'énergie (ATP), du pouvoir réducteur (NADPH, H^+ et NADH, H^+) et un précurseur, l'acétyl Co-A. En préliminaire à toute synthèse d'acide gras, deux étapes sont indispensables :

1- Transfert de l'acétyl Co-A de la mitochondrie vers le cytosol

L'acétyl Co-A formé dans la mitochondrie (durant la glycolyse, la dégradation des alcools ou le métabolisme des acides aminés) doit être transporté vers le cytosol pour servir de précurseur à la synthèse des acides gras (fig.4). Pour cela, du pyruvate est exporté du cytosol vers la matrice mitochondriale pour être carboxylé en oxaloacétate par la pyruvate carboxylase. L'oxaloacétate et l'acétyl Co-A se condensent pour former du citrate qui traverse ensuite la membrane mitochondriale interne grâce à une translocase. Sous l'action d'une citrate lyase ATP-dépendante et en présence de HSCoA, le citrate est clivé en acétyl Co-A et en oxaloacétate lequel, sous l'action de la malate déshydrogénase et de l'enzyme malique, régénère le pyruvate et permet la formation de NADPH, H^+ nécessaire à l'activité des réductases lors de la biosynthèse des acides gras.

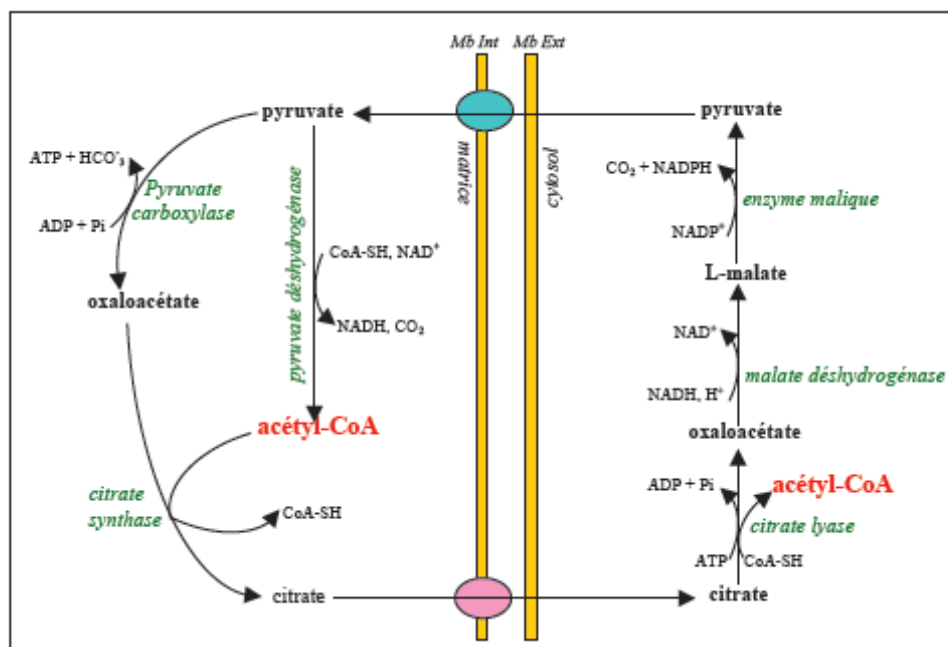


Fig. 4 Transfert de l'acétyl Co-A de la mitochondrie vers le cytosol.

2- Carboxylation de l'acétyl Co-A en malonyl-CoA

L'acétyl Co-A carboxylase catalyse la carboxylation de l'acétyl Co-A en malonyl Co-A (fig.5). Le groupement prosthétique de cette enzyme est une biotine. Grâce à l'hydrolyse de l'ATP, ce bras prosthétique transfère le groupement carboxyle d'une molécule de bicarbonate sur une molécule d'acétyl Co-A pour former du malonyl-CoA, une molécule donneuse de carbones au cours de la synthèse des acides gras.

Cette étape est limitante pour la synthèse des acides gras car l'acétyl Co-A carboxylase est soumise à divers systèmes de régulation :

- l'ACC-1 est inhibée si la concentration d'acides gras activés (acyl-CoA) augmente dans le cytoplasme (lipogenèse ralentie, apports importants en acides gras alimentaires) ;
- L'acétyl Co-A carboxylase est stimulée si la quantité de citrate, d'origine mitochondriale, augmente dans le cytosol ;
- Les hormones contrôlent également l'ACC-1 par interconversion entre les formes phosphorylées ou non. L'insuline active l'enzyme par déphosphorylation via une protéine phosphatase. Le glucagon et l'adrénaline l'inactivent par phosphorylation via une protéine kinase (PKA) ; l'AMPK inactive aussi l'ACC1.

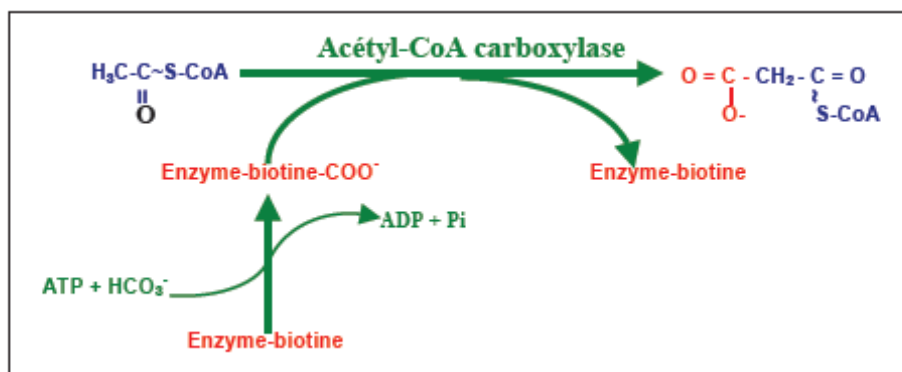


Fig. 5 Carboxylation de l'acétyl Co-A en malonyl Co-A.

Après ces deux étapes indispensables, peut ensuite débuter la synthèse des acides gras. On distinguera la synthèse des acides gras saturés de 4 à 16 carbones, la synthèse des acides gras saturés de plus de 16 carbones, la synthèse des AGMI et la synthèse des AGPI.

- Synthèse des acides gras saturés de 4 à 16 carbones

La synthèse des acides gras est catalysée par un complexe enzymatique : l'acide gras synthase. Comme l'illustre la figure 6, l'acide gras synthase est un homodimère dont chacune des chaînes peptidiques peut catalyser sept réactions distinctes nécessaires à la synthèse des acides gras saturés de 4 à 16 carbones.

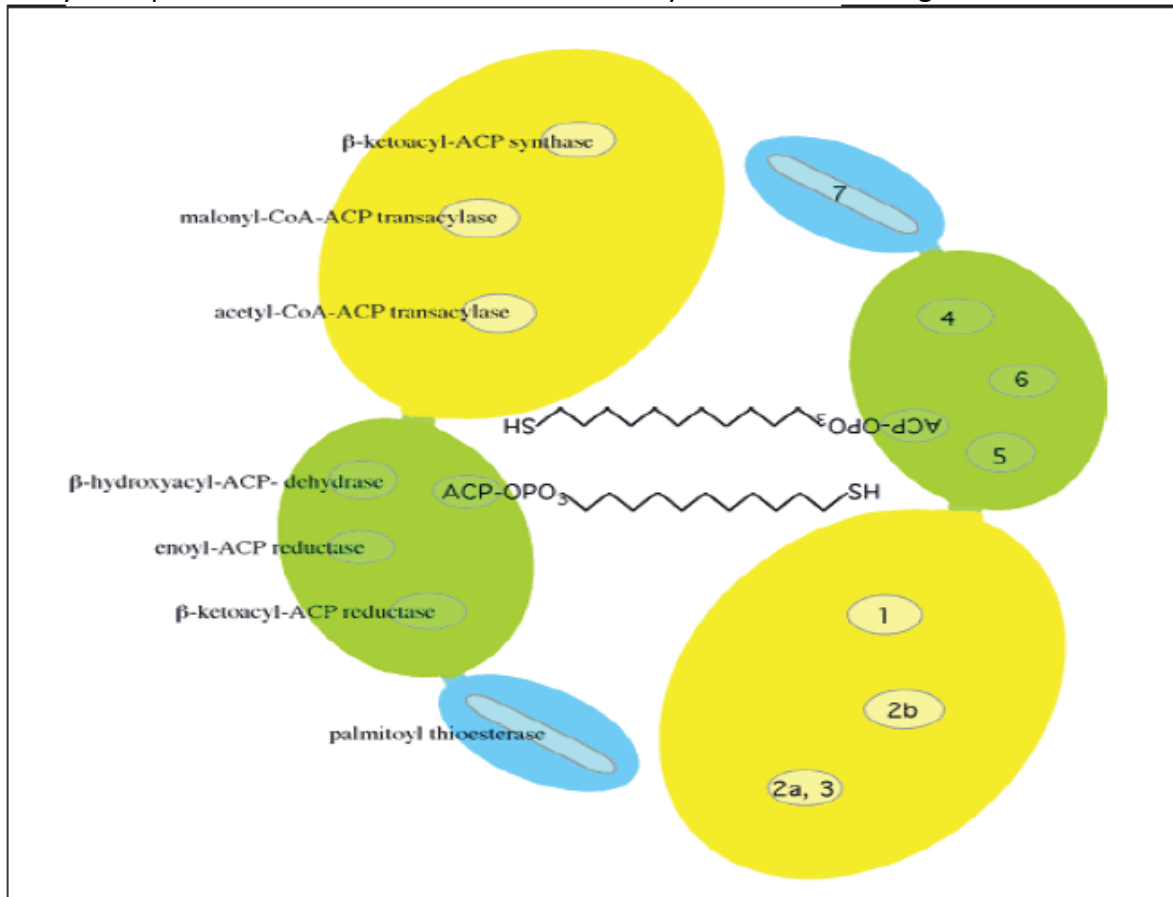


Fig. 6 Représentation schématique de l'acide gras synthase et de ses sites catalytiques.

Chaque moitié de l'acide gras synthase peut lier le substrat (acétyl ou acyl) sous forme d'un thioester au niveau de deux groupements thiol : un résidu cystéine (Cys-SH) et un groupement 4'-phosphopantéthéine (Pan-SH). Le Pan-SH est associé à un fragment du complexe que l'on nomme ACP (acyl carrier protein). Cette partie de l'enzyme fonctionne comme un long bras qui fixe le substrat et le déplace ensuite de centre actif en centre actif. Les activités enzymatiques se répartissent en trois domaines distincts. Le premier catalyse l'introduction du substrat (acétyl Co-A ou acyl Co-A) et du malonyl Co-A grâce aux activités [ACP]-S-acétyl et [ACP]-S-malonyl transférase. Les deux partenaires sont condensés par la 3-céto-acyl [ACP]-synthase. Le deuxième domaine réduit la chaîne d'acide gras en cours de synthèse à l'aide de la cétoacyl-[ACP]-réductase, la 3-hydroxyacyl-[ACP] déshydratase et l'énoyl-[ACP]-réductase. Le troisième domaine sert finalement à libérer le produit fini, l'acyl-CoA, grâce à l'activité acyl-[ACP]-hydrolase.

La biosynthèse des acides gras commence par le transfert d'un groupement acétyl sur un résidu Cys-SH et du transfert d'un résidu malonyl sur la Pan-SH de l'ACP. L'élongation de la chaîne a lieu par transfert d'un groupement acétyl sur le C-2 du résidu malonyl tandis que le groupement carboxyle libre du malonyl est clivé pour former du CO₂. Cette étape de condensation est ensuite suivie de réduction, déshydratation et à nouveau réduction. La séquence de ces quatre réactions constitue un tour. Le premier tour permet de synthétiser un acide gras de 4 carbones. A l'issue de ce tour, la synthèse peut être achevée, l'acide gras est alors libéré du complexe AGS par l'acyl-[ACP] hydrolase. L'élongation peut également continuer, le produit intermédiaire est alors transféré de l'ACP sur le résidu Cys-SH par l'acyl-transférase et

un nouveau tour commence quand le produit intermédiaire se condense à une nouvelle molécule de malonyl.

Après $n-1$ tours, l'acyl Co-A à $2n$ atomes de carbones est libéré du complexe acide gras-synthase par l'acyl-[ACP] hydrolase. Ce complexe enzymatique peut réaliser au maximum 7 tours et permet donc de synthétiser des acides gras jusqu'à 16 atomes de carbones (=palmitate). L'équation bilan est alors la suivante :



➤ Synthèse des acides gras saturés au-delà de 16 atomes de carbones

Au-delà d'une longueur de chaîne de 16 carbones, l'élongation des acides gras saturés s'effectue par un complexe enzymatique localisé sur la face cytoplasmique de la membrane du réticulum endoplasmique. Ce système d'élongation des acides gras est appelé système d'élongase ou FACES (Fatty Acid Chain Elongase System). Le système FACES réalise 4 réactions en chaîne décrites sur la figure 7 :

- Condensation de l'acyl-CoA avec du malonyl CoA par l'acide gras CoA ligase. Formation du β -kétoacyl-CoA.
- Réduction du β -kétoacyl-CoA en β -hydroxyacyl-CoA par la β -kétoacyl-CoA réductase. Réaction qui nécessite la présence des équivalents réduits NADH ou NADPH associés respectivement aux activités de la NADH cytochrome b5 réductase et de la NADPH cytochrome P-450 réductase. La cytochrome b5 est une hémoprotéine chargée de transférer 2 électrons du β -kétoacyl-CoA vers la réductase.
- Déshydratation du β -hydroxyacyl-CoA en trans-2-enoyl-CoA par la trans-2-enoyl-CoA.
- Réduction du trans-2-enoyl-CoA en (acyl+2 C)-CoA par une trans-2-enoyl-CoA réductase et nécessite la présence des équivalents réduits NADH ou NADPH.

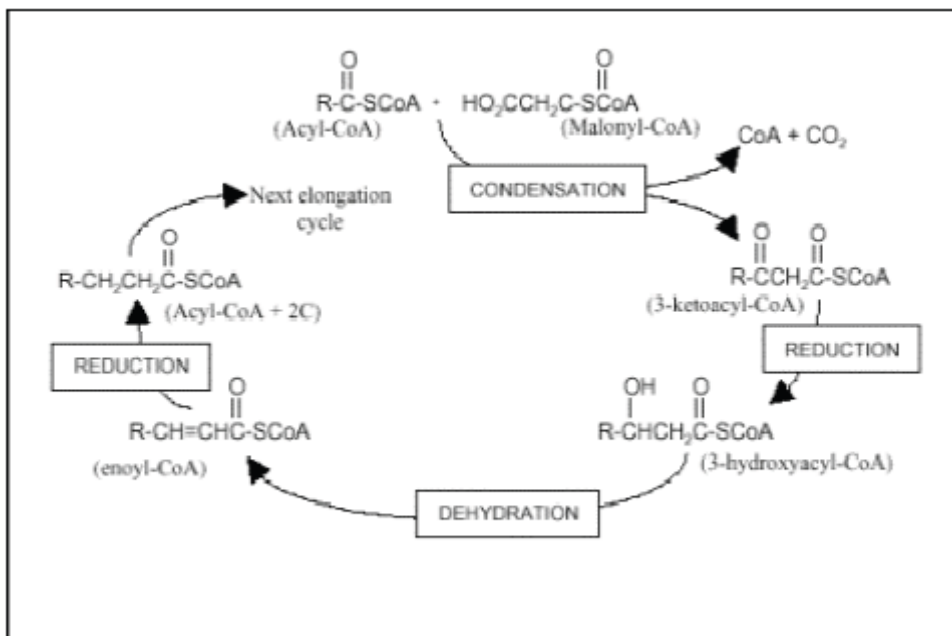


Fig. 7 Elongation des acides gras.

➤ Synthèse des AGMI

La synthèse des AGMI est réalisée grâce à la Δ^9 désaturase, un système enzymatique localisé principalement au niveau du foie, du cerveau, du pancréas, du tissu adipeux et des poumons (Kaestner *et al.*, 1989). La réaction se déroule dans le réticulum endoplasmique et consiste à synthétiser du palmitoléyl-CoA et de l'oléyl-CoA à partir des acides gras saturés correspondants. La Δ^9 désaturase porte alors le nom de l'acide gras à désaturer, il y'a donc la palmitoléyl-CoA désaturase et la stéaroyl-CoA désaturase.

Le système microsomal de la désaturase Δ^9 réalise 4 réactions en chaîne (fig. 8) :

- transfert de l'acyl-CoA sur le système désaturase grâce à l'acyl transférase
- réduction de l'acyl en hydroxyacyl par la NADH cytochrome b5 réductase ou la NADPH cytochrome P-450 réductase. La réaction nécessite également la présence de cyt b5 et d'O₂.
- déshydratation de l'hydroxyacyl en énoyl par une hydratase
- libération de l'énoyl sous forme d'énoyl-CoA par transfert d'un groupement CoA-SH sur l'énoyl par l'acyl-transférase.

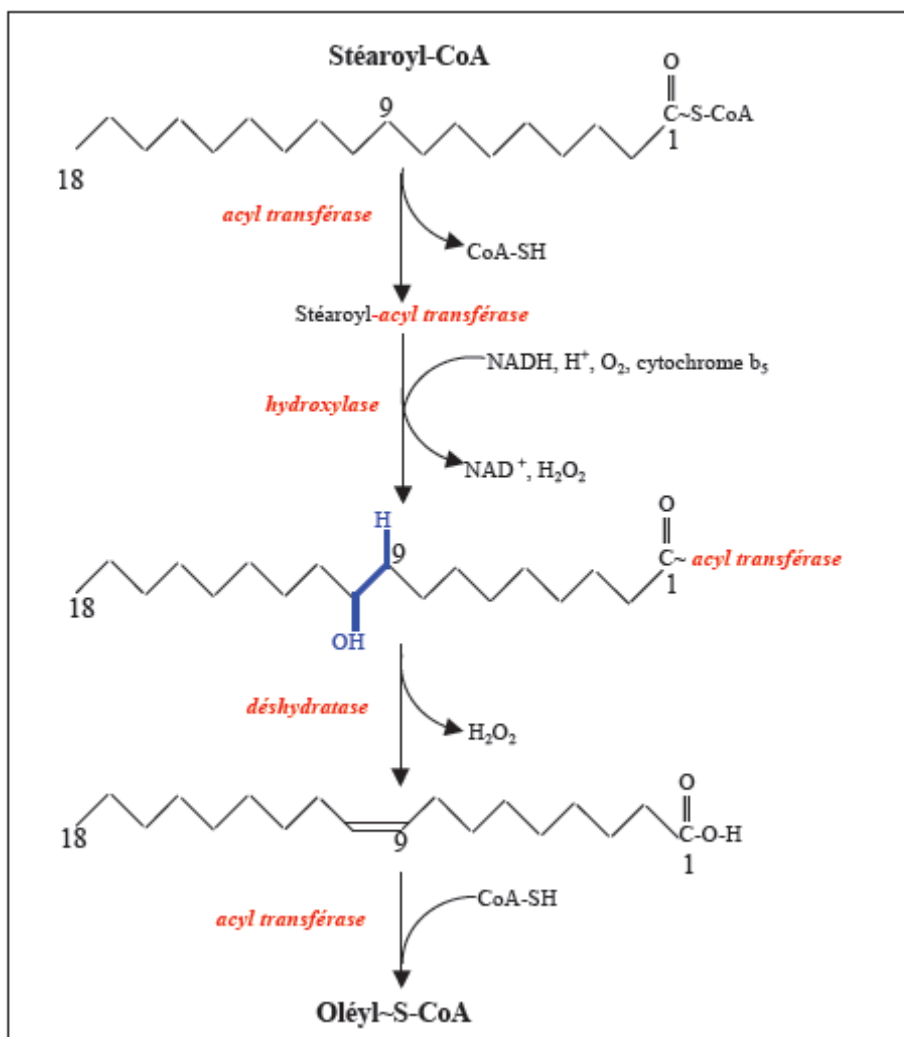


Fig. 8 Synthèse des acides gras monoinsaturés.

➤ synthèse des AGPI

La synthèse des AGPI est réalisée dans le réticulum endoplasmique et le peroxysome. La synthèse des AGPI débute avec les précurseurs, les acides gras essentiels LA et ALA. En effet, les désaturases Δ^{12} et Δ^{15} n'existent pas dans le règne animal, il nous est donc impossible de produire du LA et l'ALA qui doivent donc

être apportés par l'alimentation. Ces acides gras essentiels sont précurseurs respectivement des AGPI-TLC n-6 et n-3.

Les AGPI n-6 et n-3 suivent deux voies de synthèse parallèles impliquant au moins 3 systèmes enzymatiques : l'élongase, la désaturase Δ^6 et la désaturase Δ^5 . Le fonctionnement de ces enzymes est identique à celui décrit pour la synthèse des acides gras saturés et monoinsaturés. La seule différence étant que la désaturase Δ^6 insère une double liaison entre les carbones C-6 et C-5 et la désaturase Δ^5 insère une double liaison entre les carbones C-5 et C-4.

Comme l'indique la figure 9, la majorité des AGPI-TLC sont synthétisés dans le réticulum endoplasmique après désaturation et élongations successives. Après un maximum de deux désaturations et trois élongations, on aboutit au C24:5 n-6 et au C24:6 n-3 (Klenk and Mohrhauer, 1960). Pour palier à l'inexistence de la désaturase Δ^4 (Voss *et al.*, 1991), le C22:5 n-6 et du C22:6 n-3 sont synthétisés à partir des AGPI-TLC à 24 carbones par β -oxydation partielle peroxysomale (Osmundsen *et al.*, 1991). Cette rétroconversion peroxisomale est réalisée par des enzymes de la β -oxydation des AGPI-TLC : l'acyl-CoA oxydase, l'énoyl-CoA hydratase, 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase et la 3-kétoacyl-CoA thiolase (Lazarow, 1978).

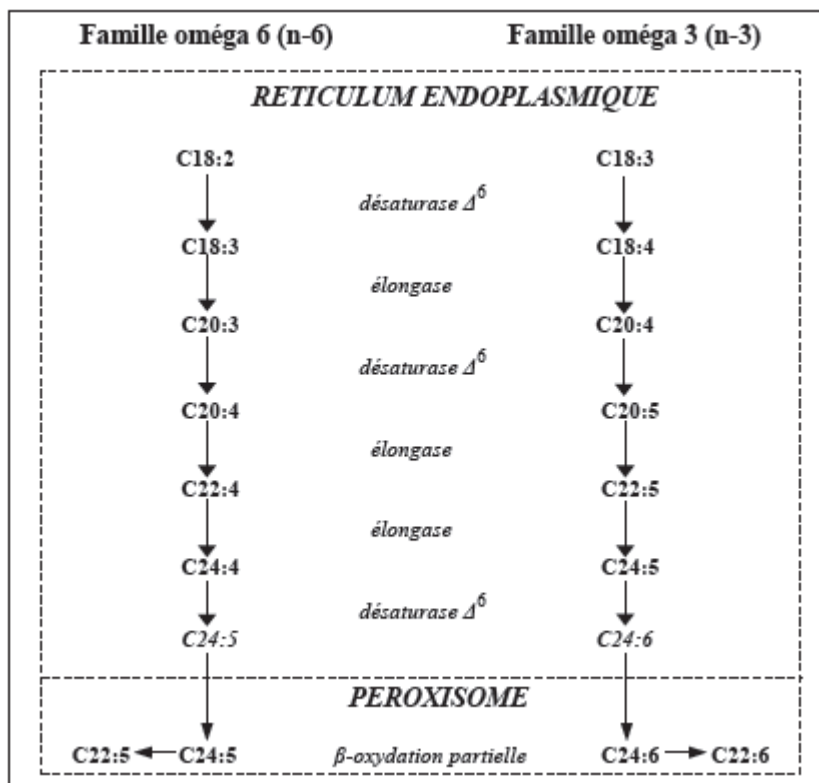


Fig. 9 Synthèse des acides gras polyinsaturés à très longues chaînes.

B. Régulation de la lipogenèse

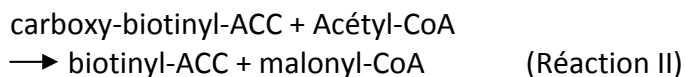
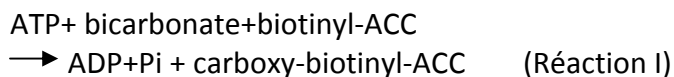
La lipogenèse est la voie métabolique qui permet de synthétiser des acides gras à partir de substrats non-lipidiques, essentiellement les glucides. Elle nécessite le métabolisme du glucose en pyruvate par la voie de la glycolyse permettant ainsi de fournir les carbones nécessaires à la synthèse des acides gras. L'activité des voies de la glycolyse et de la lipogenèse est étroitement contrôlée par les conditions nutritionnelles. Ainsi, un repas riche en hydrates de carbones stimule la synthèse des lipides alors que le jeûne ou un repas riche en lipides l'inhibe. Les enzymes impliquées dans ces voies incluent la glucokinase (GK) et la pyruvate kinase (L-PK) pour la glycolyse (dans le foie), l'acétyl Co-A carboxylase (ACC) et la *fatty acid synthase* (FAS) pour la lipogenèse (dans tous les tissus). La majorité de ces enzymes est contrôlée à

court terme par des mécanismes post-traductionnels et allostériques, mais la principale régulation s'effectue à long terme au niveau transcriptionnel. Ces régulations font intervenir des métabolites, essentiellement le glucose et les acides gras et des hormones, essentiellement l'insuline et le glucagon.

B.1 Régulation à court terme de l'acétyl CoA carboxylase

B.1.1 Régulation par phosphorylation-déphosphorylation

L'acétyl Co-A carboxylase (ACC) appartient à la famille des enzymes biotine-dépendantes ; la biotine est liée par une liaison covalente, par une holo-carboxylase synthétase, au groupe amine de résidu lysine de l'apo-ACC et joue un rôle de transporteur de carboxyle dans les deux étapes de la réaction d'ACC. La première réaction partielle (I) est ATP- dépendante et se déroule au niveau du site actif biotine-carboxylase formant le carboxyl-biotinyl-ACC. Dans la deuxième réaction partielle, le groupe carboxyl est transféré de la biotine à l'acétyl Co-A, générant le malonyl-CoA.



L'ACC est inhibée par phosphorylation par la PKA ou par la kinase dépendante de l'AMP (AMPK) et activée par déphosphorylation (action de l'insuline). Elle peut être phosphorylée par l'AMPK sur 3 sites qui correspondent dans la séquence complète aux Ser⁷⁹, Ser¹²⁰⁰ et Ser¹²¹⁵. La Ser⁷⁹ est localisée dans la région N terminale près du domaine de biotine carboxylase, alors que les Ser¹²⁰⁰ et Ser¹²¹⁵ sont localisées dans la région centrale de la séquence entre le domaine de la biotine carboxylase et la région C-terminale. La phosphorylation d'ACC-1 par l'AMPK se déroule rapidement au niveau du site Ser⁷⁹ corrélée avec son inactivation (Brownsey et al., 2006). Cependant, l'ACC-1 phosphorylée, peut être réactivée soit par une déphosphorylation soit par une protéolyse limitée qui supprime la région N-terminale de 10-20 kDa contenant la Ser⁷⁹. Ces résultats suggèrent que le site Ser⁷⁹ est responsable de l'inactivation par l'AMPK, et que la région N-terminale est le domaine régulateur qui inhibe l'enzyme quand il est phosphorylé. La PKA (cAMP-dependent protein kinase) phosphoryle les sites Ser⁷⁷ et Ser¹²⁰⁰ entraînant une inactivation modeste de l'enzyme. Cependant, l'inactivation par la PKA n'est pas démontrée in vivo alors que, plusieurs études ont montré que l'ACC-1 est la cible physiologique de l'AMPK.

L'AMPK peut être activée par le stress cellulaire comme le choc thermique ; il a été montré que ACC-1 devient inactive dans les hépatocytes isolés de rat en réponse à ces stress et que ceci est corrélé avec un arrêt de synthèse d'acides gras (Steinberg *et al.*, 2006).

L'activité de l'AMPK peut être modulée dans les cellules intactes par des drogues antidiabétiques comme la metformine.

Il a été bien montré que le foie exprime deux formes différentes d'ACC, ACC1 et ACC2 codées par des gènes différents. ACC2 possède comparativement à ACC-1, 150 acides aminés supplémentaires du côté N-terminal (peptide d'adressage vers la mitochondrie). ACC-1 est très exprimé notamment dans les tissus anaboliques (foie, tissu adipeux) alors qu'ACC-2 est surtout exprimé dans le muscle squelettique et cardiaque (tissus oxydatifs), les deux formes sont exprimées dans le foie. Les muscles squelettiques et cardiaque expriment peu la fatty acid synthase (FAS) et ont donc une activité lipogénique réduite. Ceci suggère, que le malonyl-CoA produit par ACC-2 doit avoir un rôle spécifique dans la régulation d'oxydation des acides gras. Il a été montré que le malonyl-CoA est un régulateur clé de l'oxydation des acides gras par sa capacité d'inhiber la carnitine palmitoyl-CoA acyltransférase (CPT1) et influençant la captation d'acides gras au niveau de la mitochondrie (Kreuz et al., 2009).

Il est établi que l'ACC-2 est impliquée dans la régulation de l'oxydation des acides gras et non dans leur synthèse. ACC-1 est cytoplasmique alors que ACC-2 est associée à la mitochondrie et co-localisée avec

CPT1. Les souris déficientes d'ACC-2 sont hyperphagiques et consomment 20-30% de plus de nutriments comparativement aux hétérozygotes et ont moins de tissu adipeux. Ceci peut être dû au taux élevé d'oxydation d'acides gras.

ACC-2 purifié du muscle de rat est phosphorylée et inactivée par l'AMPK, cependant les sites de phosphorylation ne sont pas étudiés en détails. Le site Ser⁷⁹ d'ACC-1 (et non pas les sites Ser¹²⁰⁰ ou Ser¹²¹⁵) est conservé dans ACC-2, le résidu serine équivalent à Ser⁷⁹ dans ACC-2 est Ser²¹⁹, ainsi les sites de reconnaissance par l'AMPK sont conservés.

B.1.2 Régulation allostérique

Une enzyme, mitochondriale, la pyruvate carboxylase, activée par l'accumulation de l'acétyl Co-A, intervient pour fournir l'oxaloacétate nécessaire à la formation du citrate lequel assure le transport des radicaux acétyles de la matrice mitochondriale vers le cytosol. Le citrate, lorsqu'il s'accumule dans le cytosol, devient un effecteur positif, permettant la structuration des oligomères inactifs d'acétyl-CoA carboxylase en polymères actifs (régulation allostérique). En revanche, le palmitoyl-CoA, à concentration élevée dans le cytosol, devient un effecteur négatif qui dépolymérise l'acétyl-CoA carboxylase et la rend inactive.

B.2 Régulation à long terme

La lipogenèse est également contrôlée à long terme au niveau de l'expression de plusieurs gènes. Cette régulation fait intervenir plusieurs facteurs de transcription dont l'expression et/ou l'activité sont elles-mêmes contrôlées par des facteurs nutritionnels (glucose, acides gras) et hormonaux.

B.2.1 Les facteurs de transcription Sterol Regulatory Element Binding Protein (SREBP)

Les SREBPs, sont des facteurs de transcription appartenant à la famille ; basic-helix-loop-helix-leucine zipper (bHLH-LZ), synthétisés sous forme de précurseurs inactifs de 1150 acides aminés (aa), liés à la membrane du réticulum endoplasmique (RE) (Hua *et al.*, 1995). Chaque précurseur SREBP est organisé en trois domaines : (a) un domaine NH₂-terminal de 480 aa, contenant le domaine de transactivation, une région riche en proline et sérine en plus de la région bHLH-LZ pour la liaison de l'ADN et la dimérisation ; (b) deux segments trans-membranaires hydrophobiques interrompus par une petite boucle de 30 aa orientée vers la lumière du RE ; et (c) un domaine régulateur C-terminal de 590 aa. Suite à l'activation, le précurseur ancré au niveau du RE subit deux étapes de clivage pour libérer le domaine actif NH₂-terminal, appelé la forme nucléaire de SREBP (nSREBP). Le domaine bHLH-LZ, contient un nouveau signal de localisation nucléaire, qui se lie directement à la protéine, l'importine, permettant le transport de nSREBPs au niveau du noyau. Une fois transloqué dans le noyau, nSREBP permet l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la cholestérogénèse et la lipogenèse.

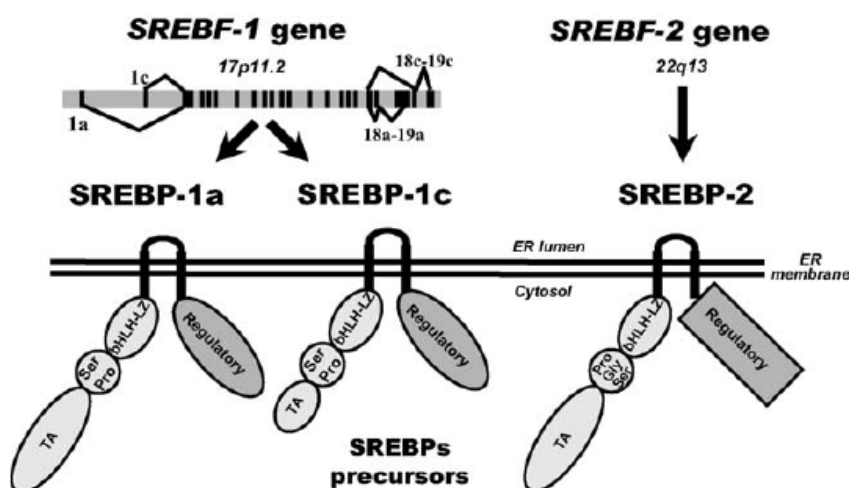


Fig. 10 Gènes et structure de SREBPs (Eberle et al., 2004). Chaque précurseur de SREBP1-c est organisé en 3 domaines : (a) un domaine NH₂ terminal de ≈ 480 aa qui contient le domaine de transactivation (TA), une région riche en sérine et en proline et une région bHLH-LZ pour la liaison avec l'ADN et la dimérisation ; (b) deux segments transmembranaires hydrophobiques interrompus par une séquence de ≈ 30 aa qui projette dans la lumière du RE ; (c) un segment COOH-terminal de ≈ 590 aa constituant le domaine régulateur.

Trois membres de la famille SREBP ont été décrits chez plusieurs espèces de mammifères : SREBP1-a et 1-c sont produits par un seul gène (SREBF-1) localisé dans le chromosome 17p11.2 et SREBP-2 dérive d'un autre gène (SREBF-2) localisé chez l'homme dans le chromosome 22q13. Les protéines SREBP-1 et SREBP-2 montrent 47 % d'homologie. Les transcrits SREBP1-a et 1-c sont produits par transcription alternative et diffèrent par leur premier exon (exon 1a et exon 1c). Les autres exons sont communs pour les deux isoformes. Chez l'homme, l'épissage alternatif dans l'extrémité 3' a été aussi décrit (exon 18a et 19a ou l'exon 18c et 19c). L'homologue de SREBP1-c chez le rat, a été initialement appelé facteur de différenciation et de détermination adipocytaire-1 (ADD-1) à cause de son rôle dans l'adipogenèse. SREBP1-a est un activateur transcriptionnel plus puissant que le SREBP1-c, à cause de la longueur du domaine NH₂-terminal. Cependant, SREBP1-c est l'isoforme prédominante exprimée dans plusieurs tissus de souris et d'homme, avec un taux particulièrement élevé dans le foie, le tissu adipeux blanc, le muscle squelettique, les glandes surrénales et le cerveau. SREBP1-a est quant à lui hautement exprimé dans les lignées cellulaires et les tissus à grande capacité de prolifération comme la rate et les intestins.

Les facteurs de transcription SREBP sont régulés à trois niveaux : (1) transcription, (2) clivage protéolytique des précurseurs de SREBP et (3) et les modifications post-traductionnelles des nSREBP. Cependant, il existe des différences de régulation entre les isoformes de SREBPs, alors que SREBP1-a et SREBP-2 sont régulés au niveau du clivage protéolytique, il semble que SREBP1-c est régulé essentiellement à l'échelle transcriptionnelle.

Contrôle transcriptionnel

Le premier aperçu de la régulation transcriptionnelle de SREBP1-c découle des états de jeûne et d'alimentation chez des rongeurs qui montrent que le changement de l'état nutritionnel régule l'expression de SREBP1-c dans le foie, le tissu adipeux blanc et récemment dans le muscle squelettique. L'expression de SREBP1-c est réprimée durant le jeûne et augmente significativement quand les animaux sont soumis à un régime riche en carbohydrates, alors que des situations pareilles n'entraînent que des effets minimes sur l'expression des autres isoformes de SREBP. Des expérimentations sur des adipocytes et des hépatocytes isolés montrent que le facteur de transcription SREBP1-c est induit par l'insuline. Cette induction de la transcription de SREBP1-c entraîne une augmentation parallèle aussi bien de l'expression du précurseur lié à la membrane du RE que de la forme nucléaire du facteur de transcription. L'effet de l'insuline sur la transcription de SREBP1-c est opposé par le glucagon via l'AMPc. L'effet de l'insuline sur l'augmentation de l'expression des ses gènes cibles comme la glucokinase (GK) et les enzymes lipogéniques est mimé par la surexpression de la forme constitutive active de SREBP1c (nSREBP). Les effets de l'insuline sur l'expression de SREBP1-c sont transmis par la voie PI(3)-kinase.

La transcription de SREBP1-c peut aussi être induite par l'activation de LXRα. Ce récepteur nucléaire est très exprimé au niveau hépatique et activé par les oxystérols. Des études *in vivo* ont identifié le rôle de LXRα dans l'induction de SREBP1-c et des gènes lipogéniques dans le foie. Des animaux déficients en LXRα, ont une expression basale réduite de SREBP1-c, FAS, ACC et SCD-1. Au contraire, des animaux soumis au régime riche en cholestérol ou associé à des agonistes synthétiques de LXR montrent une augmentation sélective des ARNm et protéines nucléaires de SREBP1-c, et l'induction de l'expression des gènes cibles lipogéniques ainsi que l'augmentation de la synthèse des acides gras. Il semble que LXRα peut agir directement pour activer certains gènes lipogéniques comme ACC-1 et FAS. Cependant, l'induction secondaire des gènes lipogéniques par LXR via SREBP1-c est physiologiquement importante, les souris déficientes de SREBP1-c ont une faible réponse lipogénique au traitement par les agonistes de LXR. LXRα

induit l'expression de SREBP1-c via le complexe RXR/LXR sur le site de liaison au niveau de l'ADN du promoteur du gène SREBP1-c. Cet élément de réponse à LXR ne transmet pas uniquement la régulation de SREBP1-c par LXR α mais il est aussi nécessaire pour l'induction de SREBP1-c par l'insuline.

Le rôle du glucose dans la régulation de SREBP1-c est controversé. La transcription de SREBP1-c est inhibée par l'AMPK, ce qui pourrait expliquer la baisse de l'expression de FAS dans des hépatocytes activés par l'AMPK.

La transcription de SREBP-1a et SREBP-2 est induite en cas de baisse de stérols, cependant il n'a été vérifié qu'in vitro sur des hépatocytes pour SREBP1-a. SREBP-2 peut induire son propre transcription par liaison avec la région SRE de son gène. Un mécanisme similaire contribue également à la régulation transcriptionnelle du gène SREBP1-c.

Activation de SREBPs par le clivage protéolytique

Suite à la traduction de l'ARNm de SREBP, le précurseur de SREBP est retenu au niveau de la membrane du RE, grâce à une liaison serrée avec le SREBP cleavage activating protein (SCAP). Sous certaines conditions SCAP escorte le précurseur de SREBP du RE vers l'appareil de Golgi où deux protéases fonctionnelles, site 1 protéase (S1P) et site 2 protéase (S2P), coupe le précurseur libérant nSREBP dans le cytoplasme. En premier lieu, S1P coupe au niveau de la boucle luminale hydrophile le précurseur de SREBP. S2P coupe ensuite la protéine au niveau du premier fragment transmembranaire. Les protéases S1P et S2P ne sont pas spécifiques de SREBPs et sont impliquées dans d'autres clivages de protéines transmembranaires.

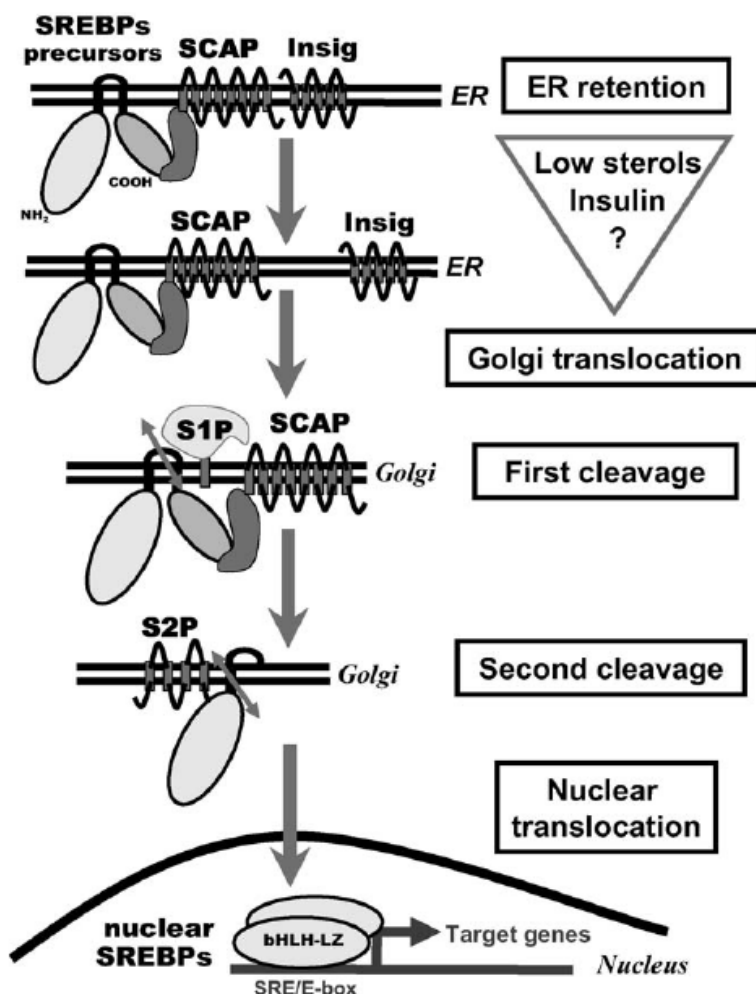


Fig. 11 Clivage protéolytique et activation de SREBPs (Eberle et al., 2004). ER : réticulum endoplasmique, SCAP : SREBP cleavage activating protein, S1P : site 1 protéase, S2P : site 2 protéase.

Les travaux de (Brown and Goldstein, 1999), ont montré que la transformation de SREBP peut être contrôlée par le contenu cellulaire en stérol. En présence de concentrations élevées de stérols, le complexe SREBP-SCAP est retenu au niveau des membranes du RE. Quand le contenu en stérol diminue, le complexe SREBP-SCAP se déplace à l'appareil de Golgi, où le clivage a lieu. Il a été montré que ce trafic dépendant des stérols, nécessite un domaine sensible aux stérols dans la protéine SCAP. Le cholestérol se lie directement au domaine sensible aux stérols de SCAP et module la conformation de cette dernière, suggérant que l'interaction protéine-protéine est impliquée dans la rétention du complexe SREBP-SCAP dans le RE. De découverte plus récente, l'insulin induced gene (Insig) est une protéine responsable comme SCAP de la rétention de SREBP-SCAP dans le RE. Sous un taux élevé de stérols, SCAP interagit avec Insig, permettant la rétention du complexe SREBP-SCAP dans le RE. Cependant, ce processus de sensibilité aux stérols, ne s'applique pas sur les trois isoformes de SREBP, et d'autres facteurs, comme l'insuline semblent être impliqués dans le clivage. Toutes ces études sur les mécanismes de maturation de SREBP et le contrôle par les stérols sont effectuées sur des lignées cellulaires qui expriment essentiellement SREBP-1a et SREBP-2. Des études effectuées *in vivo* ont montré que l'absence de stérols ne régule pas le clivage de l'isoforme SREBP1-c. *In vivo*, SREBP1-c est régulé par les changements du statut nutritionnel, ce dernier n'ayant pas d'effet sur l'expression de SREBP-2. Des études récentes effectuées *in vivo* et *in vitro* par l'équipe d'Eberlé, ont montré que le clivage de SREBP1-c est sous le contrôle de l'insuline, en absence de toutes variations des concentrations en stérols. Ils ont montré que l'insuline seule est capable de moduler rapidement les concentrations de nSREBPs dans le noyau, indépendamment de tout effet sur la transcription de SREBP1-c. Cependant, le mécanisme par lequel l'insuline agit sur le clivage de SREBP1-c n'est pas encore connu. Des observations récentes suggèrent que les protéines Insig pourraient être responsables des effets différentiels de l'insuline vs les stérols sur le clivage des isoformes SREBP1-c et SREBP-2.

La famille des Insig est composée de trois membres : Insig-2a et 2b produits par un même gène et Insig-1 par un autre gène. Les transcrits de Insig-2a et 2b diffèrent par leur 1^{er} exon non codé, cependant, ils produisent la même protéine Insig-2. La différence majeure entre Insig-2a et 2b est leur distribution tissulaire ; les transcrits de Insig-2a sont exprimés surtout dans le foie, alors que les transcrits Insig-2b sont ubiquitaires.

L'insuline, diminue l'expression des ARNm de l'Insig-2a dans le foie, alors qu'elle induit l'expression des ARNm de Insig-1, suggérant que la baisse de la protéine Insig-2a entraîne spécifiquement le clivage de SREBP1-c. Les protéines Insig semblent retenir différenciellement le complexe SREBP-SCAP dans le RE, comme conséquence de leur affinité différente pour SCAP. Comme exemple, la surexpression de la protéine Insig-2 dans les lignées cellulaires CHO retient le complexe SREBP-SCAP uniquement en présence de stérols, contrairement à ce qui est observé pour la surexpression de la protéine Insig-1.

Le clivage de SREBP1-c pourrait être secondaire à une autre voie de signalisation. Plusieurs études ont évoqué l'activation de la voie du stress du RE. Le RE est un carrefour important où les protéines subissent un contrôle de qualité très strict et, seules les protéines ayant passé avec succès ce contrôle seront acheminées vers l'appareil de Golgi pour être sécrétées ou orientées vers d'autres compartiments. Les protéines identifiées comme incorrectes sont dégradées par un processus appelé ERAD (ER-associated-degradation). Cela nécessite l'export de ces protéines vers le cytoplasme de la cellule où elles sont dégradées par la voie du protéasome. Toutes les situations conduisant à une altération de la fonction du RE, comme par exemple l'accumulation de protéines mal repliées ou des modifications de l'homeostasie calcique, entraînent le déclenchement d'une réponse physiologique appelée réponse UPR (unfolded protein response) ou encore stress du RE. La réponse UPR a pour but : (1) de ralentir la synthèse protéique globale pour empêcher l'arrivée d'autres protéines dans la lumière du RE ; (2) de synthétiser de nouvelles protéines chaperons ou des « foldases » pour stimuler les processus de repliement ; (3) d'entraîner vers la dégradation les protéines mal repliées ; (4) de déclencher l'apoptose de la cellule quand les processus précédents ont échoué.

Chez les mammifères, la réponse UPR entraîne l'activation de deux voies : une voie traductionnelle et une voie transcriptionnelle. Elle peut également déclencher, dans certains cas, l'activation d'une voie apoptotique. Elle implique l'activation de trois protéines transmembranaires du RE : PERK (PKR-like ER-associated protein kinase), ATF6 (activating transcription factor-6) et IRE1 (inositol-requiring enzyme-1). L'activation de ces trois protéines nécessite leur dissociation de la protéine chaperon BiP/GRP78 qui les maintient dans un état inactif dans les membranes du RE. L'arrivée accrue de protéines dans la lumière du RE entraîne la dissociation de BiP/GRP78 qui va s'associer aux protéines en cours de repliement permettant ainsi l'activation de la voie UPR (figure 12).

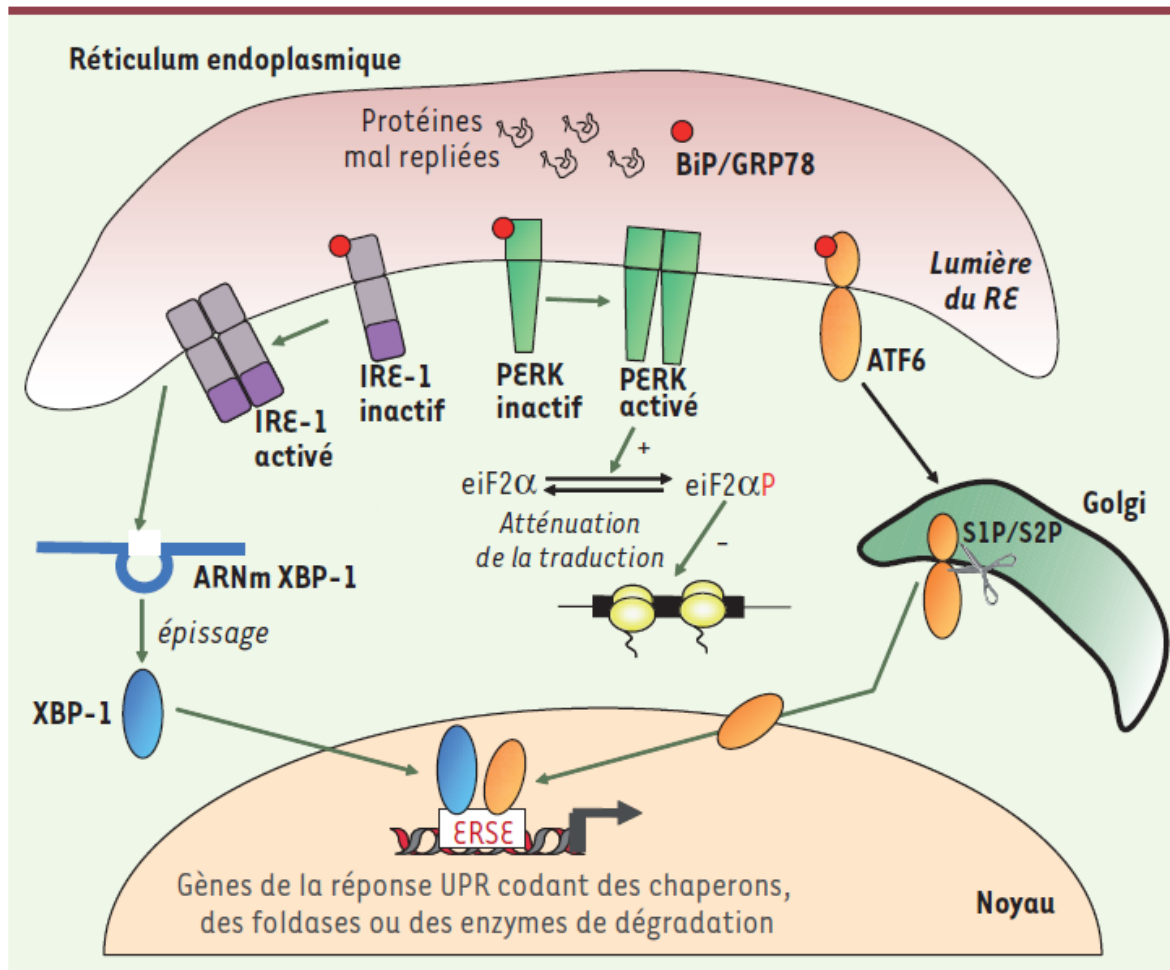


Fig. 12 Les différentes composantes de la réponse UPR (Foufelle and Ferre, 2007). A l'état non induit, les protéines transmembranaires de la réponse UPR (PERK, ATF6, IRE-1) sont maintenues inactives dans le RE grâce à leur interaction avec la protéine chaperon BiP/GRP78. L'accumulation de protéines mal conformées dans la lumière du RE entraîne une dissociation de BiP/GRP78 et l'activation des trois protéines de la réponse UPR. PERK s'oligomérisce ce qui entraîne une stimulation de son activité kinase. Elle phosphoryle alors la sous-unité α du facteur d'initiation de la traduction eIF2 entraînant une inhibition de la traduction. ATF6 migre du RE vers le Golgi où il subit un double clivage protéolytique par les protéases S1P et S2P. Le domaine amino-terminal d'ATF6 migre vers le noyau pour se fixer sur des séquences ERSE (ER stress response element). La protéine IRE-1 possède, une activité sérine/thréonine kinase et endoribonucléase dans son domaine cytoplasmique. Son activation lors de la dissociation de BiP/GRP78 entraîne une oligomérisation et une induction de l'activité kinase d'IRE-1. La protéine IRE-1 activée provoque l'épissage et la traduction de l'ARNm du facteur XBP-1. XBP-1 se lie sur des séquences ERSE des promoteurs cibles de la réponse UPR.

La lipogenèse dépendante de l'insuline est très active dans le foie chez les souris obèses *ob/ob*, qui sont caractérisées par une insulino-résistance hépatique sévère marquée par une surproduction de glucose et une hyperglycémie. Cependant l'accumulation de SREBP1-c au niveau nucléaire est observée dans le foie de ces animaux. L'incapacité de l'insuline pour inhiber la néoglucogenèse alors que la lipogenèse est activée pourrait refléter une sensibilité différente de ces deux voies à l'insuline. Il a été suggéré que la

baisse du contenu de l'IRS-2 suite à l'hyperinsulinémie pourrait expliquer la répression des gènes de la néoglucogenèse liée à la résistance à l'insuline et que cette hormone pourrait aussi activer la lipogenèse par l'IRS-1 ou par une autre voie. Cependant, la phosphorylation des tyrosines de l'IRS diminue dans le foie des souris ob/ob aussi bien pour IRS-1 que pour IRS-2. Ainsi, l'activation de SREBP1-c dans le foie de souris ob/ob ne pourrait pas être expliquée par une stimulation de la voie de signalisation insulínique. La baisse de la phosphorylation des tyrosines de l'IRS-1 et l'IRS-2 par l'insuline est la conséquence de l'activation de JNK1, un processus qui peut être attribué au stress du RE. JNK1 phosphoryle les protéines de l'IRS sur des résidus sérines, diminuant ainsi la phosphorylation des tyrosines du récepteur d'insuline. Dans le foie d'animaux présentant une stéatose, la PKC ϵ est également associée à JNK-1 pour expliquer l'insulinorésistance hépatique. Des études récentes ont montré la présence d'une réponse UPR dans le foie et le tissu adipeux de rongeurs insulino-résistants, qui une fois contrecarrées, la sensibilité à l'insuline est améliorée. Dans le foie des animaux insulino-résistants, le stress du RE entraînant le clivage de SREBP1-c pourrait être l'explication pour la synthèse des lipides.

Etant donné que la synthèse des triglycérides a lieu initialement dans le RE et implique la formation *de novo* de membranes, ceci pourrait être considéré comme une situation de stress pour cet organelle. En effet, l'augmentation de la synthèse des triglycérides dans les cellules hépatiques augmente le stress du RE. L'activation de l'UPR affecte alors rapidement l'activité fonctionnelle ou la quantité des protéines clés (Insig-1 ou GRP78) dans le complexe de SREBP, entraînant la libération de SREBP-SCAP et le clivage protéolytique dans l'appareil de Golgi des formes matures de ces facteurs de transcription indépendamment de l'insuline et du statut du cholestérol. Le facteur de transcription SREBP dans le foie, et probablement dans d'autres tissus, pourrait être considéré comme une branche de la réponse UPR, entraînant la synthèse des lipides. Cependant, l'activation de ces facteurs par l'augmentation de la lipogenèse et la synthèse du cholestérol est à l'origine d'un déséquilibre initial entraînant un cercle vicieux. De plus, le stress du RE pourrait contribuer à l'insulinorésistance hépatique par l'activation du processus de phosphorylation des sérines de l'IRS et la baisse de l'expression de l'IRS-2.

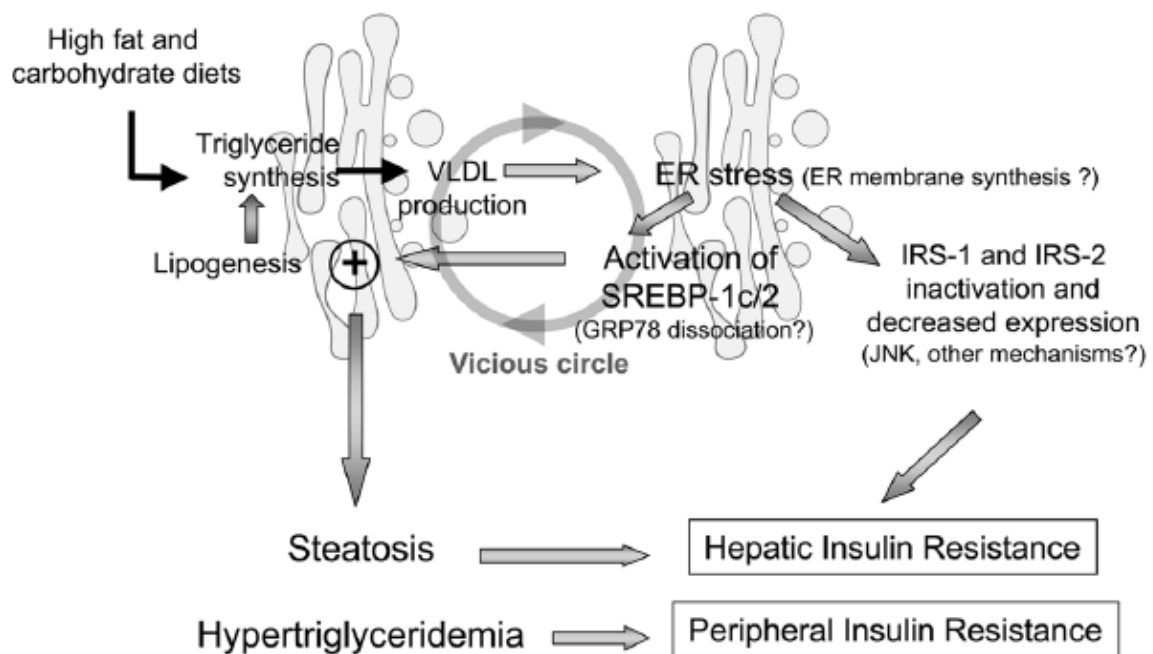


Fig.13

Modèle illustrant le stress du RE lié à un taux élevé de synthèse de TG dans le foie qui pourrait induire le clivage de SREBP1-c et l'insulino-résistance (Kammoun et al., 2009).

Récemment des équipes de recherches ont étudié dans les macrophages le lien entre le stress du RE et l'athérogenèse *in vivo*, ainsi que les mécanismes intégrant les signaux lipidiques à la fonction du RE, et en amont la voie apoptotique et sa contribution à la pathogenèse de l'athérosclérose. Les travaux de (Erbay *et al.*, 2009) ont montré que la protéine aP2 est une molécule chaperonne et un intermédiaire obligatoire entre les lipides toxiques et le stress du RE dans les macrophages *in vitro* et *in vivo*. Le stress du RE peut être diminué par l'utilisation des produits chimiques qui inhibent la protéine aP2 entraînant une protection marquée contre le stress du RE, la mort cellulaire et l'athérosclérose. Une résistance au stress du RE peut être atteinte en bloquant l'action de l'aP2, un mécanisme qui dépend de l'activité de SCD-1. L'aP2 empêche l'enrichissement des macrophages par des acides gras désaturés comme le C16:1n7-palmitoleate qui diminuent le stress du RE induit par les lipides. Cette étude a montré que l'activation de LXR α chez des macrophages déficientes de la protéine aP2 (Tcfaap2a^{-/-}) stimule la transcription de FAS et SCD-1 et la résistance au stress lipotoxique du RE. L'aP2 inhibe l'expression de LXR α et la réponse du stress du RE. Cette étude montre que la synthèse *de novo* d'acides gras et la désaturation peuvent être très bénéfiques si ce n'est pas essentiel pour la défense de la fonction du RE quand les macrophages sont exposés à des lipides toxiques. L'activation de LXR a des effets délétères dans l'organisme particulièrement dans le foie. Au contraire, une augmentation sélective de l'activité de LXR et SCD-1 dans les macrophages et les adipocytes et une diminution dans le foie peut constituer une bonne stratégie et un rendement avantageux sur le métabolisme incluant la protection contre le diabète et l'athérosclérose.

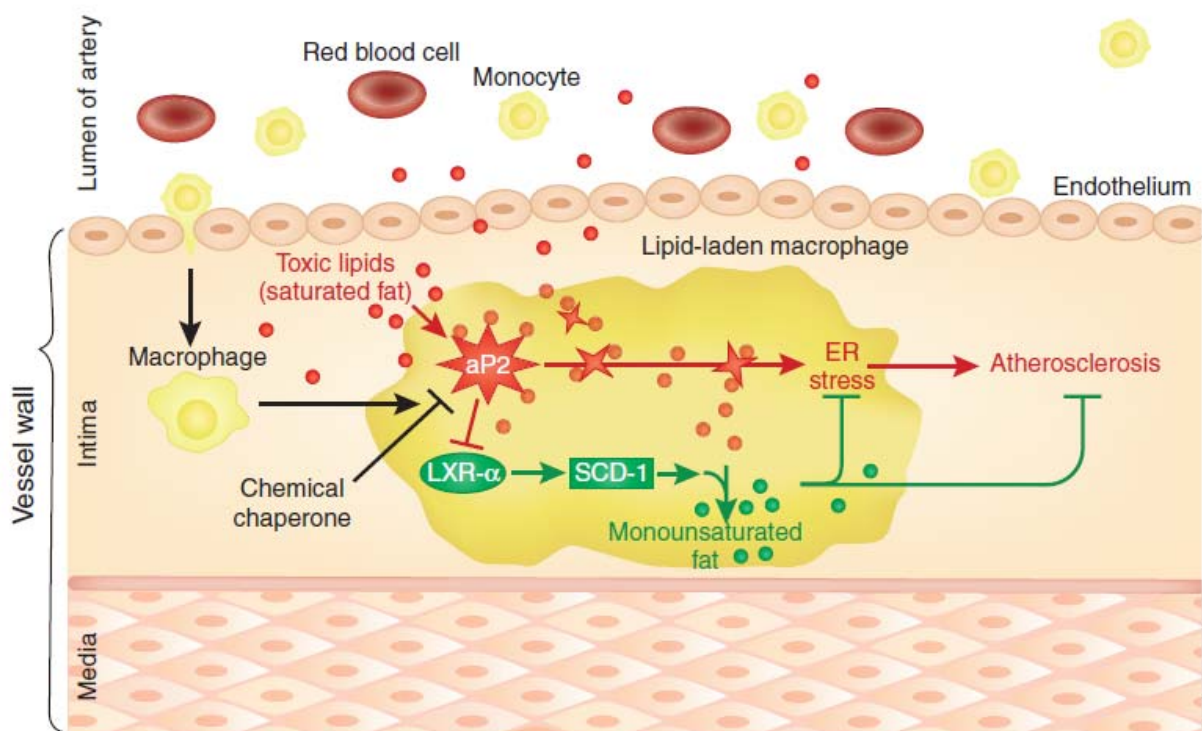


Fig. 14 Modèle de lipotoxicité cellulaire via le stress du RE au cours du développement de l'athérosclérose (Liu and Ntambi, 2009). Dans les macrophages chargés de lipides infiltrés dans la paroi artérielle, l'aP2 (adipocyte fatty acid-binding protein) liée aux lipides saturés entraîne le stress du réticulum endoplasmique (RE) favorisant le développement de l'athérosclérose. L'inhibition pharmacologique (molécules chaperonnes ou autres agents) ou génétique de l'aP2 augmente l'expression de LXR α , qui stimule l'expression d'une protéine lipogénique, Stearoyl CoA desaturase 1 (SCD-1). L'augmentation de l'activité de SCD-1 est responsable de la conversion des lipides saturés toxiques en lipides monoinsaturés, ainsi le stress induit par les lipides est réduit et l'athérosclérose prévenue.

Modifications post-traductionnelles des SREBPs

Dans le noyau, l'activité transcriptionnelle de SREBP mûre (nSREBP) est régulée par des modifications covalentes ou par des interactions avec d'autres protéines. La première preuve montrant que les SREBPs sont modifiés à l'échelle post-traductionnelle découle des travaux de (Kim et al., 2001), qui ont montré que l'insuline augmente l'activité transcriptionnelle de nSREBP1-c surexprimé dans les adipocytes 3T3-L1. D'autres études (essentiellement réalisées sur des lignées cellulaires) ont montré aussi que l'insuline stimule l'activité transcriptionnelle de nSREBP-2 et nSREBP1-a via la voie MAPK. Le résidu serine 117 est identifié comme le site de phosphorylation majeur de la MAPK dans SREBP1-a. Ser-432 et Ser-455 sont décrits comme des sites de phosphorylation des MAPK *in vitro* et *in vivo* dans SREBP-2. Ces phosphorylations ne modifient pas la liaison à l'ADN mais affectent la capacité de transactivation de SREBP-2. Le rôle des MAPK dans les modifications de l'activité transcriptionnelle de SREBP1-c reste controversé. La Ser-117, cible de MAPK dans SREBP-1a est aussi présente dans l'isoforme SREBP1-c. L'utilisation des inhibiteurs de la voie MAPK dans les hépatocytes en culture n'inhibe pas l'effet de l'insuline sur les gènes cibles de SREBP1-c, suggérant que SREBP1-c n'est pas phosphorylée par la MAPK dans les hépatocytes. L'équipe d'Eberlé ont montré que la PKB est capable de phosphoryler le nSREBP1-c purifié *in vitro*. Des expérimentations de co-transfection sur des hépatocytes en culture montrent que la phosphorylation par l'insuline et la PKB stimulent l'activité transcriptionnelle du SREBP1-c nucléaire (Azzout-Marniche, Ferré, Foulle, résultats non publiés). Il a été montré que dans le noyau, les nSREBPs sont modifiés par ubiquitination et rapidement dégradés par des protéasomes 26 S. En présence d'inhibiteurs de protéasomes ALLN et lactacystin, nSREBPs sont stabilisés et l'expression de leurs gènes cibles est affectée. Il a été montré que les facteurs de transcription SREBP sont ubiquitinés et dégradés par un mécanisme impliquant des protéasomes, terminant le signal transcriptionnel. Ces effets nécessitent aussi bien une transactivation fonctionnelle ainsi qu'un domaine de liaison à l'ADN dans les SREBPs. SREBP-1 et SREBP-2 sont aussi modifiés par le small ubiquitin-related modifier (SUMO)-1. SREBP1-a et SREBP-2 contiennent deux et un site de sumoylation respectivement. La sumoylation des SREBPs n'affecte pas l'ubiquitination et la stabilité des protéines mais réprime leur activité transcriptionnelle. Comparé avec les autres SREBPs, SREBP1-c est relativement un faible activateur transcriptionnel. Ceci peut être expliqué par une proportion réduite d'acides dans la région N-terminale comparativement avec SREBP-1a. SREBP-1a et SREBP-2 sont associés via le domaine NH₂-terminal avec plusieurs co-activateurs comme p300, CBP et ARC/DRIP, mais aucune interaction entre SREBP1-c et des co-activateurs n'a été démontrée. Des études récentes ont essayé d'identifier des protéines qui peuvent interagir spécifiquement avec SREBP1-c modifiant son activité transcriptionnelle. Lee *et al.*, 2003 ont montré que SREBP1-c interagit avec Twist2, protéine exprimée dans le foie et le tissu adipeux. La surexpression de Twist2 réprime l'activité transcriptionnelle de l'ADD1/SREBP1-c par l'inhibition de ses liaisons avec les promoteurs cibles.

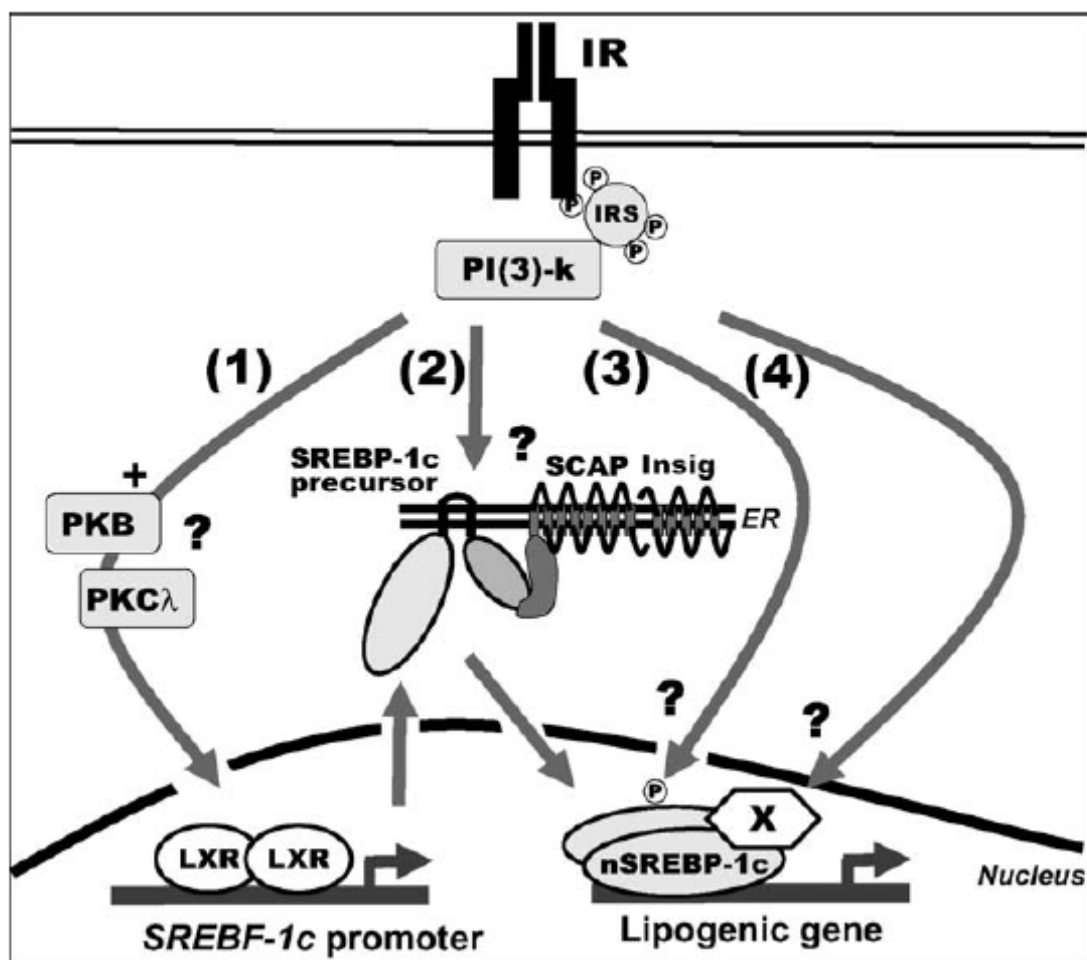


Fig. 15 Mécanisme de la stimulation de l'activité transcriptionnelle de SREBP1-c par l'insuline dans les hépatocytes en culture (Eberle et al., 2004). (1) Après liaison de l'insuline au niveau de son récepteur (IR), elle active la transcription de SREBP1-c via la voie PI(3)-kinase. PKB et PKCλ sont des effecteurs de PI(3)-kinase. La transcription de SREBP1-c induite par l'insuline implique la présence des deux sites de liaison à LXR présents dans le promoteur de SREBP1-c. (2) L'insuline active également le clivage protéolytique de SREBP1-c ou (3) modifie par phosphorylation l'activité transcriptionnelle de la forme mûre de SREBP1-c. (4) L'insuline entraîne la synthèse des protéines non encore identifiées qui modifient l'activité de SREBP1-c.

Les gènes cibles de SREBP1-c au niveau hépatique

La glucokinase

Les glucokinases hépatique et β-pancréatique jouent un rôle dans le métabolisme du glucose et la sécrétion de l'insuline par les cellules β-pancréatiques. Avec l'utilisation des formes dominantes positive et négative de SREBP1-c clonées dans des vecteurs adénoviraux, il a été montré sur les hépatocytes en culture que l'activité transcriptionnelle de SREBP1-c est nécessaire pour l'action de l'insuline sur l'expression du gène de la GK : une surexpression de la forme positive dominante de SREBP1-c mime les actions de l'insuline sur ce gène. Chez des souris diabétiques traitées avec la streptozotocine, la surexpression de SREBP1-c par un adénovirus dans le foie, augmente l'expression et l'activité du gène de la GK, ainsi que l'augmentation du contenu en glycogène hépatique, mimant l'effet d'une injection d'insuline. Quand le foie de ces souris n'exprime aucune forme nucléaire de SREBP (des souris SCAP ou S1P déficientes) la réponse du gène de la GK à l'alimentation est réprimée. SREBP1-c est essentiel pour l'expression de la GK, et il est un médiateur de l'action de l'insuline.

Les gènes lipogéniques

L'implication de SREBP1-c dans les actions de l'insuline sur les gènes qui nécessitent pour leur expression aussi bien l'insuline que des concentrations élevées de glucose (L-PK, FAS, et ACC-1) a été bien démontrée. Les gènes lipogéniques agissent avec d'autres facteurs de transcription, comme ChREBP. L'importance de SREBP1-c pour l'expression des gènes lipogéniques a été également étudiée *in vivo* en montrant que leur induction par un régime riche en carbohydrates est supprimée chez des souris déficientes de SREBP-1. Chez des souris diabétiques traitées avec la streptozotocine, la surexpression de SREBP1-c par un adenovirus dans le foie augmente l'expression des enzymes de la lipogenèse, avec augmentation du contenu hépatique en TG et une baisse significative de l'hyperglycémie de ces souris diabétiques simulant parfaitement l'effet d'une injection d'insuline.

Gènes cibles de SREBP1-c dans les tissus non hépatiques

Le tissu adipeux est le premier tissu dans lequel un effet de l'insuline sur l'activité transcriptionnelle de SREBP1-c a été décrit et dans lequel aussi le promoteur de FAS a été identifié comme cible de SREBP1-c. L'action de l'insuline sur l'expression de SREBP1-c dans les adipocytes chez l'homme a été aussi démontrée. D'autres gènes comme le récepteur des LDL et SCD-1 ont été aussi caractérisés comme des gènes cibles de SREBP1-c et de l'insuline ainsi que le facteur de transcription CCAAT/enhancer-binding protein β et l'hexokinase II. SREBP1-c est aussi impliqué dans la différenciation adipocytaire. Dans le muscle, l'expression de SREBP1-c et son abondance nucléaire sont stimulés par l'insuline et les gènes cibles sont impliqués dans la voie de la lipogenèse comme l'hexokinase II. L'hexokinase joue un rôle majeur dans l'utilisation du glucose par l'insuline. Dans les cellules β pancréatiques ou les lignées de cellules β pancréatiques des études de surexpression, ont montré que SREBP1-c contrôle comme dans le foie l'expression des gènes lipogéniques. Actuellement on ne sait pas si le contrôle de SREBP1-c par l'insuline dans ces cellules est similaire à celui observé dans le foie.

B.2.2 Le facteur de transcription Carbohydrate response element binding protein (ChREBP)

IL transmet essentiellement les effets stimulateurs du glucose sur l'expression de gènes lipogéniques. Sa distribution tissulaire a été établie. L'ARNm de ChREBP a été détecté pour la 1^{ère} fois dans le foie de souris au stade embryonnaire (Cairo *et al.*, 2001), et chez l'adulte, l'ordre de classement de l'expression dans les différents tissus est le foie >> le tissu adipeux > l'intestin > le rein = le muscle. L'ARNm de ChREBP a été aussi détecté dans différentes régions du cerveau et dans les îlots du pancréas.

ChREBP est un facteur de transcription de 100 kDa qui consiste en 850 acides aminés. Cette protéine est très conservée chez les espèces, 82% de la séquence d'acides aminés est conservée chez l'homme, le rat et la souris. ChREBP contient plusieurs domaines fonctionnels incluant : nuclear export and import signals (NES), domaine de liaison à l'ADN avec le motif basic helix-loop-helix/Zipper (bHLH/ZIP) et des régions riches en proline impliquées dans les interactions protéine-protéine. ChREBP interagit avec Max-like protein X (Mlx) (Cairo *et al.*, 2001 ; Stoeckman *et al.*, 2004) pour former un hétérodimère qui se lie avec le promoteur du gène L-PK. Cette séquence de L-PK consiste en deux E-boxes (C[C/A]CG[G/T]G) séparées par cinq nucléotides, et la liaison ChREBP/Mlx dépend des séquences et des espaces entre ces motifs. Mlx est un composant essentiel du complexe ChREBP/Mlx par ses capacités à améliorer la liaison avec l'ADN, mais il est relativement abondant, stable et il est peu probable qu'il soit régulé par l'alimentation ou les hormones. ChREBP a une demi-vie de 30 min. Il subit des modifications allostériques et des régulations par l'alimentation.

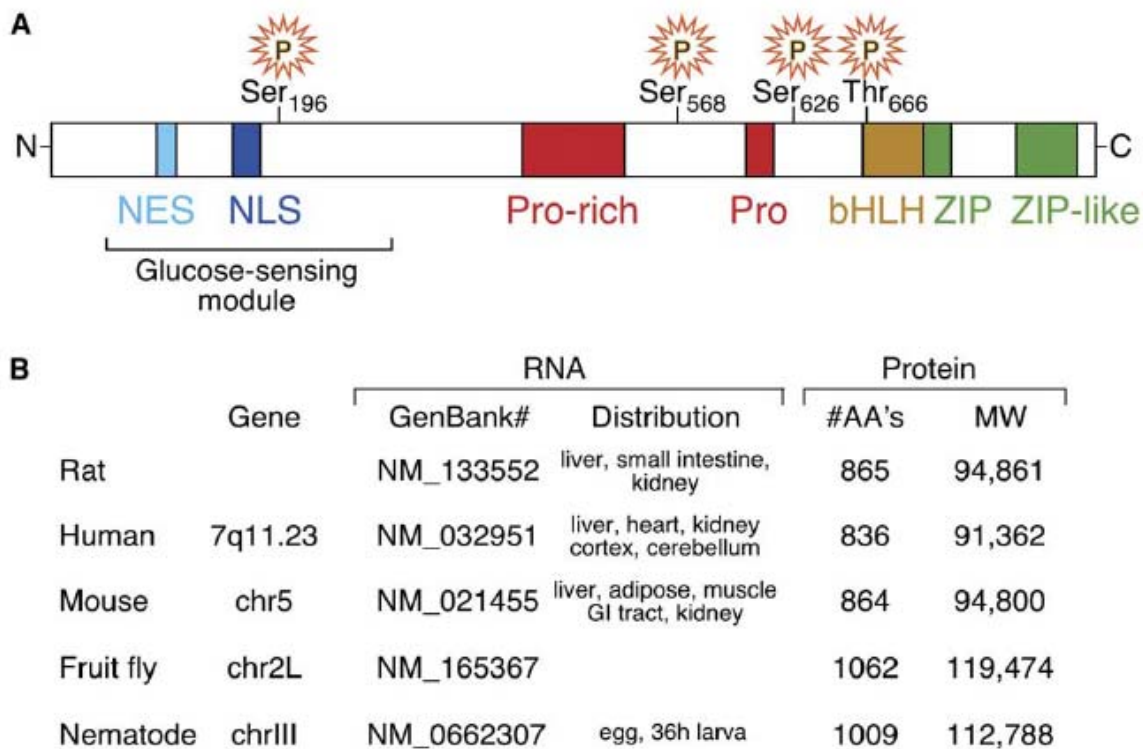


Fig. 16 Représentation schématique et caractérisation de ChREBP (Uyeda et al., 2006). **A)** Représentation schématique des différents domaines fonctionnels de ChREBP : le signal d'export nucléaire (NES) ; le signal de localisation nucléaire (NLS) ; basic helix-loop-helix/Zipper DNA binding domain (bHLH/ZIP) et le domaine riche en proline impliqué dans les interactions protéine-protéine. Ce schéma montre également les résidus d'acides aminés phosphorylés par la PKA (Ser₁₉₆, Ser₆₂₆ et Thr₆₆₆) et par l'AMPK (Ser₅₆₈) qui régulent la localisation cellulaire et la capacité de liaison à l'ADN. Un domaine sensible au glucose a été identifié et un élément de réponse au glucose C terminal. **B)** Caractérisation des ChREBPs. La distribution de l'ARN est déterminée par Northern et l'hybridation in situ révélant les sites majeurs de l'expression de ChREBP.

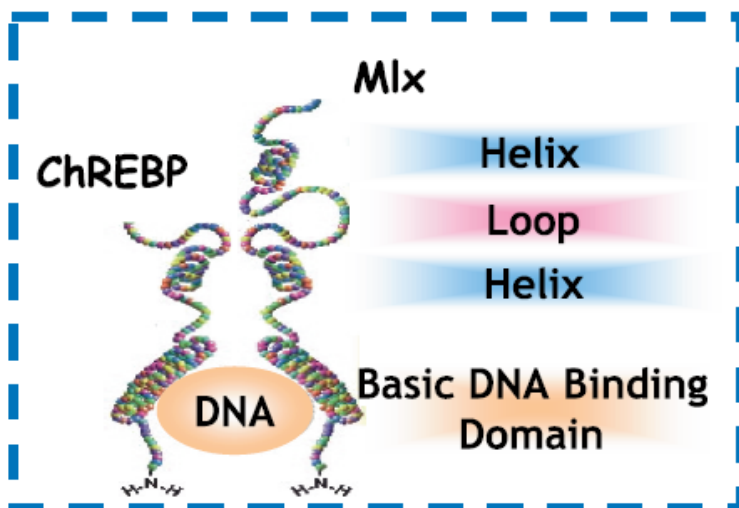


Fig. 17 Schéma de la structure de ChREBP et la protéine Mlx (Postic et al., 2007).

a. Régulation de ChREBP par translocation et phosphorylation-déphosphorylation

Plusieurs enzymes glycolytiques et lipogéniques sont induits par un régime riche en carbohydrates et inhibés par le jeûne. Durant le jeûne, la glycolyse hépatique et la lipogenèse de novo sont inhibés. Au contraire, la gluconéogenèse, la β -oxydation des acyls CoA et la cétogenèse sont augmentés. Ce changement de l'anabolisme vers le catabolisme est régulé par les hormones du stress et l'accumulation de

l'AMP. Durant le jeûne, les concentrations plasmatiques du glucagon et de l'épinephrine sont augmentées. Ces derniers augmentent les concentrations intracellulaires d'AMPc et activent la cAMP-activated protein kinase (PKA). La PKA phosphoryle ChREBP et l'inactive. La phosphorylation de ChREBP au niveau du résidu sérine 196 (Ser-196) inactive l'importation nucléaire et la phosphorylation du résidu thréonine 666 (Thr-666) empêchant la liaison du ChREBP à l'ADN. L'accumulation intracellulaire d'AMP inhibe l'activité de ChREBP en activant l'AMP-activated protein kinase (AMPK) et phosphorylant ChREBP. Au contraire, le glucose stimule l'activité de ChREBP. Le glucose est converti en xylulose-5-phosphate (Xu-5-P) dans la voie des hexoses et le Xu-5-P active la protéine phosphatase 2A delta (PP2A δ) et déphosphoryle la protéine ChREBP. Donc par un mécanisme de phosphorylation/déphosphorylation, ChREBP régule l'expression des gènes codant pour les enzymes de la glycolyse et la lipogenèse (L-PK, FAS, ACC, S14...). Cependant certains groupes, ont signalé des remarques concernant le mécanisme de phosphorylation/déphosphorylation. Malgré l'absence de la phosphorylation des sites par la PKA, les mutants S196A/T666A de ChREBP conserve la réponse au glucose et l'inhibition AMPc-dépendante de la transactivité du promoteur d'ACC. Néanmoins, la protéine ChREBP contient un détecteur de glucose (glucose-sensing) qui transmet la réponse au glucose. Il est clair que la PKA et l'AMPK inhibent la transactivité de ChREBP et PP2A l'active. Cependant le mécanisme par lequel le glucose stimule la transactivité de ChREBP n'est pas clair.

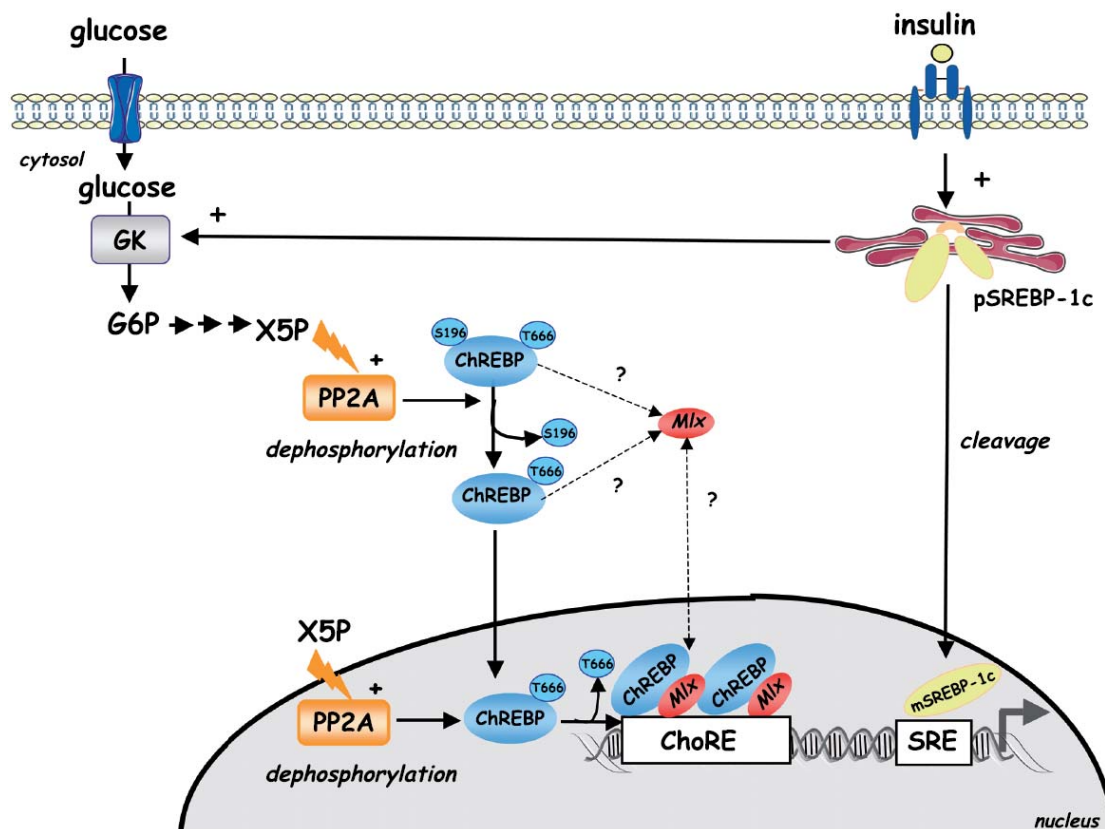


Fig. 18 Activation transcriptionnelle des gènes glycolytiques et lipogéniques par ChREBP et SREBP1-c dans le foie. (Postic *et al.*, 2007). ChoRE, carbohydrate-responsive element ; ChREBP, carbohydrate-responsive element-binding protein ; GK, glucokinase ; G6P, glucose 6-phosphate ; MLX, Max-like protein X ; PP2A, protein phosphatase 2A ; SRE, sterol regulatory element-binding protein-1c ; X5P, xylulose 5-phosphate.

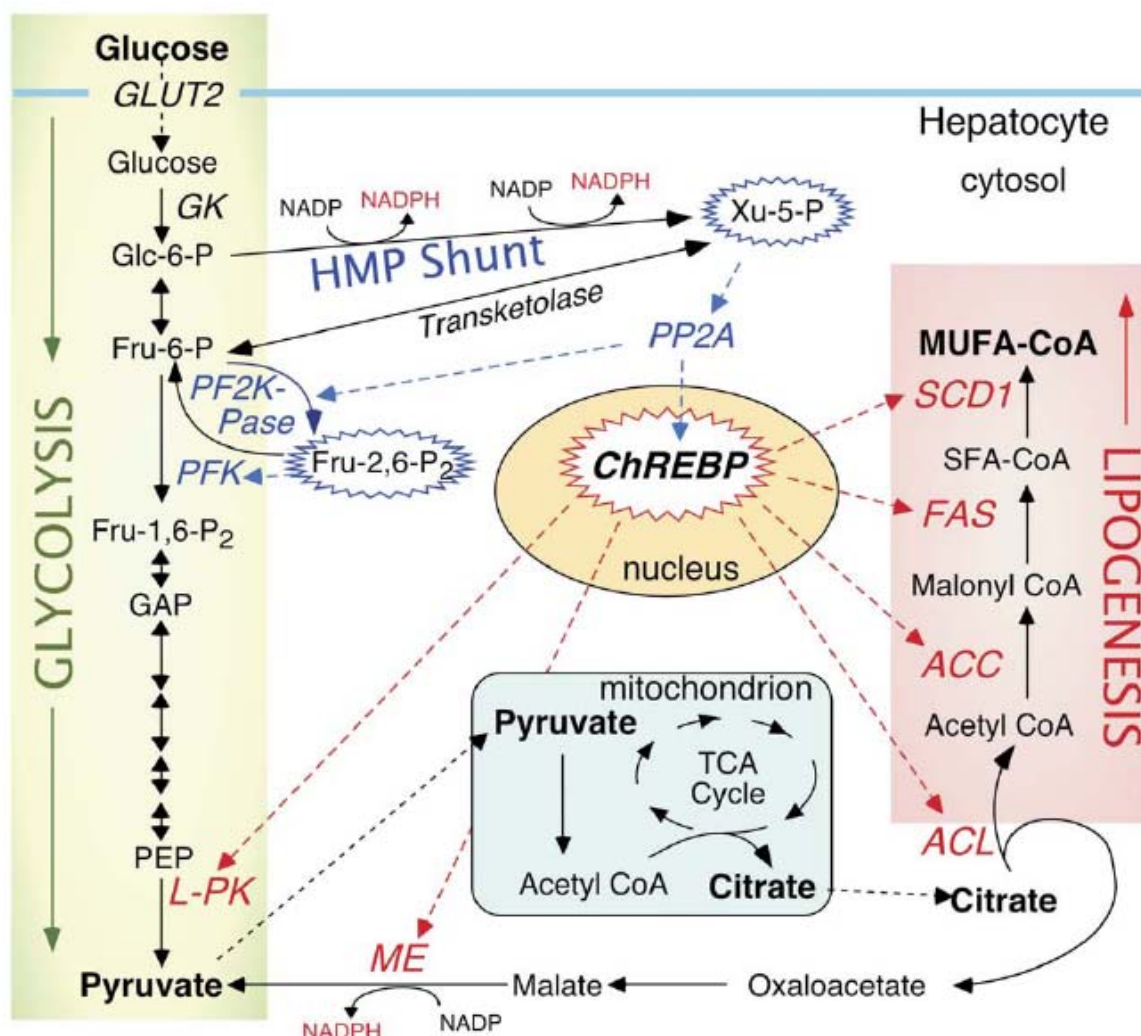


Fig. 19 Le rôle central de ChREBP dans la régulation de la glycolyse et la lipogenèse dans l'hépatocyte (Uyeda and Repa, 2006). Le catabolisme du glucose génère le pyruvate, qui est peut être orienté vers la synthèse des acides gras. Les protéines sont indiquées en majuscule italique, les métabolites intermédiaires en minuscules. La régulation allostérique des étapes précoces de la glycolyse sont indiqués en bleu : xylulose-5-phosphate (Xu-5-P) et fructose-2-6-biphosphate (Fru-2,6-P₂) régulent positivement les enzymes clés ; protéine phosphatase 2A (PP2A), et la partie kinase de l'enzyme bifonctionnelle PF2K-Pase et la phosphofructokinase (PFK). La régulation transcriptionnelle de l'étape terminale de la glycolyse (via la pyruvate kinase hépatique ; L-PK) et les enzymes clés de la lipogenèse sont contrôlées par ChREBP (représentés en rouge). La production concomitante de NADPH par les hexoses monophosphate dévie la voie (HMP shunt) vers la production de Xu-5-P et le recyclage

du pyruvate à partir du citrate libéré de l'oxaloacétate (OAA) par l'enzyme malique (ME) donnant des équivalents réduits nécessaires à la synthèse des acides gras.

b. Régulation transcriptionnelle de ChREBP

Au niveau transcriptionnel ChREBP est aussi régulé dans plusieurs conditions. La concentration des ARNm de ChREBP dans le foie à l'état nourri est la même ou trois fois plus élevée que durant le jeûne. Repa *et al.* (2007) ont montré que LXR régule directement l'expression du gène de ChREBP à l'échelle transcriptionnelle, cependant ces résultats n'ont pas été confirmés. Le promoteur du gène ChREBP contient un élément de réponse à LXR de 2.4 kbp et les agonistes de LXR augmentent au niveau hépatique les mRNA de ChREBP chez les souris contrôles mais pas chez les souris déficientes de LXR α . Cependant, malgré l'hyperinsulinémie et l'hyperglycémie observés chez les souris ob/ob, la concentration des messagers de ChREBP dans le foie des souris ob/ob n'est que deux fois plus élevée que dans le foie des souris contrôles. Ces résultats suggèrent que l'activité de ChREBP est régulée essentiellement à l'échelle post-transcriptionnelle plutôt qu'au niveau transcriptionnel.

c. Rôle de ChREBP dans les autres tissus

ChREBP est exprimé ubiquitairement, mais plus particulièrement dans les organes lipogéniques, comme le foie, l'intestin et le tissu adipeux blanc. ChREBP est également exprimé dans les îlots de Langerhans où, le glucose puisqu'il est un signal cellulaire très important stimule la sécrétion de l'insuline. Les études par puces à ADN ont identifié des gènes qui répondent au glucose dans les îlots communs avec ceux du foie. Dans les cellules produisant de l'insuline INS-1, la surexpression de ChREBP augmente les ARNm de LPK, FAS, et ACC-1, mais la réponse de l'insuline au glucose dans ces cellules est la même que dans les cellules contrôles. Dans les îlots de souris déficientes en ChREBP $^{-/-}$ la stimulation de la sécrétion de l'insuline par le glucose est la même que chez les souris contrôles. ChREBP régule également les gènes de la lipogenèse dans les îlots, uniquement une surexpression de ChREBP empêche l'accumulation de vésicules lipidiques, à l'opposé d'une surexpression de SREBP1-c. Ces données suggèrent que le signal insulinique en plus de l'activation de ChREBP sont importants pour l'induction de la lipogenèse.

ChREBP est également abondamment exprimé dans le tissu adipeux. Durant l'adipogenèse des préadipocytes 3T3-L1, ChREBP est fortement induite et l'expression de ces gènes cibles est modulée par plusieurs facteurs comme le glucose, les acides gras libres, l'insuline et les agents antidiabétiques comme les troglitazones. Cependant, l'expression de l'ARNm de ChREBP *in vivo* dans le tissu adipeux répond faiblement au changement du statut nutritionnel. ChREBP est induit dans le stade final de l'adipogenèse et participe peu à ce processus, ainsi son rôle dans le tissu adipeux reste mal connu.

B.2.3 Liver X receptor

Les récepteurs nucléaires LXRs (Liver X receptors) sont des facteurs de transcription activés par des ligands appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires. Ils ont été identifiés la première fois en 1994 par l'analyse du foie de rat (Apfel *et al.*, 1994; Song *et al.*, 1994). LXRs ont été initialement classés comme des récepteurs nucléaires orphelins car leurs ligands n'étaient pas encore identifiés. Ces récepteurs ont été « adoptés » suite à l'identification de plusieurs ligands physiologiques. La sous-famille de LXR consiste en deux isoformes, LXR α (NR1H3) et LXR β (NR1H2) qui possèdent 78% de similarité dans leurs séquences d'acides aminés correspondantes aux domaines de liaison à l'ADN et au ligand. L'expression de LXR α est restreinte à la rate, le foie, le tissu adipeux, l'intestin les reins et les poumons, alors que LXR β est exprimé dans tous les tissus examinés. Ces deux isoformes forment obligatoirement un hétérodimère avec le retinoid X receptor (RXR) et régulent l'expression des gènes par la liaison à l'élément de réponse à LXR (LXREs) dans les régions promotrices des gènes cibles. (Fig. 20). LXRE est constitué de deux séquences d'hexanucléotides (AGGTCA) séparées par 4 bases (DR-4 element). Le couple LXR/RXR est nommé l'hétérodimère permissif, qui est activé par des ligands pour chaque partenaire d'une manière

indépendante. En absence de ligands, LXR recrute des complexes de corépresseurs qui sont échangés avec des coactivateurs après activation du récepteur.

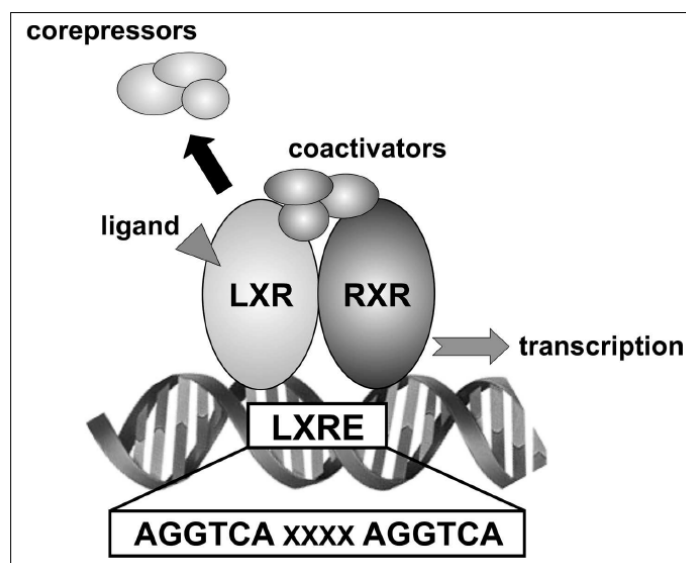


Fig. 20 Schéma du mécanisme de la régulation transcriptionnelle transmise par LXR (Baranowski, 2008).
RXR : retinoid X receptor ; LXRE : LXR response element.

Il est admis que les agonistes endogènes de LXR sont des dérivés oxydés du cholestérol ou oxystérols. Les activateurs potentiels de ce groupe sont le 22(R)-hydroxycholestérol et le 20(S)-hydroxycholestérol (intermédiaires dans la synthèse des hormones stéroïdes), le 24(S)-hydroxycholestérol (produit par le cerveau, l'oxystérol majeur du plasma humain) et le 24(S),25-epoxycholestérol (abondant dans le foie). A des concentrations physiologiques, ces oxystérols stimulent l'activité transcriptionnelle de ces LXRs. La plupart des oxystérols ont des affinités similaires pour les deux isoformes à l'exception du 5,6-24(S),25-diepoxycholestérol et le 6 α -hydroxy (acide biliaire) qui sont sélectifs pour LXR α . De plus, les travaux de Mitro et al., 2007a ont suggéré que le D-glucose et le D-glucose-6-phosphate sont des agonistes endogènes de LXR, avec une efficacité comparable aux oxystérols. Récemment ces résultats ont été mis en doute sur la base de l'incapacité du glucose et de ses métabolites d'interagir avec le récepteur de LXR α ou LXR β , en plus de l'absence des gènes sensibles au glucose régulés par LXRs dans le foie (Denechaud et al., 2008a). Il existe en plus de ligands naturels des ligands potentiels synthétiques qui ont été développés. Les deux plus utilisés dans les études expérimentales sont le TO901317 et le GW3965. Cependant il est à noter que le TO901317 est aussi un agoniste de PXR (pregnane X receptor). A l'opposé des oxystérols qui stimulent l'activité transcriptionnelle des LXRs, le géranylgeranylpyrophosphate, intermédiaire dans la voie de biosynthèse du cholestérol, inhibe les deux isoformes de LXR, par une action antagoniste via l'interaction avec les co-activateurs. Les acides gras polyinsaturés (PUFA) sont des compétiteurs des antagonistes de LXR dans plusieurs types cellulaires, cependant l'effet antagoniste sur

LXRs, n'a pas été confirmé chez les rongeurs dans le foie et les hépatocytes. Les PUFA empêchent la transcription de SREBP1-c, un des gènes cibles de LXR, cette action est indépendante de LXR α (Nakatani *et al.*, 2005; Pawar *et al.*, 2003).

L'activité de LXR n'est pas régulée uniquement par les agonistes et les antagonistes, mais également par des variations de l'expression du récepteur. Plusieurs études ont montré que l'expression de LXR α (mais non pas celle de LXR β) est contrôlée par un mécanisme autorégulateur. Un élément de réponse à LXR (LXRE) fonctionnel activé par les deux isoformes de LXR a été identifié dans le promoteur du gène LXR α chez l'homme. Les agonistes naturels et synthétiques de LXR augmentent l'expression de LXR α dans les macrophages, les adipocytes, les hépatocytes, les fibroblastes de la peau et les myotubes. L'autorégulation de LXR α est spécifique aux cellules humaines. Cependant, Ulven *et al.* (2004) ont identifié une région LXRE dans le gène LXR α de la souris et ont montré l'existence d'une autorégulation dans le tissu adipeux mais pas dans le foie ou le muscle squelettique des souris traitées avec le TO901317. Le promoteur du gène de LXR α chez l'homme et les rongeurs contient aussi un élément de réponse aux proliférateurs des peroxisomes (PPRE) et des agonistes de PPAR α et γ stimulant l'expression de LXR α chez les rongeurs ainsi que dans les macrophages, les adipocytes et les hépatocytes chez l'homme. Un autre facteur qui contrôle l'expression de LXR α est l'insuline qui augmente l'ARNm dans les hépatocytes de rat, d'une manière dose-dépendante, notamment par la stabilisation des transcrits. L'activité transcriptionnelle de LXR α est aussi régulée à l'échelle post-traductionnelle par la PKA qui phosphoryle le récepteur au niveau de deux sites empêchant sa dimérisation et sa liaison à l'ADN (Yamamoto *et al.*, 2007).

a. LXR et le métabolisme des acides gras dans le foie

Outre leur rôle dans le métabolisme du cholestérol, les LXRs régulent également la biosynthèse des acides gras au niveau hépatique. Ce processus est gouverné par SREBP1-c qui régule tous les gènes impliqués dans cette voie, notamment l'ACC1, la FAS et la stéaroyl-CoA désaturase (SCD). Peet *et al.* (1998) ont été les premiers à montrer que les souris déficientes de LXR α sont caractérisées par une expression hépatique très faible de SREBP1-c ainsi que ses gènes cibles comme FAS et SCD. Ces résultats sont confirmés chez des souris double knockout LXR α/β . En plus d'une expression faible des gènes lipogéniques, ces souris ont une concentration faible de triglycérides hépatiques et plasmatiques. D'autre part, des souris déficientes en LXR β ont une expression normale de SREBP1-c et de ses gènes cibles dans le foie, indiquant que c'est LXR α qui est responsable du contrôle de la lipogenèse hépatique. Les souris déficientes en LXR α sont caractérisées par une baisse remarquable de la synthèse d'acides gras et de l'incorporation des acides palmitoléique et oléique dans les phospholipides et les triglycérides (Repa *et al.*, 2000).

En accord avec les données chez les animaux knockout, l'administration du TO901317 augmente l'expression hépatique de SREBP1-c, ACC, FAS et SCD-1 chez des souris contrôles et pas chez les souris knockout LXR α/β ou LXR α . Le TO901317 entraîne une activation de la lipogenèse qui conduit à une accumulation massive de triglycérides hépatiques, entraînant une stéatose et un dysfonctionnement hépatique ainsi qu'une hypertriglycéridémie chez la souris, le rat et les hamsters. Un phénotype similaire a été récemment observé chez des souris qui surexprime LXR α au niveau hépatique. Le rôle clé de LXR α dans le contrôle de la lipogenèse hépatique a été confirmé par les expériences de Lund *et al.* (2006) utilisant des activateurs de LXR α .

L'activation de la lipogenèse hépatique après stimulation par LXR, dépend de l'induction de SREBP1-c. Un élément de réponse au LXR (LXRE) est identifié dans la région promotrice du gène SREBP1-c et une stimulation de l'hétérodimère LXR/PXR qui augmente le contenu du précurseur, la forme mature et nucléaire de la protéine SREBP1-c dans les cellules HepG2. L'importance de SREBP1-c dans la stimulation de LXR et l'induction de la lipogenèse hépatique a été confirmée chez des souris SREBP1-c knockout traitées avec le TO901317. Dans le foie de ces animaux, la réponse transcriptionnelle des gènes lipogéniques à l'activation de LXR α est absente et l'accumulation de triglycérides ainsi que l'hypertriglycéridémie sont réduits. Cependant, l'augmentation de l'expression d'ACC, FAS et SCD-1, est présente mais affaiblie,

indiquant la contribution d'un mécanisme SREBP1-c-indépendant. D'autres études ont révélé la présence dans ces trois gènes d'une région LXRE fonctionnelle, régulée directement par LXR (Chu *et al.*, 2006; Talukdar and Hillgartner, 2006).

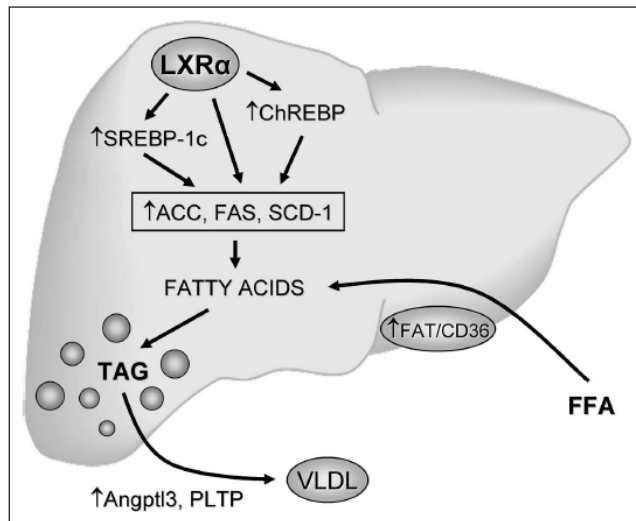


Fig. 21 Schéma de l'activation de la lipogénèse hépatique par LXR α (Baranowski, 2008). ACC : acetyl-CoA carboxylase, Angptl3 : angiopoietin-like protein 3, ChREBP : carbohydrate response element binding protein, FAS : fatty acid synthase, FAT/CD36 : fatty acid translocase/CD36, FFA : free fatty acids, PLTP : phospholipids transfer protein, SCD-1 : stearoyl-CoA desaturase 1, SREBP1-c : sterol regulatory element binding protein 1 c, TAG : triacylglycerol, VLDL : very low density lipoprotein.

Le facteur de transcription sensible au glucose (ChREBP), stimule l'expression des gènes lipogéniques et permet la conversion de l'excès de carbohydrates en lipides. Cha and Repa, (2007) ont montré que l'administration du TO901317 augmente la quantité et l'activité de ChREBP ainsi que l'expression des gènes régulés par ChREBP dans le foie chez des souris contrôles et non pas chez des souris déficientes de LXR α/β . Ils ont également identifié deux séquences LXRE, activés par LXR α et LXR β , dans la région promotrice du gène de ChREBP. Chez des souris déficientes du gène ChREBP, l'effet stimulateur du TO901317, sur l'expression hépatique des gènes lipogéniques (ACC-1, FAS et SCD-1) est atténué. L'activation de ChREBP induite par le TO901317 implique l'AMPK. L'activité transcriptionnelle de ChREBP est inhibée par la forme active phosphorylée de l'AMPK et le TO901317 diminue la phosphorylation de l'AMPK dans le foie chez la souris, par une voie dépendante de LXR, ce qui lève l'inhibition sur ChREBP (Cha and Repa, 2007). Cependant, des expériences sur des souris nourries et à jeun et sur des hépatocytes primaires incubés en présence de concentration faible ou élevée du glucose, révèlent que l'augmentation du flux du glucose intracellulaire est nécessaire pour que le TO901317 induit l'activité transcriptionnelle de ChREBP (Denechaud *et al.*, 2008). Les agonistes de LXR peuvent stimuler l'expression de ChREBP sous ces deux condition ; son activation et sa translocation dans le noyau sont induites uniquement chez des souris nourries et dans des hépatocytes incubés avec des concentrations élevées du glucose. Ainsi, LXRs régulent l'expression hépatique des gènes lipogéniques par des effets directs (*via* LXREs) et indirects (*via* SREBP1-c et ChREBP). Grefhorst *et al.* (2002) ont montré que l'hypertriglycéridémie induite par LXR résulte de l'augmentation de la sécrétion hépatique de VLDL-triglycérides. Le nombre de particules de VLDL formées n'est pas changé, mais leur diamètre augmente dû à un taux élevé de triglycérides par particule. L'action hypertriglycéridémique des agonistes de LXR peut être partiellement transmise par la protéine de transfert des phospholipides (PLTP). Cette protéine intervient non seulement dans le transport des phospholipides des lipoprotéines à apo-B aux HDLs mais favorise également la sécrétion hépatique de VLDL. L'angiopoietin-like protein 3 (Angptl3) joue un rôle clé dans l'induction de l'hypertriglycéridémie induite par LXR. Angptl3 est une protéine sécrétée, exprimée exclusivement dans le foie. Elle joue un rôle important dans le métabolisme des lipides (Koishi *et al.*, 2002). Les agonistes synthétiques et naturels

augmentent l'expression de l'Angptl3 dans les cellules hépatiques humaines et le foie de souris, par une liaison fonctionnelle avec la région LXRE identifiée dans ce gène. Inaba *et al.*, (2003) ont montré que les souris déficientes de Angptl3, traitées avec le TO901317 sont protégées d'une hypertriglycéridémie mais pas d'une accumulation hépatique de triglycérides. Les auteurs suggèrent que la protéine Angptl3 entraîne une hypertriglycéridémie par une inhibition de l'activité de la lipoprotéine lipase (LPL).

Il faut noter que l'effet hypertriglycéridémiant des agonistes de LXR est généralement transitoire et limité aux premiers jours de traitement (Lund *et al.*, 2006). Ceci est dû à l'hydrolyse des VLDL-triglycérides et à l'augmentation de l'expression de la LPL hépatique (Grefhorst *et al.*, 2002). Une région LXRE fonctionnelle activée par LXR α , et à moindre importance par LXR β , a été retrouvée dans le gène de la LPL et le TO901317 induit l'expression de LPL dans le foie et les macrophages des souris mais pas dans le muscle squelettique ou le tissu adipeux (Zhang *et al.*, 2001). Récemment, Zhou *et al.* (2008) ont identifié une protéine de transport d'acides gras (fatty acid translocase/CD36, FAT/CD36) comme étant cible de LXR α . Ils ont trouvé une région LXRE fonctionnelle dans le promoteur du gène FAT/CD36 et ont montré que son expression est induite par les oxystérols et les ligands synthétiques de LXR dans le foie, chez l'homme et la souris. La stéatose hépatique et la stimulation des gènes lipogéniques ainsi que l'hypertriglycéridémie sont atténuées chez des souris déficientes de FAT/CD36 traitées par les agonistes de LXR. Ces résultats suggèrent qu'en plus de la stimulation de la synthèse des acides gras, la captation hépatique d'acides gras peut aussi contribuer à la stéatose hépatique induite par l'activation de LXR.

Les LXRs régulent aussi d'autres aspects du métabolisme d'acides gras au niveau hépatique. Hu *et al.* (2005) ont montré que le TO901317 augmente la β -oxydation peroxisomale d'acides gras au niveau hépatique ainsi que l'expression des enzymes impliqués par un mécanisme dépendant de LXR α et indépendant de PPAR α . De plus, l'activation de LXR augmente l'expression et l'activité de la $\Delta 6$ et $\Delta 5$ désaturases dans le foie des souris.

Il semble donc que l'activation de la lipogenèse par les agonistes synthétiques de LXR entraîne une stéatose hépatique sévère et une hypertriglycéridémie, ce qui représente une barrière majeure pour leur utilisation clinique. Cependant, il n'est pas encore bien élucidé, comment peuvent se présenter chez l'homme, ces effets indésirables observés dans les expérimentations chez les rongeurs. Récemment, les travaux de Kotokorpi *et al.* (2007) montrent une différence significative entre la réponse au GW3965 au niveau des hépatocytes de rat et de l'homme, posant la question à quelle mesure les modèles de rongeurs reflètent la situation humaine. Pour le moment, l'activation de LXR réduit la sécrétion des VLDL-triglycérides dans les hépatocytes chez l'homme et pas chez les rats. Le GW3965 augmente remarquablement la stimulation de l'expression des gènes lipogéniques chez l'homme, cependant l'augmentation du contenu en triglycérides reste modeste.

b. LXR et le métabolisme des acides gras dans le muscle squelettique

Les deux types de LXR sont exprimés dans le muscle squelettique chez l'homme et la souris, à ce jour. Seulement quelques études se sont intéressées aux rôles de LXRs dans ce tissu. LXR β est la forme dominante dans le muscle squelettique de la souris et l'homme. Cependant, les travaux de Muscat *et al.* (2002) ont montré des concentrations d'ARNm de LXR α et LXR β dans le muscle quadriceps de souris. Les travaux de Baranowski, (2008) ont observé une prédominance de la protéine LXR α dans les muscles soleus et gastrocnemius de rat. Les deux isoformes sont exprimées précocement au cours de la différenciation et augmentent dans les myotubes mûres. L'expression de LXR α augmente significativement suite à l'activation de LXR dans les myotubes indifférenciés chez l'homme mais pas dans le muscle squelettique de souris.

Des études suggèrent une différence remarquable dans la signalisation entre le foie et le muscle squelettique. A l'opposé du foie, le taux de synthèse d'acides gras et l'expression des gènes de la lipogenèse ne sont pas réduits dans le muscle squelettique chez les souris LXR α/β déficientes (Muscat *et al.*, (2002). Alors que, le TO901317 et le GW3965 augmentent significativement l'expression de SREBP1-c dans le muscle squelettique chez la souris, les taux d'ARNm des gènes lipogéniques (FAS, ACC et SCD-1) ne

sont pas augmentés. Cependant, l'expression des autres gènes cibles de LXR comme ABCA1, ABCG1 et apoE sont significativement exprimés après administration du TO901317, indiquant une réponse normale à la stimulation de LXR. Les travaux de Kase *et al.* (2007) ont montré que contrairement au muscle squelettique de la souris, les myotubes différenciés chez l'homme répondent au TO901317 avec une augmentation très marquée de SREBP1-c et une baisse aussi importante de ses cibles (ACC, FAS et SCD-1). Dans les mêmes expérimentations le 22(R)-hydroxycholestérol augmente l'expression de SREBP1-c, d'autres gènes lipogéniques ne sont pas induits par cet oxystérol. Le TO901317 et non pas le 22(R)-hydroxycholestérol stimule la lipogenèse dans les myotubes humains. Il est à noter cependant, que contrairement à Kase *et al.* (2007), les travaux de Cozzzone *et al.* (2006) ont montré une augmentation modeste de l'expression des gènes lipogéniques dans les myotubes différenciés de l'homme traités avec le TO901317, dû au fait que l'activation de LXR, augmente uniquement le précurseur mais non pas la forme mûre de la protéine SREBP1-c. Dans les myotubes humains, le TO901317 induit également l'expression de FAT/CD36 et l'acyl Co-A synthase long chain family member-1. Il en résulte ainsi une augmentation de la captation du palmitate et son incorporation dans les lipides cellulaires. L'oxydation du palmitate est parallèlement élevée, mais insuffisamment pour compenser la captation d'acides gras. En conséquence, l'activation de LXR oriente le palmitate vers la formation de lipides complexes.

B.2.4 Pregnane X receptor

Pregnane X receptor (PXR, NR112) est un membre de la famille des récepteurs nucléaires. Il est connu sous le nom de récepteur aux stéroïdes et xénobiotiques (SXR) ou le récepteur activé par prégnane (PAR). Il agit comme un facteur de transcription activé par des ligands, c'est un régulateur clé des gènes impliqués dans le métabolisme des endobiotiques et des xénobiotiques (Bertilsson *et al.*, 1998; Kliewer *et al.*, 1998).

L'activité transcriptionnelle de PXR est augmentée après liaison du ligand. Plusieurs molécules synthétiques comme la rifampicine, phenobarbital, clotrimazole, ritonavir, paclitaxel, nifedipine, dexaméthasone et des produits naturels sont des régulateurs de l'activité transcriptionnelle de PXR. Le mécanisme moléculaire de ces régulations n'est pas encore bien élucidé. La forme active de PXR constitue un hétérodimère avec le RXR α et se lie à une variété d'éléments de réponse (direct repeats DR-3, D-R4 at DR-5 ainsi que everted repeats ER-6 et ER-8) dans la région promotrice des gènes cibles.

Parmi les gènes cibles de PXR on trouve la famille de cytochrome P450 (CYP), la glutathione S-transferase (GST) et la sulfotransférase (SULT). PXR régule également l'expression des gènes codants pour des transporteurs de certaines drogues. Comme les autres membres de la famille des récepteurs nucléaires, le domaine de liaison au ligand (LBD) de PXR est composé de domaines multifonctionnels permettant la liaison au ligand, la dimérisation, l'activation transcriptionnelle et l'interaction avec les cofacteurs transcriptionnels.

Le danger représenté par les xénobiotiques pour l'organisme est la cible d'une stratégie complexe. Le métabolisme des drogues et autres xénobiotiques dans le foie est la défense primaire de l'organisme contre l'accumulation de composants lipophiles potentiellement toxiques. Cette stratégie comprend des xénosensors qui reconnaissent des xénobiotiques et d'autres molécules endogènes dangereuses et le système de transporteurs et métabolisme des xénobiotiques (xenobiotic metabolizing and transporters systems XMTS). La première étape du mécanisme nommé « détoxification » est la détection des xénobiotiques par les xenosensors, comme PXR. Ces xénosensors coordonnent l'expression des gènes du système XMTS pour inactiver et/ou éliminer les xénobiotiques en quatre phases essentielles :

1. captation des xénobiotiques (transporteurs)
2. oxydation des xénobiotiques par la famille des cytochrome P450 (CYPs).
3. conjugaison des xénobiotiques par l'UDP-glucuronyl transférase, la glutathione S transférase ou la sulfotransférase.

4. efflux des xénobiotiques par les transporteurs comme MDR1 (ATP-binding cassette, sous-famille B, membre 1), MRP2 (ATP-binding cassette, sous-famille C, membre 2).

Toutes les protéines induites sont responsables du métabolisme et du transport des drogues chimiques et de l'environnement mais sont également impliquées dans le catabolisme des acides biliaires, des hormones stéroïdes et thyroïdiennes. Ainsi les xénobiotiques interfèrent avec des fonctions physiologiques normales.

Effets de l'activation de PXR sur le métabolisme lipidique

Plusieurs observations cliniques ont montré que plusieurs médicaments, actuellement identifiés comme des activateurs de PXR, affectent le métabolisme lipidique. Notamment, le traitement avec la rifampicine (un activateur potentiel de PXR chez l'homme) induit une stéatose hépatique chez des patients tuberculeux (Morere *et al.*, 1975) ainsi qu'un effet stéatogénique dans le foie de rat (Piriou *et al.*, 1979). Le carbamazépine un activateur récemment caractérisé de PXR (Oscarson *et al.*, 2006) est connu pour induire une stéatohépatite.

Plusieurs observations ont montré que les activateurs de PXR entraînent une inhibition du catabolisme des lipides. L'activation de PXR entraîne une diminution de la β -oxydation liée à l'expression génique. L'agoniste de PXR (16 α -carbonitrile (PCN)) diminue les concentrations d'ARNm de la carnitine palmitoyltransférase 1 (CPT1) chez des souris contrôles mais pas chez les souris déficientes en PXR. La régulation transcriptionnelle de CPT1 est régulée par plusieurs facteurs et co-facteurs de transcription comme le facteur nucléaire hépatocytaire 3 β (FoxA-2), le PPAR α et le récepteur des hormones thyroïdiennes (TR).

PXR augmente la captation d'acides gras dans le foie chez la souris. Récemment, il a été montré que l'activation de PXR augmente l'accumulation de triglycérides dans le foie chez la souris (Zhou *et al.*, 2006). L'expression de CD36, une translocase d'acides gras impliquée dans le transport des acides gras à longues chaînes (LCFA) est stimulée. Cette classe B des récepteurs scavenger est impliquée dans la captation périphérique des acides gras. La transcription de CD 36 est activée par les acides gras et le facteur de transcription nucléaire PPAR γ . Zhou et ses collaborateurs, (2006) ont montré que le promoteur du gène CD36 chez la souris contient un élément de réponse fonctionnel au PXR de type DR-3. CD36 est ainsi une cible transcriptionnelle directe de PXR, en plus d'une cible indirecte par l'intermédiaire de la stimulation de l'expression de PPAR γ . L'accumulation hépatique de lipides et l'induction de CD36 sont aussi observées chez des souris traitées avec un autre agoniste de PXR, la rifampicine.

PXR augmente aussi l'expression hépatique de facteurs de transcription et des enzymes de la lipogenèse. In vivo, chez la souris, l'activation pharmacologique de PXR ou l'utilisation de mutants actifs de PXR ont montré que le facteur de transcription (PPAR γ) et les ARNm de deux enzymes lipogéniques, stéaryl CoA désaturase (SCD1) et la fatty acid elongase, sont induits d'une manière dépendante de PXR. Cependant, aussi bien l'accumulation des triglycérides sous l'effet de PXR et l'induction des gènes de la lipogenèse sont indépendants de l'activation du facteur de transcription lipogénique SREBP1-c (Zhou *et al.*, 2006), suggérant que ces effets sont indépendants de la voie SREBP1-c lipogénique classique. En effet l'ARNm et de la protéine de SREBP1-c (les formes précurseurs et mûres) ne sont pas induits après l'activation de PXR chez la souris et dans les hépatocytes humains. Une part des effets de PXR semble passer par l'intermédiaire de S14 (Moreau *et al.*, 2008).

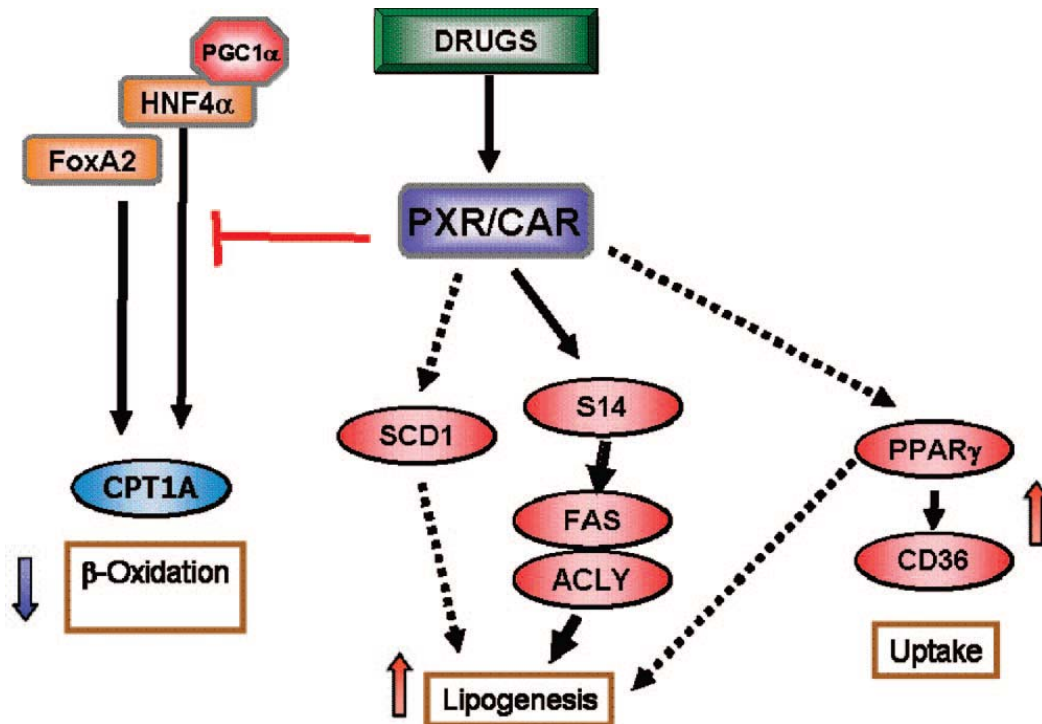


Fig. 22 Représentation schématique de l'implication de PXR dans l'altération de l'homéostasie des lipides (Moreau *et al.*, 2008).

B.2.5 Régulation par les hormones thyroïdiennes

Les hormones thyroïdiennes (TH) ont un grand impact sur l'homéostasie lipidique (Oppenheimer *et al.*, 1987). Le rôle des TH et leurs récepteurs (TRs) dans le métabolisme du cholestérol a été très étudié (Oppenheimer *et al.*, 1987) (Duntas, 2002). Cependant il reste encore difficile de savoir comment les TH agissent sur le métabolisme des triglycérides. SREBP1-c est le facteur majeur impliqué dans la synthèse des TG. Les travaux de Hashimoto *et al.* (2009) et ceux de Hashimoto *et al.* (2006b) ont montré récemment que l'expression du gène de SREBP1-c est négativement régulée par les TH. ChREBP qui joue un rôle dans la glycolyse et la lipogenèse a été récemment identifié comme un gène cible de LXR (Cha and Repa, 2007). LXR et TRs interagissent mutuellement au cours de la transcription, partageant un même domaine de liaison à l'ADN [direct repeat-4 (DR4)] avec une géométrie et une polarité identiques. Il a été récemment montré que TR-β1 et LXRα interagissent au niveau du promoteur du gène cholestérol 7α-hydroxylase chez la souris (Hashimoto *et al.*, 2006a) et que le promoteur du gène LXRα est régulé positivement par les TH et TR-β (Hashimoto *et al.*, 2007) suggérant des interactions entre les deux récepteurs. Les travaux de Hashimoto *et al.* (2009) ont montré que l'expression des ARNm et des protéines de ChREBP augmente dans le foie des souris sous l'effet des TH et que le promoteur de ce gène est activé par T3. Ils ont également montré que ChREBP est un nouveau gène cible des TH. Chez l'homme, le promoteur du gène ChREBP est positivement régulé par les TH. Aussi bien ChREBP que SREBP1-c sont des facteurs clés de la synthèse des triglycérides. La fonction des TH dans le métabolisme des TG est obscure, en effet le taux des triglycérides plasmatiques est variable chez des patients thyrotoxiques et hypothyroïdiens. L'augmentation de ChREBP et l'inhibition de SREBP1-c par les TH sont impliqués dans cette instabilité. Parce qu'il a été récemment rapporté que l'expression du gène LXRα est positivement régulée par les TH, Hashimoto *et al.* (2009) ont émis l'hypothèse que les TH ajusteraient la synthèse des TG. Etant donné que TR régule l'expression des gènes LXR, SREBP1-C et ChREBP, les TR pourraient avoir un rôle clé dans la régulation transcriptionnelle de la lipogenèse hépatique. En effet, une étude récente a montré que ChREBP et non pas LXR est nécessaire pour l'induction de L-PK et ACC Denechaud *et al.* (2008b), indiquant qu'il existe un régulateur transcriptionnel autre que LXR dans le foie. Ces résultats montrent le rôle des TH dans le métabolisme des lipides.

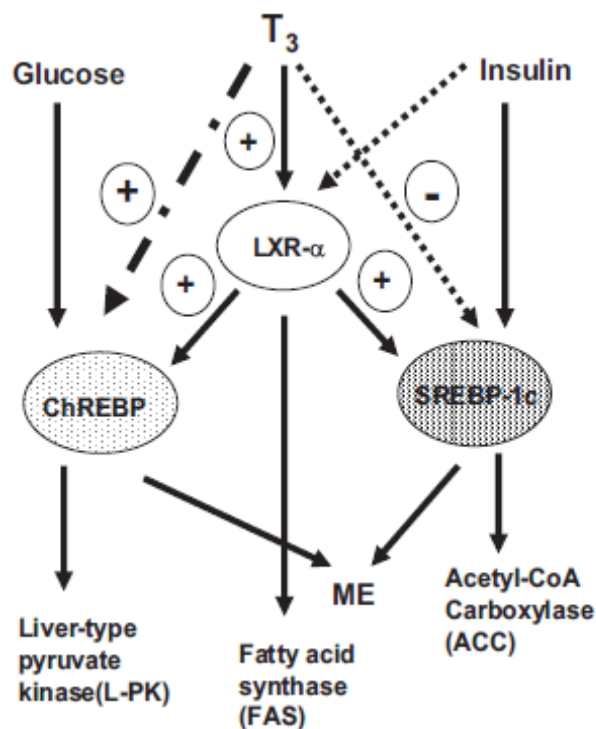
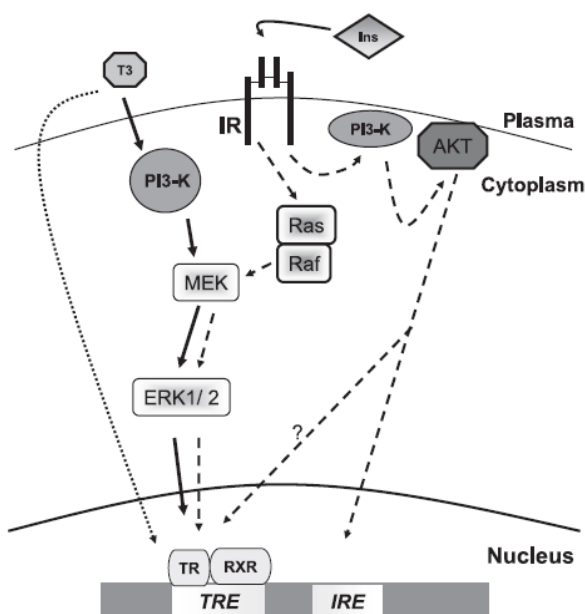


Fig. 23 Schéma de la contribution des hormones thyroïdiennes (T3) au métabolisme des acides gras (Hashimoto *et al.*, 2009). T3 induit LXR-α et inhibe SREBP-1c, ce qui augmente ACC et l'enzyme malique (ME) sous l'effet de l'insuline. L'insuline inhibe l'expression de LXR-α. LXR-α augmente l'expression de ChREBP et SREBP-1c et stimule FAS. T3 induit l'expression du gène de ChREBP qui stimule sous l'effet du glucose la L-PK et la ME.

Plusieurs études (Wilson *et al.*, 1986) (Stapleton *et al.*, 1990) ont montré que T3 est capable de potentialiser les effets de l'insuline sur la transcription de FAS, le mécanisme mis en jeu n'est pas encore bien élucidé. T3 régule la transcription génique par la liaison du complexe hormone/récepteur à l'élément de réponse à T3 (TREs) localisé dans le promoteur de plusieurs gènes. Les TRE se lient au récepteur de T3 appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires. Le récepteur de T3 peut soit former un homodimère ou interagir avec d'autres récepteurs nucléaires comme le RXR (retinoid X receptor) et former ainsi un hétérodimère. Ce dernier se lie à la région TRE du gène appelée DR (direct repeat), une séquence séparée par 4 nucléotides (DR4), elle est bien conservée chez les différentes espèces ce qui suggère le même type de régulation. Ceci augmente l'activité transcriptionnelle en réponse à T3 plus efficacement que l'homodimère TR/TR. Il est devenu clair que les hormones thyroïdiennes (THs) régulent la transcription génique par un mécanisme non génomique par activation des différentes cascades de signalisation intracellulaire Radenne *et al.* (2008). Les travaux de Cao *et al.* (2005) ont montré au niveau des fibroblastes humains, que T3 est capable d'activer la voie PI 3-Kinase/PKB/mTOR/p70^{S6K} par une interaction directe entre TR et la kinase.

kinase, le
lier également
cellulaire α(V)β,
ERK1/2 MAPK et
noyau, ERK1/2
hormones
dissociation des
augmente la
induit la



Indépendamment de la PI 3-hormones thyroïdiennes peuvent se aux intégrines de la surface entrainant l'activation des kinases leur translocation nucléaire. Dans le MAPK phosphoryle le récepteur des thyroïdiennes (TR), entrainant la co-represseurs SMRT et NCor. Ceci dégradation des co-répresseurs et transcription. La phosphorylation de

TR est indispensable à l'hétérodimérisation avec RXR, augmentant la liaison du complexe TR/RXR au niveau du TRE. Le co-activateur SRC-1, qui est recruté au niveau du complexe transcriptionnel TR, est aussi décrit comme une cible de ERK1/2 MAPK. Le complexe ERK1/2 MAPK/TR se lie également et phosphoryle la protéine p53 et les facteurs de transcription STAT modulant la transcription d'autres gènes cibles. En conclusion les travaux de Radenne *et al.* (2008) ont montré au niveau hépatique, que T3 régule la transcription de FAS via une action génomique impliquant la liaison de l'hétérodimère TR/RXR au niveau de l'élément de réponse à T3. Cependant, T3 peut aussi par un mécanisme non génomique, par la voie PI 3-kinase, qui active ERK1/2 MAPK, augmenter la transcription de FAS. D'autre part, la liaison de l'insuline à son récepteur membranaire active les voies de signalisation PI 3-kinase et Ras/Raf/ERK1/2-MAPK stimulant la transcription de FAS via TRE.

Fig. 24 Représentation schématique de la régulation transcriptionnelle de FAS en réponse à T3 et à l'insuline (Radenne *et al.*, 2008). La liaison de l'insuline à son récepteur membranaire entraîne l'activation des voies PI 3-kinase/Akt et Ras/Raf/ERK1/2 MAPK, les deux voies régulent les séquences IRE (insulin response element) et probablement TRE (T3 response element) localisées dans le promoteur du gène FAS (flèches en pointillés). La T3 peut réguler la transcription du gène FAS directement via un mécanisme génomique par la liaison de l'hétérodimère TR/RXR au niveau du TRE. Cependant la T3 peut moduler l'activité transcriptionnelle de TRE via un mécanisme non génomique par l'activation de la voie PI 3-kinase/ERK1/2 MAPK (flèches continues).

Les travaux de Cachefo *et al.* (2001) ont montré que la lipogenèse hépatique est augmentée chez des patients hyperthyroïdiens. Plusieurs mécanismes interviennent dans cette stimulation de la lipogenèse. Les hormones thyroïdiennes peuvent agir directement. Elles stimulent l'activité du promoteur I de l'ACC-1, et celui de la FAS. De plus les hormones thyroïdiennes augmentent la transcription de l'enzyme malique, l'ATP citrate lyase et L-pyruvate kinase, des gènes qui codent pour des enzymes impliqués dans le contrôle de la lipogenèse par la production de l'acétyl-CoA et de NADPH. Les hormones thyroïdiennes peuvent agir également par modification de l'environnement hormonal et métabolique du foie.

B.2.6 Les « Peroxisome Proliferator-activated Receptor » PPARs

La famille des récepteurs stimulés par les proliférateurs des peroxisomes PPARs appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires. Il existe trois sous-types de récepteurs PPARs, soit PPAR α , PPAR β/δ et PPAR γ qui comprend trois isoformes, tous codés par un gène différent (Blaschke *et al.*, 2006). Ces facteurs de transcription régulent l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et lipoprotéines, la balance énergétique, la différenciation cellulaire et la tumogénèse. Ces facteurs

forment un hétérodimère, avec le récepteur de l'acide rétinoïque (RXR), qui une fois activé par la fixation de leur ligand (physiologique ou synthétique), va se lier à une séquence d'ADN spécifique située sur le promoteur des gènes cibles. Cette séquence d'ADN spécifique est nommée « peroxisome proliferator response element » (PPRE) et consiste en deux séquences répétées de AGGTCA, espacées d'un nucléotide. Il est important de préciser que le complexe PPAR/RXR peut être activé par le ligand d'un des deux récepteurs, mais qu'une liaison simultanée des deux substrats rend l'activation plus efficace. Les acides gras insaturés à longue chaîne ainsi que les dérivés eicosanoides sont des ligands endogènes pour les 3 isotypes de PPAR. Des ligands synthétiques pour PPAR α et PPAR γ ont été développés pour l'utilisation clinique, les ligands de PPAR β/δ sont actuellement en cours d'études cliniques. Chaque sous-type de récepteur PPAR a une expression distincte mais aussi des activités biologiques différentes. PPAR α et PPAR γ prédominent dans le foie et le tissu adipeux respectivement, PPAR β/δ son expression est ubiquitaire.

PPAR α

Premier PPAR identifié, il est impliqué dans la régulation du métabolisme lipidique et l'homéostasie du glucose par la régulation de l'expression des protéines impliquées dans le transport et la β -oxydation des acides gras libres. PPAR α , est principalement exprimé dans le foie mais aussi dans le cœur, le muscle squelettique et les reins, où il joue un rôle clé dans le métabolisme lipidique intracellulaire. Les fibrates comme les finofibrates ou les benzafibrates sont des activateurs de PPAR α et sont très utilisés dans le traitement des hypertriglycéridémies.

Les PUFA de l'huile de poisson de la série (n-3), qui diminuent les taux plasmatiques de VLDL et chylomicrons chez les patients hypertriglycéridémiques, sont actuellement considérés comme protecteurs des maladies cardiovasculaires. Cet effet des PUFA, résulte de la diminution de l'activité des enzymes lipogéniques hépatiques, dus à l'inhibition de la transcription des gènes et/ou modification de la maturation et/ou stabilité des ARNm. La répression de l'expression des gènes par les acides gras est limitée uniquement aux acides gras ayant plus que 18 atomes de carbones et au moins deux double liaisons, alors que l'augmentation de l'expression des gènes est indépendante du degré de saturation (Pegorier *et al.*, 2004).

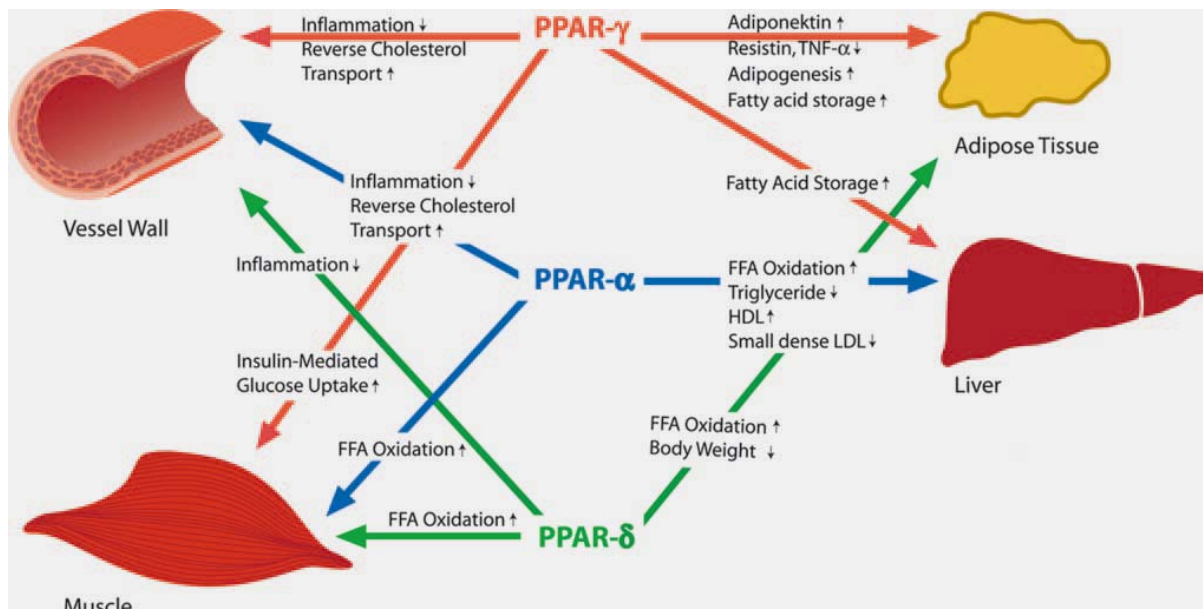


Fig. 25 Effet des isoformes de PPAR (PPAR α , PPAR β/δ et PPAR γ) dans le tissu adipeux, le foie, le muscle et la paroi artérielle. (Blaschke *et al.*, 2006)

Les acides gras (saturés et PUFA) et certains eicosanoides sont des ligands potentiels des PPAR. La modulation de la transcription des gènes est due à la liaison de l'hétérodimère PPAR/RXR (retinoic x receptor) à une séquence spécifique de l'ADN, l'élément de réponse aux proliférateurs des péroxisomes (PPRE). La séquence consiste en un hexamère répété AGGTCA avec un espace d'une paire de base (DR1) avec une extension 5' (AACT) essentielle pour la polarité et la spécificité de la liaison à l'ADN de l'hétérodimère PPAR/RXR. L'analyse structurale de PPAR révèle que les ligands se lient à la région LBD (ligand binding domain) aboutissant à une conformation active du récepteur par la stabilisation de l'AF-2 (activator function) une région de LBD. Les changements conformationnels aboutissent à l'enlèvement du complexe de corepresseur de l'hétérodimère PPAR/RXR et le recrutement du complexe co-activateur essentiel pour l'interaction avec la machinerie de transcription. Le recrutement de la machinerie transcriptionnelle peut se dérouler directement ou en réponse au remodelage de la chromatine (acytélolation des histones). La découverte des récepteurs PPAR et leur implication dans la régulation de l'expression des gènes, ces derniers qui possèdent une ou plusieurs séquences PPRE au niveau de leur promoteur en réponse à des acides gras par l'intermédiaire des PPAR. Cependant, la régulation de l'expression des gènes par les acides gras est plus complexe que ce simple schéma (Pegorier *et al.*, 2004).

La nature du signal responsable de l'effet transcriptionnel des LCFA est encore controversée. Actuellement, certaines expériences ont suggéré que l'oxydation mitochondriale des LCFA est nécessaire pour l'effet inhibiteur sur l'expression des gènes. D'autre part, plusieurs études ont montré que les inhibiteurs de l'oxydation des acides gras à longues chaînes, ou les acides gras non métabolisables, n'empêchent pas les effets transcriptionnels de ces acides gras. Ceci suggère que la molécule active doit être l'acide gras lui-même ou leurs dérivés Co-A. Plusieurs expérimentations ont montré que les esters d'acyl Co-A sont les composants actifs sur la transcription des gènes. Cependant, chez les mammifères certaines données suggèrent que les acides gras libres plutôt que les acyl-Co-A sont les plus actifs sur l'expression des gènes. La présence de plusieurs molécules de signalisation (NEFA, Acyl-CoA, prostanoides) suggère que les acides gras peuvent contrôler la transcription des gènes par différents mécanismes selon la spécificité cellulaire et les gènes cibles.

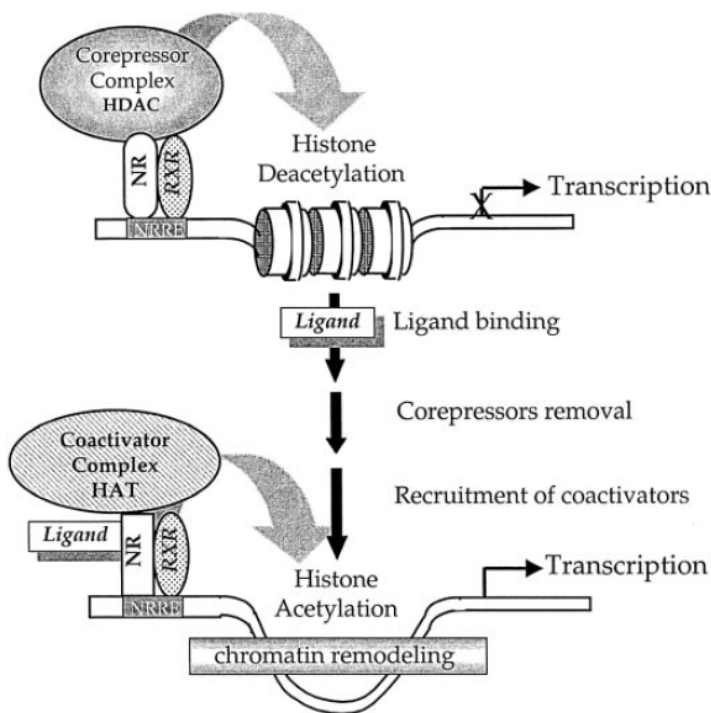


Fig. 26 Représentation schématique de la régulation de la transcription génique par les récepteurs nucléaires. (Pegorier *et al.*, 2004).

Les gènes apo-AII et FAT-CD36, ne répondent pas aux acides gras en absence de la séquence PPRE dans leur promoteur. Dans le foie, des souris mutantes de PPAR α /- , l'effet inhibiteur des PUFA sur l'expression des gènes codants des protéines régulatrices de la lipogenèse (ACC-1, FAS, spot 14) ou de la glycolyse (L-pyruvate kinase) est présent malgré l'absence du récepteur PPAR α . Les PUFA inhibent la transcription des gènes de $\Delta 5$ et $\Delta 6$ désaturase alors que les agonistes de PPAR stimulent la transcription de ces gènes. Ces résultats suggèrent que des facteurs de transcription différents de PPAR sont impliqués dans l'expression des ces gènes par les acides gras comme LXR (liver x receptor).

PPAR γ

Trois isoformes de PPAR γ sont identifiées, PPAR- $\gamma 1$, PPAR- $\gamma 2$ et PPAR- $\gamma 3$. La protéine produite de l'isoforme PPAR- $\gamma 2$ contient un domaine supplémentaire dans la région N terminale composé de 30 acides aminés, cependant les protéines produites par les isoformes PPAR- $\gamma 1$ et - $\gamma 3$ sont identiques. L'expression de PPAR- $\gamma 2$ est principalement restreinte aux tissus adipeux, PPAR- $\gamma 1$ est largement exprimé. Les PPAR- γ jouent un rôle clé dans l'homéostasie du glucose et sont les cibles d'une classe de substances augmentant la sensibilité à l'insuline connues sous le nom de thiazolidinediones (TZDs). Les ligands de PPAR- γ disponibles et utilisés en clinique pour le traitement du diabète de type 2 sont les rosiglitazones et les pioglitazones. Les TZD réduisent la résistance périphérique à l'insuline caractéristique du diabète de type 2, ce qui augmente l'utilisation périphérique du glucose, réduit la production hépatique du glucose améliorant ainsi le contrôle glycémique. En plus de leurs effets sur le métabolisme des carbohydrates, les ligands de PPAR- γ ont des actions bénéfiques sur les lipides plasmatiques. Aussi bien, les pioglitazones que les rosiglitazones augmentent le taux des HDLs plasmatiques. Avec les pioglitazones le taux des triglycérides plasmatique diminue également. Les ligands de PPAR- γ inhibent aussi l'expression d'une variété de gènes proinflammatoires dans les macrophages.

PPAR β/δ

PPAR δ est le troisième isoforme de la famille des récepteurs nucléaires les PPAR, il est ubiquitaire mais plus particulièrement exprimé dans le foie, l'intestin, les reins, les tissus adipeux et le muscle squelettique. Les PPAR δ sont impliqués dans le contrôle de l'adipogenèse, le métabolisme des lipides et l'homéostasie énergétique. Le traitement avec des agonistes de PPAR δ améliore le profil lipidique chez la souris et les singes, et joue également un rôle dans l'inflammation. Les ligands physiologiques de ces récepteurs sont, entre autres, les acides gras à longues chaînes et les prostaglandines. Les PPAR δ seraient impliqués dans l'oxydation des acides gras au niveau musculaire et dans la différenciation cellulaire adipocytaire.

Effets des fibrates sur le métabolisme des acides gras et la synthèse des triglycérides

Les fibrates exercent leur effet hypolipémiant non seulement par leur action sur le catabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides, mais également par l'augmentation de la captation et du métabolisme des acides gras libérés. La captation des longues chaînes d'acides gras est facilitée par les transporteurs des acides gras comme la FATP. Après avoir traversé la membrane plasmique, l'acyl-CoA synthétase estérifie les acides gras en dérivés d'acyl-CoA, prévenant ainsi leur efflux de la cellule. Les intermédiaires d'acyl-Co-A activés peuvent être métabolisés dans la voie catabolique de la β -oxydation ou dans la voie anabolique où ils sont convertis en des lipides complexes. L'expression du gène de l'acyl-Co-A synthétase et l'activité de l'enzyme sont stimulés par les fibrates et les acides gras dans plusieurs tissus et cellules. Cet effet est transmis par l'intermédiaire de la région PPRE localisée dans le promoteur C du gène de l'acyl Co-A synthétase. Cette induction de l'expression du gène de l'acyl Co-A synthétase dépendante des PPAR et induite par les fibrates et les acides gras, entraînant l'activation de l'acyl-CoA synthétase et la captation des acides gras libres, suggère un feed-back positif dans lequel l'augmentation de l'activité de

l'acyl-CoA synthétase stimule la production des activateurs des PPAR qui en retour active l'activité de l'acyl CoA synthétase. L'activation de l'acyl-CoA synthétase génère les esters d'acyl CoA qui sont utilisés pour la β -oxydation. A cause de l'augmentation prononcée de la β -oxydation péroxisomale associée à une augmentation modérée de la β -oxydation mitochondriale, après traitement avec les proliférateurs des peroxisomes, peu d'esters d'acyl CoA sont disponibles pour la synthèse des triglycérides. La diminution de l'activité de l'ACC-1 et de la FAS inhibe la synthèse *de novo* d'acides gras, et diminue encore le taux d'acides gras pour la synthèse des triglycérides. De plus, les proliférateurs des peroxisomes n'augmentent pas uniquement la β -oxydation et diminuent la synthèse des triglycérides, mais aussi diminuent la production et la sécrétion d'apoB et des VLDL.

En conclusion, les PPAR α régulent plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides par :

- L'augmentation de l'hydrolyse des TG.
- La stimulation de la captation cellulaire des acides gras libres et leur conversion en dérivés d'acyl-CoA.
- La stimulation de la β -oxydation.
- La diminution de la synthèse des acides gras et des triglycérides ainsi que la production des VLDL.

Tous ces effets expliquent l'action hypolipidémique des fibrates chez l'homme et les rongeurs. Cependant, chez les rongeurs, la contribution relative de la β -oxydation péroxisomale à la diminution du taux des TG est beaucoup plus importante que chez l'homme. En effet, l'administration des fibrates chez les rongeurs augmente la β -oxydation péroxisomale associée à l'augmentation de la prolifération des peroxisomes, un phénomène qui n'est pas observé chez l'homme (Schoonjans *et al.*, 1996).

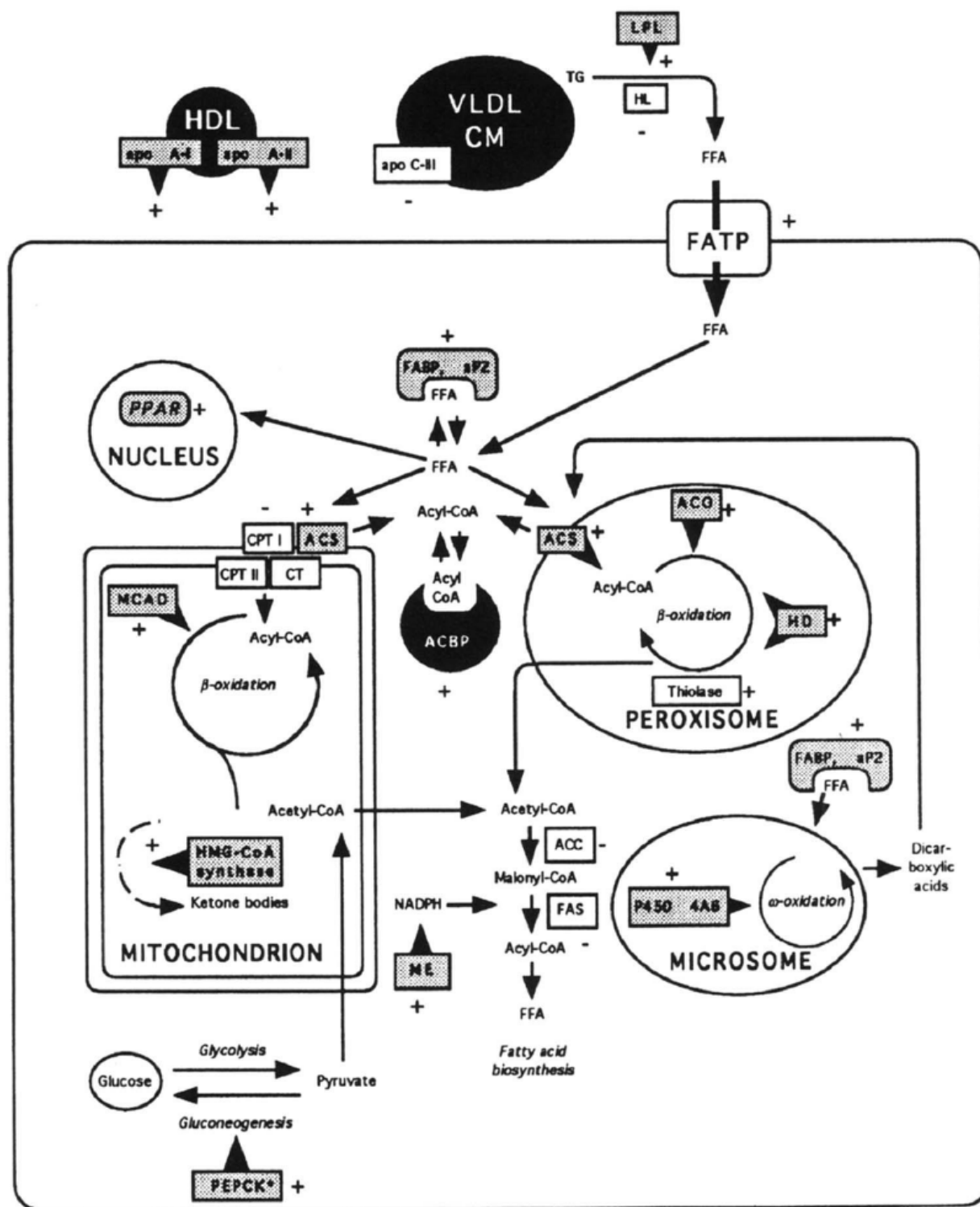


Fig. 27 Schéma des différents gènes régulés par les PPARs et leur rôle dans le métabolisme lipidique intra et extracellulaire (Schoonjans *et al.*, 1996). Les gènes représentés dans des rectangles gris codent pour des protéines qui contiennent un domaine PPRE fonctionnel, les autres gènes dans les rectangles avec un fond blanc, sont régulés par les proliférateurs des peroxisomes, mais ne possèdent pas une région PPRE. ACBP, acyl-CoA binding protein ; CM, chylomicron ; CPT, carnitine palmitoyl transferase ; CT, carnitine : acylcarnitine translocase ; FATP, fatty acid transporter protein ; FFA, free fatty acid.

C. La lipogenèse dans le tissu adipeux

La contribution du tissu adipeux à la synthèse des lipides chez l'homme est moins bien définie que celle du foie. Les enzymes clés de la synthèse d'acides gras sont présents dans le tissu adipeux chez l'homme, mais leur contribution à la lipogenèse de l'organisme est considérée très faible comparativement à la contribution du foie. Cette situation est différente chez les rats, puisque la lipogenèse *de novo* (DNL) se déroule d'une façon similaire dans le foie et le tissu adipeux et elle est plus active que chez l'homme. Cette grande différence dans l'activité lipogénique du tissu adipeux entre l'homme et le rat pourrait être due à des facteurs nutritionnels.

En effet, le régime habituel des rats est riche en carbohydrates, contrairement au régime quotidien chez l'homme qui plutôt riche en graisses, notamment dans les pays occidentaux. Ceci joue un rôle dans la différence entre les deux espèces, connaissant l'effet stimulateur des carbohydrates et l'action inhibitrice des graisses sur la lipogenèse.

De plus, la mesure de la lipogenèse corporelle et hépatique chez des sujets soumis à une surcharge en carbohydrates montre que la lipogenèse hépatique explique uniquement en partie l'augmentation de la lipogenèse corporelle. Ceci suggère que la lipogenèse est stimulée dans un autre tissu, probablement le tissu adipeux (Diraison *et al.*, 2003b).

Cependant, les travaux de Letexier *et al.* (2003) n'ont pas trouvé de stimulation de l'expression et l'activité de la voie de la lipogenèse dans le tissu adipeux des sujets contrôles aussi bien après une surcharge de glucose ou après un régime modérément riche en carbohydrates, alors que la lipogenèse hépatique est clairement stimulée. Ainsi, la DNL du tissu adipeux répond très faiblement comparativement au foie aux variations physiologiques de la prise de carbohydrates.

Chez l'homme ni les concentrations d'ARNm de FAS, ACC-1, et SREBP1-c ni celles des précurseurs ou de formes mûres de la protéine SREBP1-c sont modifiées par le régime. Les ARNm de ChREBP sont présents dans le tissu adipeux et ne sont également pas modifiés par le régime. La lipogenèse hépatique mesurée par la méthode de l'eau deutérée est contrairement au tissu adipeux très sensible aux variations du régime comme l'on montré plusieurs travaux sur la différence entre le tissu adipeux et le foie chez des sujets normaux, où ni une surcharge de glucose ni un régime riche en carbohydrates ne stimulent l'expression et l'activité de la lipogenèse dans le tissu adipeux alors que la lipogenèse hépatique est stimulée. Ces résultats n'ont également trouvé aucune différence de l'expression des gènes lipogéniques y compris ChREBP dans le tissu adipeux de rats soumis aux régimes riche en carbohydrates ou en graisses. D'autres études ont montré que la réponse des gènes lipogéniques à la stimulation par l'insuline/glucose, le sucrose, un régime riche en carbohydrates et l'inhibition par les acides gras polyinsaturés est moins importante dans le tissu adipeux comparativement au foie. La capacité lipogénique est nettement réduite chez des sujets humains normaux, avec des taux faibles d'ARNm de FAS et ACC-1 avec une baisse également de l'activité de FAS. Cette capacité lipogénique dans le tissu adipeux est également diminuée chez les sujets obèses. Les concentrations d'ARNm de FAS et ACC-1 dans le tissu adipeux sous-cutané sont plus faibles chez les sujets obèses comparativement aux contrôles. Il n'y a pas de diminution des concentrations d'ARNm de SREBP1-c chez des sujets contrôles chez l'homme comparativement avec les rats. En accord avec d'autres travaux, les messagers de SREBP1-c diminuent chez les sujets obèses, cette baisse est plus importante dans le tissu adipeux omental. Cependant, les taux des formes mûres et précurseur de SREBP1-c sont fortement diminués dans le tissu adipeux des sujets contrôles et obèses comparativement avec le tissu adipeux de rat. Cette faible abondance de la protéine SREBP1-c joue probablement un rôle majeur dans la baisse de la capacité lipogénique du tissu adipeux humain. Les concentrations d'ARNm de ChREBP sont nettement plus faibles dans le tissu adipeux chez l'homme comparativement au rat, cette différence d'expression peut être impliquée dans la différence de l'activité lipogénique entre le tissu adipeux de l'homme et du rat. En conclusion, la capacité lipogénique du tissu adipeux est réduite chez l'homme comparativement aux rats. Ceci n'est pas expliqué par la différence de la ration carbohydrates-graisses dans le régime mais semble être liée plutôt à la baisse des taux de la protéine SREBP1-c. La différence de l'expression de ChREBP peut aussi jouer un rôle. Cette baisse de l'activité lipogénique dans le tissu adipeux chez l'homme confirme que

les triglycérides stockés dans le tissu adipeux proviennent majoritairement de l'alimentation et sont délivrés aux adipocytes par les lipoprotéines circulantes.

Régulation de la lipogenèse par LXR dans le tissu adipeux

Les travaux de Juvet *et al.* (2003) ont décrit le rôle physiologique de LXR dans les adipocytes. L'activation de PPAR γ induit l'expression du gène LXR α via la séquence PPRE dans le promoteur du gène LXR α . Cette régulation de LXR par l'activation de PPAR γ est observée dans les adipocytes de souris, dans les cellules primaires d'adipocyte chez l'homme et le rat Zucker obèse. Ces travaux montrent que les agonistes de LXR sont capables d'induire l'accumulation de lipides dans les adipocytes 3T3-L1 en culture. Le rôle des LXRs dans le stockage des lipides dans les adipocytes est largement confirmé chez les souris déficientes de LXR α/β , où la masse de tissu adipeux diminuent comparativement avec les souris contrôles. Ces résultats montrent clairement que LXR α est directement régulé par PPAR γ dans les adipocytes. Une augmentation de l'expression de LXR α par les agonistes de PPAR γ a été montrée chez le rat Zucker obèse, dans les adipocytes chez l'homme et dans les adipocytes matures 3T3-L1 ce qui confirme la régulation de LXR α par les PPAR γ . Il a été aussi montré une augmentation de l'expression de LXR α par un agoniste endogène de LXR, le 22-(R)-HC, dans les adipocytes matures 3T3-L1, les adipocytes humaines en culture ainsi que par la stimulation par le TO901317 chez la souris. Une autorégulation de LXR α a été également récemment observée dans les macrophages chez l'homme, mais aucune autorégulation n'a été signalée dans les adipocytes. Une accumulation de lipides est observée dans les cellules 3T3-L1 traitées avec les agonistes de LXR, le 22-(R)-HC ou le TO901317. Alors que l'antagoniste de LXR, le 22-(S)-HC est incapable d'induire une accumulation de lipides durant la différenciation adipocytaire de 3T3-L1. Le darglitazone (agoniste de PPAR γ) stimule une accumulation importante de lipides dans les cellules 3T3-L1. Cependant, cette accumulation est atténuée par l'addition du 22-(S)-HC. Le taux des triglycérides dans les cellules traitées avec le 22-(R)-HC augmente avec la même amplitude dans les cellules traitées avec le darglitazone, cependant ni le taux du cholestérol ou les esters de cholestérol changent. Ces résultats indiquent donc que l'activation des LXRs augmente l'accumulation des TG dans les adipocytes.

Etant donné que plusieurs études ont montré le rôle des LXRs dans la régulation de la synthèse des triglycérides dans le foie, les travaux de Juvet *et al.* (2003) ont voulu savoir quels sont les agonistes de LXR qui peuvent modifier l'expression des gènes de la voie lipogénique dans les adipocytes. Leurs études *in vitro* et *in vivo* ont montré une augmentation de FAS et LXR α après un traitement de 24 heures avec le TO901317. D'autres études *in vivo*, ont montré également une augmentation de SREBP-1. Le transcrit est probablement l'isoforme, SREBP1-c, puisqu'il est le plus répandu dans ce tissu. Le manque de régulation de SREBP-1 dans les cellules 3T3-L1 peut être dû à l'expression très abondante de SREBP-1a comparativement avec celle de SREBP1-c. Au contraire, Ross *et al.*, n'ont rapporté aucun effet du TO901317 sur l'accumulation des triglycérides dans leurs conditions de culture, aussi bien sur les cellules 3T3-L1 différenciées qui expriment des récepteurs LXR α ectopiques avec 1 μ M de TO901317 ou chez les souris femelles C57BL/6 injectées avec 50 mg de TO901317/kg/jour pendant 1, 3 et 7 jours. Ces auteurs montrent de nouveaux rôles métaboliques de LXR dans le tissu adipeux comme, l'augmentation de la captation basale du glucose, la synthèse du glycogène, la synthèse du cholestérol, et la libération des AGNE.

Etant donné que l'expression de LXR α est induite aux stades tardifs du processus de différenciation, on ne peut lui attribuer un rôle important au cours de la différenciation adipocytaire. Juvet *et al.* (2003) suggèrent que LXR joue un rôle dans l'étape finale de la différenciation adipocytaire par l'induction de l'expression des gènes clés pour le transport et la synthèse des acides gras et l'accumulation des triglycérides. Cette hypothèse est confortée par les résultats qui montrent que les souris déficientes en LXR α/β contiennent des graisses, mais moins par rapport aux contrôles, indiquant que LXR n'est pas nécessaire pour la différenciation adipocytaire. Cependant, la faible accumulation de lipides montre que LXR joue un rôle important dans le métabolisme des lipides et probablement dans le remodelage des

adipocytes mûres. Pour obtenir une baisse significative des dépôts lipidiques, aussi bien LXR α que LXR β doivent être supprimés, puisque une petite baisse mais non significative des dépôts lipidiques est obtenue chez des souris déficientes de LXR α . LXR α est exprimé durant la différenciation adipocytaire et semble être le candidat clé responsable des effets cités ci-dessus. Cependant, puisque les agonistes de LXR sont des ligands pour les deux isoformes, on ne peut exclure le rôle de LXR β dans le tissu adipeux. D'autres études sont nécessaires pour comprendre le rôle précis de LXR α et LXR β dans les adipocytes.

D. La lipogenèse dans le muscle squelettique

Un dysfonctionnement de l'expression des gènes peut être impliqué dans la pathogenèse du diabète de type 2. Les travaux de Ducluzeau *et al.* (2001), ont étudié la régulation par l'insuline (après un clamp hyperinsulinémique de 3 heures) de l'expression de certains gènes dans le muscle squelettique et le tissu adipeux sous-cutané. Le taux basal d'ARNm du récepteur de l'insuline, du substrat du récepteur de l'insuline (IRS-1), p85 α -PI3-kinase, p110 α - PI3-kinase, p110 β PI3kinase, GLUT4, glycogène synthase et SREBP1-c est identique dans le muscle des sujets contrôles, diabétiques de type 2, diabétiques de type 1, et des sujets non diabétiques obèses. Dans le muscle, l'expression de l'hexokinase II, diminue chez les patients diabétiques de type 2. Les messagers de SREBP1-c sont plus abondants dans le tissu adipeux que dans le muscle chez l'homme. Dans le tissu adipeux, l'expression de l'ARNm de SREBP1-c diminue chez les sujets obèses (non diabétiques) et les diabétiques de type 2, cependant dans le muscle squelettique, l'expression de SREBP1-c n'est pas significativement différente entre les deux groupes, elle a tendance à être plus faible chez les patients diabétiques de type 2 comparativement aux contrôles. L'insuline augmente d'un facteur de 2 à 3 le taux d'ARNm de l'hexokinase II, p85 α -PI3-kinase, et SREBP1-c dans le muscle et le tissu adipeux de sujets contrôles, chez des patients insulino-résistants non-diabétiques et obèses ainsi que chez des sujets diabétiques de type 1 hyperglycémiques. L'augmentation de ces gènes est complètement inhibée chez des patients diabétiques de type 2. En plus de l'insulino-résistance, un dysfonctionnement de la machinerie transcriptionnelle peut contribuer aux altérations observées. Cette hypothèse est confortée par l'identification récente d'un facteur de transcription muté dans un sous-type de diabète de maturité (MODY) et dans une autre forme particulière du diabète de type 2. Si cela a lieu également dans la forme classique du diabète de type 2 cela peut suggérer qu'un dysfonctionnement de l'expression des gènes peut jouer un rôle primordial dans la pathogenèse de la maladie. Le facteur de transcription SREBP1-c est impliqué dans les effets de l'insuline dans la transcription de plusieurs gènes qui codent pour les enzymes du métabolisme glucidique et lipidique. Cependant, une surexpression de SREBP1-c dans le tissu adipeux chez la souris est associée avec l'insulino-résistance, le diabète et la lipodystrophie. Le promoteur des gènes de l'hexokinase, et de la protéine p85 α -PI3-kinase contient plusieurs séquences SRE et E-box, constituant un élément potentiel de réponse au facteur de transcription SREBP1-c. Ce facteur est un candidat clé dans le dysfonctionnement de l'expression des gènes observé dans le diabète de type 2. SREBP1-c diminue dans le tissu sous-cutané des sujets obèses diabétiques de type 2. Cette baisse ne semble pas jouer un rôle prédominant dans l'altération de l'expression des gènes dans le diabète de type 2. Il n'y a pas eu un dysfonctionnement majeur des ARNm de SREBP1-c dans le muscle squelettique, alors qu'un défaut de la régulation de l'expression des gènes en réponse à l'insuline est observé aussi bien dans le tissu adipeux que dans le muscle squelettique. En plus, la baisse de SREBP1-c dans le tissu adipeux semble être associée à l'obésité, alors que la régulation de l'expression des gènes par l'insuline n'est pas modifiée dans les tissus des sujets obèses non diabétiques. Cependant, il a été montré qu'en plus de l'augmentation de l'expression de SREBP1-c, l'insuline active également l'activité transcriptionnelle de SREBP1-c. En définitif, l'implication de ce facteur de transcription dans la régulation de l'expression des gènes au niveau tissulaire chez l'homme et son rôle dans le dysfonctionnement observé dans le diabète de type 2 nécessite d'autres études.

La régulation de l'expression de l'hexokinase II, p85 α -PI3-kinase, et SREBP1-c est altérée dans le muscle squelettique et le tissu adipeux de sujets diabétiques de type 2. Il est à noter le dysfonctionnement de l'expression de ces trois gènes en réponse à l'insuline dans le diabète de type 2. Dans ce contexte, il a

été montré que l'insuline nécessite la voie PI3-kinase pour contrôler l'expression des gènes de l'hexokinase II et la p85 α -PI3-kinase à l'échelle transcriptionnelle dans les cellules musculaires en culture. Dans les hépatocytes, la même voie est impliquée dans les effets de l'insuline sur l'expression et l'activation de SREBP1-c. Cependant, il a été bien montré que l'activation par l'insuline de la voie PI3-kinase est altérée dans le muscle de patients diabétiques de type 2. Ce dysfonctionnement de la transmission du signal via la voie PI3-kinase est impliqué dans une mauvaise régulation de l'expression des gènes. Alors que la même voie est nécessaire dans les actions de l'insuline sur le métabolisme du glucose, la réponse des trois gènes à l'insuline est normale dans les tissus insulino-résistants des sujets obèses non diabétiques. Ce résultat suggère que les voies impliquées dans la régulation de l'expression des gènes et dans le contrôle du métabolisme du glucose divergent après l'activation de PI3K et que le diabète de type 2 a des déficiences supplémentaires qui entraînent des régulations transcriptionnelles dans le noyau. D'autres études sont nécessaires pour comprendre les mécanismes de l'action de l'insuline au niveau de son récepteur et au niveau des promoteurs des gènes cibles et identifier l'élément commun qui peut être impliqué dans le défaut de régulation de ces gènes. En résumé l'insuline module d'une manière coordonnée le taux d'ARNm de plusieurs gènes impliqués dans les actions de l'insuline et le métabolisme du glucose dans le muscle squelettique et le tissu adipeux. Ces travaux de Ducluzeau *et al.* (2001) ont montré que la régulation des gènes de la p85 α -PI3-kinase, l'hexokinase II et SREBP1-c par l'insuline est déficiente dans les tissus des patients diabétiques de type 2 et semble être indépendante de l'obésité liée à l'insulino-résistance et l'hyperglycémie chronique. Ce résultat suggère que le diabète de type 2 peut être associé à une altération spécifique de la signalisation au niveau du noyau ou dans la machinerie transcriptionnelle.

Cette étude montre un dysfonctionnement spécifique dans la régulation d'un groupe important de gènes en réponse à l'insuline dans les tissus périphériques des patients diabétiques de type 2.

Implication de LXR dans la régulation de l'accumulation des lipides dans le muscle

Le rôle de LXR dans le muscle squelettique chez l'homme n'est pas encore bien connu. L'étude de Kase *et al.* (2005) montre que l'activation chronique par un ligand synthétique de LXR augmente la captation, la distribution dans des complexes lipidiques cellulaires et l'oxydation du palmitate ainsi que la captation et l'oxydation du glucose dans les cellules musculaires humaines. L'effet de l'agoniste de LXR, est accentué par l'action de l'insuline sur la captation et le métabolisme du palmitate. L'activation de LXR induit l'expression des gènes de la fatty acid translocase (CD36/FAT), et le transporteur du glucose (GLUT 1 et 4), SREBP1-c, PPAR γ , carnitine palmitoyl transférase-1 et uncoupling protein 2 et 3. En réponse à l'activation de LXR, les myotubes des patients diabétiques de type 2, montrent une augmentation de la captation et l'incorporation du palmitate dans des complexes lipidiques mais sans oxydation du palmitate en CO₂. Ce résultat montre le rôle fonctionnel de LXR dans aussi bien le métabolisme des lipides et du glucose ainsi que le métabolisme énergétique dans les myotubes humains.

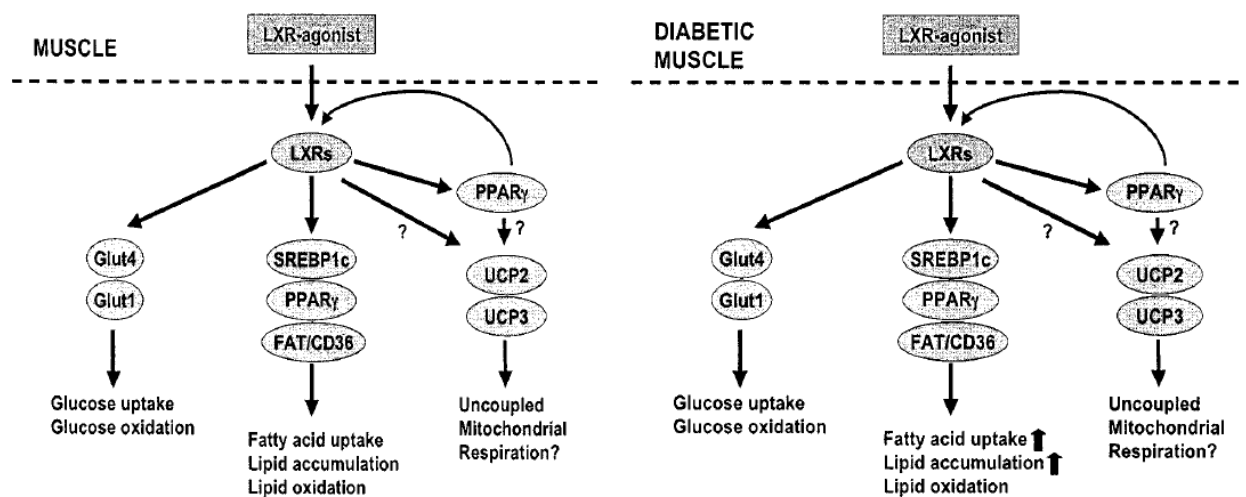


Fig. 28 Rôle de LXR dans le métabolisme des lipides et du glucose dans le muscle squelettique. (Kase *et al.*, 2005)

E. La lipogenèse dans la paroi artérielle et les CMLV

La lipogenèse a été mesurée dans les aortes normales et athérosclérotiques de lapins par l'utilisation de substrats radioactifs ; le glucose-2-¹⁴C et l'acétate-1-¹⁴C (Howard, 1971). Le carbone marqué du glucose apparaît nettement dans les TG et les phospholipides et avec un marquage plus faible dans les esters de cholestérol. L'incorporation augmente de plus de 3 fois au cours de l'athérosclérose. La radioactivité apparaît dans le glycérol et plus particulièrement dans le carbone 2 du glycérol. Environ 70 % de l'acétate-1-¹⁴C incorporé dans les phospholipides et les TG se trouve dans les acides gras, le reste dans la fraction glycérides-glycérol ; 98 % de la radioactivité dans les esters de cholestérol se trouve dans la fraction acides gras. L'incorporation de la radioactivité dans les esters de cholestérol augmente durant le développement de l'athérosclérose. La synthèse d'acides gras est identique à partir de l'acétate ou du glucose.

Dans l'aorte normale et athérosclérotique de lapins, mais pas de l'homme, la concentration des TG est plus importante que celle des phospholipides, cependant l'augmentation des TG due à l'athérosclérose est similaire (Howard, 1971). L'estérification du cholestérol à partir d'acides gras provenant du glucose ou de l'acétate marqués dans l'aorte de lapins a été montrée par les travaux de Howard, (1971). L'incorporation de l'acétate dans les acides gras utilisés pour l'estérification du cholestérol représente 20 à 90 % d'esters de cholestérol accumulés durant le développement de l'athérosclérose.

L'équipe de Capron et Jarnet en 1990 a mesuré la lipogenèse à partir du glucose marqué dans l'aorte thoracique de rat lésée avec un ballon-cathéter. La lésion stimule transitoirement, après deux jours, la lipogenèse dans l'intima-média, malgré la faible sensibilité à l'insuline de ces aortes. Cependant, l'insuline ajoutée au milieu d'incubation des aortes (*ex vivo*) à des concentrations très élevées (10⁵ μunités/ml) ne modifie pas la lipogenèse de l'intima-média. Ces mêmes travaux ont montré également que le changement phénotypique des CMLV de l'état contractile à l'état synthétique, n'influence pas la sensibilité métabolique de l'intima-média à l'insuline. Ces auteurs n'appuient pas l'idée que l'insuline contribue au développement des maladies cardiovasculaires par un effet lipogénique direct sur les CMLV.

Des travaux plus récents de Davis *et al.* (2005) ont décrit le rôle de la synthèse *de novo* d'acides gras dans l'accumulation des triglycérides dans des vacuoles intracellulaires et la formation des cellules spumeuses à partir des CMLV humaines. Les CMLV humaines mises en culture dans un milieu de différenciation adipocytaire accumulent des lipides et expriment les gènes marqueurs de la cellule adipocytaire sans pour cela atteindre une différenciation complète. Ces cellules vasculaires ne répondent pas à la stimulation par un agoniste des PPAR γ , alors qu'un agoniste du récepteur nucléaire LXR stimule fortement l'accumulation des triglycérides. Les deux types de LXR sont exprimés dans les CMLV humaines et leur activation par le TO901317 induit l'expression des gènes de la lipogenèse (FAS, SREBP1-c, SCD-1). L'immunohistologie a montré que les CMLV humaines au niveau des plaques athérosclérotiques expriment les marqueurs adipogéniques et contribuent au développement de l'athérome.

Métabolisme de la paroi artérielle au cours de l'insulino-résistance et du diabète

L'insuline a de nombreuses actions sur les cellules vasculaires comme l'augmentation du transport des acides aminés, la synthèse du glycogène, la synthèse de l'ADN et l'expression des gènes. L'insuline possède également des actions vasculaires spécifiques, comme son rôle dans la libération du monoxyde d'azote (NO) et la régulation de l'expression des ARNm des protéines matricielles et la NO-synthase constitutive endothéliale (eNOS). Physiologiquement, l'induction avec l'insuline stimule la vasodilatation locale via les actions du NO.

L'insulino-résistance et l'hyperinsulinémie sont associées au développement des maladies cardiovasculaires et à l'hypertension. Les mécanismes qui expliquent l'association entre l'insulino-résistance et les maladies cardiovasculaires sont attribués aux effets de l'insuline sur la croissance des CMLV, la production de la matrice extracellulaire, la réabsorption rénale du sodium et la stimulation

adrénergique. L'hypothèse qui supporte ces théories est que l'insulino-résistance est spécifique à certains tissus comme le muscle squelettique et le tissu adipeux uniquement, considérant que le tissu vasculaire et rénal restent sensibles à l'insuline. Les effets de l'insuline sur la croissance dans les tissus vasculaire et rénal sont également affectés. Cependant, des études physiologiques ont montré que les fonctions endothéliales évaluées par la vasodilatation induite par l'insuline sont réduites chez des patients insulino-résistants et diabétiques, ce qui suggère que les cellules vasculaires sont aussi résistantes à l'insuline en ce qui concerne certaines de ses actions physiologiques. Pour expliquer ces données, les travaux de Zhen *et al.*, (1999) ont suggéré que certaines actions de l'insuline comme les effets stimulateurs sur la production du NO, sont sélectivement inhibées en état d'insulino-résistance. Alors que les autres actions de l'insuline sur la croissance ne sont pas affectées. Le résultat de cette insulino-résistance sélective dans les tissus vasculaires est accentué dans l'athérosclérose en état d'insulino-résistance. L'explication possible de la perte sélective des actions de l'insuline en état d'insulino-résistance réside dans les multiples voies par lesquelles l'insuline transmet ses effets. Dans les cellules non-vasculaires, les actions de l'insuline sont transmises par la liaison de l'insuline à la sous-unité α du récepteur de l'insuline (IRs) qui active le récepteur intrinsèque tyrosine kinase, augmentant ainsi l'autophosphorylation de la sous-unité β du récepteur de l'insuline (IR β) et la phosphorylation des tyrosines des protéines adaptatrices intracellulaires comme les substrats du récepteur de l'insuline (IRS-1 et IRS-2) et Shc. IRS-1 et IRS-2 phosphorylés se lient aux domaines SH2 (src-homology 2) des protéines intracellulaires comme la sous-unité régulatrice p85 du phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase). L'interaction de l'IRS et la sous-unité p85 de la PI3-kinase, entraîne l'activation de la sous-unité catalytique p110 de la PI3-kinase. L'activation de la voie PI3-kinase par l'insuline est liée aux fonctions métaboliques de l'insuline comme le transport du glucose, la synthèse du glycogène et des protéines. Les protéines Shc et IRS phosphorylées peuvent aussi se lier au domaine GRB2 aboutissant à l'activation de la voie Ras-Raf-MAP kinase qui est associée à l'expression des gènes et la croissance cellulaire.

Cependant, dans les cellules vasculaires, la voie de transduction du signal de l'insuline n'a pas été mesurée *in vivo* directement dans les tissus vasculaires. Comme dans les cellules non vasculaires le récepteur de l'insuline est exprimé dans les CMLV ou les cellules endothéliales, une fois l'insuline liée au récepteur et celui-ci phosphorylé, ce dernier phosphoryle l'IRS-1, l'IRS-2 et Sch et active la voie PI3-kinase et Raf-MAP kinase. Biologiquement, l'activation de la voie PI3-kinase est liée à la production du NO, alors que l'activation de la voie Raf-MAP kinase est associée à la croissance des cellules vasculaires et l'expression des protéines matricielles. Ainsi il est possible qu'il y ait une perte sélective de l'activation de la voie PI3-kinase par l'insuline, mais la voie MAP-kinase reste fonctionnelle en état d'insulino-résistance.

Les travaux de Jiang *et al.* (1999) ont caractérisé la signalisation insulinique dans les aortes et les micro-vaisseaux de rats Zucker obèses. Ces derniers, ont une insulino-résistance, une hyperinsulinémie, une hyperlipidémie, une intolérance au glucose et une hypertension modérée, propriétés similaires à l'insulino-résistance liée à l'obésité et au diabète de type 2. Les résultats ont montré que la phosphorylation des tyrosines du récepteur de l'insuline IRS-1/2, l'activité de la PI3-kinase et la phosphorylation des sérines de Akt/PKB sont altérées au niveau vasculaire chez ces animaux. Cependant, l'insuline phosphoryle de la même manière les tyrosines des protéines ERK-1/2 MAP kinase dans les micro-vaisseaux des rats contrôles et obèses. Cependant le taux basal de la phosphorylation des tyrosines des MAP kinases est significativement plus élevé dans les aortes et les micro-vaisseaux de rats obèses comparativement aux contrôles. Ce résultat a apporté la première analyse quantitative de la voie de signalisation de l'insuline dans des tissus vasculaires intacts et démontré le dysfonctionnement sélectif de l'activation par l'insuline de la voie Akt-PI3-kinase chez les animaux obèses et insulino-résistants. Les sites du dysfonctionnement de la signalisation de l'insuline semblent être au niveau du récepteur de l'insuline et à l'échelle post-récepteur dans l'aorte et les micro-vaisseaux de rats Zucker obèses. La quantité des récepteurs d'insuline n'est pas changée, les niveaux des phosphorylations des tyrosines induits par l'insuline diminuent significativement dans les vaisseaux sanguins des rats Zucker obèses (études réalisées *in vivo* et *ex vivo*) comparativement avec les rats contrôles. La baisse de la phosphorylation du récepteur de l'insuline et la signalisation via la voie PI-3 kinase dans les tissus vasculaires des rats Zuckers obèses semble être

similaire à celle trouvée dans le muscle, le foie et le tissu adipeux des modèles animaux d'insulino-résistance et chez l'homme (Folli *et al.*, 1993; Kerouz *et al.*, 1997). Dans le foie de rats Zucker obèses, la liaison de l'insuline à la membrane plasmique diminue avec l'âge (une seule étude) (Clark and Clark, 1982), cependant d'autres études n'ont pas rapporté des changements de la liaison avec le récepteur, alors que l'activité tyrosine kinase diminue (Hurrell *et al.*, 1989). Chez des patients obèses, le nombre du récepteur d'insuline et de liaison diminue dans le muscle squelettique (Goodyear *et al.*, 1995). Cependant, la stimulation de l'activité de la PI3-kinase par l'insuline est toujours altérée et les taux des protéines IRS-1 et IRS-2 diminuent dans le muscle et le foie des rats Zucker obèses (Anai *et al.*, 1998). Chez des souris diabétiques ob/ob, la diminution de la phosphorylation des tyrosines du récepteur de l'insuline, la phosphorylation des tyrosines de l'IRS-1 et la diminution de l'activation de la PI-3kinase dans le foie et le muscle squelettique sont associés avec la réduction de l'expression des protéines du récepteur de l'insuline, IRS-1, IRS-2 et la sous-unité p85 de la PI3-kinase (Kerouz *et al.*, 1997). Par contre, les travaux de Jiang *et al.* (1999), n'ont pas trouvé des changements de l'expression des protéines du récepteur de l'insuline β ou la sous-unité p85 de la PI-3kinase dans les tissus vasculaires de rats Zucker obèses. Cette différence pourrait être due au fait d'avoir quantifié la totalité des récepteurs de l'insuline plutôt qu'uniquement ceux liés à la membrane plasmique. En plus, il est possible que l'insulino-résistance peut être induite sans changement du taux des protéines du récepteur de l'insuline. Il a été rapporté que le TNF α inhibe la signalisation insulinaire au niveau des phosphorylations des tyrosines du récepteur et de l'IRS-1 sans changement dans les taux des protéines du récepteur de l'insuline.

Il y a probablement plusieurs mécanismes qui sont à l'origine de la diminution de la signalisation par l'insuline via la voie PI-3kinase au niveau vasculaire chez des rats obèses insulino-résistants.

- 1- Augmentation de la phosphorylation des sérines et thréonine du récepteur β de l'insuline (IR β) ce qui réduit l'activité kinase du récepteur et l'autophosphorylation. Il a été montré que l'activation de la PKC induit la phosphorylation des sérines du récepteur de l'insuline ce qui inhibe l'activité tyrosine kinase aboutissant à la baisse des activités PI-3kinase induites par l'insuline dans les cellules vasculaires et non vasculaires. L'activation de la protéine kinase C- α , - β , - ϵ et - δ a été rapportée dans le muscle squelettique de rats Zucker obèse et des rats Goto-Kakizaki diabétiques.
- 2- Altération de l'activité phosphotyrosine phosphatase qui entraîne une baisse de la phosphorylation des tyrosines du récepteur de l'insuline et les protéines substrat du récepteur de l'insuline qui secondairement diminuent l'activité PI3-kinase. Aussi bien l'augmentation et la diminution des activités phosphotyrosine phosphatase ont été montrées dans le muscle squelettique et/ou le tissu adipeux des rats Zucker obèses et chez des patients obèses et diabétiques.
- 3- La dyslipidémie joue un rôle dans l'insulino-résistance observée chez les rats Zucker obèses. Des études récentes suggèrent que l'hypertriglycéridémie induite expérimentalement et l'augmentation des taux d'acides gras libres plasmatiques affectent in vivo les actions métaboliques de l'insuline.
- 4- Les facteurs circulants et les hormones (TNF α , TNF β , angiotensine II) peuvent aussi réguler la voie de signalisation de l'insuline au niveau vasculaire. Il a été suggéré que le TNF α est un important médiateur de la résistance à l'insuline chez les animaux obèses par ses sur-expressions dans les tissus adipeux. L'angiotensine II, inhibe la signalisation insulinaire par la modulation de la phosphorylation des protéines substrat de l'insuline et/ou l'activité de la PI3-kinase. L'endothéline-1 qui augmente dans le diabète de type 2, atténue l'activité de la PI3-kinase dans les CMLV en culture.

Le dysfonctionnement sélectif de la signalisation insulinaire sur la voie PI3-kinase peut être important du point de vue pathophysiologique dans l'incidence des maladies cardiovasculaires. Une étude récente de Zeng et Quon montre que l'activation de la voie PI3-kinase peut être impliquée dans les effets stimulateurs de l'insuline sur la libération du NO par les cellules endothéliales vasculaires en culture. Cet

effet de l'insuline sur le NO pourrait être responsable des actions vasodilatatrices de l'insuline. En état d'insulino-résistance, la vasodilatation induite par l'insuline est affectée à cause de l'inhibition partielle de la voie PI3-kinase. L'effet vasodilatateur de l'insuline est également inhibé chez les sujets obèses et des patients diabétiques de type 2. Il a été récemment rapporté que l'effet vasodilatateur de l'insuline pourrait être partiellement dû à l'augmentation de l'expression du gène eNOS via la voie PI3-kinase. En plus des actions vasodilatatrices, la stimulation de la production du NO par l'insuline peut aussi affecter le remodelage vasculaire comme l'inhibition de la prolifération et la migration des CMLV, l'agrégation plaquettaire et l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales. Ces données suggèrent que l'inhibition de l'activation de la voie PI3-kinase par l'insuline dans les tissus vasculaires en état d'insulino-résistance contribue à la perte des effets de l'insuline sur la production du NO, ce qui accentue le potentiel athérogénique de l'état d'insulino-résistance.

Contrairement à l'activation de la voie PI3-kinase, les connaissances sur l'activation de la voie ERK-1/2 MAP kinase en conditions d'insulino-résistance et de diabète *in vivo* sont limitées. Les résultats de Jiang, (1999), ont montré que l'insuline à des taux physiologiques peut activer modérément la MAP-kinase dans les microvaisseaux. Cette étude de Jiang *et al.*, (1999) a montré que l'insuline peut stimuler aussi bien la voie PI3-kinase que la voie MAP kinase au niveau vasculaire *ex vivo* ou *in vivo*. En situation d'insulino-résistance, la voie PI-3 kinase est sélectivement inhibée dans les tissus vasculaires comparativement à l'activité de la voie MAP kinase. Ce résultat conforte l'hypothèse selon laquelle, l'insuline dans les conditions physiologiques, possède des actions vasodilatatrices et antiathérogéniques transmises par la voie NO-PI3-kinase, cependant la voie PI3-kinase stimule également la synthèse de l'ADN. En conditions d'obésité et d'insulino-résistance les fonctions vaso-dilatatrices et antiathérogéniques de l'insuline transmises par la voie PI3-kinase sont altérées, alors que les actions proathérogéniques transmises par la cascade des MAP kinases sont augmentées du à l'hyperinsulinémie et les facteurs plasmatiques mitogènes. Le déséquilibre entre la signalisation de la voie PI3-kinase et MAP kinase au niveau vasculaire favorise le développement des anomalies cardiovasculaires observées chez des patients insulino-résistants et diabétiques.

Les travaux d'Hodroj *et al.* (2007), sur les CMLV humaines en culture de sujets diabétiques, ont montré que l'action de l'insuline sur l'expression de l'angiotensinogène et le récepteur AT1R est transmise uniquement par la voie MAP kinase, la voie PI3-kinase étant résistante à l'action de l'insuline.

MATERIEL & METHODES

I. MATERIEL BIOLOGIQUE

Animaux étudiés :

Nous avons au cours de ce travail utilisé trois modèles d'animaux : rats Zucker (contrôles, obèses, diabétiques), souris C57/B6 et une gerbille (*Psammomys obesus*).

1- Rats Zucker obèses.

Le rat Zucker obèse est un modèle d'obésité et d'insulino-résistance d'origine génétique. Ces rats sont génétiquement déficients en signalisation de la leptine du fait d'une mutation du récepteur de la leptine (Kasiske *et al.*, 1992). Les rats homozygotes pour la mutation sont hyperphagiques, ont une activité physique diminuée et développent rapidement une obésité et une insulino-résistance du métabolisme glucidique pouvant évoluer vers le diabète de type 2. Les rats hétérozygotes pour la mutation du récepteur de la leptine n'ont pas d'anomalies métaboliques et sont utilisés comme contrôles.

Les rats obèses (ZO, n=18) et contrôles (CO, n=18), tous mâles, ont été fournis par Charles River (France). Ils sont arrivés à l'âge de 6 semaines et ont été hébergés pendant tout le protocole dans les locaux de la plate-forme ANIPHY (Explorations physiologiques du petit animal vivant) de l'UCBLyon1 dans des conditions de température ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$) et d'éclairage (lumière allumée à 07h et éteinte à 19h) contrôlés. Les animaux ont reçu *ad libitum* de l'eau et une alimentation standard de laboratoire (Global Diet 2018). Ce régime a la composition centésimale suivante :

Eau :	12.00
Protéines :	18.50
Lipides :	5.50
Fibres :	4.50
Autres :	6.00

Les rats Zucker obèses et leurs contrôles ont été répartis en trois lots de six rats chacun et suivis respectivement pendant 7 (un groupe ZO et CO), 14 (un groupe ZO et CO) et 21 (un groupe ZO et CO) semaines avant le sacrifice final.

2- Rats Zucker diabétiques (ZDF)

Les rats ZDF sont un modèle d'animaux obèses et insulino-résistants puis diabétiques. Ils ont également une mutation du récepteur de la leptine mais associée à d'autres anomalies, en particulier de la sécrétion insulinaire. Le développement du diabète nécessite une alimentation particulière, enrichie en lipides par rapport à l'alimentation habituelle en milieu d'animalerie, et différente pour les rats mâles et femelles. Ces rats homozygotes pour la mutation sont comme les Zucker obèses hyperphagiques avec des

dépenses d'énergie diminuées. Lorsqu'ils reçoivent l'alimentation nécessaire, leurs anomalies métaboliques évoluent en trois phases (*Forcheron et al.*, 2009) : obésité avec insulino-résistance manifeste dès l'âge de 7 semaines, diabète de type 2 avec hyperinsulinisme apparaissant vers les 10^e-12^e semaines, puis évolution progressive vers la carence insulinaire, en général marquée à la 21^e semaine et pouvant aller jusqu'au diabète insulino-dépendant.

Les rats ZDF (fa/fa, n=15) et leurs contrôles (CZ, +/+, n=15), tous males, ont été fournis par Charles River (France). Ils sont arrivés à l'âge de 6 semaines et ont été hébergés pendant tout le protocole dans les locaux de la plate-forme ANIPHY dans les mêmes conditions que les Zucker obèses à l'exception de l'alimentation qui était dès leur arrivée celle recommandée pour l'apparition du diabète (Formulab Diet, 5008*). Les calories fournies sont en % les suivants :

Protéines :	26,85
Lipides :	16,71
Carbohydrates :	56,44

Cette alimentation a été donnée aux rats ZDF et aux rats CZ. Les animaux ont reçu *ad libitum* de l'eau.

Les rats ZDF et leurs contrôles ont été répartis en trois lots de 5 rats chacun et suivis pendant 7 (un groupe ZDF et CZ), 14 (un groupe ZDF et CZ) et 21 (un groupe ZDF et CZ) semaines avant le sacrifice final. Notre travail sur le rat Zucker diabétique a porté sur l'extraction au niveau des aortes des lipides totaux, des ARNs et la mesure par PCR quantitative des gènes d'intérêt, l'expérimentation animale a été réalisée par d'autres membres de l'équipe.

3- *Psammomys obesus*

C'est une gerbille déserticole diurne appartenant à la famille des Gerbillidés. En Algérie, nous le trouvons dans plusieurs régions du Sahara notamment dans la région de Béni-Abbès (30°7' de latitude nord et 2°10' de longitude ouest) au sud-ouest d'Alger, wilaya de Béchar, où il a été capturé. Il est appelé communément, « gerd » par les populations locales des différentes contrées sahariennes (*Daly et al.*, 1973).

Pour échapper aux conditions climatiques sévères du désert, *Psammomys obesus* choisit le lit des oueds ou les rivières desséchées. Il creuse des terriers très profonds et communicants à l'intérieur par des galeries à plusieurs étages et avec plusieurs sorties à l'extérieur. En général, les trous des terriers sont faits à la base des dômes de terre sablonneuse, recouverts par des touffes de plantes halophiles dont il se nourrit. Ces plantes appartiennent à la famille des Chénopodiacées ; *Tragum nudatum*, *Salsola foetida* et *Suaeda mollis* ; elles sont très riches en eau et en sels minéraux en particulier en sels de sodium.

En tenant compte de la vie de l'animal dans son biotope naturel, nous avons essayé de réaliser des conditions de captivité appropriées pour réussir le maintien de l'animal au laboratoire (Animalerie de l'USTHB Houari Boumediene, Alger). Ainsi, les animaux sont répartis dans des cages individuelles, munies d'une litière en sciure, renouvelée tous les deux jours et d'une boîte en bois pourvue de plusieurs ouvertures, pour leur servir de terrier où ils créent des conditions d'humidité proches de celles de leur biotope, en accumulant des plantes salées riches en eau. La température de l'animalerie est maintenue constante, aux environs de 25°C. Dans la journée, l'éclairage est réalisé par la lumière artificielle (de 07h à 19h). A leur arrivée, les animaux continuent de recevoir les plantes salées provenant de leur biotope et ce, pendant quelques jours. Cette nourriture est progressivement complétée puis remplacée par des plantes salées (Salicornes) de la même famille que celle du désert mais poussant en bordure de mer (Anse de Kouali à Tipaza, Alger).

Après une période d'adaptation, les animaux sont répartis en groupes suivant le régime alimentaire, cette expérimentation a duré six mois.

Le régime naturel administré est la plante halophile poussant en bordure de mer caractérisée par une forte teneur en eau (80.79 %) et en sels minéraux (6.86 %), sa composition est la suivante :

Eau :	80,79 %
Matières minérales :	6,86 %
Matières grasses :	0,40 %
Matières protéiques :	3,53 %
Hydrates de carbone :	8,42 %
Les hydrates de carbone se répartissent en :	
Sucres totaux :	0,18 %
Lignine :	1,12 %
Hémicellulose :	2,62 %
Cellulose :	2,23 %
Indéterminée :	2,27 %

La valeur énergétique peut être estimée à moins de 450 Calories par kilogramme de plantes fraîches. La prise journalière est de 50 g, l'animal reçoit donc 20-22 Calories par jour.

Régime naturel additionné de régime hyperlipidique (RNL)

Le régime lipidique est à base de jaune d'œuf cuit. Chaque animal reçoit quotidiennement ¼ de jaune d'œuf. La composition en g pour 100g de jaune d'œuf est la suivante :

Eau :	40 – 46
Matières sèches :	43,5 – 50
Protéines :	13,5 – 17.5
Lipides :	30 – 34
o saturés	10,5 – 12
o monoinsaturés	16,5 – 19
o polyinsaturés	variables
o cholestérol	1.2 – 1.35
Glucides :	0.15 – 0.25
Cendres :	1 – 1.5
Calories :	370 – 400 Calories
La composition en vitamines et en sels minéraux (µg/100g d'œuf)	
Vitamine A :	1000
Vitamine D :	5
Vitamine E :	5000
Vitamine K :	100
Phosphore :	540
Fer :	6,5

Un quart de jaune d'œuf pèse en moyenne 5g représentant une ration de 20 Calories en moyenne ; additionné à la plante constitue une ration alimentaire journalière totale de 40 Calories.

3 animaux ont reçu l'alimentation normale et 6 l'alimentation hyperlipidique pendant six mois avant le sacrifice final. Leur poids a été suivi pendant ces six mois et des prélèvements de sang ont été faits avant puis 1, 2, 4 et 6 mois après le début de l'alimentation contrôlée.

4- Souris traitées avec l'agoniste de LXR

Des souris mâles de la souche C57/BL6 de poids moyen de 25 g ont été hébergées à ANIPHY. Elles ont reçu une alimentation standard et ont été réparties en deux lots : un lot contrôle (12) et un lot traité (12) par un agoniste de LXR, le GW3965 à raison de 40 mg/kg/ jour, pendant trois jours. Le GW3965 dilué dans du méthyle cellulose à une concentration de 0.5 % a été administré par gavage le matin. Les souris contrôles ont reçu uniquement le méthyle cellulose. Les gavages ont commencé après une semaine d'adaptation. Au terme de l'expérimentation, le sang est prélevé au niveau du sinus rétro-orbital de l'œil. Pour les prélèvements de tissus (foie, aorte) les souris sont sacrifiées par torsion cervicale. Les aortes de 6 souris de chaque groupe ont été utilisées pour l'extraction des lipides, celles des six autres souris pour l'extraction des ARN totaux.

II. TECHNIQUES OPERATOIRES ET ANALYTIQUES

Afin de contrôler leur évolution pondérale, les animaux (Zucker, *Psammomys obesus* et les souris) sont régulièrement pesés, chaque début de semaine ou chaque jour pour les souris. L'évolution métabolique est suivie par des prélèvements de sang sur l'animal vigile par des ponctions au niveau du plexus rétro-orbital de l'œil à l'aide d'une pipette pasteur préalablement héparinée (*Psammomys*, souris) ou au niveau de la queue (rats). Après centrifugation, le plasma est conservé à -80°C pour le dosage des paramètres biochimiques (glycémie (glucometer), triglycéridémie, cholestérolémie et acides gras non estérifiés (dosage enzymatique par le kit bioMérieux®) ainsi que pour le dosage de l'insuline (Rat Insulin ELISA, Mercodia, ou CristalChem)).

Au terme de l'expérimentation (3 jours pour les souris, 7, 14 ou 21 semaines pour les différents groupes de rats Zucker et contrôles et 6 mois pour *Psammomys obesus*), les animaux sont sacrifiés après anesthésie à l'uréthane (0.4 ml/100g, *Psammomys obesus*) ou au pentobarbital. Les tissus (foie, aorte) sont prélevés rapidement et rincés dans du salé isotonique froid. Une partie des tissus est congelée immédiatement dans l'azote liquide puis conservée à -80°C jusqu'aux analyses. Pour l'étude histologique et histochimique, d'autres fragments sont fixés dans le Bouin aqueux et/ou le formol à 4 %.

III. ETUDE DANS LES PLAQUES ATHEROMATEUSES CHEZ L'HOMME

Ce travail a été fait sur des échantillons recueillis chez des patients diabétiques et non diabétiques. Le protocole a été approuvé par le comité d'éthique de Lyon. Les plaques d'athérome ont été prélevées lors d'endartériectomie carotidienne à l'hôpital Edouard HERRIOT de Lyon par le Professeur Patrick Feugier. Les échantillons directement collectés dans la salle d'opération sont immédiatement disséqués selon leur aspect macroscopique en deux parties : une athéromateuse (A), présentant des dépôts lipidiques, et une seconde saine (S), sans dépôts lipidiques, avoisinante à la précédente, puis immédiatement congelés dans de l'azote liquide. La collecte des échantillons a été réalisée par d'autres membres du laboratoire ainsi que les extractions d'ARNt, notre travail a consisté en la réalisation de la RT-PCR pour la mesure des gènes d'intérêt.

IV. CULTURE DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES VASCULAIRES

Il est indispensable de souligner l'importance de l'asepsie dans les moindres gestes des étapes de la culture cellulaire. Les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) sont mises en culture selon la technique de (Ross, 1971) modifiée par (Bourdillon *et al.*, 1977). Ces mises en culture ont été faites à partir de rats ZO et CO de 14 semaines et de *Psammomys obesus* diabétiques ou contrôles après 6 mois de régime contrôlé. Après anesthésie à l'uréthane (*Psammomys*) ou au pentobarbital (rats), l'aorte est soigneusement prélevée et immédiatement plongée dans une boîte de pétri contenant du soit du DMEM (cellules de *Psammomys*) ou du PromoCell (cellules de Zucker) avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) et 5 % d'hépès pour le maintien du pH. Afin d'isoler la média de l'adventice et de l'endothélium, l'aorte est incubée (20 mn à 37°C) dans un tube stérile contenant de la collagénase (type IA, Sigma) à 0.1 %. L'aorte thoracique constituée seulement de la média est fragmentée en anneaux « explants » de 0.5 à 1 mm d'épaisseur qui sont déposés sur le support de flacons de culture qui contiennent chacun 5 ml de DMEM à 15 % de SVF. Pour adhérer à leur support, les explants sont laissés pendant 10 à 15 mn en position verticale puis placés dans un incubateur à 37°C sous atmosphère constituée de 95 % d'air et 5 % de CO₂.

La mise en culture des explants correspond à la culture primaire ou primoculture, au cours de laquelle se forment des aires de prolifération autour des explants qui finissent par constituer un tapis cellulaire au bout de 3 à 4 semaines, c'est la confluence. Au-delà, une trypsinisation s'avère nécessaire. La trypsine (0.1 %, Gibco) est utilisée pour détacher les CMLV en primoculture de leur support. Une suspension cellulaire est ainsi obtenue. Les cellules sontensemencées par la suite dans d'autres flasques, le 1^{er} passage est ainsi réalisé. La culture secondaire correspond à tous les passages qui suivent le premier. Lorsque les cellules arrivent à confluence et après chaque trypsinisation (0.08%) un nouveau passage est réalisé. Pour notre étude, les cellules sont utilisées à un stade précoce (3 au 5^{ème} passage). Pour les expériences elles sont réparties dans les puits de plaques à six puits (10⁶ cellules/puits)

Traitement *in vitro*

Pour ces expériences le milieu de culture avec SVF a d'abord été remplacé par du milieu (DMEM 5mM de glucose ou Promocell 5Mm de glucose) sans SVF pendant 24 heures. Ensuite des cellules ont été recueillies (temps témoin initial D0) et le milieu des autres puits est remplacé par du DMEM ou du PromoCell auquel avait été rajouté les molécules à tester :

✓ Facteurs adipogéniques

Les différents types de cellules musculaires lisses vasculaires ont été incubés en présence de facteurs adipogéniques à la concentration (finale dans le milieu) de :

- Insuline 1.2 µM (préparée dans du NaCl 0.9 %)
- Triiodothyronine (T3) 1nM (préparée dans NaOH 0.01N)
- Dexaméthasone 100 nM (dans l'éthanol absolu)
- 3-Isobutyl 1-méthyl xanthine (IBMX) 0.25 mM (dans le milieu de culture)

Le traitement a été administré sous forme de mélange des trois facteurs adipogéniques (insuline, T3, dexaméthasone et IBMX). Ce milieu adipogénique (ADM) est celui utilisé par Davies *et al.* (2005). Ce traitement a été fait pendant 3, 7 et 21 jours pour les CMLV de ZO et CO et pendant 3 et 7 jours pour les CMLV de *Psammomys*. Les effets de l'insuline et de la T3 utilisées de manière isolée (même concentration que pour le mélange) ont également été testés. On rajoute 1 µl de la solution de dissolution/ml de milieu de culture pour les cellules qui ne sont pas traitées.

✓ **Concentrations élevées de glucose :**

L'action du glucose a été testée en remplaçant le milieu à 5 mM de glucose par du milieu à 25 mM de glucose pendant 3, 7 et 21 jours pour les CMLV de ZO et CO et pendant 3 et 7 jours pour les CMLV de Psammomys. L'action du glucose a été testée en l'absence et en présence de milieu adipogénique.

✓ **Agonistes de LXR et PXR**

Les cellules ont été traitées également avec des agonistes spécifiques de LXR comme le GW3965 (1µM, concentration finale) et la paxilline (10 µM) ou spécifique de PXR, le pregnen-3B-OL-20-ONE-16A-Carbonitrile (PCN) (30 µM) ; Ces agonistes proviennent de SIGMA. L'agoniste mixte de LXR et de PXR (Mitro *et al.*, 2007b) utilisé est le TO901317 (10 µM) de Calbiochem. Tous les agonistes ont été dissous dans l'éthanol (solution stock de 10 ou 30 mM). De l'éthanol a été ajouté à la même concentration finale dans le milieu de cellules contrôles.

La durée des différents traitements a été de 3 et 7 jours selon les types cellulaires.

V. EXTRACTION TISSULAIRE ET CELLULAIRE DES LIPIDES

L'extraction totale des lipides est réalisée selon la méthode de (Folch *et al.*, 1957). Les tissus (aorte ou foie 40-100 mg) ont été broyés dans un mélange chloroforme-méthanol (2/1 v/v) dans la proportion de 1.5 ml du mélange pour 100 mg de tissu. Après centrifugation (2000 g) de 10 min à +4°C, la phase chloroformique a été récupérée dans un autre tube (phase A). Sur le culot, une deuxième extraction a été réalisée par 2ml de chloroforme-méthanol (1/1 v/v). La deuxième phase organique (phase B) récupérée a été rajoutée à la première. Les deux phases ont été lavées avec 2 ml d'eau distillée. La phase chloroformique a été reprise après centrifugation. Après évaporation sous azote de cette phase, le culot a été repris dans 100 µl de propanol. Les lipides ainsi dilués dans du propanol ont été dosés par le kit de TG (bioMérieux®, France), par la méthode colorimétrique enzymatique.

L'extraction à partir des cellules suit les mêmes étapes. Après trypsinisation, les cellules de chaque Falcon ont été reprises par 1.1 ml de PBS (1X). 100µl ont été prélevés pour la numération des cellules. L'extraction des lipides a été réalisée sur le 1 ml de suspension restant. Après centrifugation, le culot cellulaire a été repris dans 1.5 ml du mélange de Folch (chloroforme-méthanol (2/1 v/v)). Les étapes suivantes sont identiques à celles utilisées pour les tissus.

VI. MESURE DE LA LIPOGENESE DANS LES CMLV PAR LA SPECTROMETRIE DE MASSE

Le palmitate synthétisé par la voie de la lipogenèse incorpore dans sa molécule au cours de cette synthèse de l'hydrogène provenant directement ou indirectement (par l'intermédiaire de NADP réduit) de l'eau intracellulaire. Lorsque de l'eau tritiée ou deutérée est introduite dans les cellules, du tritium ou du deutérium est incorporé dans les acides gras synthétisés incorporés eux-mêmes ensuite dans les triglycérides (pool du produit). Cette incorporation est d'autant plus importante que l'enrichissement en deutérium ou tritium de l'eau intracellulaire (pool précurseur) est important et que la voie de la lipogenèse est active. En mesurant l'enrichissement dans l'eau et dans le pool des molécules synthétisées, nous pouvons donc calculer la contribution de la lipogenèse au pool des molécules produites (Diraison *et al.*, 1997). Cet enrichissement est mesuré lors de l'utilisation d'eau deutérée par la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse. Nous avons utilisé cette méthode pour évaluer la lipogenèse par des cellules musculaires lisses vasculaires en culture, par la mesure de l'enrichissement en deutérium incorporé dans les lipides synthétisés, notamment le palmitate des triglycérides (Beylot, 2006; Diraison *et al.*, 1997; Lowenstein *et al.*, 1975). Pour cela, de l'eau deutérée est ajoutée dans le milieu de culture des cellules (3% v/v), et les cellules et le milieu de culture sont récupérés après 24 h d'incubation pour la mesure d'enrichissement en deutérium dans le milieu de culture et le palmitate des TG des CMLV.

Cette technique nécessite 4 étapes :

- 1- *Extraction des lipides totaux* par la méthode de Folch (méthode sus-citée) et dosage des TG par la méthode colorimétrique enzymatique.
- 2- *Séparation des lipides par chromatographie sur couches minces (CCM)* ; après évaporation du propanol, utilisé pour le dosage des TG, les lipides sont repris dans 75 µl de mélange chloroforme/méthanol, 2 :1 (V:V) et déposés sur la plaque de silice. Cinq extraits lipidiques (75 µl) et le standard des TG, sont déposés sur chaque plaque. La migration se fait verticalement dans un mélange hexane-éther-acide acétique (80/20/1). Les spots des différentes classes de lipides sont révélés sous une lampe à UV après une pulvérisation de dichloro-fluoréscéine et identifiés grâce aux standards. La tache identifiée qui correspond aux triglycérides est marquée par un cercle à l'aide d'un crayon. Avant de passer à l'étape suivante, les plaques peuvent être conservées dans du papier aluminium à -20°C.
- 3- *Dérivation des lipides* : cette étape permet de masquer les groupements polaires des lipides par l'addition de groupements neutres (méthylation), permettant ainsi d'augmenter leur volatilité, leur stabilité et leur détectabilité, afin de faciliter leur séparation par CPG. Le dérivé est choisi de façon à ce que sa fragmentation dans le spectromètre de masse donne naissance à un fragment facilement utilisable pour la mesure de l'enrichissement.
 Sur les plaques de silice, les taches correspondantes aux fractions triglycérides sont grattées à l'aide d'un scalpel et récupérées dans des tubes à vis en pyrex de 10 ml. Les acides gras des TG sont transformés en esters méthyliques selon la technique de (Morrison and Smith, 1964). Chaque fraction de TG récupérée sur la silice reçoit 250 µl d'heptane-méthanol (20 : 80) et 250 µl de boron fluoride (BF₃)-méthanol.
 Les tubes bien fermés sont placés 30 min à 100°C dans un bain marie pour la transméthylation des TG. La réaction est stoppée en plaçant les tubes dans la glace. On ajoute ensuite 1.5 ml de K₂CO₃ (5%) qui précipite la silice et le BF₃ et 2 ml d'iso-octane pour extraire les esters d'acides gras méthylés. Le mélange est agité et centrifugé (3000 trs/min ; 10min) ; la phase supérieure contenant les lipides est récupérée, la phase inférieure est lavée avec 2 ml d'iso-octane. Après homogénéisation et centrifugation, la phase supérieure est récupérée et ajoutée à la première. L'iso-octane contenant les AG méthylés est évaporé complètement sous flux d'azote. Les échantillons sont repris dans 100 µl d'iso-octane puis transvasés dans des cônes pour la chromatographie en phase gazeuse (CPG)-spectrométrie de masse.
- 4- *Chromatographie en phase gazeuse (CPG)* : Cette étape permet de purifier le produit étudié et de l'introduire sous forme gazeuse dans le spectromètre de masse. Les molécules dérivées sont introduites dans le chromatographe (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) équipé d'une colonne capillaire de silice (OV-1701 ; Chrompack, Raritan, NJ, USA) interfacé par un spectromètre de masse HP 5871 (Hewlett Packard, impact d'électron de 70eV). La colonne du chromatographe est parcourue continuellement par un gaz vecteur (l'hélium). Les molécules introduites dans la colonne vont se répartir entre cette phase (phase stable) et le gaz vecteur (phase mobile) en fonction de leur stabilité relative dans ces deux phases. La température de l'injecteur du chromatographe est de 250°C, celle du four est de 75°C, cette dernière augmente de 20°C par minute pour atteindre 250°C.
- 5- *Spectromètre de masse* : à la sortie de la CPG, les différentes molécules vont être ionisées et fragmentées par un flux d'électrons d'une énergie stable, donnant naissance pour une molécule donnée aux mêmes ions, dans les mêmes proportions. L'ensemble de ces ions une fois recueillis par l'analyseur, constitue le spectre de masse de la molécule qui est caractéristique de celle-ci. Ces ions sont séparés en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Pour notre étude, il s'agit des ions de m/z de 270 (le palmitate naturel) et 271 et 272 (palmitate marqué).

Calcul de la synthèse lipidique :

La lipogenèse est mesurée au niveau des CMLV, à partir des enrichissements en eau deutérée dans le palmitate des TG. L'eau deutérée présente dans le milieu de culture s'incorpore dans les hydrogènes du palmitate, normalement il y'a 31 sites d'incorporation au niveau de cette molécule, mais étant donné

l'effet isotopique, les enzymes « préfèrent » l'eau naturelle à l'eau deutérée. Il n'y aura ainsi que 21 sites « apparents » d'incorporation du deutérium dans le palmitate. On calcule l'enrichissement réel (EI) ; c'est la soustraction de la valeur du rapport 271/270 du palmitate marqué de la valeur donnée de ce rapport donnée par le palmitate naturel. Cet enrichissement en rapport molaire (RM = molécules marquées/molécules naturelles) est transformé en mole per cent excess (MPE) qui correspond au rapport de molécules marquées sur la somme des molécules marquées et non marquées ($MPE = \frac{P^*}{P^*+P}$). L'enrichissement théorique maximal dans le milieu de culture (EI_{max} , valeur qui aurait été observée si toutes les molécules de palmitate ont été produites par la lipogenèse) correspond à l'enrichissement de l'eau (0.03) multiplié par le nombre de site d'incorporation du palmitate (N) ($EI_{max} = 0.03 \times 21$). La contribution de la lipogenèse, en pourcentage, correspond au rapport MPE / EI_{max} . On peut ensuite si on a mesuré la concentration de TG dans les cellules calculer la lipogenèse absolue en $\mu g/10^6$ cellules (lipogenèse $n \% [C] TG$).

VII. MESURE DES ARNm

A. EXTRACTION TISSULAIRE ET CELLULAIRE DES ARN TOTAUX

Les ARN totaux sont extraits par la méthode du guanidium/thiocyanate/phénol/chloroforme (TRIZOL[®] - Invitrogen) (Chomczynski and Sacchi, 1987). 100 mg de tissu ou de cellules sont repris par 1 ml de TRIZOL[®]. On rajoute ensuite le mélange chloroforme/alcool isoamylique (24/1) (V/V). Après centrifugation, la phase supérieure est récupérée pour la précipitation par l'isopropanol du culot d'ARN. Le culot est lavé dans l'éthanol 70°, puis séché et remis en suspension dans 50 μl d'eau RNase free. L'ARN total extrait est traité par la DNase I (QIAGEN) dans un tampon d'incubation (Acétate de sodium à 0.1 M et du $MgCl_2$ à 5 mM pH=5.2) pendant 1 heure au bain marie à 37°C. Une seconde extraction au phénol/chloroforme est effectuée. L'ARN précipité est remis en suspension dans 25 μl d'eau RNase free et dosé au spectrophotomètre (D.O. à 260 nm). La pureté est vérifiée par la mesure du rapport DO 260 nm/ DO 280 nm.

B. TRANSCRIPTION INVERSE

La transcriptase inverse est une enzyme qui transcrit l'information génétique de l'ARN en ADN (appelé aussi ADN complémentaire, ADNc). L'ADNc produit par la RT est utilisé pour effectuer une PCR.

L'ADNc est synthétisé à partir de 500 ng d'ARN total avec 200 U/ μl de reverse transcriptase (SuperScriptTM II, Invitrogen) en présence d'amorces au hasard, des hexamères de séquence aléatoire (Random Primer Promega) (50 $\mu g/ml$). L'ARN est rétrotranscrit dans un volume réactionnel de 20 μl contenant 1 μl de mix dNTP (10 mM) (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 4 μl du tampon 5X first-stand buffer (Tris-HCl, 250 mM pH 8.3, KCl 375 mM, $MgCl_2$ 15 mM), 2 μl DTT (0.1 M).

Les étapes de la transcription inverse sont réalisées dans un thermocycleur. La première étape, en présence de dNTP et des hexamères, le mélange est chauffé à 65 °C pendant 5 min. Après avoir ajouté la SuperScript II, les étapes qui suivent sont :

25°C pendant 10 mn ; hybridation des amorces.

42°C pendant 50 mn ; activation de l'enzyme, la reverse transcriptase.

70°C pendant 15 mn ; arrêt de la réaction de l'enzyme.

C. PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL

La *Polymerase Chain Reaction* ou PCR, consiste en la réplication à la chaîne d'une séquence d'ADN par des enzymes, les ADN polymérases. La PCR repose sur deux principes : les ADN polymérases ADN dépendantes

thermostables ont des propriétés de synthèse enzymatique et d'initiation (ADN double brins spécifique) ; l'hybridation et la séparation des brins complémentaires d'ADN est fonction de la température. En contrôlant la température il est ainsi possible de contrôler l'activité enzymatique des ADN polymérases. La PCR est basée sur un cycle de dénaturation-hybridation-élongation, chacune de ces étapes étant « pilotée » par une température différente.

Le protocole de la PCR en temps réel, comprend plusieurs cycles, chaque cycle est constitué d'une ou plusieurs étapes.

Cycle 1 : Dénaturation initiale	95°C pendant 3 min	séparation des doubles brins d'ADN, homogénéisation du milieu réactionnel par agitation thermique et activation des ADN polymérases.
Cycle 2 : Amplification x 40	95°C pendant 10 sec	dénaturation
	60°C (peut varier selon les amorces utilisées) pendant 45 sec	Hybridation
Cycle 3 : Cycle 4 : Cycle 5 : x 80 Courbe de Fusion	95°C pendant 1 min 55°C pendant 1 min 55°C pendant 10 sec	Remettre la fluorescence de l'appareil à 0 Le système chauffe les échantillons de 55°C à 95°C par palier de 0.5°C et à chaque étape il s'arrête 10 sec pour recueillir les résultats. Cette étape permet d'obtenir la courbe de fusion, afin d'assurer l'absence de toute hybridation non spécifique du produit PCR.

Afin de recueillir des données quantitatives avec précision, chacun des échantillons doit être analysé dans la phase exponentielle d'amplification qui est la phase la plus reproductible de la réaction de PCR (fig. 29). La PCR en temps réel permet le suivi de la fluorescence émise pendant la réaction avec un indicateur de la production des amplicons durant chaque cycle. L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR. En observant la quantité de fluorescence émise à chaque cycle, il devient possible de suivre la réaction PCR durant sa phase exponentielle où la première augmentation significative dans la quantité d'amplicons est en corrélation directe avec la quantité initiale de la matrice originale cible (template).

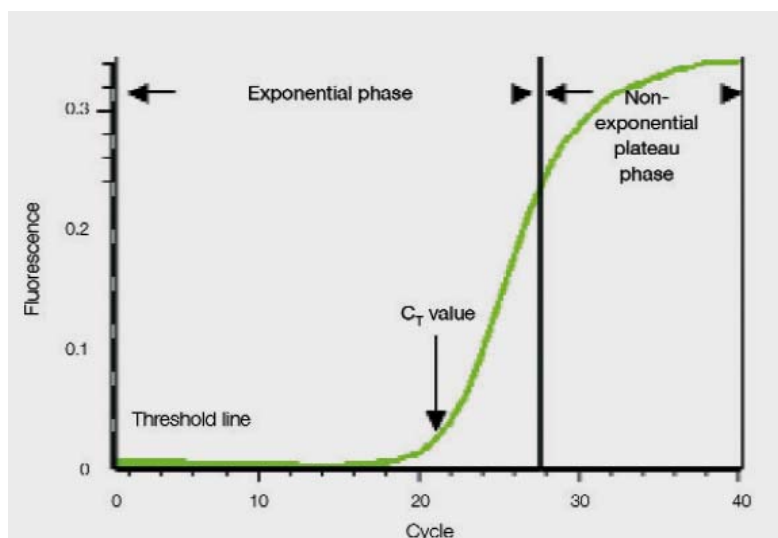


Fig. 29 Profil d'une courbe de PCR en temps réel.

Tous les systèmes de PCR en temps réel reposent donc sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent pendant le processus d'amplification et l'augmentation du signal d'émission fluorescente est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits. Parmi ces agents liant l'ADN double brin le SYBER Green I, est l'agent le plus fréquemment utilisé. Lors de la réaction d'amplification par PCR, le colorant libre en solution exhibe peu de fluorescence. Durant l'étape d'élongation, une augmentation de la fluorescence est associée à la quantité de colorant se fixant à l'ADN double brin naissant. Lorsque suivi en temps réel, l'augmentation du signal de fluorescence est observée pendant l'étape de polymérisation et l'émission fluorescente décroît complètement lorsque l'ADN est dénaturé à l'étape suivante. En conséquence, l'émission de fluorescence est mesurée à la fin de chaque étape d'élongation pour chacun des cycles par un système de lecture intégré à l'appareil de PCR en temps réel qui permet de suivre l'augmentation de la quantité d'ADN amplifié durant la réaction (Bustin, 2000) (Fig. 29).

La technologie basée sur le SYBER Green I ne nécessite aucune sonde fluorescente mais sa spécificité repose entièrement sur ses amorces (Bustin, 2000; Valasek and Repa, 2005).

Le concept du « cycle seuil » est à la base d'une quantification précise et reproductible pour les techniques fluorescentes en PCR, plus il ya de matrices à amplifier au départ de la réaction PCR, moins élevé sera la nombre de cycle requis pour atteindre un point où le signal d'émission de fluorescence sera statistiquement et significativement plus élevé que le bruit de fond (Valasek and Repa, 2005). Ce point est défini comme étant le cycle seuil (Ct) et apparaîtra au cours de la phase exponentielle d'amplification. Les valeurs de fluorescence sont enregistrées au cours de chaque cycle et représentent la quantité d'amplicons produits en un point précis de la réaction. Ces valeurs peuvent être traduites en résultats quantitatifs. Les concentrations de gènes cibles sont exprimées en ng/μg d'ARN total, puis normalisées par les concentrations de l'ARN 18S.

Avant de réaliser la PCR, les séquences d'ADNc pour chaque gène étudié ont été recueillies sur le site NCBI et les paires d'amorces spécifiques sélectionnées à l'aide des logiciels Primer Premier et Oligo 6, les séquences sont données en annexes.

La PCR est réalisée par l'appareil iCycler MyIQ (BIORAD), dans des plaques de 96 puits.

Dans chaque puits le volume réactionnel total est de 15 μl contenant 25 ng/μl d'ADNc, 10 μM de chaque paires d'amorces (sens et antisens), 8 μl du supermix BIORAD (iQ™ SYBR® Green Supermix) constitué de 100 mM KCl, 40 mM Tris-HCl, pH 8.4, 0.4 mM dNTP, Taq polymérase 50 unités/ml, 6 mM MgCl₂, SYBR Green I, 20 nM fluorescéine et stabilisateurs, ce mélange est complété avec 4 μl d'eau. Un contrôle constitué uniquement du mélange réactionnel et de l'eau (sans ADNc) permet de vérifier une éventuelle hybridation parasite.

Afin de mesurer l'expression des gènes cibles, une gamme étalon est également préparée au même temps que les échantillons. Les points de cette courbe standard vont de 10⁻² à 10⁻⁸ ng/μl, les différents points sont obtenus à partir de la dilution au 1/10^{ème} de la solution mère du standard qui est à 1ng/μl. Le standard est obtenu après purification sur colonne du produit d'amplification par PCR, en utilisant les amorces spécifiques pour chaque gène. La concentration d'ADN est mesurée par spectrophotométrie et diluée par la suite pour obtenir 1ng/μl. Les taux d'ARNm des gènes d'intérêt sont normalisés par rapport au taux d'amplification obtenu pour l'ARN ribosomal 18S pour chaque échantillon. Pour cette dernière mesure, une dilution préalable des différents échantillons est effectuée, pour obtenir une concentration d'ARN du 18S égale à 300 pg/μl. Ainsi, les concentrations d'ARNm des différents gènes sont exprimées en ng/μg d'ARN total et par 18S.

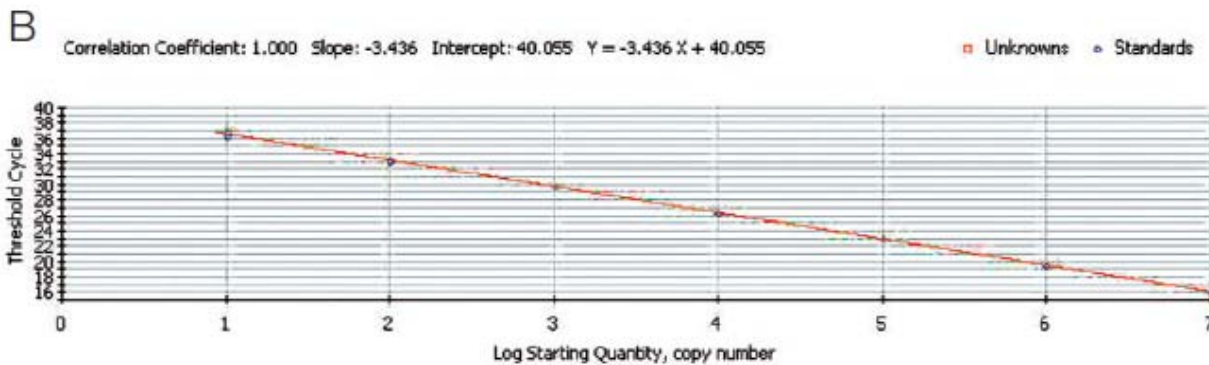


Fig. 30 Schéma de la courbe standard de la PCR en temps réel.

VIII. ANALYSE DES RESULTATS

L'étude statistique est réalisée par le logiciel GraphPad Prism 5.02 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Les résultats sont exprimés en moyennes affectées de l'erreur standard. Les comparaisons ont été faites, soit par le test t de Student (two-tailed) pour des valeurs non appariées (comparaison de deux groupes) ou par analyse de variance à un facteur (ANOVA) (pour la comparaison de plusieurs groupes) suivie du test de Newman-Keuls (comparaison de tous les groupes entre eux) ou du test de Dunnett (comparaison par rapport à un groupe de référence).

RESULTATS

I Données *in vivo*

A. Paramètres biochimiques plasmatiques

Les rats Zucker diabétiques (ZDF) et les rats Zucker obèses (ZO) ainsi que leurs contrôles respectifs ont été suivis à l'âge de 7, 14 et 21 semaines.

A.1 Le rat Zucker diabétique (fig. 31, 32)

Chez les animaux contrôles (CZ), le glucose plasmatique affiche à l'âge de 7 semaines une valeur moyenne de 7.35 ± 0.29 mM qui reste stable durant toute l'expérimentation (6.97 ± 0.39 mM à 14 semaines, 7.57 ± 0.28 mM à 21 semaines). La glycémie chez les animaux diabétiques passe de 7.26 ± 0.32 mM à 7 semaines à 30.15 ± 0.87 mM et 30.24 ± 0.20 mM à 14 et 21 semaines respectivement. Il existe chez les ZDF à 7 semaines une insulino-résistance avec hyperinsulinémie significative (fig. 31, $p < 0.001$), confirmée par un test de tolérance à l'insuline (fig. 32). Le diabète apparaît vers la 10^{ème} semaine, marqué par l'installation d'une polyurie et polydipsie. Ce diabète est à 14 semaines un diabète de type 2 qui évolue en fin de l'expérimentation à 21 semaines vers une carence insulinaire significative. En ce qui concerne les triglycérides plasmatiques, leur concentration reste faible durant les 21 semaines chez les animaux contrôles, de l'ordre de 0.40 à 0.60 mM (état post-absorptif). Cependant chez les animaux diabétiques (ZDF) les triglycérides sont très élevés à 7 semaines et atteignent à 21 semaines 5.85 ± 1.03 mM ($***p < 0.001$).

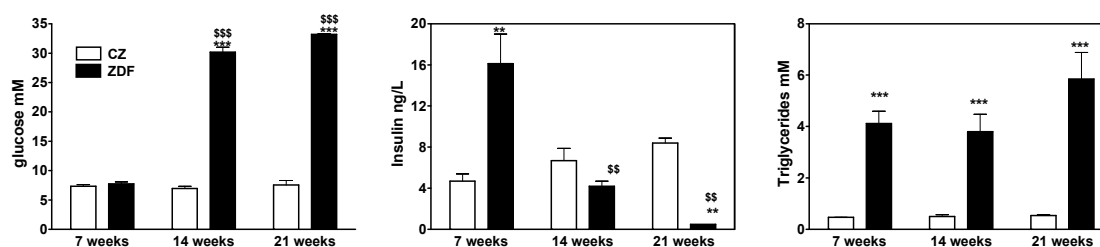


Fig. 31 Evolution de la glycémie, de l'insulinémie et la triglycéridémie chez le rat Zucker diabétique.

** $P < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs les valeurs des contrôles correspondants ; \$\$\$\$ $p < 0.001$ vs les valeurs du même groupe à 7 semaines.

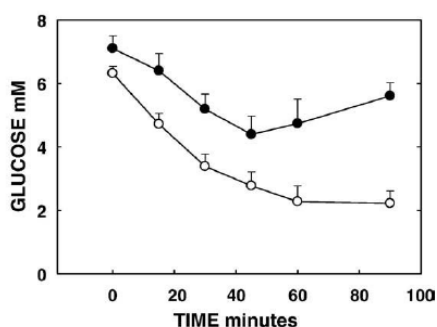


Fig. 32 Test de tolérance à l'insuline, chez les rats Zucker contrôles (cercles blancs) et diabétiques (cercles noirs) âgés de 7 semaines. L'insuline est injectée (IP) au temps 0.

A.2 Le rat Zucker obèse (fig. 33)

Il n'y a pas de différence significative de la glycémie entre les rats Zucker obèse (ZO) et leurs contrôles correspondants (ZC) à 7 et 14 semaines. A 21 semaines, la glycémie atteint 10.59 ± 2.45 mM chez les ZO montrant l'apparition d'un diabète de type 2. La différence est significative (* $p < 0.05$) comparativement à celle des rats contrôles correspondants et des ZO de 7 semaines. Les rats Zucker obèses présentent un état d'hyperinsulinémie comparativement à leurs contrôles correspondants témoignant d'une insulino-résistance dès la 7^{ème} semaine. Les triglycérides plasmatiques, restent stables chez les animaux contrôles aux différents temps, ils sont plus élevés chez les ZO comparativement à leurs contrôles à 7 et 14 semaines (1.19 ± 0.09 vs 0.49 ± 0.09 mM et 2.15 ± 0.30 vs 0.55 ± 0.07 mM respectivement) et augmentent avec l'âge pour atteindre une valeur moyenne de 3.73 ± 1.09 mM à 21 semaines. Le cholestérol plasmatique est élevé chez les ZO à 7, 14 et 21 semaines. Il augmente avec l'âge dans les deux groupes.

En ce qui concerne les acides gras non estérifiés (AGNE) plasmatiques, leur concentration ne change pas chez les rats Zucker contrôle. Chez les obèses, ils augmentent à partir de la 14^{ème} semaine ($p < 0.001$) et restent élevés jusqu'aux 21 semaines ($p < 0.01$).

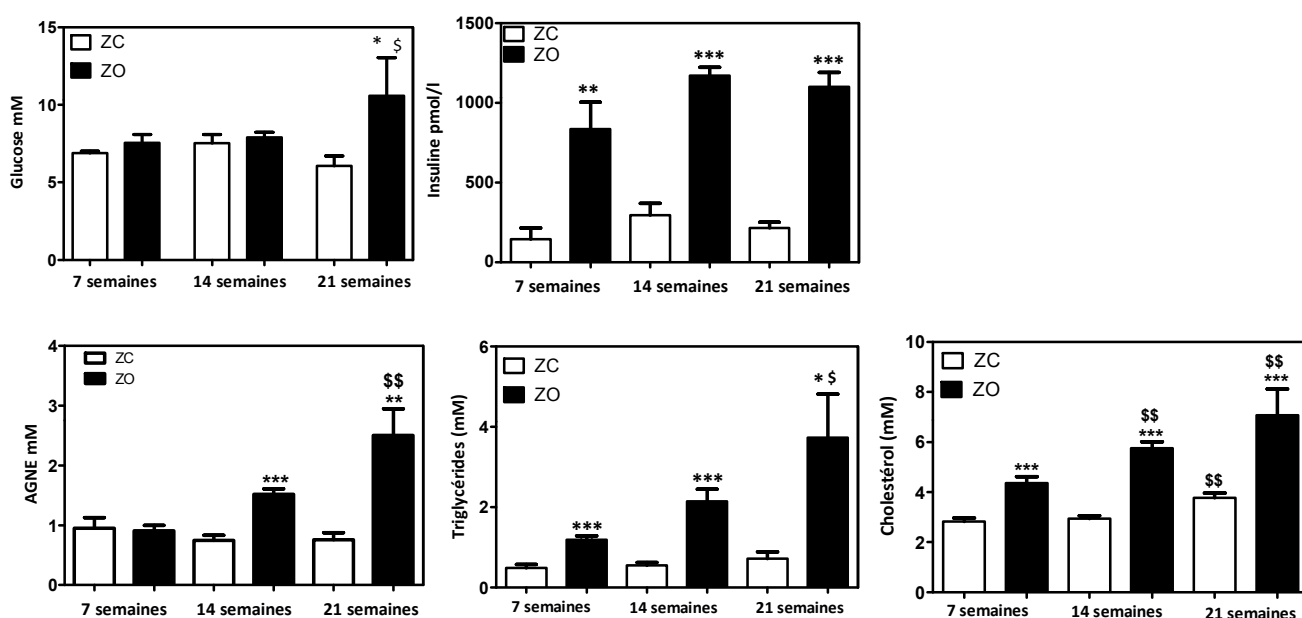


Fig. 33 Evolution de la glycémie, de l'insulinémie et des lipides chez le rat Zucker obèse

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs les valeurs des contrôles correspondants ; \$ $p < 0.05$, \$\$ $p < 0.01$ vs les valeurs du même groupe à 7 semaines.

A.3 *Psammomys obesus* (fig. 34)

L'étude réalisée chez le rat des sables (*Psammomys obesus*) a été menée pendant 6 mois, deux lots ont été suivis :

- Un lot contrôle soumis au régime naturel constitué de plantes halophiles.
- Un lot soumis au régime riche en lipides constitué de jaune d'œuf cuit en association avec les plantes halophiles.

En ce qui concerne les paramètres biochimiques plasmatiques, la glycémie reste faible et stationnaire durant toute l'expérimentation chez le groupe de *Psammomys* contrôle elle est de l'ordre de 2.75 mM. Les animaux soumis au régime hyperlipidique sont diabétiques à partir du deuxième mois jusqu'à la fin de l'expérimentation où leur glycémie affiche une valeur moyenne de 11.72 ± 2.84 vs 2.73 ± 0.37 mM, $p < 0.05$. Le dosage de l'insuline plasmatique a montré une augmentation significative chez les animaux diabétiques notamment au deuxième et au troisième mois comparativement à l'état initial, traduisant un état d'hyperinsulinémie et d'insulinorésistance. Cet état évolue vers une carence insulinaire au sixième mois, nous enregistrons à ce stade comparativement au début de l'expérimentation chez les animaux diabétiques 70.18 ± 15.1 vs 794.10 ± 71.0 pmol/L. Le cholestérol plasmatique varie peu chez les témoins. Il affiche chez les *Psammomys* soumis au régime hyperlipidique une augmentation spectaculaire dès la fin du premier mois après instauration du régime. En outre, l'hypercholestérolémie demeure très élevée pendant toute l'expérimentation.

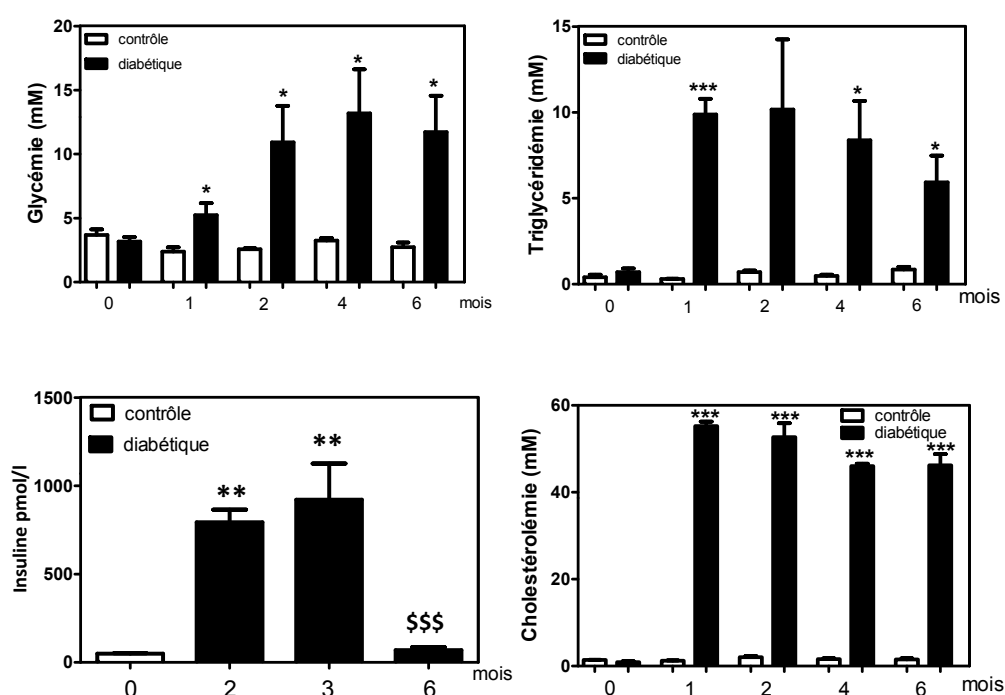


Fig. 34 Evolution des paramètres biochimiques plasmatiques et de l'insulinémie chez *Psammomys obesus* soumis au régime hyperlipidique.

Pour les paramètres biochimiques plasmatiques : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs les valeurs des contrôles correspondants. Pour l'insulinémie : ** $p < 0.01$ vs le temps 0 des contrôles; \$\$\$ $p < 0.001$ vs les diabétiques de 2 mois.

B. Expression hépatique des gènes de la lipogenèse

B.1 Rat Zucker obèse (fig. 35)

Nous avons mesuré l'expression des gènes de la lipogenèse notamment l'acide gras synthase (fatty acid synthase, FAS) et l'acétyl Co-A carboxylase-1 (ACC-1), ainsi que les facteurs de transcription impliqués dans cette voie, SREBP1-c (sterol regulatory element binding protein) et ChREBP (carbohydrate response element binding protein) qui transmettent respectivement l'effet de l'insuline et du glucose, dans le foie de rats Zucker obèses et leurs contrôles âgés de 14 semaines. A ce stade de l'expérimentation ces animaux sont hyperinsulinémiques et la lipogenèse est stimulée, ce qui se traduit par l'augmentation significative de l'expression des gènes clés de cette voie.

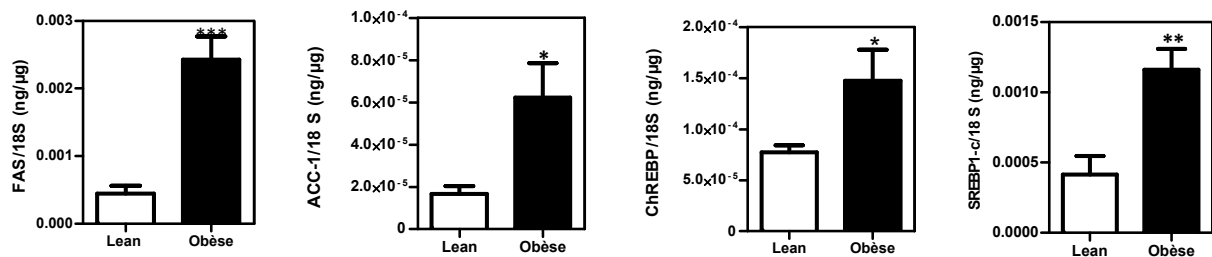


Fig. 35 Expression hépatique des gènes de la lipogenèse chez le rat Zucker obèse.

*p<0.05, **P<0.01, ***p<0.001 vs les valeurs des contrôles.

B.2 *Psammomys obesus* (fig. 36, 37,38)

Chez *Psammomys obesus*, l'étude histologique du foie montre chez *Psammomys* diabétiques une véritable stéatose hépatique, où presque tous les hépatocytes sont remplis de gouttelettes lipidiques, donnant au tissu hépatique un aspect vacuolaire et une couleur claire par rapport à la teinte brune du foie normal.



Fig. 36 Coupe transversale du foie de *Psammomys obesus* contrôle. Grossissement (x100)

Cette figure montre une partie de la structure du foie de *Psammomys* contrôle constitué de la veine centro-lobulaire (étoile), à partir de laquelle les lames hépatocytaires (flèches jaunes) et les capillaires sinusoides (flèches blanches) sont disposées de façon radiaire.

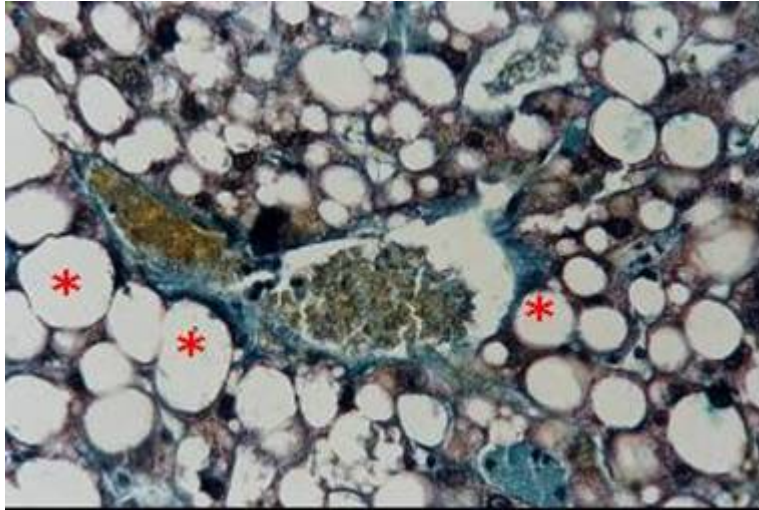


Fig. 37 Coupe transversale du foie de *Psammomys obesus* diabétique. Grossissement (x100)
Le foie de ce groupe de *Psammomys* est gravement atteint par la stéatose hépatique, la cellule hépatocytaire est presque entièrement occupée par des gouttes lipidiques (étoiles).

Au terme de l'expérimentation après 6 mois de régime hyperlipidique, nous avons mesuré l'expression des gènes de la lipogenèse dans le foie de *Psammomys* contrôle et diabétique. Les résultats montrent une baisse de l'expression de ces gènes chez les diabétiques mais la différence n'est significative que pour FAS. Etant donné le nombre d'échantillons très réduit, l'étude statistique ne révèle pas de différence significative pour les autres gènes (fig.38).

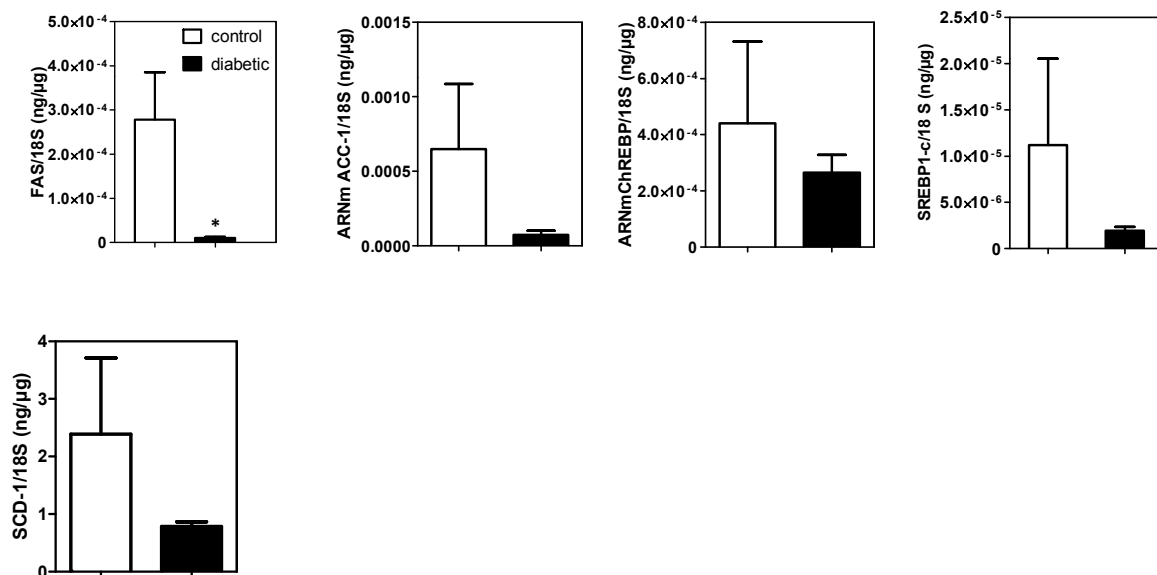


Fig. 38 Expression des gènes de la lipogenèse dans le foie de *Psammomys obesus*

*p<0.05 vs les valeurs des contrôles.

C. Triglycérides et lipogenèse dans la paroi artérielle

C.1 Rats Zucker diabétiques et obèses (fig. 39, 40, 41)

C.1.1 Triglycérides dans la paroi artérielle (fig. 39)

Nous avons mesuré le contenu en triglycérides dans la paroi artérielle de rats Zucker diabétiques et obèses, à l'âge de 7, 14 et 21 semaines. Les résultats ont montré une augmentation significative du contenu en triglycérides dans les aortes de rat Zucker diabétique comparativement aux contrôles correspondants. Nous avons noté que les triglycérides augmentent également significativement avec l'âge dans les aortes de rats contrôles et diabétiques.

Comparativement au rat Zucker diabétique, le contenu en triglycérides des aortes est dix fois plus important chez le rat Zucker obèse. Il est plus élevé dans les aortes de rats obèses comparativement à leurs contrôles. La tendance à une augmentation avec l'âge n'est pas significative dans ces groupes.

Il n'a pas été possible de mesurer le contenu en triglycérides des aortes de *Psammomys* contrôles et diabétiques du fait de la quantité d'échantillons disponible faible mais l'histologie des aortes montrent des dépôts lipidiques et des cellules spumeuses dans les aortes de *Psammomys* diabétiques (cf paragraphe sur l'histologie de ces aortes)

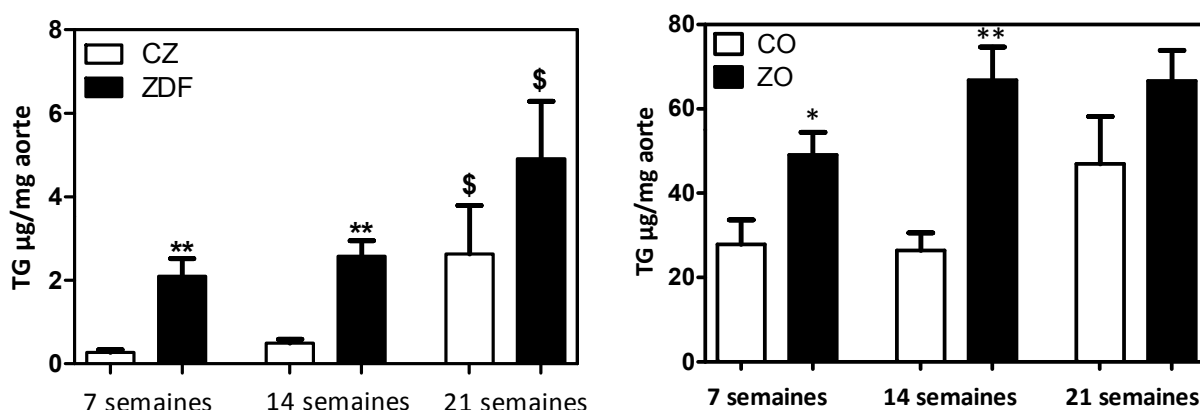


Fig. 39 Triglycérides aortiques chez le rat Zucker diabétique et obèse

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs les valeurs des contrôles correspondants ; \$ $p < 0.05$ vs des valeurs des contrôles et diabétiques de 7 semaines.

C.1. 2 Expression des gènes de la lipogenèse dans la paroi artérielle de rat Zucker diabétique et obèse (fig. 40, 41)

Nous avons mesuré dans la paroi aortique, l'expression des gènes de la lipogenèse (FAS, ACC1) ainsi que de facteurs de transcription impliqués dans la régulation de cette voie (Srebp1-c et ChREBP). Les résultats montrent que les ARNm de ces gènes sont présents dans la paroi artérielle chez le rat Zucker diabétique et obèse ainsi que chez leurs contrôles respectifs. L'expression de ces gènes n'est pas plus élevée dans les aortes provenant de rats Zucker diabétiques que dans celles des contrôles correspondants. On observe plutôt une

baisse de l'expression de certains gènes, notamment Srebp1-c qui diminue significativement à 7 et 14 semaines dans les aortes de rats Zucker diabétiques comparativement aux contrôles (fig. 40).

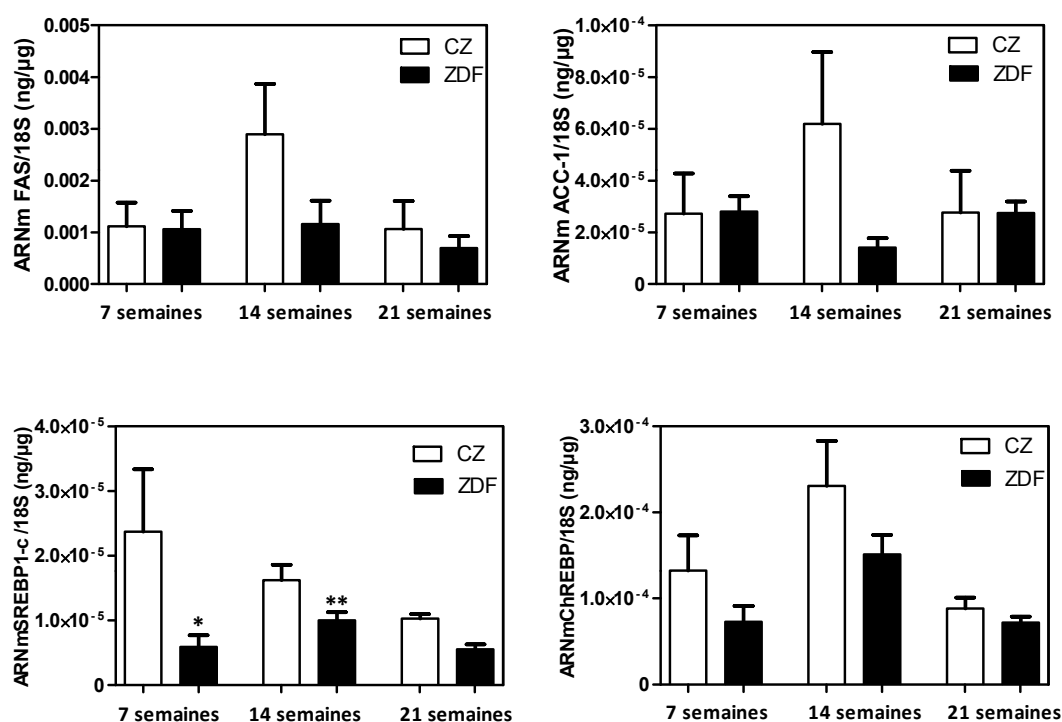


Fig.40 Expression des gènes de la lipogenèse chez le rat Zucker diabétique

*p<0.05, **P<0.01, vs les valeurs des contrôles correspondants.

Le profil d'expression des gènes de la lipogenèse dans les aortes de rat Zucker obèse ressemble à celui des rats Zucker diabétiques. Les concentrations d'ARNm ne sont pas plus élevées dans les aortes de rats Zucker obèses comparativement aux contrôles et ne traduisent pas le contenu très élevé de triglycérides dans ces aortes. L'ARNm de Srebp1-c diminue significativement dans les aortes de rat Zucker obèse à 21 semaines, lorsqu'ils ont développé un diabète de type 2 (fig. 41).

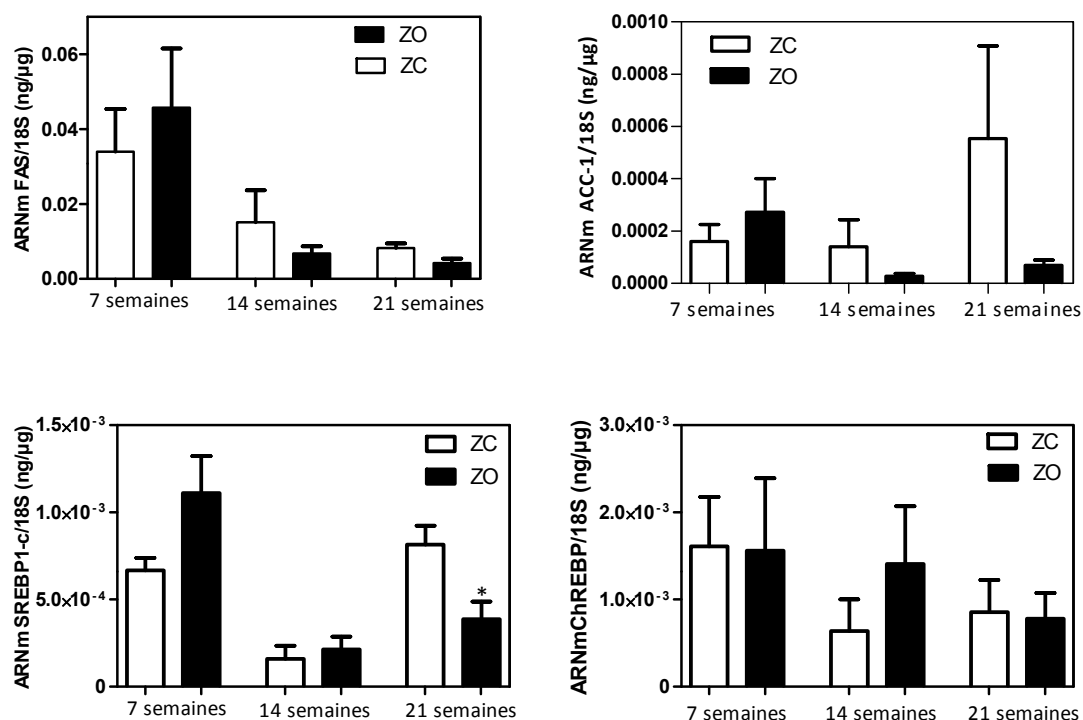


Fig.41 Expression des gènes de la lipogenèse chez le rat Zucker obèse.

*p<0.05 vs les valeurs des contrôles correspondants.

C.1 3 Expression des gènes responsables de la captation d'acides gras libres chez le rat Zucker diabétique et obèse (fig. 42, 43)

Puisque nous n'avons pas observé chez les rats Zucker une expression augmentée de la lipogenèse pouvant contribuer au contenu élevé de triglycérides dans leur aorte, nous avons voulu savoir si ces triglycérides accumulés dans la paroi aortique pourraient être synthétisés en utilisant des acides gras provenant d'une autre voie telle que la captation des acides gras présents dans la circulation sous forme d'acides gras libres ou incorporés dans les triglycérides plasmatiques. Pour cela, nous avons mesuré les ARNm codants pour des molécules responsables de la captation des acides gras libres plasmatiques comme la FAT (fatty acid transporter) ou impliquées dans l'hydrolyse des TG véhiculés par les lipoprotéines (LPL, récepteur pour des lipoprotéines riches en triglycérides (VLDLr)).

Nos résultats ont montré que ces gènes ne sont pas plus exprimés dans les aortes de rat Zucker diabétique (fig. 42) ou obèse (fig. 43) comparativement à leurs contrôles, ni augmentés avec l'âge. Une surexpression de cette voie ne semble donc pas être impliquée dans les dépôts aortiques accrus de triglycérides. Il est possible cependant que cette captation d'acides gras provenant de la circulation soit augmentée chez les rats Zucker du fait de la simple augmentation des concentrations circulantes, et donc de la disponibilité de ces substrats.

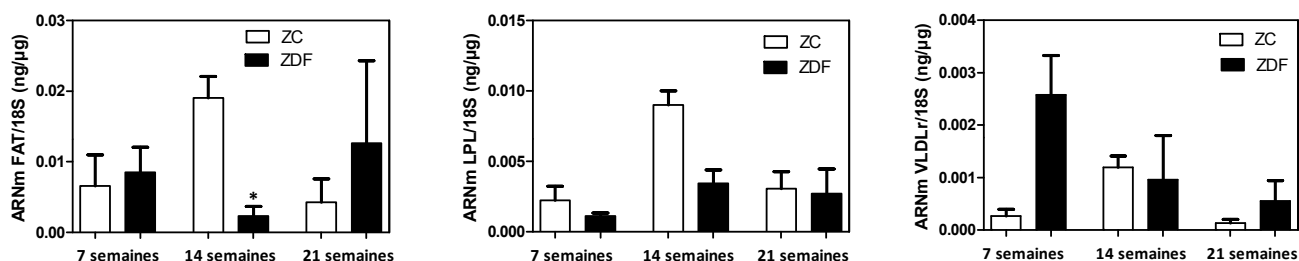


Fig.42 Expression des gènes responsables de la captation d'acides gras libres chez le rat Zucker diabétique.

*p<0.05 vs les valeurs des contrôles correspondants.

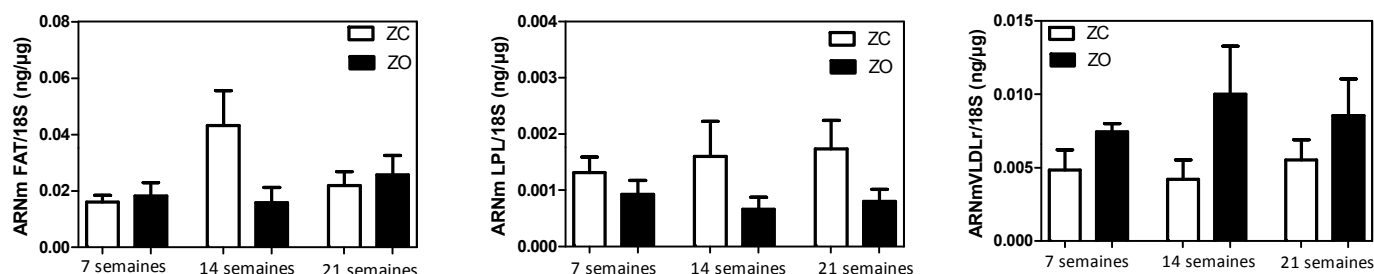


Fig.43 Expression des gènes responsables de la captation d'acides gras libres chez le rat Zucker obèse.

D. Histologie et lipogenèse dans la paroi artérielle chez *Psammomys obesus*

D.1 Etude structurale de l'aorte chez *Psammomys obesus* soumis au régime hyperlipidique (fig. 44, 45a, 45b, 45c)

L'examen morphologique au trichrome de Masson qui révèle les structures conjonctives notamment les collagènes en vert, le cytoplasme en rose et les noyaux en brun, nous a permis d'abord d'analyser la structure de l'aorte de *Psammomys obesus* contrôle. Cette dernière est tapissée au niveau de la surface interne par une couche de cellules aplaties étroitement jointes réalisant un revêtement continu et constituant l'endothélium. Les cellules endothéliales sont étirées dans le sens du courant, renflées au niveau du noyau, minces ailleurs. La face profonde des cellules endothéliales repose sur une lame basale mince et discontinue qui sépare l'endothélium des couches sous-endothéliales conjonctives de l'intima. La limitante élastique interne sépare cette dernière de la média.

La média ou tunique moyenne de la paroi artérielle est constituée de CML, dont les noyaux sont bien visibles, orientées en hélice, entourées de quantités variables de collagènes et de fibres élastiques.

L'adventice ou tunique externe est reconnaissable à la présence de faisceaux lâches de collagènes. La limite avec la média est habituellement marquée par du tissu élastique organisé en limitante élastique externe (fig 44).

Après 6 mois de régime athérogène, l'étude histologique de l'aorte montre des altérations importantes et variables d'un animal à l'autre. Ainsi nous avons observé une désorganisation complète de la structure de l'aorte avec des ruptures de la limitante élastique interne, du dépôt de matériel fibreux notamment des collagènes, du matériel cellulaire et lipidique formant des cellules spumeuses et plusieurs foyers de cœur lipidique dans le premier espace sous-endothélial mais également dans la média (fig. 45a,b,c). Ces altérations étaient plus accentuées dans certaines aortes (fig. 45c), ce qui a causé un amincissement et une rupture de la paroi aortique. Nous notons également des agrégations sanguines à la surface luminale de l'endothélium (fig. 45a, 45b) mais également au niveau du sous-endothélium après lésion endothéliale (fig 45c).

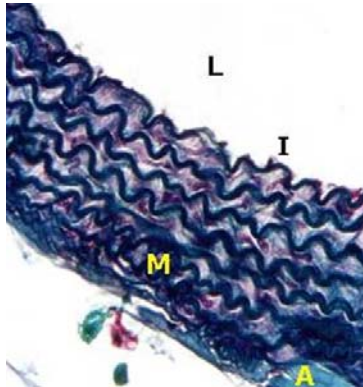


Fig. 44 Coupe transversale d'aorte de Psammomys contrôle. Grossissement (x40) La paroi artérielle est constituée de 3 couches ; l'intima (I), la média (M) et l'adventice (A). Nous observons les noyaux des cellules endothéliales (flèche noire), des lames élastiques ondulées (flèches oranges) etourées par les fibres de collagènes délimitant des espaces interlamellaires contenant les noyaux des CML (tête de flèche jaune). L'adventice (A), la couche la plus externe constituée de faisceaux de collagènes.

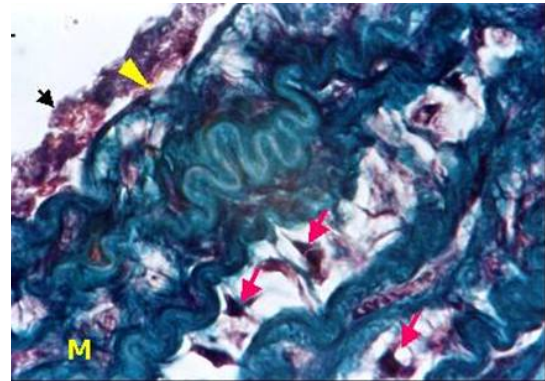


Fig. 45 (a) Coupe transversale d'aorte de Psammomys diabétique. Grossissement (x100) La paroi d'aorte de Psammomys diabétique montre en plus de l'agrégation sanguine (flèche noire), la présence d'espaces interlamellaires élargis et clairs au niveau desquels, les CML sont orientées perpendiculairement à l'axe de l'aorte (flèches roses).

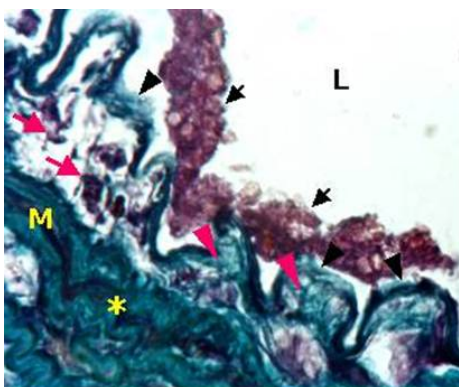


Fig. 45 (b) Coupe transversale d'aorte de Psammomys diabétique. Grossissement (x100) Cette illustration montre une importante agrégation sanguine au niveau de l'endothélium (flèches noires) avec désorganisation cellulaire et conjonctive au niveau du 1^{er} espace sous-endothélial qui présente un aspect spumeux.

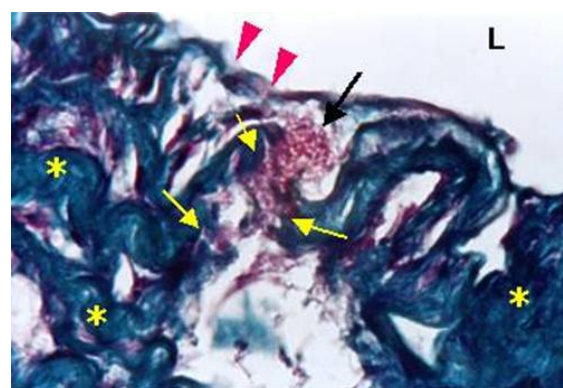


Fig. 45 (c) Coupe transversale d'aorte de Psammomys diabétique. Grossissement (x100) Cette coupe de l'aorte montre la rupture de la trame élastique (flèches jaunes) et le dépôt de matériel conjonctif (étoiles jaunes). Nous notons l'infiltration sanguine et l'aspect spumeux dans les espace interlamellaires.

D.2 Etude des gènes de la lipogenèse dans l'aorte de *Psammomys obesus* (fig. 46)

La mesure des gènes de la lipogenèse (FAS, ACC-1) et des facteurs de transcription (ChREBP, SREBP1-c) dans la paroi aortique de *Psammomys obesus* soumis au régime hyperlipidique pendant 6 mois, ne montre pas de différence d'expression de FAS et SREBP1c par rapport aux psammomys contrôles. Il y'a une tendance à l'augmentation d'ACC-1 et de ChREBP dans les aortes de psammomys soumis au régime hyperlipidique. Néanmoins, étant donné le nombre réduit d'échantillons, l'étude statistique ne révèle pas de différence significative. En ce qui concerne l'expression de la SCD-1 (steaoryl CoA desaturase-1), nous enregistrons une augmentation significative ($p < 0.05$) dans les aortes de Psammomys diabétiques (1.68 ± 0.44 vs 0.48 ± 0.31 ng/ μ g 18S).

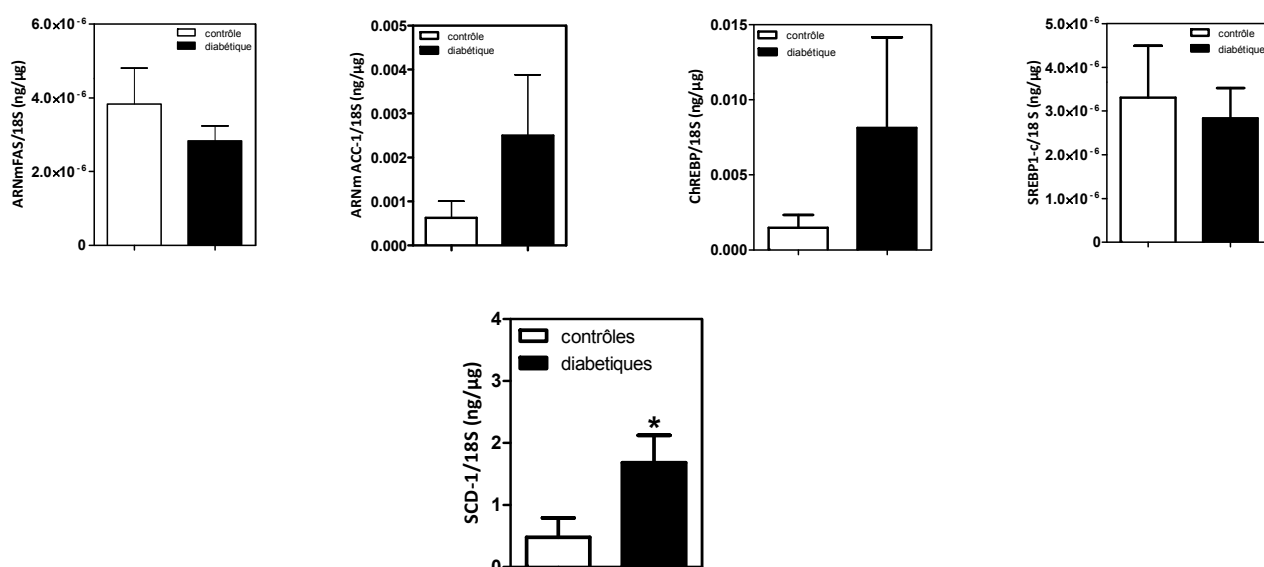


Fig.46 Profil d'expression des gènes de la lipogenèse dans les aortes de *Psammomys obesus*

E. Expression des gènes de la lipogenèse dans la plaque athéromateuse humaine (fig. 47)

Pour étudier l'implication de la voie de synthèse de *nov*o d'acides gras au cours de pathologies favorisant le développement de l'athérome et au cours du processus athéroscléreux, nous avons mesuré les ARNm des gènes codants pour les enzymes (ACC-1 et FAS) et les facteurs de transcription (ChREBP et SREBP1-c) clés de cette voie chez des modèles de rat présentant des anomalies du métabolisme lipidique et/ou glucidique, comme le rat Zucker obèse insulino-résistant ou le rat Zucker diabétique, ainsi que chez le rat des sables (*Psammomys obesus*) soumis au régime hyperlipidique. Ce dernier régime est à l'origine de l'installation du diabète de type 2 associé à des altérations de la structure de la paroi artérielle caractéristiques du processus athéroscléreux.

(Davies et al., 2005) ont décrit une augmentation d'expression de gènes lipogéniques dans des plaques d'athérome carotidien humain. Pour vérifier ces données et les étendre à d'autres gènes lipogéniques, nous avons mesuré les gènes indiqués ci-dessus dans les plaques d'athérome carotidien humain et dans de l'endartère située au voisinage de la plaque et macroscopiquement saine. Les résultats ne montrent pas de différence significative de l'expression des gènes (ACC-1, FAS, ChREBP et SREBP1-c) entre les parties saines et athéromateuses des échantillons des sujets non diabétiques. Cependant chez les

sujets diabétiques les ARNm codants pour les facteurs de transcription ChREBP et SREBP sont significativement plus abondants dans la partie athéromateuse comparativement à la partie macroscopiquement saine, avec une tendance non significative dans le même sens pour ACC-1 et FAS. Ceci correspond en fait à une diminution de l'expression des gènes lipogéniques dans la partie macroscopiquement saine des sujets diabétiques par rapport aux non diabétiques alors qu'il n'y a pas de différence entre ces deux groupes de sujets dans la partie athéromateuse. Ces résultats montrant l'absence de surexpression ou une répression des gènes lipogéniques dans la paroi artérielle des sujets diabétiques sont cohérents avec ceux obtenus dans les aortes de rats diabétiques Zucker ou *Psammomys obesus*.

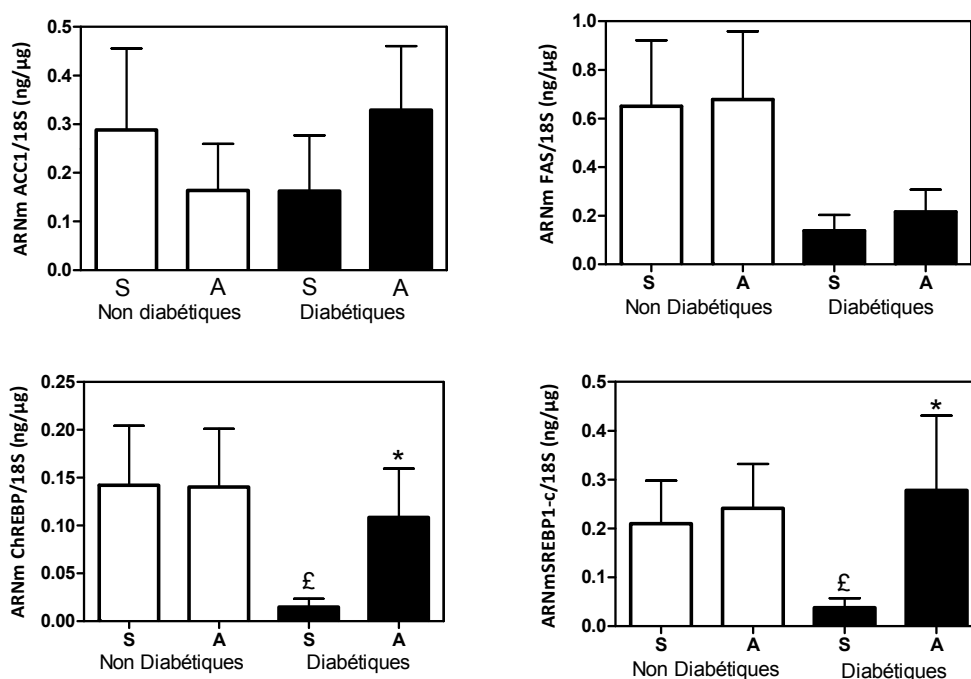


Fig. 47 Expression des gènes de la lipogenèse dans la plaque d'athérome chez l'homme

* $P < 0.05$ vs la partie saine des mêmes patients ; £ $p < 0.5$ vs les valeurs correspondants chez les sujets non diabétiques.

II Données *in vitro*

Pour étudier l'expression de la lipogenèse au niveau cellulaire et le rôle de certaines hormones et substances dans la régulation de cette voie, nous avons mis en culture des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) provenant d'aortes de rat Zucker obèses et contrôles ainsi que de *Psammomys obesus* recevant ou non une alimentation hyperlipidique depuis 6 mois. Nous avons mesuré l'expression des gènes clés (ACC-1, FAS, ChREBP, SREBP) dans un premier temps en absence de toute stimulation, à partir des cellules cultivées dans un milieu basal sans sérum à 5 mM de glucose puis en présence de molécules connues pour stimuler dans d'autres types cellulaires l'expression et l'activité de la lipogenèse (glucose, triiodothyronine (T3), angiotensine II, agonistes de LXR). Le milieu utilisé est le PromoCell pour les cellules de rat Zucker ou le DMEM pour les cellules de *Psammomys obesus*.

1. Expression basale des gènes de la lipogenèse dans les cellules musculaires lisses vasculaires

1.1 Chez le rat Zucker obèse (fig. 48)

Dans les CMLV provenant d'aortes de rat Zucker obèses, les concentrations d'ARNm de FAS sont plus basses que dans les CMLV de rat Zucker contrôles, (** $p < 0.01$, $1,17E-02 \pm 2,31E-03$ vs $1,04E-03 \pm 2,41E-04$ ng/ μ g 18S). L'expression de ChREBP est également plus basse dans les cellules provenant d'aortes de rat Zucker obèses, mais la différence reste non significative ($4,07E-05 \pm 2,26E-05$ vs $1,41E-05 \pm 2,29E-06$ ng/ μ g 18S). L'expression d'ACC-1 est similaire dans les CMLV provenant des deux groupes. Il y'a une tendance à l'augmentation de SREBP1-c dans les CMLV de Zucker obèse comparativement aux contrôles, mais sans atteindre la significativité.

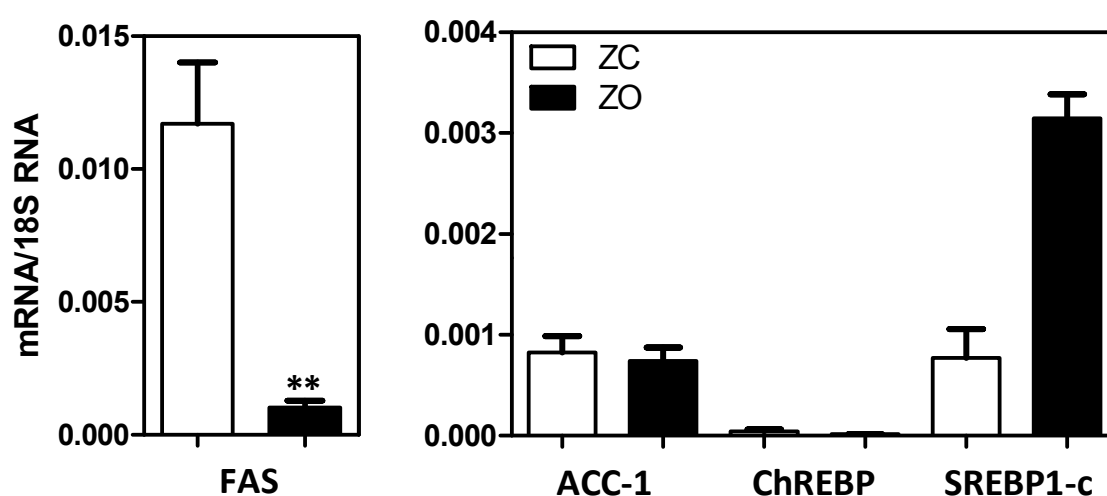


Fig. 48 Expression basale des gènes lipogéniques dans les CMLV de rat Zucker obèse
** $P < 0.01$ vs les contrôles.

1.2 Chez *Psammomys obesus* (fig. 49)

L'expression basale de ChREBP et SREBP est diminuée dans les CMLV de *Psammomys obesus* diabétiques comparativement aux contrôles ($p < 0.05$ et $p < 0.01$ respectivement) mais ceci n'est pas associé à une diminution des messagers de FAS et ACC-1, qui sont au contraire légèrement augmentés.

Au total, à l'état basal, nous ne trouvons pas non plus de surexpression dans les CMLV des gènes de la lipogenèse dans les deux modèles d'insulino-résistance et de diabète.

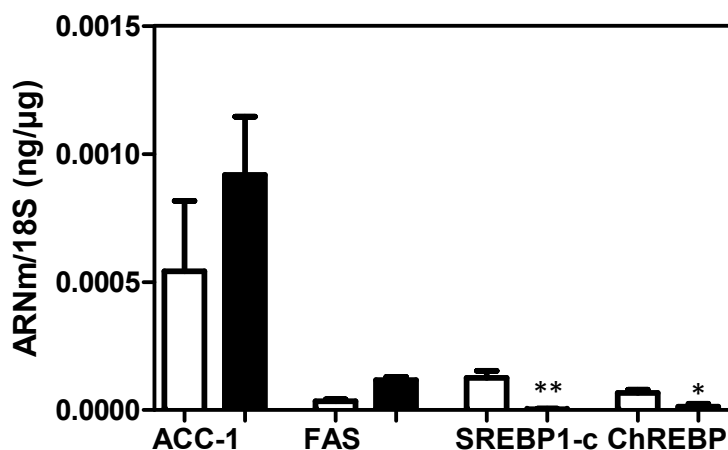


Fig. 49 Expression basale des gènes lipogéniques dans les CMLV de *Psammomys obesus*.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs les contrôles.

2. Régulation de la lipogenèse dans les CMLV

2.1 Régulation par le glucose et les facteurs adipogéniques

Nous avons mesuré les ARNm des gènes de la lipogenèse dans les CMLV provenant des aortes de rats Zucker obèses et de *Psammomys obesus*, dans un milieu de culture avec une concentration normale (5 mM) ou élevée (25 mM) de glucose. Cette étude est réalisée à l'état basal (D0), à 3 (D3) et 7 (D7) jours pour *Psammomys obesus* ou 3 (D3), 7 (D7) et 21 (D21) jours pour le rat Zucker obèse.

Nous avons testé *in vitro* l'effet d'un ensemble de facteurs (insuline, T3, dexaméthasone, IBMX), appelé par Davies, milieu de différenciation adipocytaire (ADM), sur certains paramètres notamment :

- L'expression des gènes de la lipogenèse (FAS, ACC-1, ChREBP et SREBP1-c).
- Le contenu cellulaire en TG.
- La contribution de la lipogenèse au pool des TG synthétisés mesurée par CPG-SM.

2.1.1 CMLV de rat Zucker obèse

Dans les conditions basales, à 5 mM du glucose, les concentrations d'ARNm des gènes de la lipogenèse diminuent progressivement avec le temps, dans les CMLV de rats Zucker obèses et contrôles. Cette baisse est pour SREBP1-c, ChREBP et FAS plus importante dans les cellules de rats obèses avec à 21 jours des valeurs plus basses que dans les cellules de rats contrôles (fig. 50).

Glucose 5 mM

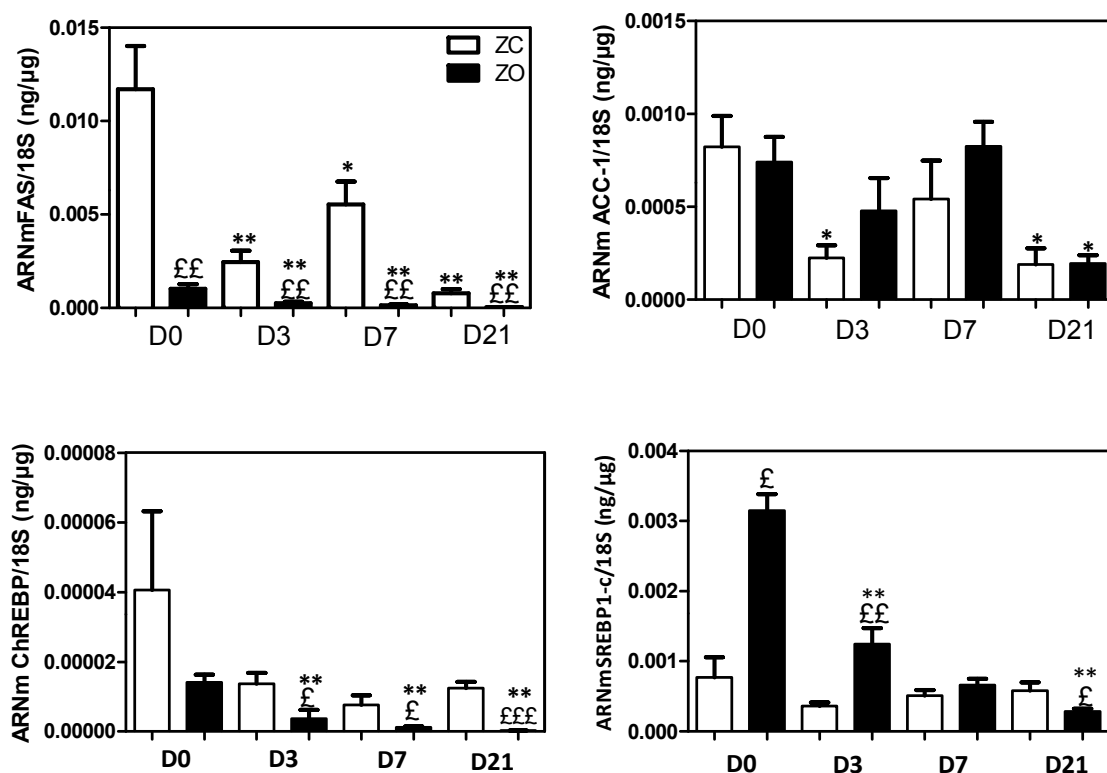


Fig. 50 Effet du glucose sur l'expression des gènes de la lipogenèse dans les CMLV de rat Zucker obèse mises en culture dans un milieu à 5 mM de glucose.

* $p < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs les valeurs obtenues au temps 0 (D0) ; £ $p < 0.05$, ££ $p < 0.01$, £££ $p < 0.001$ vs les valeurs dans les CMLV des contrôles correspondants.

L'addition de glucose à une concentration élevée (25 mM) diminue la baisse des concentrations d'ARNm pour SREBP1-c et ChREBP mais uniquement dans les cellules de rats contrôles. Il n'y a aucun effet dans les cellules de rats obèses (fig. 51).

Glucose 25 mM

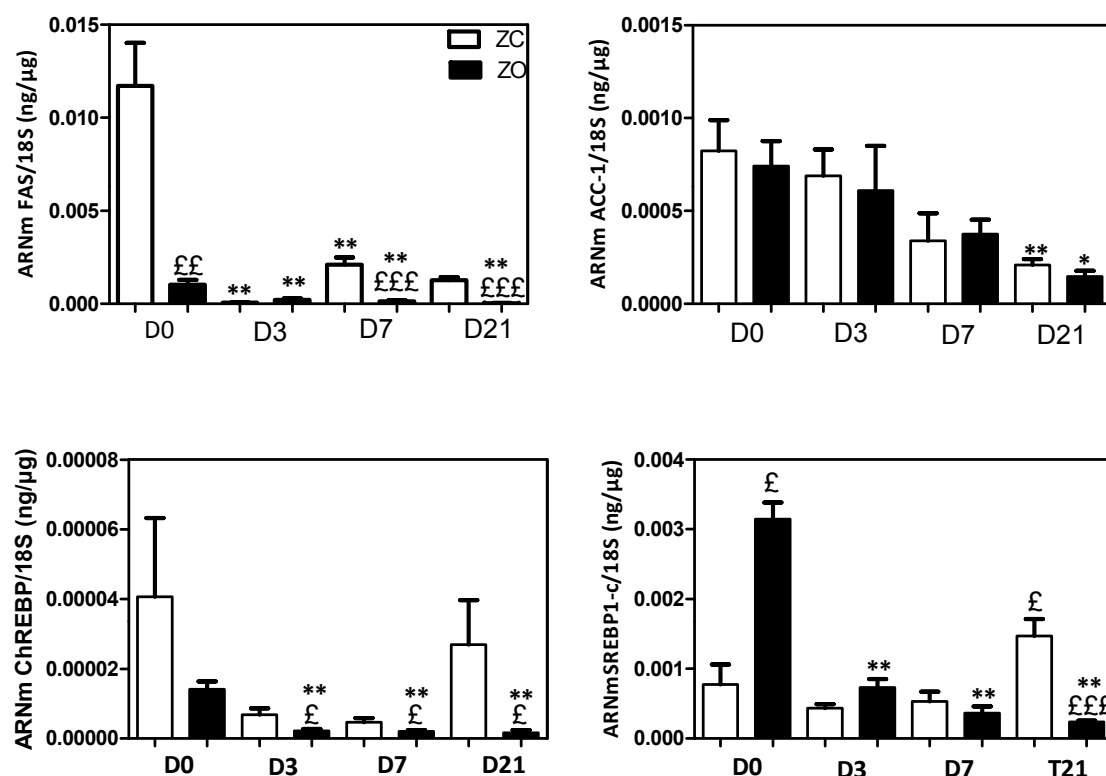


Fig. 51 Effet du glucose sur l'expression des gènes de la lipogenèse dans les CMLV de rat Zucker obèse mises en culture dans un milieu enrichi en glucose (25 mM).

* $p < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs les valeurs obtenues au temps 0 (D0) ; £ $p < 0.05$, ££ $p < 0.01$, £££ $p < 0.001$ vs les valeurs dans les CMLV des contrôles correspondants.

Dans un milieu à 5 mM de glucose et sous l'effet des facteurs adipogéniques, les gènes de la lipogenèse ne sont pas augmentés dans les CMLV de rats Zucker obèses. ChREBP et SREBP1-c augmentent significativement dans les CML de Zucker contrôles à 7 et 21 jours respectivement (fig. 52).

Le milieu adipogénique augmente le contenu en triglycérides dans les CMLV de rats Zucker contrôles à 21 jours (232.60 ± 22.44 vs 114.40 ± 11.00 $\mu\text{g}/10^6$ cellules, $p < 0.001$), l'augmentation est moins prononcée dans les cellules de rats obèses (170.20 ± 10.48 vs 129.10 ± 17.25 $\mu\text{g}/10^6$ cellules, $p < 0.05$) (fig. 53A). Ces contenus en triglycérides reflètent une lipogenèse active traduisant un enrichissement d'un facteur de 1.69 et 1.55 dans les CMLV de rats Zucker contrôles et obèses respectivement (fig. 53B).

Glucose 5 mM + ADM

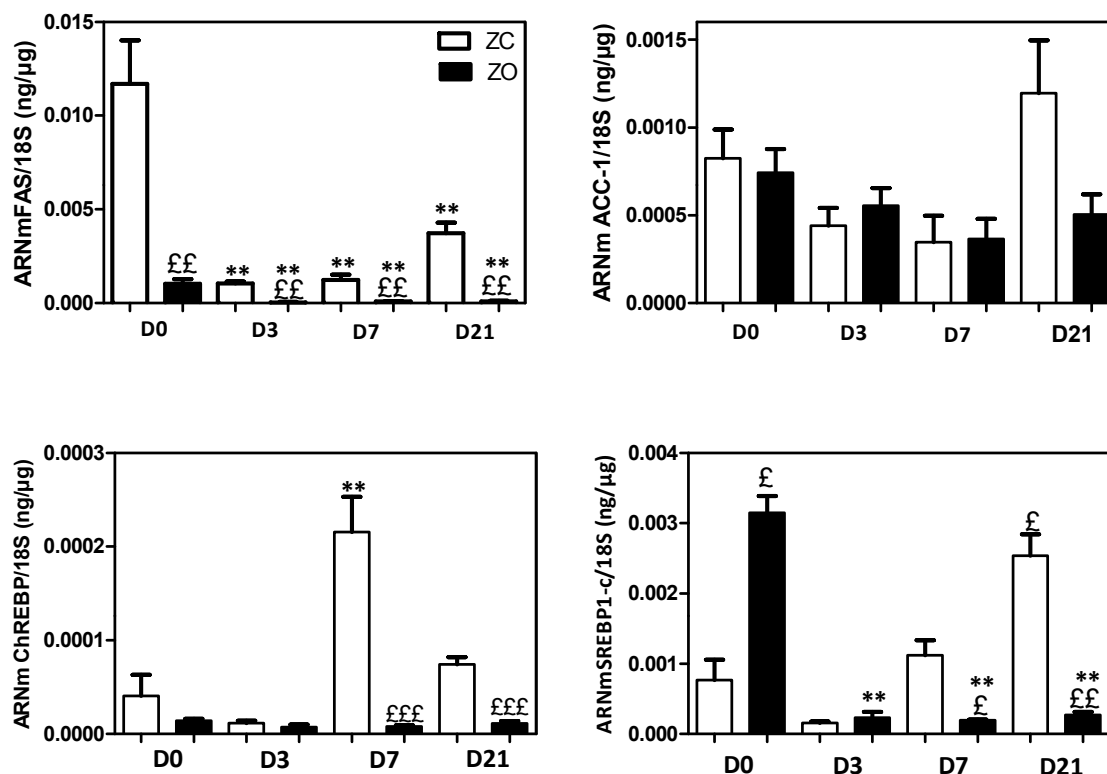


Fig. 52 Effet des facteurs adipogéniques sur l'expression des gènes de la lipogenèse dans les CMLV de rats Zucker obèses et contrôles cultivée dans un milieu à 5 mM de glucose.

*p<0.05, **p<0.01 vs les valeurs obtenues au temps 0 (D0) ; £p<0.05, ££p<0.01, £££p<0.001 vs les valeurs dans les CMLV des contrôles correspondants.

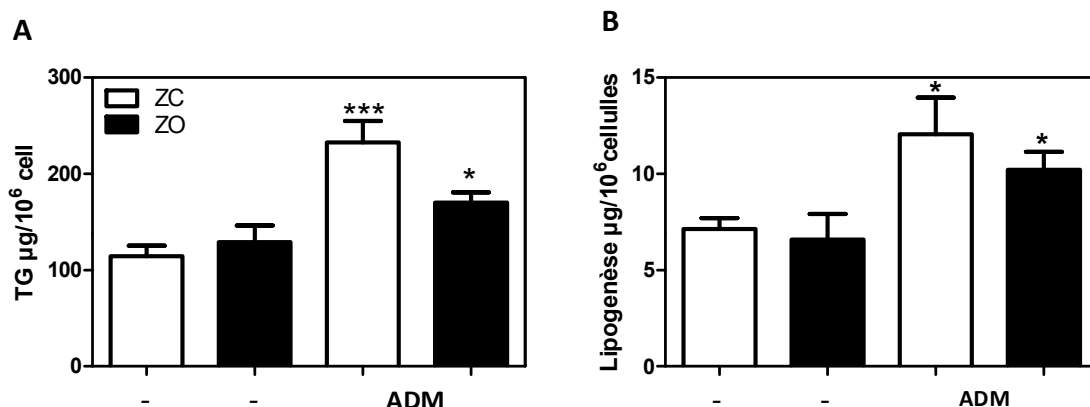


Fig. 53 Effet des facteurs adipogéniques (ADM) sur le contenu en triglycérides (A) et la lipogenèse (B) dans les CMLV de rats Zucker contrôles et obèses traitées pendant 21 jours.

*p<0.05, ***p<0.001 vs les valeurs correspondants sans ADM.

2.1.2 CMLV de *Psammomys obesus* (fig. 54, 55)

Dans les conditions basales (DMEM à 5 Mm de glucose, sans facteurs adipogéniques), les gènes de la lipogenèse sont analysés aux différents temps de l'expérimentation, commençant par le temps 0 (D0), à 3 jours (D3) et à 7 jours (D7). Les concentrations d'ARNm des facteurs de transcription ChREBP et SREBP1-c sont significativement plus faibles dans les CMLV de *Psammomys* diabétiques comparativement aux contrôles durant toute l'expérimentation. Ceci n'est pas associé à une baisse de l'expression d'ACC-1 ou FAS dans les CML de *Psammomys* diabétiques, nous observons plutôt une augmentation de l'expression de ces gènes, dans ces CML de *Psammomys* diabétiques. La différence n'est pas significative pour ACC-1, cependant FAS augmente significativement ($p < 0.05$) à D0 et D3 dans les CML de *Psammomys* diabétiques comparativement aux contrôles (fig. 54).

Les facteurs adipogéniques (ADM) augmentent les ARNm d'ACC-1 à 3 et 7 jours dans les CML de *Psammomys* diabétiques ($1,72E-03 \pm 5,19E-04$ vs $8,25E-04 \pm 1,83E-04$, $p < 0.05$ et $2,82E-03 \pm 4,19E-04$ vs $7,98E-04 \pm 1,22E-04$, $p < 0.01$ respectivement). L'expression des autres gènes n'est pas modifiée, sauf pour FAS qui augmente dans les CML de *Psammomys* contrôles à 3 jours (D3), $p < 0.05$ (fig 54).

Contrairement à ce que l'on s'attendait, les gènes de la lipogenèse ne sont pas augmentés dans un milieu enrichi en glucose (25 mM) et en présence de facteurs adipogéniques (ADM), sauf dans les CML de *Psammomys* contrôle où ACC-1 augmente à 7 jours ($p < 0.01$). Le milieu adipogénique (ADM) exerce un effet inhibiteur sur l'augmentation des ARNm d'ACC-1 dans les CML de *Psammomys* diabétiques à D3 et D7. Nous notons, sous l'effet de l'ADM, une baisse significative de l'expression de FAS dans les CML de *Psammomys* diabétiques à 3 et 7 jours (fig. 54).

Nous avons mesuré les messagers de SCD-1 dans les CMLV de *Psammomys obesus* contrôles et diabétiques mises en culture en présence de facteurs adipogénique (ADM) pendant 3 et 7 jours, les résultats montrent une action stimulante de ces facteurs sur l'expression de SCD-1 dans les CML de *Psammomys* contrôles, mais également dans les CML de *psammomys* diabétiques à 7 jours, mais cette augmentation est moins importante que celle observée dans les CML contrôles (fig. 55).

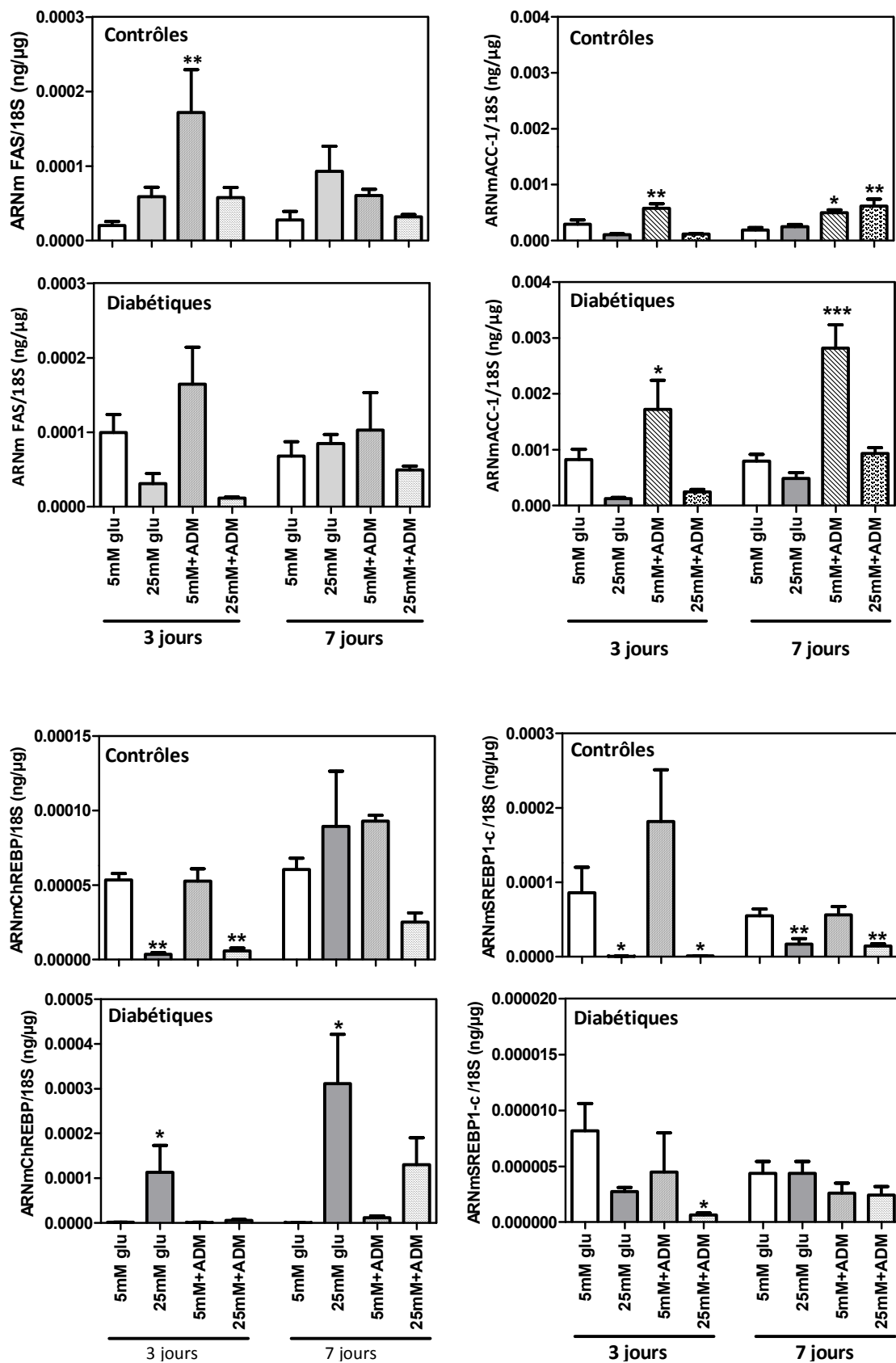


Fig. 54 Effet des facteurs adipogéniques sur l'expression des gènes de la lipogenèse dans les CMLV de *Psammomys obesus* cultivée dans un milieu basal ou enrichi en glucose.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs les valeurs obtenues au temps 0 (D0).

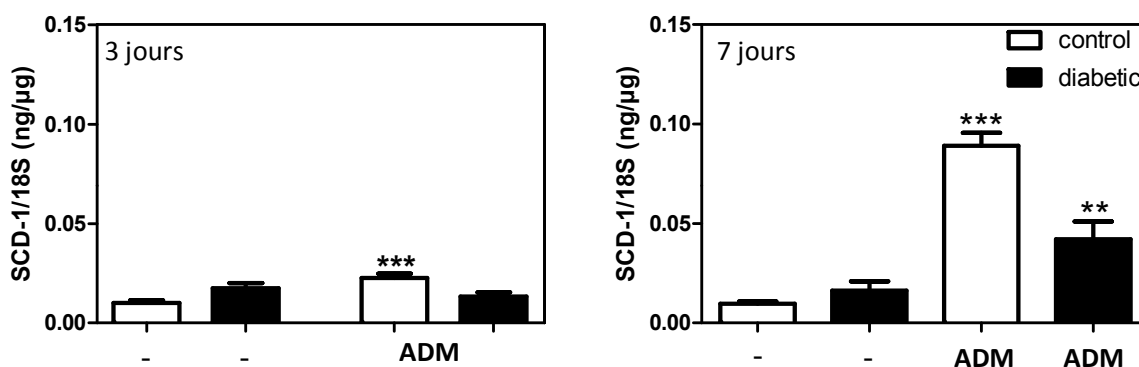


Fig. 55 Effet des facteurs adipogéniques (ADM) sur l'expression de SCD-1 dans les CMLV de *Psammomys obesus*.

P<0.01, *p<0.001 vs les valeurs sans stimulations.

Les facteurs adipogéniques augmentent le contenu en triglycérides (fig. 56) dans les CML de *Psammomys* diabétiques traitées pendant 7 jours (190.10 ± 14.61 vs 117.80 ± 11.61 $\mu\text{g}/10^6$ cellules) cette augmentation est parallèle à une activité lipogénique deux fois plus importante dans ces cellules. Aucun changement n'a été observé dans les CML de *Psammomys* contrôles (fig. 56).

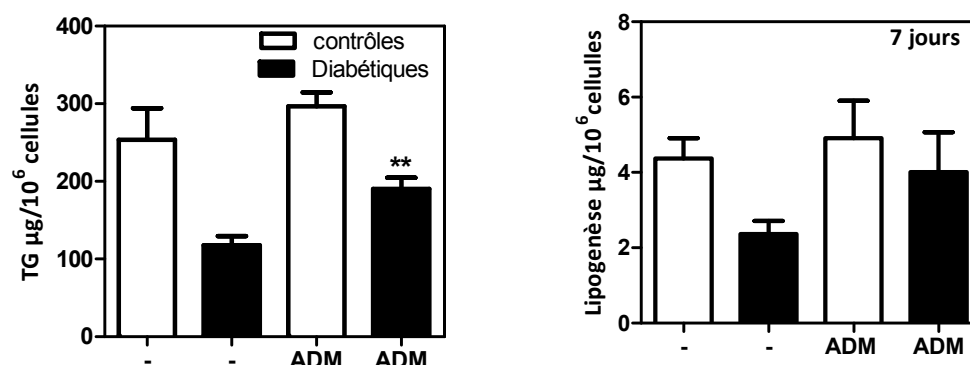


Fig.56 Effet des facteurs adipogéniques sur le contenu cellulaire en triglycérides et l'activité lipogénique dans les CMLV de *Psammomys obesus*.

2.2 Régulation par l'insuline

2.2.1 CMLV de rat Zucker obèse (fig. 57)

Nous avons testé l'effet de l'insuline sur l'expression de certains gènes de la voie de la lipogenèse (FAS et ACC-1) et les facteurs de transcription impliqués (Srebp1-c et Chrebp) dans les CMLV de rats Zucker obèses et contrôles. L'expression de ces derniers facteurs n'est pas modifiée sous l'effet de l'insuline. Nous enregistrons à 7 jours une augmentation des concentrations d'ARNm de FAS dans les CML de rat contrôle ($1,48\text{E-}03 \pm 2,70\text{E-}04$ vs $6,65\text{E-}04 \pm 9,24\text{E-}05$, $p<0.05$), mais pas dans les cellules de rats obèses. En ce qui concerne l'expression d'ACC-1 elle diminue significativement ($p<0.001$) à 3 jours dans les CML de Zucker obèse, une diminution de moindre importance ($p<0.05$) est également notée dans les

CML de Zucker contrôle à 7 jours de traitement avec l'insuline. La lipogenèse répond donc faiblement à l'insuline dans les cellules de rat Zucker contrôles et apparaît résistante à l'action de l'insuline dans les CML de Zucker obèse (fig. 57).

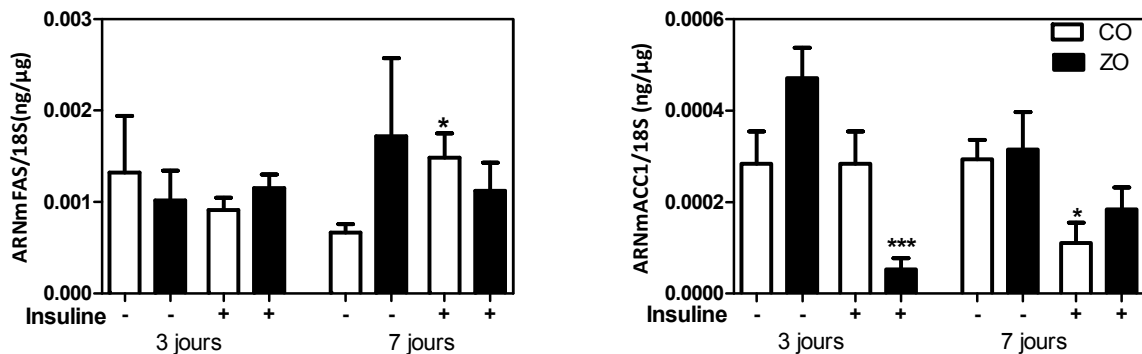


Fig. 57 Effet de l'insuline sur l'expression de FAS et ACC-1 dans les CMLV de rat Zucker obèse.

*p<0.05, ***p<0.001 vs conditions sans insuline.

Les TG mesurés dans les CML de Zucker obèses n'augmentent pas sous l'effet de l'insuline à 3 ou 7 jours d'incubation. Dans les CML de Zucker contrôles, les triglycérides augmentent modérément sous l'effet de l'insuline à 7 jours d'incubation ($132,00 \pm 13.73$ vs 98.77 ± 6.06 , p<0.05). (fig. 58)

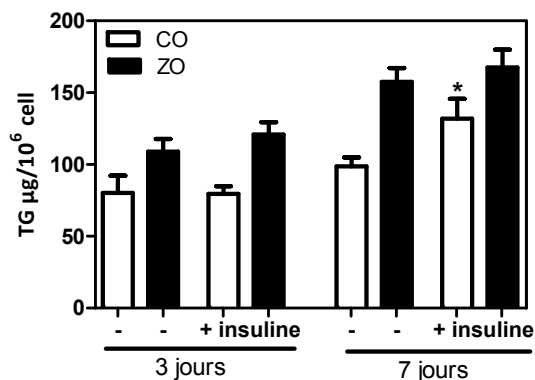


Fig. 58 Contenu en TG dans les CMLV de rat Zucker obèse traitées avec l'insuline. *p<0.05 vs conditions sans insuline.

Les résultats de la spectrométrie de masse, exprimés en valeurs absolues, ne montrent pas d'augmentation de la contribution de la lipogenèse *de novo* au pool des TG, dans les CML de Zucker contrôles et obèses. (fig. 59)

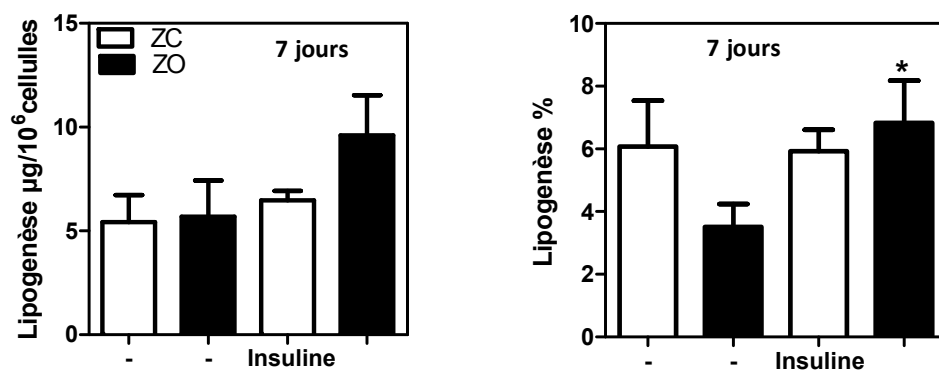


Fig. 59 Mesure de la synthèse hépatique des TG sous l'effet de l'insuline dans les CMLV de rats Zucker obèses.

* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs conditions sans insuline.

2.2.2 CMLV de *Psammomys obesus* (fig. 60, 61, 62)

A 3 jours, l'insuline n'a pas d'effets sur les CMLV de *Psammomys* contrôles et diabétiques. A 7 jours d'incubation, les messagers de FAS et d'ACC-1 augmentent uniquement dans les CML de *Psammomys* diabétiques ($p < 0.05$ et $p < 0.01$ respectivement pour les deux gènes). Les facteurs de transcription ne sont pas augmentés sous l'effet de l'insuline, on note plutôt une baisse significative ($p < 0.05$) de SREBP1-c dans les CML de *Psammomys* contrôle à 7 jours (fig. 60).

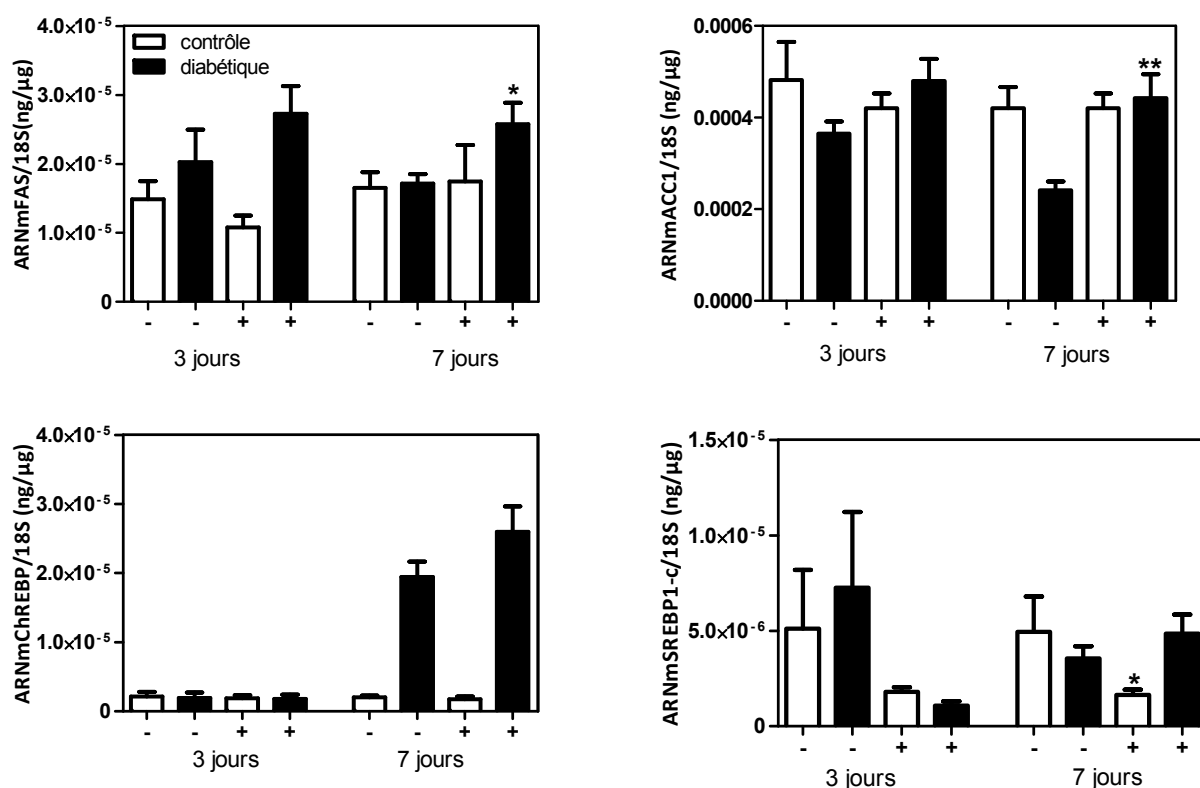


Fig. 60 Effet de l'insuline sur l'expression des gènes de la lipogenèse chez *Psammomys obesus*. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs conditions sans insuline.

Les TG mesurés à l'état basal (sans stimulation par l'insuline), sont plus élevés dans les CML de *Psammomys* contrôles comparativement aux contenus dans les CML de *Psammomys* diabétiques (253.40 ± 40.58 vs 117.80 ± 11.61 $\mu\text{g}/10^6$ cellules, $p < 0.01$). Sous l'effet de l'insuline, après 7 jours de traitement, les TG augmentent dans les CMLV de *Psammomys* diabétiques (215.00 ± 69.74 vs 117.80 ± 11.61 , $p < 0.01$). En l'occurrence, l'insuline n'a pas d'effet sur les CML de *Psammomys* contrôles. (fig. 61)

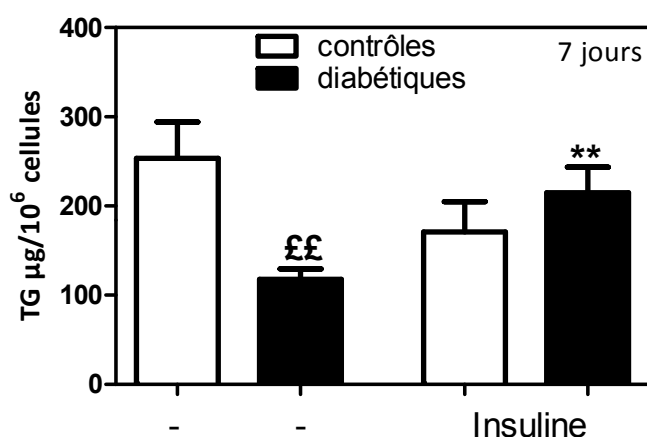


Fig. 61 Concentrations des TG dans les CMLV de *Psammomys obesus* traitées avec l'insuline. ** $P < 0.01$ vs valeurs sans stimulation, ££ $p < 0.01$ vs les contrôles correspondants.

La mesure de la lipogenèse dans les CMLV de *Psammomys obesus*, montre que les synthèses *de novo* d'acides gras sont plus élevées dans les CML de *Psammomys* contrôles que dans les CML de *Psammomys* diabétiques (4.38 ± 0.53 vs 2.36 ± 0.34 $\mu\text{g}/10^6$ cellules, $p < 0.05$). L'insuline n'a pas d'effets sur ces synthèses tant dans les CML de *Psammomys* contrôles que diabétiques (valeurs absolues) (fig. 62).

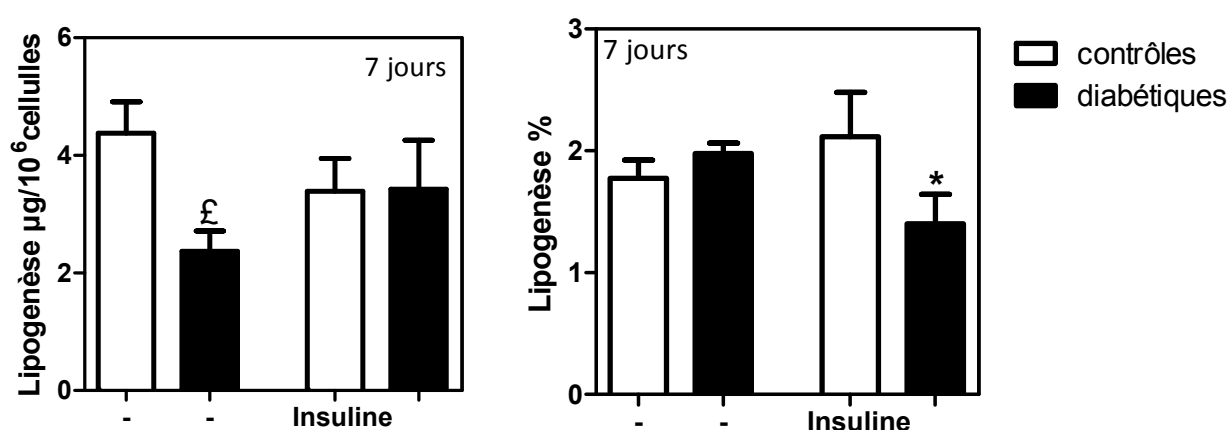


Fig. 62 Lipogenèse et contribution de la synthèse *de novo* d'acides gras, sous l'effet de l'insuline, dans les CML de *Psammomys obesus*.

* $p < 0.05$ vs conditions sans insuline dans les mêmes cellules, £ $p < 0.05$ vs les contrôles correspondants.

2.3 Régulation par la triiodothyronine et l'angiotensine II

2.3.1 CMLV de rat Zucker obèse (fig. 63, 64, 65)

Sous l'effet de l'hormone thyroïdienne (T3), l'expression des gènes de la lipogenèse (ACC-1, ChREBP et SREBP1-c) diminue à 7 jours dans les CMLV provenant d'aortes de rats Zucker contrôles, sauf pour FAS qui augmente dans ces cellules à 3 et 7 jours de traitement. En ce qui concerne l'effet de T3 sur l'expression de ces mêmes gènes dans les CMLV de rats Zucker obèses, nous notons une baisse des concentrations d'ARNm d'ACC-1 à 3 jours, FAS et ChREBP à 7 jours de traitement. Cependant les ARNm de SREBP1-c augmentent significativement ($p < 0.001$) dans les CML de rats Zucker obèses sous l'effet de T3 (fig. 63).

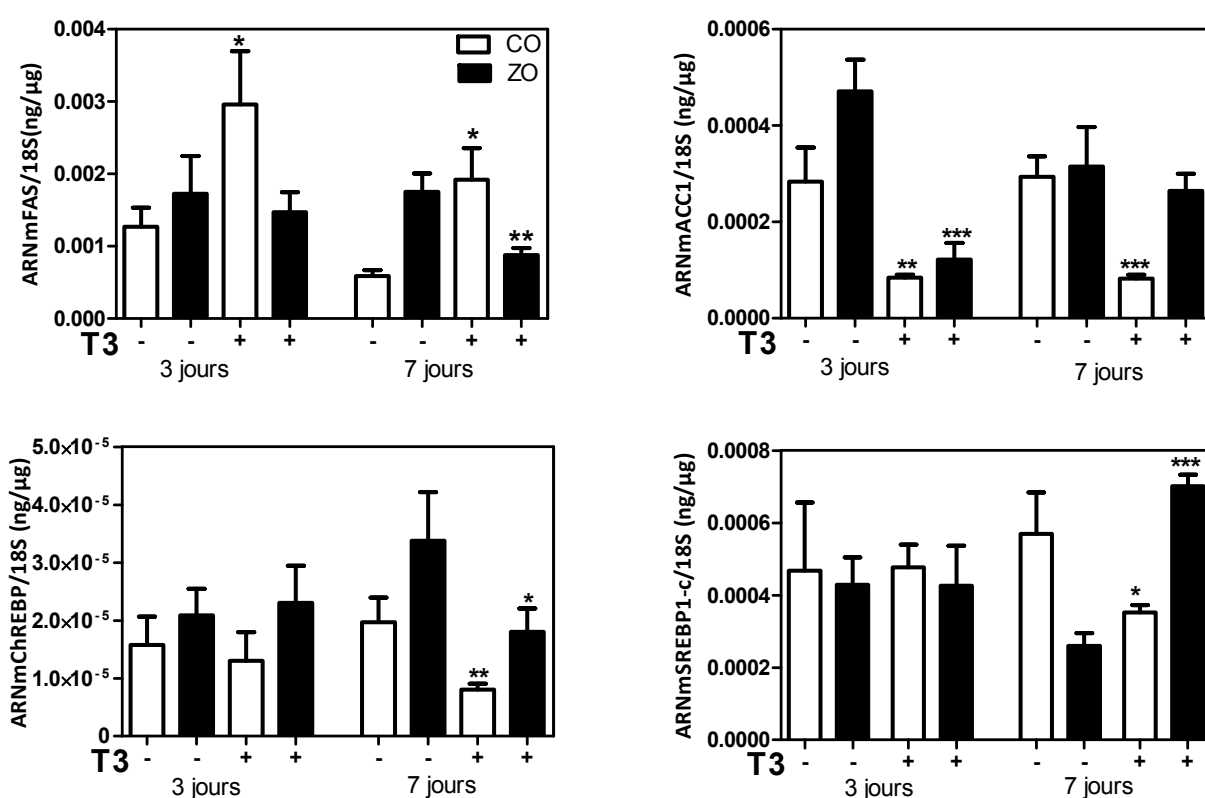


Fig. 63 Effet de l'hormone thyroïdienne (T3) sur l'expression des gènes de la lipogenèse dans les CMLV de rat Zucker obèse.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs conditions sans stimulation par la T3.

L'étude de l'effet de l'angiotensine II (AngII) sur la voie de la lipogenèse vasculaire, montre une action stimulante sur l'expression de FAS dans les CMLV de rat Zucker contrôle à 3 et 7 jours ($p < 0.01$) et dans les CML de Zucker obèse à 3 jours de traitement ($p < 0.05$). Les autres gènes ne sont pas plus élevés sous l'action de l'AngII, on observe plutôt une baisse significative des ARNm d'ACC-1 et ChREBP dans les CML de rat Zucker obèse (fig. 64).

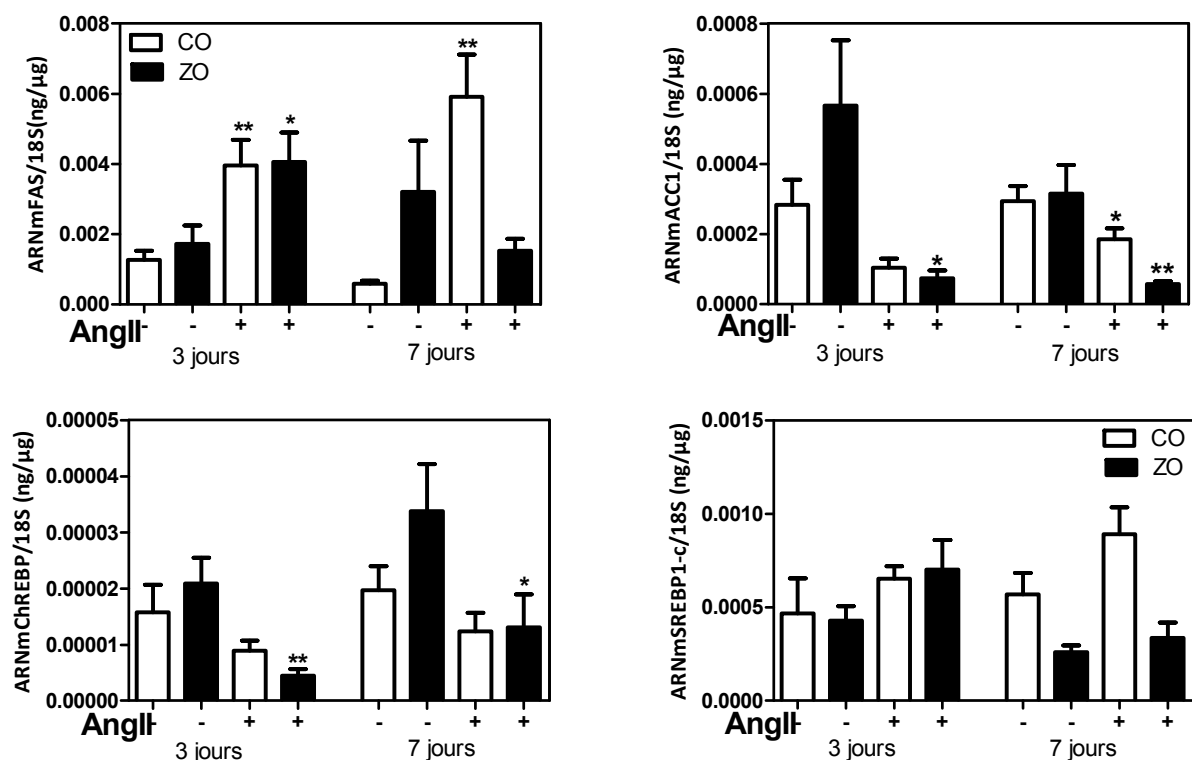


Fig. 64 Effet de L'angiotensine II (AngII) sur l'expression des gènes de la lipogenèse dans les CMLV de rat Zucker obèse.

*p<0.05, **p<0.01 vs conditions sans stimulation par la T3.

La lipogenèse *de novo* évaluée dans les CML de Zucker obèses et contrôles traitées avec l'Ang II et la T3 pendant 7 jours, n'est pas augmentée sous l'effet de ces hormones dans les deux types cellulaires (fig. 65).

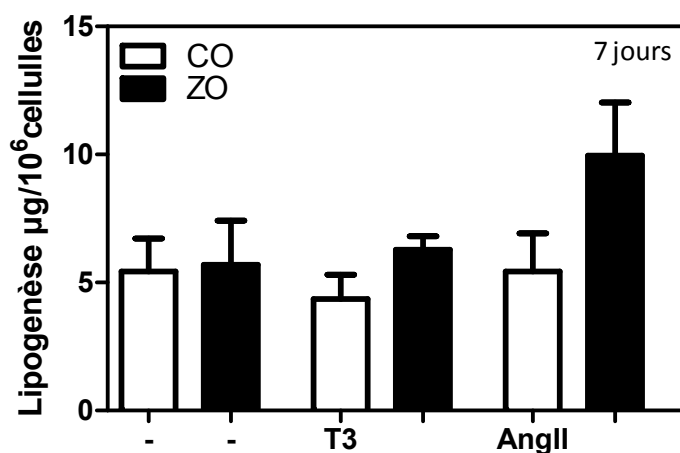


Fig. 65 Action de l'AngII et la T3 sur la lipogenèse *de novo* dans les CMLV de rats Zucker obèses.

2.3.2 CMLV de *Psammomys obesus* (fig. 66)

Dans les CMLV de *Psammomys obesus* contrôle, la voie de la lipogénèse est fortement stimulée sous l'action de T3 introduite dans le milieu de culture pendant 3 jours. Ainsi, les ARNm codants pour les enzymes (FAS et ACC-1) et les facteurs de transcription clés de la lipogénèse (ChREBP et SREBP1-c) sont fortement augmentés. En revanche, sur les CMLV provenant de *Psammomys* diabétique, la T3 n'a aucun effet sur la stimulation de ces gènes. De même, l'AngII, n'augmente pas l'expression des gènes sus-cités, aussi bien dans les CML de *Psammomys* contrôle que diabétique, à l'exception des ARNm de SREBP1-c qui augmentent significativement ($p < 0.01$) dans les CML de *Psammomys* contrôle (fig. 66).

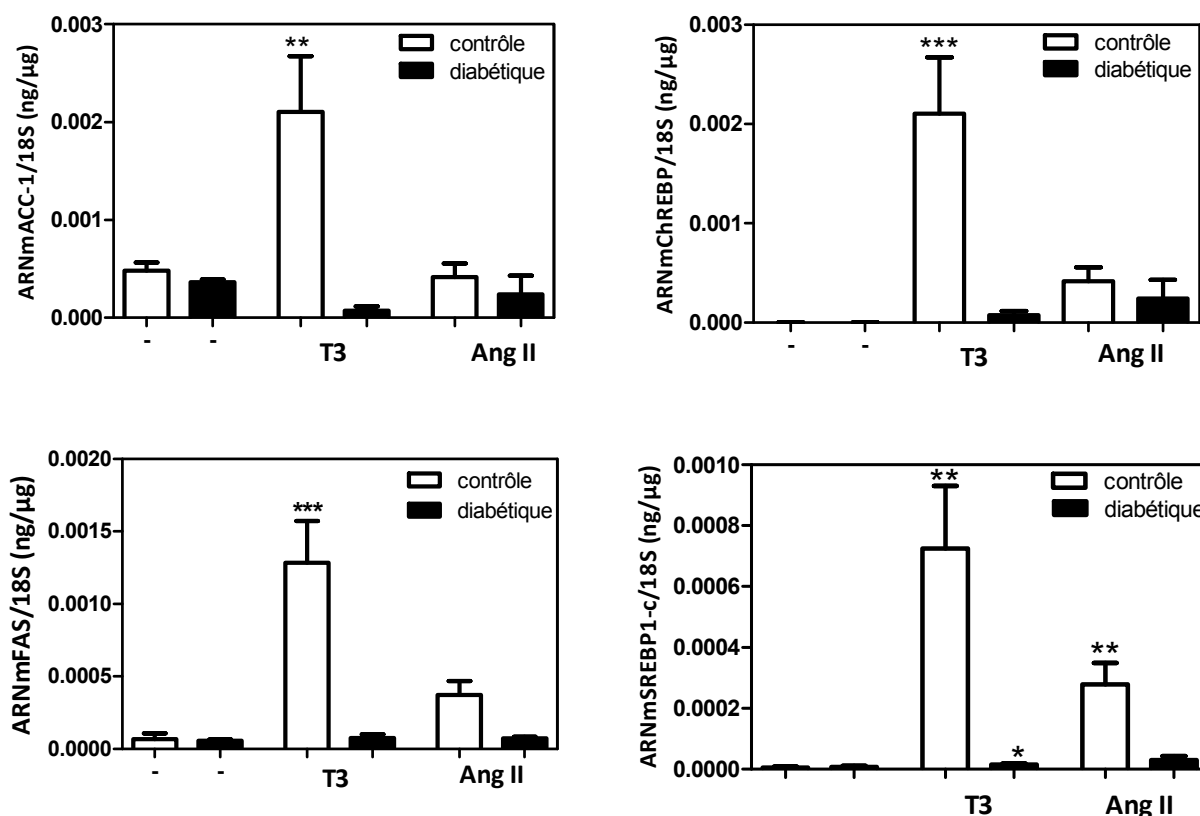


Fig. 66 Effet de L'angiotensine II (Ang II) et l'hormone thyroïdienne (T3) sur l'expression des gènes de la lipogénèse dans les CMLV de *Psammomys obesus*.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs conditions sans stimulation par l'Ang II ou la T3.

2.4 Régulation par les récepteurs nucléaires LXR et/ou PXR

Avant d'entamer cette étude, nous avons d'abord procédé à la vérification de l'expression des récepteurs nucléaires LXR et PXR dans les CMLV de rats Zucker obèses et *Psammomys obesus*.

2.4.1 CMLV de rat Zucker obèse (fig. 67)

En présence de l'agoniste de LXR, le TO901317, dans le milieu de culture, la lipogénèse est fortement stimulée, après incubation des cellules provenant d'aortes de rat Zucker contrôle pendant 3 et 7 jours, l'expression de FAS augmente très significativement, nous enregistrons $2,44E-02 \pm 3,60E-03$ vs $9,14E-03 \pm 9,88E-04$, $p < 0.001$ et $2,24E-02 \pm 4,29E-03$ vs $4,58E-03 \pm 2,94E-04$, $p < 0.001$. Cependant, les concentrations d'ARNm de FAS

n'augmentent pas dans les CML de Zucker obèse en présence de l'agoniste. Les messagers de SREBP1-c augmentent avec la même amplitude ($p < 0.001$) dans CML de Zucker contrôles au 7^{ème} jour de traitement. Le TO901317, n'a pas d'effet sur ces ARNm dans les CMLV de rats Zucker obèses.

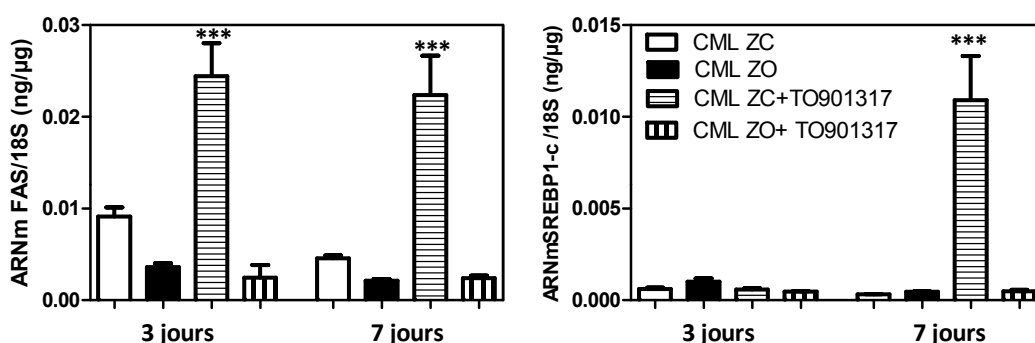


Fig. 67 Effet de l'agoniste de LXR (TO901317), sur l'expression de FAS et SREBP1-c dans les CMLV de rat Zucker obèse.

*** $p < 0.001$ vs les valeurs obtenues dans les CML de ZC et ZO sans stimulation par le TO901317.

Nos résultats dans les CMLV de Zucker contrôles confirment les travaux de *Davies et al.* (2005) montrant que le TO901317 stimule l'expression des gènes de la lipogenèse dans les CMLV. Cependant, d'autres études (*Mitro et al.*, 2007a) ont montré que le TO901317 est également un agoniste du récepteur nucléaire PXR, ce dernier une fois activé, stimule la lipogenèse au niveau hépatique. Nous avons voulu savoir si les effets observés après stimulation par le TO901317 sont dus à l'activation de LXR ou de PXR.

Nous avons testé l'effet de plusieurs agonistes synthétiques, après 3 jours de traitement, sur l'expression des gènes de la lipogenèse et l'accumulation des TG dans les CMLV de rats Zucker contrôles.

- le TO901317, agoniste mixte de LXR et PXR.
- La paxilline, agoniste spécifique de LXR.
- Le PCN, agoniste spécifique de PXR.

Les résultats montrent une augmentation très significative ($p < 0.001$) des concentrations d'ARNm du facteur de transcription SREBP1-c après stimulation par le TO901317 et la paxilline, nous enregistrons respectivement, $3,88E-03 \pm 2,71E-04$ vs $8,47E-04 \pm 5,41E-04$, $p < 0.001$ et $1,70E-02 \pm 3,01E-03$ vs $8,47E-04 \pm 5,41E-04$, $p < 0.001$ (/18S (ng/μg)). La FAS augmente également significativement sous l'effet du TO901317 ($p < 0.01$) et la paxilline ($p < 0.05$). Les messagers d'ACC-1 augmentent ($p < 0.05$) sous l'effet du TO901317. L'agoniste de PXR, le PCN, n'a aucun effet sur l'expression des trois gènes étudiés (fig. 68).

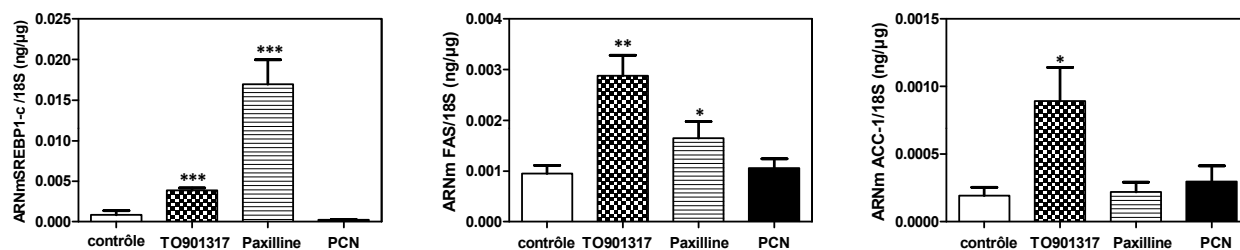


Fig. 68 Effet des agonistes de LXR et/ou de PXR sur l'expression des gènes de la lipogenèse.

* $P < 0.05$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ vs contrôle (sans stimulation).

Le contenu en triglycérides dans les CMLV de rats Zucker contrôles, augmente d'un facteur de 2.5 sous l'effet du TO901317. Cependant il augmente aussi sous l'effet du PCN, bien que plus faiblement (1.6 fois).

Dans les CMLV de rats Zucker obèses, ces agonistes n'augmentent pas les concentrations des TG, on observe plutôt une baisse significative sous l'effet de PCN (101.60 ± 7.88 vs 231.30 ± 66.40 $\mu\text{g}/10^6$ cellules). (fig. 69)

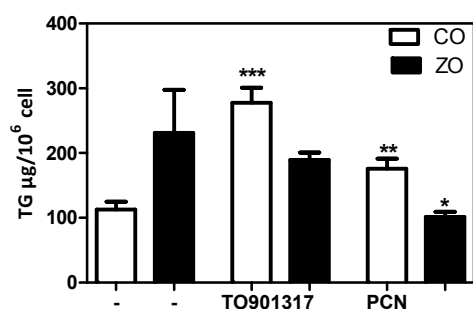


Fig. 69 Contenu cellulaire en TG ($\mu\text{g}/10^6$ cellules) dans les CMLV de rat Zucker sous l'effet des agonistes synthétiques de certains récepteurs nucléaires.

* $P < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs conditions sans stimulation.

Dans les CMLV de rat Zucker contrôle et obèse incubées avec l'agoniste de LXR (TO901317) ou de PXR (PCN) pendant 3 jours, la contribution de la synthèse *de novo* d'AG augmente dans les deux types de cellules sous l'effet du TO901317, en valeurs absolues, cette augmentation est plus marquée dans les cellules de rat Zucker contrôle (18.87 ± 3.03 vs 3.69 ± 0.95 $\mu\text{g}/10^6$ cellules, $p < 0.001$) que dans les cellules de ZO (19.25 ± 2.73 vs 10.61 ± 3.63 $\text{TG}/\mu\text{g}/10^6$). La contribution de la synthèse *de novo* d'acides gras, n'est pas modifiée après stimulation par PCN dans les deux types cellulaires. Cependant, en valeurs absolues, la lipogenèse diminue significativement dans les CML de Zucker diabétiques (3.69 ± 0.59 vs 10.60 ± 3.63 , $p < 0.05$). (fig. 70)

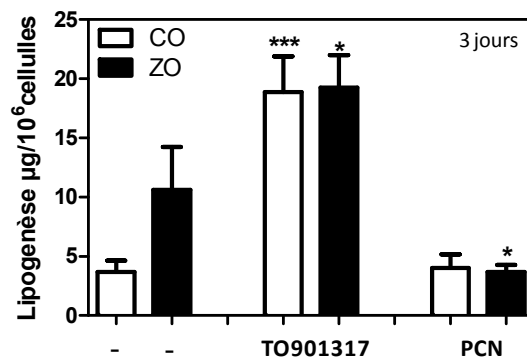


Fig. 70 Activité lipogénique dans les CMLV de rats Zucker traitées avec les agonistes synthétiques de LXR et/ou PXR. * $P < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs conditions sans stimulation.

2.4.2 CMLV de *Psammomys obesus* (fig. 71)

Alors que le TO901317 n'augmente pas les concentrations d'ARNm des facteurs de transcription (SREBP et ChREBP) dans les cellules de *Psammomys* contrôles et diabétiques. Nous notons, une augmentation de l'expression de FAS sous l'effet de l'agoniste dans les CMLV de *psammomys* contrôles. Nous enregistrons à 3 jours $1,26E-03 \pm 2,85E-04$ vs $2,01E-05 \pm 5,57E-06$ ($p < 0.05$) et $2,09E-03 \pm 4,26E-04$ vs $2,75E-05 \pm 1,17E-05$ à 7 jours ($p < 0.001$).

Les ARNm d'ACC-1 augmentent aussi bien dans les CML de *psammomys* contrôles que diabétiques sous l'effet du TO901317 ($p < 0.05$) après 7 jours d'incubation avec l'agoniste.

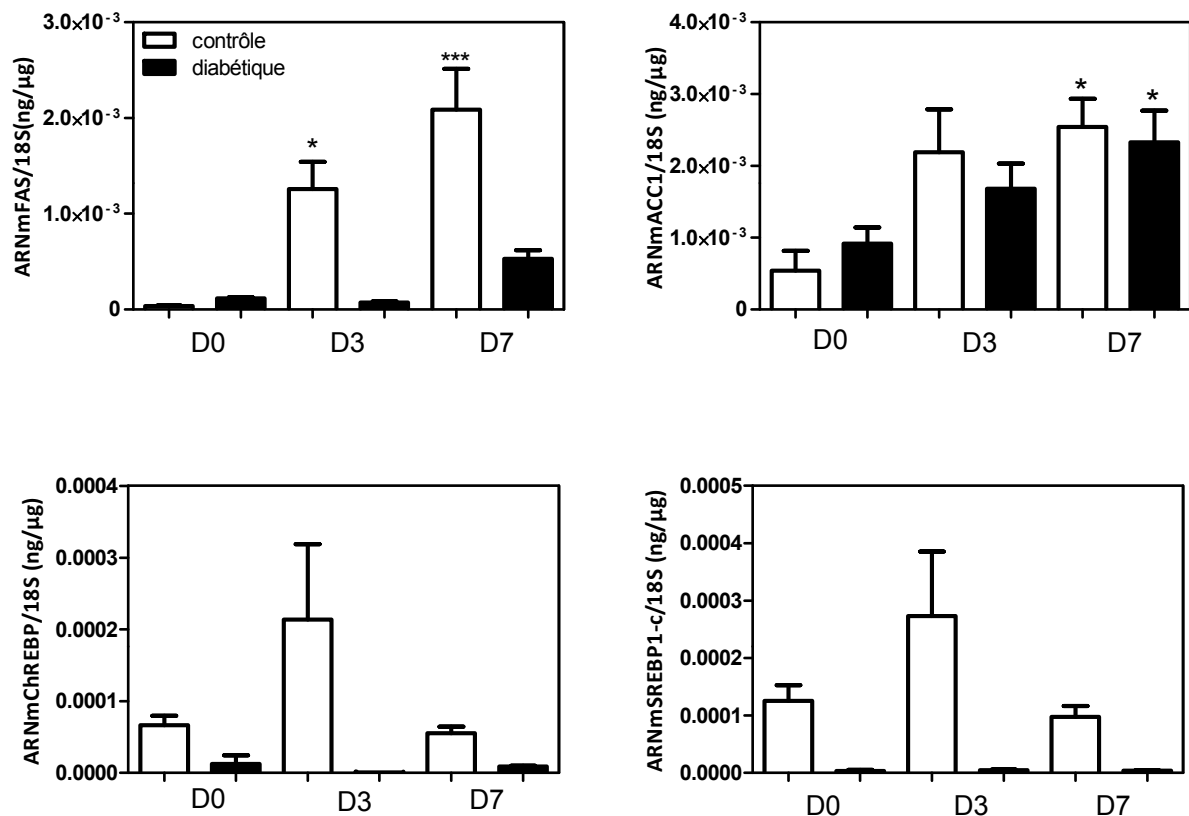


Fig. 71 Expression des gènes de la lipogenèse dans les CMLV de *Psammomys obesus* en présence de l'agoniste du récepteur nucléaire LXR dans un milieu de concentration normale de glucose.

* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs les valeurs correspondants aux temps 0.

Les différents agonistes cités précédemment en plus de l'agoniste spécifique de LXR, le GW3965, ont été testés sur les CML de *Psammomys* contrôles et diabétiques pendant 3 jours (fig. 72). Les ARNm de FAS augmentent significativement, dans les deux types de cellules de psammomys sous l'effet des agonistes de LXR (TO901317, Paxilline, GW3965). Une augmentation significative ($p < 0.05$) de l'expression de FAS est également observée dans les CML de psammomys diabétique après stimulation par l'agoniste de PXR. L'expression du deuxième gène de la voie de la lipogenèse étudié ACC-1, augmente dans les CML de psammomys contrôle et diabétique sous l'action du TO901317 ($p < 0.001$), nous enregistrons respectivement ($2,19E-03 \pm 6,00E-04$ vs $2,97E-04 \pm 7,54E-05$ et $2,26E-03 \pm 4,71E-04$ vs $1,03E-03 \pm 2,41E-04$ mRNA/18S (ng/ μ g). Les messagers de SCD-1 augmentent significativement sous l'effet de l'agoniste mixte de LXR et PXR, aussi bien dans les CML de *Psammomys* contrôles ($p < 0.001$) que dans les CML de *Psammomys* diabétiques ($p < 0.05$), cependant l'augmentation est de moindre importance dans ces dernières cellules. L'agoniste spécifique de PXR n'a aucun effet sur l'expression de SCD-1 dans les deux types cellulaires de *Psammomys obesus*. (fig. 72)

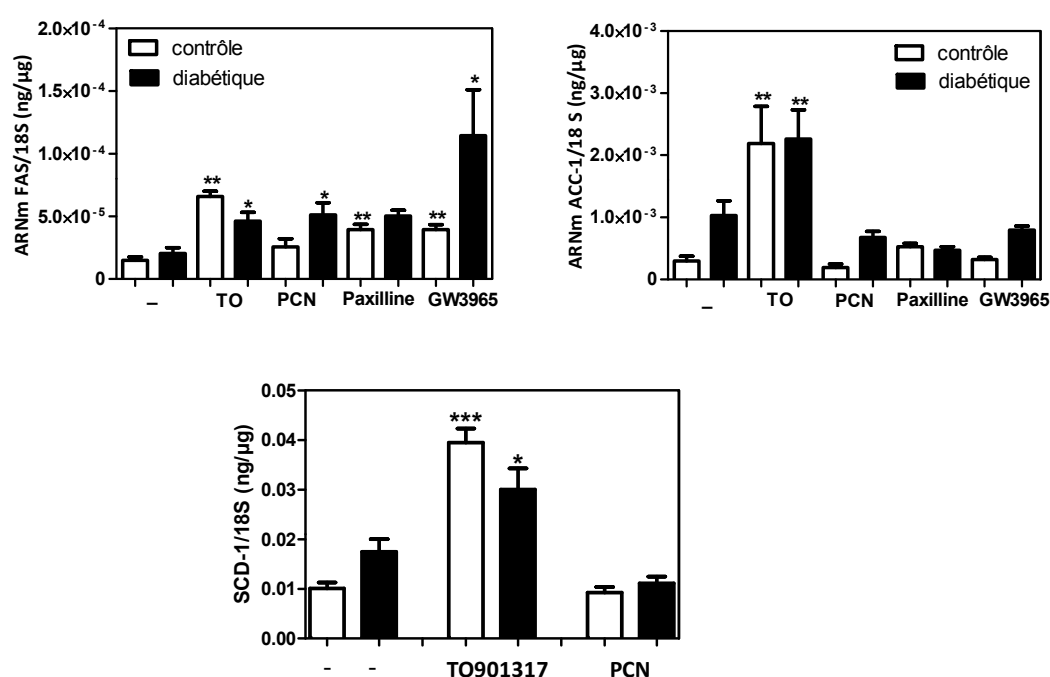


Fig. 72 Effet des agonistes de LXR et/ou de PXR sur l'expression des gènes de la lipogenèse.

* $P < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs conditions sans stimulation.

Les CML de *Psammomys obesus* contrôles et diabétiques mises en culture pendant 3 jours en absence de toute stimulation montrent des concentrations en TG plus élevées dans les CML provenant d'animaux diabétiques comparativement à leurs concentrations dans les CML de psammomys contrôles ($p < 0.01$) (fig. 73). Le traitement avec le TO901317 se traduit par l'augmentation de la lipogenèse dans les CML de psammomys contrôles ($p < 0.05$), alors qu'elle diminue sous l'effet de cet agoniste dans les CML de psammomys diabétiques ($p < 0.01$) (fig. 73).

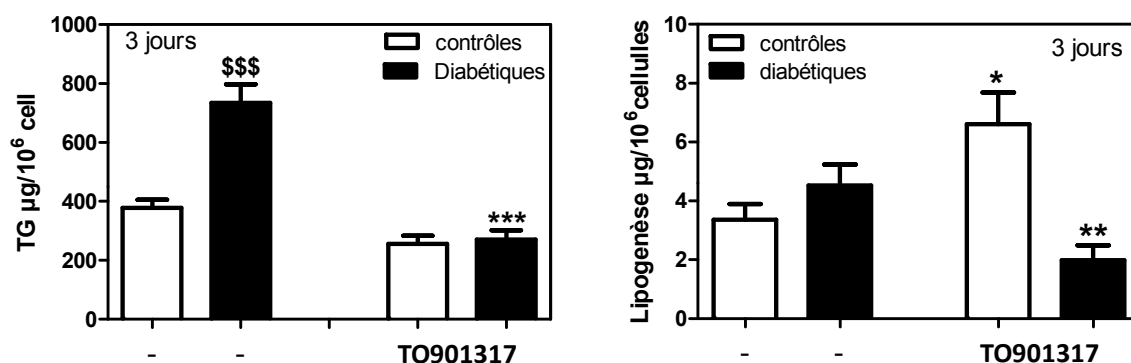


Fig. 73 Contenu en triglycérides et activité lipogénique dans les CML de *Psammomys obesus* traitées avec le TO901317 pendant 3 jours. \$\$\$ $p < 0.001$ vs contrôles, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs conditions sans stimulation.

Le contenu en triglycérides ou l'activité lipogénique ne sont pas augmentés sous l'effet de l'agoniste de PXR (PCN) dans les CML de *Psammomys* contrôles et diabétiques traitées pendant 7 jours (fig. 74). Cependant, l'agoniste mixte de LXR et PXR, le TO901317, augmente très significativement, aussi bien le contenu en TG que l'activité lipogénique mais uniquement dans les CML de *Psammomys* contrôles, alors qu'il n'a aucun effet sur les CML de *Psammomys* diabétiques (fig. 74).

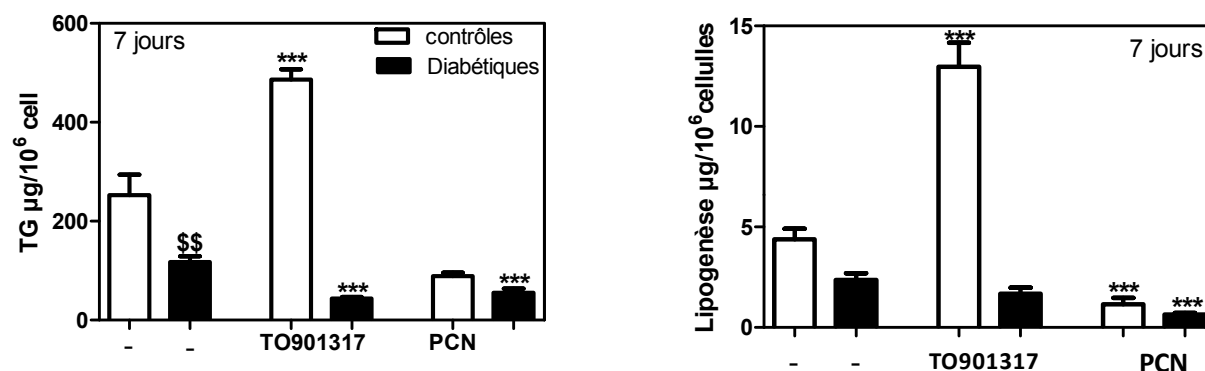


Fig. 74 Contenu en triglycérides et activité lipogénique dans les CML de *Psammomys obesus* traitées avec les agonistes de PXR et LXR pendant 7 jours. \$\$ $p < 0.01$ vs contrôles, *** $p < 0.001$ vs conditions sans stimulation.

2.4.3 Effets *in vivo* chez la souris (fig. 75, 76, 77, 78)

Etant donné les actions des agonistes de LXR sur l'expression et l'activité de la lipogenèse et le contenu en triglycérides dans les CMLV nous avons voulu savoir si ces actions existent *in vivo* au niveau de la paroi artérielle. Des souris ont reçu pendant trois jours par gavage un agoniste spécifique de LXR, le GW3965. Cette molécule a comme attendu augmenté par rapport aux souris témoins le contenu hépatique en TG (7.35 ± 1.30 vs 2.34 ± 1.30 vs 2.34 ± 0.56 µg/mg de foie $p < 0.01$) (fig. 75) ainsi que l'expression de FAS et ACC1

(fig. 76), sans modification de srebp-1c. ChREBP, considéré aussi comme un gène cible de LXR (Cha and Repa, 2007) n'a pas non plus été modifié. Le GW3965 n'a pas entraîné d'hypertriglycéridémie plasmatique, en accord avec des études précédentes (Miao *et al.*, 2004; Mitro *et al.*, 2007b; Quinet *et al.*, 2006). Le contenu en TG de la paroi artérielle a été augmenté (34.73 ± 7.48 vs 16.71 ± 2.42 $\mu\text{g}/\text{mg}$ d'aorte $p < 0.05$), mais, contrairement au foie, sans stimulation de l'expression de gènes lipogéniques (figure 76).

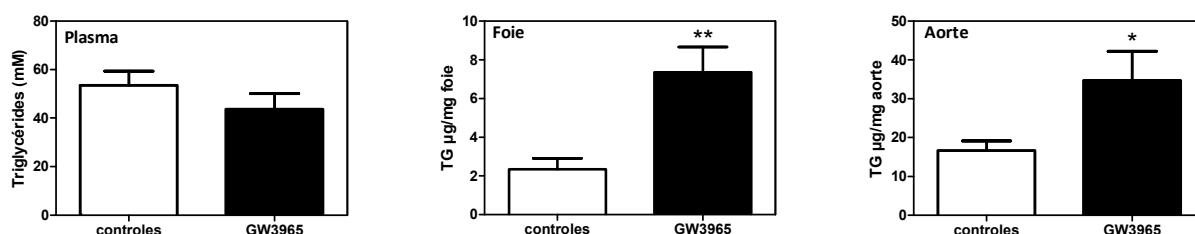
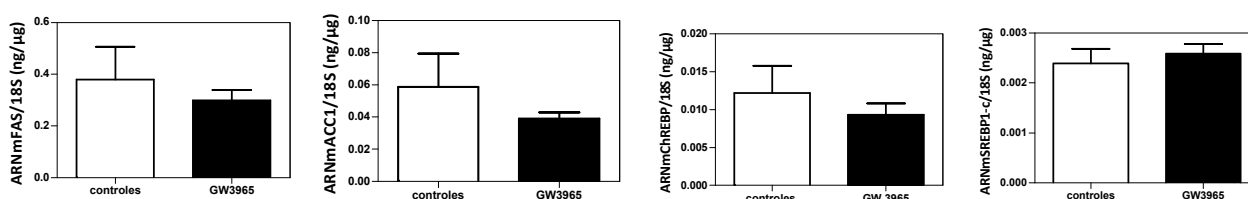


Fig. 75 Triglycérides plasmatiques et tissulaires chez la souris traitée avec le GW3965.

* $P < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs les contrôles.

Aorte



Foie

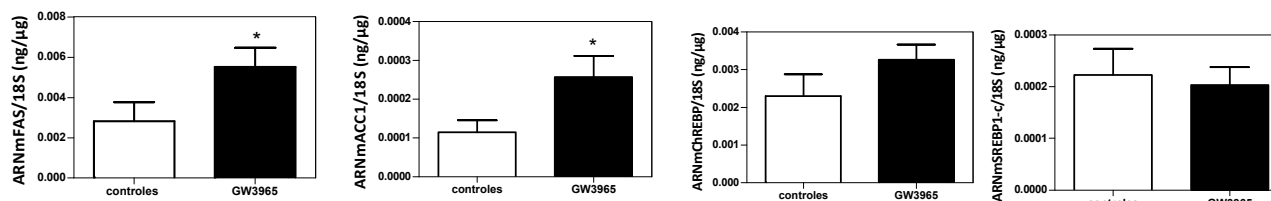


Fig. 76 Expression des gènes de la lipogenèse dans le foie et l'aorte de souris traitées avec l'agoniste de LXR (GW3965).

* $P < 0.05$ vs les contrôles.

Pour comprendre le mécanisme de cette accumulation de TG dans l'aorte, nous avons ensuite mesuré l'expression de gènes impliqués dans la captation des acides gras. L'expression de ces gènes, au moins FAT, a été trouvée stimulée par LXR au niveau du foie (Zhou *et al.*, 2008). Nous n'avons pas retrouvé cette action dans le foie chez nos souris (fig. 77). L'expression de FAT n'a pas été stimulée non plus dans l'aorte mais FATP a été clairement stimulé. Il est possible que cette stimulation soit impliquée dans l'accumulation de TG aortiques.

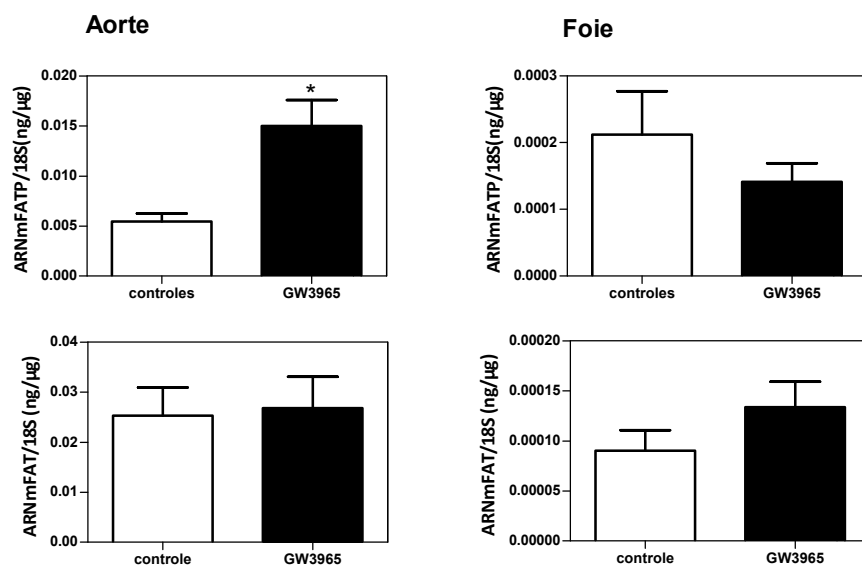


Fig. 77 Expression de FATP et FAT dans le foie et l'aorte de souris traitées avec le GW3965. *P<0.05 vs les contrôles.

Même si l'accumulation de TG aortiques et la stimulation de l'expression de FATP suggèrent fortement que le GW3965 a bien agi au niveau de la paroi artérielle, nous avons vérifié si l'expression d'un gène cible classique de LXR, ABCA1, est stimulée dans l'aorte. Nous n'avons noté aucune stimulation, alors que celle-ci existe dans les CMLV en culture (Davies *et al.*, 2005). Nous avons alors vérifié si le GW3965 a eu un effet sur un autre tissu extra-hépatique, le tissu adipeux. Nous n'avons noté aucun effet, ni sur les gènes lipogéniques, ni sur ABCA1 ou ABCG1 (figure 79). Ceci peut vouloir dire que le GW3965 a, du fait de son administration orale, agit essentiellement au niveau du foie et que peu de GW3965 ait atteint les tissus extra-hépatiques, par ailleurs, le GW3965 a des spécificités d'action sur les hépatocytes par rapport à d'autres types cellulaires.

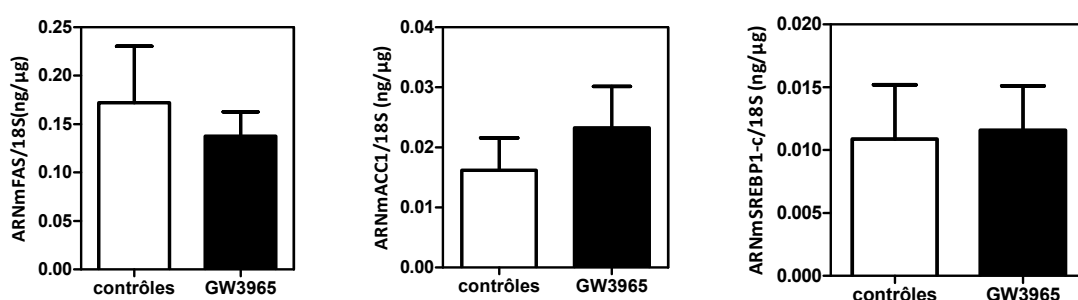


Fig. 78 Expression de certains messagers de la lipogenèse dans le tissu adipeux épидидymaire des souris contrôles et traitées avec le GW3965.

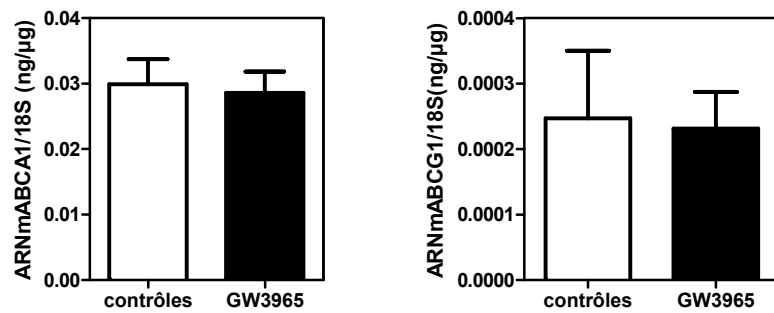


Fig. 79 Expression des gènes cibles de LXR α dans le tissu adipeux épидидymaire des souris contrôles et traitées avec le GW3965.

DISCUSSION

Notre travail a porté sur l'étude de l'expression de la voie de la lipogenèse dans la paroi artérielle et les CMLV au cours de certaines conditions pathologiques favorisant l'athérome comme l'insulino-résistance, l'obésité et le diabète ainsi que, chez l'homme, au cours de l'athérome lui-même. Ce travail a été réalisé sur des pièces d'endartériectomie des patients diabétiques et non diabétiques et sur les aortes et les CMLV de plusieurs modèles (et de leurs contrôles) chez l'animal :

1. Les rats Zucker obèses (ZO) et diabétiques (ZDF) qui développent, du fait essentiellement d'une mutation du récepteur de la leptine, une obésité, une insulino-résistance et un diabète de type 2, évoluant chez le rat ZDF vers le diabète avec carence insulinique, sans complications vasculaires.
2. Le rat des sables (*Psammomys obesus*), modèle de diabète de type 2, d'origine génétique et nutritionnelle, associé à des lésions artérielles ressemblant aux lésions initiales d'athérome chez l'homme.

Nos investigations ont porté sur l'étude *ex vivo* des aortes des différents modèles animaux par la mesure de leur contenu en TG et en ARNm des gènes responsables de la synthèse *de novo* et de la captation d'acides gras, ainsi que sur l'étude de l'expression des gènes de la lipogenèse dans la partie athéromateuse et la partie macroscopiquement saine de pièces d'endartériectomie carotidiennes prélevées des patients diabétiques et non diabétiques.

En ce qui concerne l'étude *in vitro*, nous avons testé l'effet de l'insuline et du glucose, régulateurs majeurs de l'expression de la lipogenèse, isolés ou associés à d'autres facteurs de différenciation adipogénique (ADM : insuline, triiodothyronine (T3), dexaméthasone). Afin d'avoir une étude plus complète, nous avons étudié aussi les actions d'autres agents régulateurs de la lipogenèse, la T3 seule ainsi que l'angiotensine II et d'agonistes des récepteurs nucléaires LXR et PXR. Ceci a été fait sur l'expression des messagers de la voie de synthèse endogène et de la captation des acides gras (voie exogène d'apport d'acides gras) ainsi que, dans une partie des expériences, sur le contenu des cellules en triglycérides et sur l'activité de la voie de synthèse *de novo* d'acides gras.

Nos résultats ont montré une augmentation du contenu en triglycérides dans les aortes de rats Zucker diabétiques et obèses comparativement à leurs contrôles correspondants. Les triglycérides augmentent également avec l'âge dans les aortes de rats contrôles et diabétiques en accord avec les données de la littérature (Davies *et al.*, 2005). Nous n'avons pas pu mesurer le contenu en TG des aortes de *Psammomys* diabétiques mais l'histologie a clairement montré la présence de dépôts lipidiques.

Nous avons voulu savoir si l'expression de la voie de la lipogenèse est à l'origine de l'accumulation des TG dans ces aortes. Pour cela, l'étude de la lipogenèse s'est effectuée par la mesure des gènes codants pour les enzymes clés de la lipogenèse (FAS et ACC1) et les facteurs de transcription impliqués dans cette voie transmettant l'action de l'insuline et du glucose (SREBP1-c et ChREBP). Nos résultats ont montré que ces différents messagers sont exprimés dans la paroi aortique mais leurs concentrations ne sont pas plus élevées dans les aortes de rats Zucker diabétiques et obèses comparativement à leurs contrôles correspondants. L'expression de ces gènes n'augmente pas non plus avec l'âge. En se basant sur les résultats, la voie de synthèse endogène *in situ* des acides gras ne semble donc pas être celle impliquée dans l'accumulation des lipides. La voie de captation des acides gras provenant de la circulation n'est pas non plus surexprimée au niveau de l'aorte étant donné

que les ARNm des gènes codants pour les molécules impliquées (FAT, LPL, VLDLr) dans cette voie ne sont pas augmentés dans les aortes de rats Zucker diabétiques et obèses ; une augmentation avec l'âge n'a pas été observée non plus. Cependant les concentrations plasmatiques des triglycérides et des AGNE sont significativement augmentés chez les rats Zucker diabétiques et obèses comparativement à leurs contrôles correspondants. Ceci suggère que les TG accumulés dans l'aorte sont le résultat de la disponibilité accrue pour la captation par la paroi artérielle de substrats lipidiques plasmatiques. L'absence d'augmentation des ARNm codants pour les gènes de la lipogenèse dans les aortes des rats Zucker insulino-résistants et diabétiques suggère fortement que la voie de la lipogenèse est résistante à l'action de l'insuline et du glucose dans ce tissu. La mesure des gènes et les facteurs de transcription de la lipogenèse dans les pièces d'endartériectomie des sujets humains diabétiques et non diabétiques, ne montre pas de différence d'expression de ces gènes entre la partie athéromateuse et la partie saine des sujets non diabétiques. Chez les sujets diabétiques, les ARNm des facteurs de transcription SREBP1-c et ChREBP sont plus élevés dans la partie athéromateuse comparativement à la partie macroscopiquement saine, avec une tendance non significative dans le même sens pour ACC-1 et FAS. Cependant, ces messagers de la lipogenèse ne sont pas surexprimés dans la partie athéromateuse des sujets diabétiques comparativement aux sujets non diabétiques. Ces résultats obtenus chez l'homme sont également en faveur d'une résistance de la lipogenèse à l'action de l'insuline et du glucose dans les plaques d'athérome carotidien humain. Ces résultats rejoignent ceux obtenus dans les aortes des rats Zucker diabétiques et obèses. Les travaux de Jiang *et al.* (1999) ont montré un dysfonctionnement sélectif au niveau vasculaire de la voie de signalisation de l'insuline chez les rats Zucker obèses. La phosphorylation des tyrosines du récepteur de l'insuline et d'IRS, ainsi que la phosphorylation des sérines des protéines kinase Akt/PKB est défectueuse au niveau vasculaire chez ces animaux obèses. Cependant, la phosphorylation des tyrosines des ERK-1 /2 MAP-kinases est identique dans les microvaisseaux des rats Zucker contrôles et obèses. Des résultats similaires ont été obtenus par Hodroj *et al.* (2007). A l'aide d'inhibiteurs spécifiques des voies PI3-kinase et ERK-MAP kinase de la signalisation insulinique, ces auteurs ont montré que l'effet de l'insuline sur l'expression de l'angiotensinogène et le récepteur AT1R est transmis par les deux voies citées ci-dessus chez des patients sains. Par contre, seule la voie MAP kinase est impliquée dans l'augmentation de l'angiotensinogène observée chez les patients diabétiques, alors que la transduction du signal par la voie PI3-kinase diminue. Nos résultats suggèrent que cette insulino-résistance de la paroi vasculaire implique également la voie de la lipogenèse.

Chez *Psammomys obesus*, nous avons également déterminé l'expression de la lipogenèse dans la paroi artérielle et dans les CMLV d'animaux diabétiques soumis au régime riche en lipides et non diabétiques soumis au régime naturel à base de plantes halophiles. La lipogenèse dans le foie et le tissu adipeux de *Psammomys* a déjà été étudiée. En effet des études antérieures ont montré une augmentation de la lipogenèse hépatique chez *Psammomys* diabétique (Kalderon *et al.*, 1983; Lewandowski *et al.*, 1998). De même, cette augmentation de la lipogenèse a été observée chez des *Psammomys* soumis à un régime riche en carbohydrates et présentant des taux plasmatiques élevés de glucose et d'insuline. Dans ces mêmes conditions, les travaux de Koceir *et al.* (2003) ont montré une augmentation de la lipogenèse dans l'hépatocyte isolé de *Psammomys* obèse et diabétique, et que l'acétate est le substrat privilégié pour la synthèse des lipides par rapport au glucose. En ce qui concerne notre travail, l'étude de la lipogenèse chez *Psammomys* soumis au régime hyperlipidique en situation de diabète avec un effondrement de l'insuline a montré

une baisse de l'expression des gènes codants pour les enzymes (ACC-1 et FAS) et des facteurs de transcription (ChREBP et SREBP1-c) de la lipogenèse dans le foie ; ceci pourrait être expliqué par l'action inhibitrice du régime riche en lipides et surtout par déficience en insuline plasmatique. La stéatose hépatique observée sur les coupes histologiques de *Psammomys* diabétique serait en relation avec l'alimentation riche en lipides. La répression de l'expression de SREBP1-c et de ChREBP que nous avons trouvé dans les CMLV de *Psammomys* diabétiques n'est pas accompagnée par une baisse des taux d'ARNm de FAS et ACC-1. Dans les aortes de *Psammomys* diabétiques, nous n'avons pas enregistré une diminution de l'expression des gènes codants pour les facteurs de transcription, comme celle observée dans les cellules en culture, probablement à cause de l'hétérogénéité cellulaire de la paroi artérielle. Au total, la lipogenèse n'est pas surexprimée dans les aortes et les CMLV de *Psammomys* diabétiques, elle est plutôt réprimée. Ces résultats rejoignent ceux que nous avons obtenus chez le rat Zucker.

Nous avons étudié *in vitro*, l'expression des gènes de la lipogenèse dans les CMLV de rats Zucker contrôles et obèses. A l'état basal, les concentrations d'ARNm de FAS et ChREBP sont plus faibles dans les CML de Zucker obèses comparativement à leur expression dans les CML de Zucker contrôles. Cependant, la différence n'est pas significative pour ChREBP. L'expression d'ACC-1 est similaire dans les CML provenant des deux groupes, alors que les ARNm de SREBP1-c sont plus élevés dans les CML de Zucker obèses mais l'étude statistique ne révèle pas de différence significative. Les facteurs adipogéniques (ADM) ou le glucose n'augmentent pas les gènes de la lipogenèse dans les CML de Zucker obèses. En revanche, les facteurs adipogéniques (ADM) augmentent significativement les ARNm de ChREBP et SREBP1-c dans les CML de Zucker contrôles à 7 et 21 jours respectivement. Ces réponses sont traduites par un contenu en TG et une lipogenèse plus marquée dans les CML de Zucker contrôles que dans les CML de Zucker obèses.

En étudiant la régulation de l'expression des gènes lipogéniques dans les CMLV de *Psammomys obesus*, nous avons noté l'absence de stimulation par un taux élevé de glucose, des gènes de la lipogenèse à l'exception de ChREBP lequel augmente dans les cellules de *Psammomys* diabétiques. En effet, les taux élevés de glucose ont en revanche, une action répressive qui s'oppose à l'action stimulante modérée de l'ADM sur l'expression de FAS et ACC-1. Le glucose pourrait ne pas être le substrat privilégié pour la lipogenèse dans les CMLV comme cela a été montré par KOCEIR, (2003) dans l'hépatocyte isolé de *Psammomys obesus*.

L'effet modéré des facteurs adipogéniques (ADM) observé pourrait être du à l'action de l'insuline, de la T3 ou la dexaméthasone seule ou à l'action additive ou synergique de ces hormones. Dans les CMLV de *Psammomys* diabétiques, malgré une augmentation de l'expression de FAS et d'ACC-1, la lipogenèse mesurée par spectrométrie de masse ne montre aucune différence significative après un traitement de 7 jours par l'insuline comparativement aux CMLV de *Psammomys* contrôles. Cette résistance est une caractéristique générale de *Psammomys obesus*, des études ont montré que le métabolisme du glucose de *Psammomys* au stade normoglycémique et normoinsulinique répond très faiblement à l'insuline exogène comparativement aux autres rats contrôles (Shafrir et al., 2006). Cependant, la voie de la lipogenèse est fortement stimulée par l'insuline dans l'hépatocyte de *Psammomys*. L'incorporation de l'acétate [$1-^{14}\text{C}$] dans les lipides totaux de l'hépatocyte de *Psammomys* obèses et diabétiques est plus marquée comparativement à leurs contrôles correspondants. Chez le rat Zucker, les CMLV ont une réponse modérée des gènes de la lipogenèse aux facteurs adipogéniques en combinaison ou séparément. Les

CMLV de Zucker obèses ne répondent pas à la stimulation insulinique, les concentrations des messagers de la voie de la lipogenèse sont nettement plus basses par rapport à celles dans les cellules de Zucker contrôles. Ces résultats sont eux aussi en faveur d'une insulino-résistance de la voie lipogénique.

Le statut de la lipogenèse dans la paroi artérielle en situation d'insulino-résistance est comparable à celui observé dans le muscle squelettique (Ducluzeau *et al.*, 2001) et le tissu adipeux (Diraison *et al.*, 2002), avec une diminution de l'expression basale des gènes codant pour les enzymes de la voie de la lipogenèse et une résistance à l'action de l'insuline. Cette répression de la lipogenèse contraste fortement avec sa surexpression hépatique aussi bien chez les modèles expérimentaux d'insulino-résistance (Forcheron *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2000) que chez des sujets obèses et insulino-résistants chez l'homme (Diraison *et al.*, 2002; Diraison *et al.*, 2003a). En outre, cette surexpression de la lipogenèse au niveau hépatique conduit à une accumulation excessive de TG décrite dans ces situations (Denechaud *et al.*, 2008b; Dentin *et al.*, 2004; Diraison *et al.*, 2003a; Donnelly *et al.*, 2005). Les raisons de cette divergence dans le statut de la lipogenèse entre d'une part, le foie et le tissu adipeux, le muscle squelettique et les CMLV d'autre part restent encore obscures. Quelles que soient les raisons de cette divergence, l'accumulation des lipides au niveau de la paroi artérielle des rats insulino-résistants et diabétiques pourraient contribuer à son insulino-résistance.

Dans les CML de Zucker contrôles, la T3 augmente significativement les ARNm de FAS à 3 et 7 jours de traitement. Les travaux de Pihlajamaki *et al.* (2009) confortent l'hypothèse précédemment citée des effets à court et à long terme des hormones thyroïdiennes et ils remarquent que l'expression de FAS augmente de 3 à 6 fois après 2 heures de traitement avec la T3, alors qu'un traitement chronique avec la T3 (5 jours) entraîne une baisse de 30 % de l'expression de FAS. Ces données sont en accord avec nos résultats qui montrent une tendance de concentrations d'ARNm de FAS plus élevées à 3 qu'à 7 jours dans les CMLV de Zucker contrôles traitées avec la T3. La T3 seule, n'a aucun effet sur l'augmentation de l'expression de la lipogenèse dans les CML de Zucker obèses, sauf pour les ARNm de SREBP1-c qui augmentent significativement sous l'effet de T3. L'effet des hormones thyroïdiennes sur l'expression de SREBP1-c reste controversé. Viguerie *et al.* (2002) ont montré que les hormones thyroïdiennes diminuent de 50 % les ARNm de SREBP1-c dans les adipocytes humains. Les travaux de Zhang *et al.* (2003) ont montré que la T3 induit une augmentation des ARNm de SREBP1-c dans les hépatocytes des embryons de poulet sous une administration de glucose. En outre, Kawai *et al.* (2004) concluent que la T3 induit dans les cellules HepG2 dérivées des hépatocytes humains, l'expression des ARNm de SREBP1-c. Plus récemment, les travaux de Hashimoto *et al.* (2006b) ont essayé d'apporter des explications à ces résultats controversés concernant la régulation de SREBP1-c par les hormones thyroïdiennes. Ils observent une diminution des ARNm de SREBP1-c *in vivo* et *in vitro* chez la souris notamment au niveau hépatique. La T3 régule négativement le promoteur du gène de SREBP1-c via TR- β , son site de liaison à l'ADN responsable de cette inhibition est différent du site de liaison à LXR, l'hétérodimère RXR-TR se lie au site 2, qui entoure le site du début de la transcription. Ces données sont confirmées également par l'utilisation des cellules Hepa1-6, qui dérivent des hépatocytes de souris. Les mêmes auteurs montrent également que le promoteur du gène SREBP1-c est négativement régulé par les hormones thyroïdiennes chez l'homme.

Dans les CMLV de *Psammomys obesus* contrôles, la T3 stimule fortement, *in vitro*, les gènes codants pour les enzymes (FAS et ACC-1) et les facteurs de transcription (SREBP1-c et

ChREBP) de la lipogenèse. Cette action stimulante de la T3 sur l'expression de ChREBP récemment décrite dans le foie chez la souris et chez l'homme (Hashimoto *et al.*, 2009), est aussi présente dans d'autres tissus. Dans les CML de *Psammomys* diabétique, la T3 n'a aucun effet stimulant sur l'expression des gènes de la lipogenèse. Des résultats récents ont montré une diminution de l'expression des récepteurs des hormones thyroïdiennes (TR α -1) dans le tissu adipeux des patients obèses ou diabétiques de type 2 (Nannipieri *et al.*, 2009). Si elle est présente dans les CMLV, une telle diminution pourrait contribuer à l'absence des effets de la T3.

En ce qui concerne l'étude de l'effet de l'AngII sur l'expression des gènes codants pour les enzymes clés de la lipogenèse dans les CMLV de rats Zucker obèses, FAS augmente significativement à 3 et 7 jours de traitement dans les CML de Zucker contrôles et à 3 jours dans les cellules de Zucker obèses. Les autres gènes ne sont pas plus élevés sous l'action de l'AngII, nous observons plutôt une diminution significative des ARNm d'ACC-1 et de ChREBP notamment dans les CMLV de rat Zucker obèse. L'activité de la lipogenèse mesurée à l'aide d'eau deutérée n'est pas augmentée sous l'effet de l'AngII dans les deux types cellulaires. Pour ce qui est de l'effet de l'AngII sur les CML de *Psammomys obesus*, comme pour la T3, cette hormone n'a aucun effet sur les CMLV d'animaux diabétiques, le manque d'action de l'AngII sur les CML de *Psammomys* diabétiques est surprenant puisque l'expression des ARNm et des protéines codants pour le récepteur AT1R sont augmentés dans les CMLV de sujets diabétiques chez l'homme (Hodroj *et al.*, 2007). Sur les CML de *Psammomys* contrôles l'AngII stimule essentiellement l'expression de SREBP1-c. Dans les adipocytes l'AngII agit comme l'insuline pour contrôler certains gènes lipogéniques notamment FAS. Jones *et al.*, 1997 ont montré que l'AngII augmente significativement le contenu en TG et l'activité de deux enzymes de la lipogenèse (FAS et GPDH) dans les adipocytes 3T3-L1. Ces effets sont transmis via le récepteur AT2. L'AngII exerce des effets similaires dans les cellules adipeuses humaines maintenues en culture primaire. Les travaux de Kim *et al.* (2001) ont montré que l'AngII régule à l'échelle transcriptionnelle l'expression de FAS dans les adipocytes 3T3 via l'élément de réponse à l'AngII trouvé dans le gène de FAS. L'élément de réponse à l'AngII est une séquence E box (CATGTG) qui est aussi une séquence de réponse à l'insuline et les deux séquences sont sous la régulation du facteur de transcription SREBP1-c. Le récepteur qui transmet la régulation des gènes de la lipogenèse par l'Ang II dans les adipocytes est l'angiotensin type II (AT2) receptor identifié par Jones *et al.* (1997). Des travaux plus récents (Ran *et al.*, 2004) ont montré que l'utilisation des bloqueurs des récepteurs de l'Ang II diminue la surproduction des TG chez les rats Zucker obèses soumis au régime riche en fructose, suggérant le rôle de cette hormone dans la stimulation de la production des TG. La perfusion de l'Ang II augmente la sécrétion et le contenu hépatique en TG. La lipogenèse évaluée par l'incorporation du glycérol tritié dans les TG hépatiques est significativement augmentée chez les rats perfusés avec l'AngII.

Nous avons également abordé dans cette étude la régulation de la lipogenèse par le récepteur nucléaire LXR (Liver X Receptor), *in vivo* dans les aortes de souris et *in vitro* dans les CMLV de rats Zucker obèse et de *Psammomys obesus*. Nos résultats ont confirmé l'effet stimulant de l'agoniste synthétique de LXR (TO901317) sur l'expression des gènes de la lipogenèse dans les CMLV (Davies *et al.*, 2005). Ceci est accompagné par une augmentation de l'activité de la voie de la lipogenèse via la stimulation du récepteur nucléaire LXR. Dans les CMLV de Zucker contrôles, l'agoniste mixte de LXR et de PXR le TO901317 ainsi que l'agoniste spécifique de LXR, la paxilline, augmentent significativement l'expression de

SREBP1-c et de FAS. Ces agonistes sont sans effets sur les CML de Zucker obèses. L'effet stimulant du TO901317 est présent aussi bien dans les CML de *Psammomys* contrôles que dans les CML de *Psammomys* diabétiques, les autres agonistes spécifiques de LXR (la paxilline et le GW3965) reproduisent l'effet du TO901317 notamment pour l'expression de FAS dans les CML de *Psammomys* contrôles. Les travaux de Mitro *et al.* (2007b) ont montré que le TO901317, agoniste de LXR est aussi un ligand de haute affinité pour les récepteurs PXR et active ce récepteur. TO901317 induit l'expression non seulement des gènes cibles de LXR mais aussi des gènes cibles de PXR. L'activation des gènes cibles de PXR explique sans doute pourquoi le TO901317 induit des stéatoses hépatiques sévères alors que le GW3965 à un effet stéatotique modéré. Ces résultats suggèrent que plusieurs activités biologiques jusqu'ici associées avec l'activation de LXR peuvent être transmises par PXR et non pas par LXR. Les travaux de Zhou *et al.* (2008) ont montré également que le CD36 est un gène cible commun des récepteurs nucléaires LXR, PXR et PPAR γ . Afin de vérifier si les effets observés après l'activation par l'agoniste mixte de PXR et de LXR (TO901317) pourraient être transmis par le récepteur PXR, nous avons testé l'effet de l'agoniste spécifique de ce récepteur (PCN) sur les CMLV. Alors que le PCN n'a aucun effet sur l'expression des gènes de la lipogenèse dans les CML de rats Zucker contrôles et obèses, il reproduit en partie l'effet du TO901317 sur les CMLV de *Psammomys* diabétiques; ce qui suggère que les effets de l'agoniste mixte de LXR et de PXR résultent, chez *Psammomys obesus*, de l'activation des deux récepteurs LXR et PXR.

Les agonistes de LXR ont été proposés comme agents thérapeutiques possibles dans le traitement de l'athérome. En effet, ils réduisent le développement de l'athérome chez les modèles de souris (Joseph *et al.*, 2002) via la stimulation du transport inverse et l'efflux du cholestérol cellulaire (Naik *et al.*, 2006) et probablement aussi grâce à certaines actions anti-inflammatoires (Hong and Tontonoz, 2008). Ces effets sont associés à une augmentation de la lipogenèse *de novo* au niveau hépatique et l'élévation plasmatique des VLDL riches en TG, limitant ainsi l'utilisation clinique de ces agonistes de LXR. Cela peut être résolu par l'utilisation d'agonistes plus spécifiques de LXR, comme le GW3965. Toutefois, nos résultats ont montré malgré l'absence d'une augmentation significative de l'expression des gènes de la lipogenèse dans la paroi artérielle *in vivo*, une augmentation du contenu en TG de cette paroi. Les effets délétères possibles à long terme de cette augmentation de lipides doivent être étudiés. Clarifier les conséquences des actions directes des agonistes de LXR sur le développement de l'athérome dans la paroi artérielle nécessite d'autres études.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Notre travail confirme que les gènes principaux de la lipogenèse ainsi que ceux des facteurs de transcription majeurs contrôlant leur expression sont bien exprimés dans la paroi artérielle et dans les CMLV. Nous montrons de plus que cette voie métabolique est bien active dans les CMLV, qu'elle est stimulable dans certaines conditions et que cette activité participe à l'accumulation de triglycérides dans les CMLV *in vitro*.

La paroi artérielle accumule des TG avec l'âge ainsi que dans les situations d'insulino-résistance et de diabète, comme nous l'avons observé. Nous avons voulu savoir si la lipogenèse *in situ* peut contribuer à cette accumulation, une hypothèse soutenue par les résultats obtenus sur les CMLV en culture. Cependant, l'expression de la lipogenèse dans la paroi artérielle n'augmente pas avec l'âge chez les rats, et n'est pas augmentée dans les différents modèles d'insulino-résistance et de diabète que nous avons explorés. De plus, l'expression de la lipogenèse n'est pas augmentée non plus dans les CMLV isolées à partir des aortes d'animaux insulino-résistants et diabétiques. Globalement, nos résultats suggèrent que l'accumulation de TG dans la paroi artérielle résulte essentiellement de la disponibilité accrue en acides gras circulants sous forme non estérifiée ou incorporés dans les triglycérides plasmatiques. Cette hypothèse pourrait être confirmée en perfusant les animaux avec un acide gras marqué ou une émulsion de TG marqués et en mesurant l'incorporation des molécules marquées dans les TG de la paroi artérielle.

Dans notre étude la lipogenèse des CMLV obtenues à partir d'animaux contrôles répond modérément à un milieu de différenciation adipocytaire identique à celui utilisé par (Davies *et al.*, 2005), ainsi qu'à des constituants individuels de ce milieu (insuline, T3) et qu'au glucose. Elle est stimulable aussi par l'angiotensine II. Elle répond clairement aux agonistes de LXR α , mais peu ou pas à un agoniste de PXR, ce qui nous a permis de montrer que l'action du double agoniste LXR-PXR, le TO901317, décrite précédemment (Mitro *et al.*, 2007b) est bien liée à l'activation de LXR. *In vivo*, Nous n'avons testé que l'action d'un agoniste LXR. Celui-ci a bien agi au niveau du foie mais, malgré une augmentation du contenu en TG de la paroi, n'a pas stimulé à ce niveau l'expression de la lipogenèse. Nous n'avons pas mis en évidence non plus d'action sur d'autres cibles de LXR comme ABCA1. Il est donc possible que la disponibilité de l'agoniste LXR dans la circulation générale ait été insuffisante pour que cet agoniste agisse sur la paroi artérielle. Cette expérience serait à refaire avec des doses plus importantes et d'autres agonistes. Il serait utile aussi de vérifier si les actions *in vitro* de la T3 et de l'angiotensine II sont présentes *in vivo*. Enfin, nous n'avons pas déterminé, que ce soit *in vivo* dans les aortes ou *in vitro* dans les CMLV si la lipogenèse est sensible à l'action inhibitrice des acides gras polyinsaturés.

La lipogenèse des CMLV d'animaux insulino-résistants ou diabétiques répond peu aux facteurs adipogéniques par rapport aux CMLV contrôles. Cette voie semble donc insulino-résistante, ce qui serait cohérent avec la résistance sélective de la voie PI3-kinase à l'action de l'insuline décrite précédemment dans la paroi artérielle (Jiang *et al.*, 1999) et les CMLV (Hodroj *et al.*, 2007). Cependant nous n'avons pas vérifié que dans les conditions de notre étude la voie PI3-kinase était bien résistante. Le mécanisme de cette insulino-résistance reste aussi à préciser. Elle pourrait être liée à l'accumulation de substrats lipidiques. La mesure des concentrations des substrats impliqués (diacylglycérols, céramide) apporterait

une première réponse. Cette perte de réponse de la lipogenèse à des éléments régulateurs apparaît plus générale puisque, de manière inattendue, nous avons observé aussi une réponse diminuée aux agonistes LXR, à la T3 et à l'angiotensine II dans les CMLV d'animaux diabétiques. Nous ne savons pas si cette « résistance » large est simplement la somme d'une série d'anomalies individuelles (modifications de l'expression de récepteurs de l'angiotensine II, de T3,..) ou a un mécanisme général.

Enfin, si nos résultats montrent clairement des anomalies de régulation de la lipogenèse dans la CMLV d'animaux insulino-résistants et diabétiques, et probablement *in vivo* dans la paroi artérielle, et suggèrent fortement que cette voie n'a pas de rôle majeur dans l'accumulation de TG dans cette paroi, le rôle éventuel de la lipogenèse dans le développement de l'athérome reste incertain. Ceci nécessitera des études dans des modèles expérimentaux tels que les souris ApoE ou LDLr KO.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Anai, M., M. Funaki, T. Ogihara, J. Terasaki, K. Inukai, H. Katagiri, Y. Fukushima, Y. Yazaki, M. Kikuchi, Y. Oka, and T. Asano. 1998. Altered expression levels and impaired steps in the pathway to phosphatidylinositol 3-kinase activation via insulin receptor substrates 1 and 2 in Zucker fatty rats. *Diabetes*. 47:13-23.
- Apfel, R., D. Benbrook, E. Lernhardt, M.A. Ortiz, G. Salbert, and M. Pfahl. 1994. A novel orphan receptor specific for a subset of thyroid hormone-responsive elements and its interaction with the retinoid/thyroid hormone receptor subfamily. *Mol Cell Biol*. 14:7025-35.
- Baranowski, M. 2008. Biological role of liver X receptors. *J Physiol Pharmacol*. 59 Suppl 7:31-55.
- Bertilsson, G., J. Heidrich, K. Svensson, M. Asman, L. Jendeberg, M. Sydow-Backman, R. Ohlsson, H. Postlind, P. Blomquist, and A. Berkenstam. 1998. Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:12208-13.
- Beylot, M. 2006. Use of stable isotopes to evaluate the functional effects of nutrients. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 9:734-9.
- Beylot, M., C. Pinteaur, and O. Peroni. 2006. Expression of the adiponectin receptors AdipoR1 and AdipoR2 in lean rats and in obese Zucker rats. *Metabolism*. 55:396-401.
- Blaschke, F., O. Leppanen, Y. Takata, E. Caglayan, J. Liu, M.C. Fishbein, K. Kappert, K.I. Nakayama, A.R. Collins, E. Fleck, W.A. Hsueh, R.E. Law, and D. Bruemmer. 2004. Liver X receptor agonists suppress vascular smooth muscle cell proliferation and inhibit neointima formation in balloon-injured rat carotid arteries. *Circ Res*. 95:e110-23.
- Blaschke, F., Y. Takata, E. Caglayan, R.E. Law, and W.A. Hsueh. 2006. Obesity, peroxisome proliferator-activated receptor, and atherosclerosis in type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 26:28-40.
- Blennemann, B., Y.K. Moon, and H.C. Freake. 1992. Tissue-specific regulation of fatty acid synthesis by thyroid hormone. *Endocrinology*. 130:637-43.
- Bourdillon, M.C., J.P. Boissel, and B. Crouzet. 1977. Proliferation of primary cultures from rat aortic media. Effects of hyperlipemic serum. *Prog Biochem Pharmacol*. 13:103-10.
- Brown, M.S., and J.L. Goldstein. 1999. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:11041-8.
- Brownsey, R.W., A.N. Boone, J.E. Elliott, J.E. Kulpa, and W.M. Lee. 2006. Regulation of acetyl-CoA carboxylase. *Biochem Soc Trans*. 34:223-7.
- Bustin, S.A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*. 25:169-93.
- Cachefo, A., P. Boucher, C. Vidon, E. Dusserre, F. Diraison, and M. Beylot. 2001. Hepatic lipogenesis and cholesterol synthesis in hyperthyroid patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 86:5353-7.
- Cao, G., Y. Liang, C.L. Broderick, B.A. Oldham, T.P. Beyer, R.J. Schmidt, Y. Zhang, K.R. Stayrook, C. Suen, K.A. Otto, A.R. Miller, J. Dai, P. Foxworthy, H. Gao, T.P. Ryan, X.C. Jiang, T.P. Burris, P.I. Eacho, and G.J. Etgen. 2003. Antidiabetic action of a liver x receptor agonist mediated by inhibition of hepatic gluconeogenesis. *J Biol Chem*. 278:1131-6.
- Cao, X., F. Kambe, L.C. Moeller, S. Refetoff, and H. Seo. 2005. Thyroid hormone induces rapid activation of Akt/protein kinase B-mammalian target of rapamycin-p70S6K cascade through phosphatidylinositol 3-kinase in human fibroblasts. *Mol Endocrinol*. 19:102-12.
- Cha, J.Y., and J.J. Repa. 2007. The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *J Biol Chem*. 282:743-51.
- Cha, J.Y., and J.J. Repa. 2007. The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *J Biol Chem*. 282:743-51.
- Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 162:156-9.

- Chu, K., M. Miyazaki, W.C. Man, and J.M. Ntambi. 2006. Stearoyl-coenzyme A desaturase 1 deficiency protects against hypertriglyceridemia and increases plasma high-density lipoprotein cholesterol induced by liver X receptor activation. *Mol Cell Biol.* 26:6786-98.
- Clark, J.B., and C.M. Clark, Jr. 1982. Age-related changes in insulin receptor regulation in liver membranes from Zucker fatty rats. *Endocrinology.* 111:964-9.
- Commerford, S.R., L. Vargas, S.E. Dorfman, N. Mitro, E.C. Rocheford, P.A. Mak, X. Li, P. Kennedy, T.L. Mullarkey, and E. Saez. 2007. Dissection of the insulin-sensitizing effect of liver X receptor ligands. *Mol Endocrinol.* 21:3002-12.
- Cozzone, D., C. Debard, N. Dif, N. Ricard, E. Disse, J. Vouillarmet, R. Rabasa-Lhoret, M. Laville, D. Pruneau, J. Rieusset, E. Lefai, and H. Vidal. 2006. Activation of liver X receptors promotes lipid accumulation but does not alter insulin action in human skeletal muscle cells. *Diabetologia.* 49:990-9.
- Dalen, K.T., S.M. Ulven, K. Bamberg, J.A. Gustafsson, and H.I. Nebb. 2003. Expression of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 in adipocytes is dependent on liver X receptor alpha. *J Biol Chem.* 278:48283-91.
- Davies, J., K. Carpenter, I. Challis, N. Figg, R. McNair, D. Proudfoot, P. Weissberg, and C. Shanahan. 2005. Adipocytic differentiation and liver X receptor pathways regulate the accumulation of triacylglycerols in human vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 280:3911-3919.
- Denechaud, P.D., P. Bossard, J.M. Lobaccaro, L. Millatt, B. Staels, J. Girard, and C. Postic. 2008. ChREBP, but not LXRs, is required for the induction of glucose-regulated genes in mouse liver. *J Clin Invest.* 118:956-64.
- Denechaud, P.D., R. Dentin, J. Girard, and C. Postic. 2008. Role of ChREBP in hepatic steatosis and insulin resistance. *FEBS Lett.* 582:68-73.
- Dentin, R., F. Benhamed, J.P. Pegorier, F. Fofelle, B. Viollet, S. Vaulont, J. Girard, and C. Postic. 2005. Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation. *J Clin Invest.* 115:2843-54.
- Dentin, R., J. Girard, and C. Postic. 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.* 87:81-6.
- Dentin, R., J.P. Pegorier, F. Benhamed, F. Fofelle, P. Ferre, V. Fauveau, M.A. Magnuson, J. Girard, and C. Postic. 2004. Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression. *J Biol Chem.* 279:20314-26.
- Desvergne, B., L. Michalik, and W. Wahli. 2006. Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol Rev.* 86:465-514.
- Diraison, F., E. Dusserre, H. Vidal, M. Sothier, and M. Beylot. 2002. Increased hepatic lipogenesis but decreased expression of lipogenic gene in adipose tissue in human obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 282:E46-51.
- Diraison, F., P. Moulin, and M. Beylot. 2003. Contribution of hepatic de novo lipogenesis and reesterification of plasma non esterified fatty acids to plasma triglyceride synthesis during non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Metab.* 29:478-85.
- Diraison, F., C. Pachiardi, and M. Beylot. 1997. Measuring lipogenesis and cholesterol synthesis in humans with deuterated water: use of simple gas chromatographic/mass spectrometric techniques. *J Mass Spectrom.* 32:81-6.
- Diraison, F., V. Yankah, D. Letexier, E. Dusserre, P. Jones, and M. Beylot. 2003. Differences in the regulation of adipose tissue and liver lipogenesis by carbohydrates in humans. *J Lipid Res.* 44:846-53.
- Donnelly, K.L., C.I. Smith, S.J. Schwarzenberg, J. Jessurun, M.D. Boldt, and E.J. Parks. 2005. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest.* 115:1343-51.
- Ducruzeau, P.H., N. Perretti, M. Laville, F. Andreelli, N. Vega, J.P. Riou, and H. Vidal. 2001. Regulation by insulin of gene expression in human skeletal muscle and adipose tissue. Evidence for specific defects in type 2 diabetes. *Diabetes.* 50:1134-42.

- Duntas, L.H. 2002. Thyroid disease and lipids. *Thyroid*. 12:287-93.
- Eberle, D., B. Hegarty, P. Bossard, P. Ferre, and F. Foufelle. 2004. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie*. 86:839-48.
- Erbay, E., V.R. Babaev, J.R. Mayers, L. Makowski, K.N. Charles, M.E. Snitow, S. Fazio, M.M. Wiest, S.M. Watkins, M.F. Linton, and G.S. Hotamisligil. 2009. Reducing endoplasmic reticulum stress through a macrophage lipid chaperone alleviates atherosclerosis. *Nat Med*. 15:1383-91.
- Ferre, P., and F. Foufelle. 2007. SREBP-1c transcription factor and lipid homeostasis: clinical perspective. *Horm Res*. 68:72-82.
- Folch, J., M. Lees, and G.H. Sloane Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 226:497-509.
- Folli, F., M.J. Saad, J.M. Backer, and C.R. Kahn. 1993. Regulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity in liver and muscle of animal models of insulin-resistant and insulin-deficient diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 92:1787-94.
- Forcheron, F., P. Abdallah, A. Basset, P. del Carmine, G. Haffar, and M. Beylot. 2009. Nonalcoholic hepatic steatosis in Zucker diabetic rats: spontaneous evolution and effects of metformin and fenofibrate. *Obesity (Silver Spring)*. 17:1381-9.
- Foufelle, F., and P. Ferre. 2007. [Unfolded protein response: its role in physiology and physiopathology]. *Med Sci (Paris)*. 23:291-6.
- Goodridge, A.G. 1987. Dietary regulation of gene expression: enzymes involved in carbohydrate and lipid metabolism. *Annu Rev Nutr*. 7:157-85.
- Goodyear, L.J., F. Giorgino, L.A. Sherman, J. Carey, R.J. Smith, and G.L. Dohm. 1995. Insulin receptor phosphorylation, insulin receptor substrate-1 phosphorylation, and phosphatidylinositol 3-kinase activity are decreased in intact skeletal muscle strips from obese subjects. *J Clin Invest*. 95:2195-204.
- Grefhorst, A., B.M. Elzinga, P.J. Voshol, T. Plosch, T. Kok, V.W. Bloks, F.H. van der Sluijs, L.M. Havekes, J.A. Romijn, H.J. Verkade, and F. Kuipers. 2002. Stimulation of lipogenesis by pharmacological activation of the liver X receptor leads to production of large, triglyceride-rich very low density lipoprotein particles. *J Biol Chem*. 277:34182-90.
- Grefhorst, A., T.H. van Dijk, A. Hammer, F.H. van der Sluijs, R. Havinga, L.M. Havekes, J.A. Romijn, P.H. Groot, D.J. Reijngoud, and F. Kuipers. 2005. Differential effects of pharmacological liver X receptor activation on hepatic and peripheral insulin sensitivity in lean and ob/ob mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 289:E829-38.
- Groot, P.H., N.J. Pearce, J.W. Yates, C. Stocker, C. Sauermelch, C.P. Doe, R.N. Willette, A. Olzinski, T. Peters, D. d'Epagnier, K.O. Morasco, J.A. Krawiec, C.L. Webb, K. Aravindhan, B. Jucker, M. Burgert, C. Ma, J.P. Marino, J.L. Collins, C.H. Macphee, S.K. Thompson, and M. Jaye. 2005. Synthetic LXR agonists increase LDL in CETP species. *J Lipid Res*. 46:2182-91.
- Guillet-Deniau, I., V. Mieulet, S. Le Lay, Y. Achouri, D. Carre, J. Girard, F. Foufelle, and P. Ferre. 2002. Sterol regulatory element binding protein-1c expression and action in rat muscles: insulin-like effects on the control of glycolytic and lipogenic enzymes and UCP3 gene expression. *Diabetes*. 51:1722-8.
- Hamlat, N., S. Neggazi, L. Raaf, Y. Benazzoug, G. Kacimi, S. Aouichat-Bouguerra. 2006. Effets d'un régime enrichi en lipides sur des paramètres plasmatiques et tissulaires chez *Psammomys obesus*. *Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle d'Afrique du Nord* 73:183 - 195.
- Hamlat, N., F. Forcheron, S. Neggazi, P. Del Carmine, P. Feugier, G. Bricca, S. Aouichat-Bouguerra, and M. Beylot. 2009. Lipogenesis in arterial wall and vascular smooth muscular cells: regulation and abnormalities in insulin-resistance. *Cardiovasc Diabetol*. 8:64.
- Hamlat N, F.F., Del Carmine P, Aouichat-Bouguerra S, Beylot M. 2009. Expression of lipogenesis in the arterial wall and vascular smooth muscle cells : stimulation by LXR and repression in insulin resistance. . *Diabetes & Metabolism* 35:A14-A (abstract).
- Hardie, D.G., and D.A. Pan. 2002. Regulation of fatty acid synthesis and oxidation by the AMP-activated protein kinase. *Biochem Soc Trans*. 30:1064-70.

- Hashimoto, K., R.N. Cohen, M. Yamada, K.R. Markan, T. Monden, T. Satoh, M. Mori, and F.E. Wondisford. 2006. Cross-talk between thyroid hormone receptor and liver X receptor regulatory pathways is revealed in a thyroid hormone resistance mouse model. *J Biol Chem.* 281:295-302.
- Hashimoto, K., E. Ishida, S. Matsumoto, S. Okada, M. Yamada, T. Satoh, T. Monden, and M. Mori. 2009. Carbohydrate response element binding protein gene expression is positively regulated by thyroid hormone. *Endocrinology.* 150:3417-24.
- Hashimoto, K., S. Matsumoto, M. Yamada, T. Satoh, and M. Mori. 2007. Liver X receptor-alpha gene expression is positively regulated by thyroid hormone. *Endocrinology.* 148:4667-75.
- Hashimoto, K., M. Yamada, S. Matsumoto, T. Monden, T. Satoh, and M. Mori. 2006. Mouse sterol response element binding protein-1c gene expression is negatively regulated by thyroid hormone. *Endocrinology.* 147:4292-302.
- Hodroj, W., L. Legedz, N. Foudi, C. Cerutti, M.C. Bourdillon, P. Feugier, M. Beylot, J. Randon, and G. Bricca. 2007. Increased insulin-stimulated expression of arterial angiotensinogen and angiotensin type 1 receptor in patients with type 2 diabetes mellitus and atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27:525-31.
- Hong, C., and P. Tontonoz. 2008. Coordination of inflammation and metabolism by PPAR and LXR nuclear receptors. *Curr Opin Genet Dev.* 18:461-7.
- Howard, C.F., Jr. 1971. Lipogenesis from glucose-2- ¹⁴ C and acetate-1- ¹⁴ C in aorta. *J Lipid Res.* 12:725-30.
- Hu, T., P. Foxworthy, A. Siesky, J.V. Ficorilli, H. Gao, S. Li, M. Christe, T. Ryan, G. Cao, P. Eacho, M.D. Michael, and L.F. Michael. 2005. Hepatic peroxisomal fatty acid beta-oxidation is regulated by liver X receptor alpha. *Endocrinology.* 146:5380-7.
- Hua, X., J. Sakai, Y.K. Ho, J.L. Goldstein, and M.S. Brown. 1995. Hairpin orientation of sterol regulatory element-binding protein-2 in cell membranes as determined by protease protection. *J Biol Chem.* 270:29422-7.
- Hurrell, D.G., O. Pedersen, and C.R. Kahn. 1989. Alterations in the hepatic insulin receptor kinase in genetic and acquired obesity in rats. *Endocrinology.* 125:2454-62.
- Inaba, T., M. Matsuda, M. Shimamura, N. Takei, N. Terasaka, Y. Ando, H. Yasumo, R. Koishi, M. Makishima, and I. Shimomura. 2003. Angiotensin-like protein 3 mediates hypertriglyceridemia induced by the liver X receptor. *J Biol Chem.* 278:21344-51.
- Jiang, Z.Y., Y.W. Lin, A. Clemont, E.P. Feener, K.D. Hein, M. Igarashi, T. Yamauchi, M.F. White, and G.L. King. 1999. Characterization of selective resistance to insulin signaling in the vasculature of obese Zucker (fa/fa) rats. *J Clin Invest.* 104:447-57.
- Jones, B.H., M.K. Standridge, and N. Moustaid. 1997. Angiotensin II increases lipogenesis in 3T3-L1 and human adipose cells. *Endocrinology.* 138:1512-9.
- Joseph, S.B., A. Castrillo, B.A. Laffitte, D.J. Mangelsdorf, and P. Tontonoz. 2003. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat Med.* 9:213-9.
- Joseph, S.B., E. McKilligin, L. Pei, M.A. Watson, A.R. Collins, B.A. Laffitte, M. Chen, G. Noh, J. Goodman, G.N. Hagger, J. Tran, T.K. Tippin, X. Wang, A.J. Lusis, W.A. Hsueh, R.E. Law, J.L. Collins, T.M. Willson, and P. Tontonoz. 2002. Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:7604-9.
- Kalderon, B., J.H. Adler, E. Levy, and A. Gutman. 1983. Lipogenesis in the sand rat (*Psammomys obesus*). *Am J Physiol.* 244:E480-6.
- Kallin, A., L.E. Johannessen, P.D. Cani, C.Y. Marbehant, A. Essaghir, F. Fougelle, P. Ferre, C.H. Heldin, N.M. Delzenne, and J.B. Demoulin. 2007. SREBP-1 regulates the expression of heme oxygenase 1 and the phosphatidylinositol-3 kinase regulatory subunit p55 gamma. *J Lipid Res.* 48:1628-36.
- Kammoun, H.L., H. Chabanon, I. Hainault, S. Luquet, C. Magnan, T. Koike, P. Ferre, and F. Fougelle. 2009. GRP78 expression inhibits insulin and ER stress-induced SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice. *J Clin Invest.* 119:1201-15.

- Kase, E.T., G.H. Thoresen, S. Westerlund, K. Hojlund, A.C. Rustan, and M. Gaster. 2007. Liver X receptor antagonist reduces lipid formation and increases glucose metabolism in myotubes from lean, obese and type 2 diabetic individuals. *Diabetologia*. 50:2171-80.
- Kase, E.T., A.J. Wensaas, V. Aas, K. Hojlund, K. Levin, G.H. Thoresen, H. Beck-Nielsen, A.C. Rustan, and M. Gaster. 2005. Skeletal muscle lipid accumulation in type 2 diabetes may involve the liver X receptor pathway. *Diabetes*. 54:1108-15.
- Kasiske, B.L., M.P. O'Donnell, and W.F. Keane. 1992. The Zucker rat model of obesity, insulin resistance, hyperlipidemia, and renal injury. *Hypertension*. 19:1110-5.
- Kawai, K., S. Sasaki, H. Morita, T. Ito, S. Suzuki, H. Misawa, and H. Nakamura. 2004. Unliganded thyroid hormone receptor-beta1 represses liver X receptor alpha/oxysterol-dependent transactivation. *Endocrinology*. 145:5515-24.
- Kerouz, N.J., D. Horsch, S. Pons, and C.R. Kahn. 1997. Differential regulation of insulin receptor substrates-1 and -2 (IRS-1 and IRS-2) and phosphatidylinositol 3-kinase isoforms in liver and muscle of the obese diabetic (ob/ob) mouse. *J Clin Invest*. 100:3164-72.
- Kim, S., I. Dugail, M. Standridge, K. Claycombe, J. Chun, and N. Moustaid-Moussa. 2001. Angiotensin II-responsive element is the insulin-responsive element in the adipocyte fatty acid synthase gene: role of adipocyte determination and differentiation factor 1/sterol-regulatory-element-binding protein 1c. *Biochem J*. 357:899-904.
- Klenk, E., and H. Mohrhauer. 1960. [Studies on the metabolism of polyenoic fatty acids in the rat.]. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*. 320:218-32.
- Kliwer, S.A., J.T. Moore, L. Wade, J.L. Staudinger, M.A. Watson, S.A. Jones, D.D. McKee, B.B. Oliver, T.M. Willson, R.H. Zetterstrom, T. Perlmann, and J.M. Lehmann. 1998. An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. *Cell*. 92:73-82.
- KOCEIR, E.-A. 2003. Etude du métabolisme glucidique et lipidique de l'hépatocyte isolé de rat des sables (*Psammomys obesus*) au cours du développement du syndrome diabétique. Influence nutritionnelle, hormonale et pharmacologique. Vol. Docorat Es sciences naturelles. Université des sciences et de la technologie, Houari Boumediene. 1-274.
- Koceir, E.A., Y. Dahmani, and X. Leverve. 2003. Low rate of glucose 6-phosphate hydrolysis in liver cells is a physiological feature of non-diabetic wild sand rats (*Psammomys obesus*). *Diabetes Metab*. 29:363-74.
- Koishi, R., Y. Ando, M. Ono, M. Shimamura, H. Yasumo, T. Fujiwara, H. Horikoshi, and H. Furukawa. 2002. Angptl3 regulates lipid metabolism in mice. *Nat Genet*. 30:151-7.
- Kotokorpi, P., E. Ellis, P. Parini, L.M. Nilsson, S. Strom, K.R. Steffensen, J.A. Gustafsson, and A. Mode. 2007. Physiological differences between human and rat primary hepatocytes in response to liver X receptor activation by 3-[3-[N-(2-chloro-3-trifluoromethylbenzyl)-(2,2-diphenylethyl)amino]propyl oxy]phenylacetic acid hydrochloride (GW3965). *Mol Pharmacol*. 72:947-55.
- Kratzer, A., M. Buchebner, T. Pfeifer, T.M. Becker, G. Uray, M. Miyazaki, S. Miyazaki-Anzai, B. Ebner, P.G. Chandak, R.S. Kadam, E. Calayir, N. Rathke, H. Ahammer, B. Radovic, M. Trauner, G. Hoefler, U.B. Kompella, G. Fauler, M. Levi, S. Levak-Frank, G.M. Kostner, and D. Kratky. 2009. Synthetic LXR agonist attenuates plaque formation in apoE^{-/-} mice without inducing liver steatosis and hypertriglyceridemia. *J Lipid Res*. 50:312-26.
- Kreuz, S., C. Schoelch, L. Thomas, W. Rist, J.F. Rippmann, and H. Neubauer. 2009. Acetyl-CoA carboxylases 1 and 2 show distinct expression patterns in rats and humans and alterations in obesity and diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*.
- Lazarow, P.B. 1978. Rat liver peroxisomes catalyze the beta oxidation of fatty acids. *J Biol Chem*. 253:1522-8.
- Leonard, B.L., R.N. Watson, K.M. Loomes, A.R. Phillips, and G.J. Cooper. 2005. Insulin resistance in the Zucker diabetic fatty rat: a metabolic characterisation of obese and lean phenotypes. *Acta Diabetol*. 42:162-70.

- Levin, N., E.D. Bischoff, C.L. Daige, D. Thomas, C.T. Vu, R.A. Heyman, R.K. Tangirala, and I.G. Schulman. 2005. Macrophage liver X receptor is required for antiatherogenic activity of LXR agonists. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25:135-42.
- Lewandowski, P.A., D. Cameron-Smith, C.J. Jackson, E.R. Kultys, and G.R. Collier. 1998. The role of lipogenesis in the development of obesity and diabetes in Israeli sand rats (*Psammomys obesus*). *J Nutr.* 128:1984-8.
- Lin, H.Z., S.Q. Yang, C. Chuckaree, F. Kuhajda, G. Ronnet, and A.M. Diehl. 2000. Metformin reverses fatty liver disease in obese, leptin-deficient mice. *Nat Med.* 6:998-1003.
- Liu, X., and J.M. Ntambi. 2009. Atherosclerosis: keep your macrophages in shape. *Nat Med.* 15:1357-8.
- Liu, Y., C. Yan, Y. Wang, Y. Nakagawa, N. Nerio, A. Anghel, K. Lutfy, and T.C. Friedman. 2006. Liver X receptor agonist T0901317 inhibition of glucocorticoid receptor expression in hepatocytes may contribute to the amelioration of diabetic syndrome in db/db mice. *Endocrinology.* 147:5061-8.
- Lowenstein, J.M., H. Brunengraber, and M. Wadke. 1975. Measurement of rates of lipogenesis with deuterated and tritiated water. *Methods Enzymol.* 35:279-87.
- Lund, E.G., L.B. Peterson, A.D. Adams, M.H. Lam, C.A. Burton, J. Chin, Q. Guo, S. Huang, M. Latham, J.C. Lopez, J.G. Menke, D.P. Milot, L.J. Mitnaul, S.E. Rex-Rabe, R.L. Rosa, J.Y. Tian, S.D. Wright, and C.P. Sparrow. 2006. Different roles of liver X receptor alpha and beta in lipid metabolism: effects of an alpha-selective and a dual agonist in mice deficient in each subtype. *Biochem Pharmacol.* 71:453-63.
- McGarry, J.D., and N.F. Brown. 1997. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem.* 244:1-14.
- Miao, B., S. Zondlo, S. Gibbs, D. Cromley, V.P. Hosagrahara, T.G. Kirchgessner, J. Billheimer, and R. Mukherjee. 2004. Raising HDL cholesterol without inducing hepatic steatosis and hypertriglyceridemia by a selective LXR modulator. *J Lipid Res.* 45:1410-7.
- Mitro, N., P.A. Mak, L. Vargas, C. Godio, E. Hampton, V. Molteni, A. Kreuzsch, and E. Saez. 2007. The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature.* 445:219-23.
- Mitro, N., L. Vargas, R. Romeo, A. Koder, and E. Saez. 2007. T0901317 is a potent PXR ligand: implications for the biology ascribed to LXR. *FEBS Lett.* 581:1721-6.
- Molteni, V., X. Li, J. Nabakka, F. Liang, J. Wityak, A. Koder, L. Vargas, R. Romeo, N. Mitro, P.A. Mak, H.M. Seidel, J.A. Haslam, D. Chow, T. Tuntland, T.A. Spalding, A. Brock, M. Bradley, A. Castrillo, P. Tontonoz, and E. Saez. 2007. N-Acylthiadiazolines, a new class of liver X receptor agonists with selectivity for LXRbeta. *J Med Chem.* 50:4255-9.
- Moreau, A., M.J. Vilarem, P. Maurel, and J.M. Pascussi. 2008. Xenoreceptors CAR and PXR activation and consequences on lipid metabolism, glucose homeostasis, and inflammatory response. *Mol Pharm.* 5:35-41.
- Morere, P., G. Nouvet, J.P. Stain, B. Paillot, J. Metayer, and J. Hemet. 1975. [Information obtained by liver biopsy in 100 tuberculous patients]. *Sem Hop.* 51:2095-102.
- Morrison, W.R., and L.M. Smith. 1964. Preparation of Fatty Acid Methyl Esters and Dimethylacetals from Lipids with Boron Fluoride--Methanol. *J Lipid Res.* 5:600-8.
- Muscat, G.E., B.L. Wagner, J. Hou, R.K. Tangirala, E.D. Bischoff, P. Rohde, M. Petrowski, J. Li, G. Shao, G. Macondray, and I.G. Schulman. 2002. Regulation of cholesterol homeostasis and lipid metabolism in skeletal muscle by liver X receptors. *J Biol Chem.* 277:40722-8.
- Naik, S.U., X. Wang, J.S. Da Silva, M. Jaye, C.H. Macphee, M.P. Reilly, J.T. Billheimer, G.H. Rothblat, and D.J. Rader. 2006. Pharmacological activation of liver X receptors promotes reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation.* 113:90-7.
- Nakatani, T., A. Katsumata, S. Miura, Y. Kamei, and O. Ezaki. 2005. Effects of fish oil feeding and fasting on LXRA/RXRalpha binding to LXRE in the SREBP-1c promoter in mouse liver. *Biochim Biophys Acta.* 1736:77-86.
- Nannipieri, M., F. Cecchetti, M. Anselmino, S. Camastra, P. Niccolini, M. Lamacchia, M. Rossi, G. Iervasi, and E. Ferrannini. 2009. Expression of thyrotropin and thyroid hormone receptors in

- adipose tissue of patients with morbid obesity and/or type 2 diabetes: effects of weight loss. *Int J Obes (Lond)*. 33:1001-6.
- Nogalska, A., E. Sucajty-Szulc, and J. Swierczynski. 2005. Leptin decreases lipogenic enzyme gene expression through modification of SREBP-1c gene expression in white adipose tissue of aging rats. *Metabolism*. 54:1041-7.
- Oppenheimer, J.H., H.L. Schwartz, C.N. Mariash, W.B. Kinlaw, N.C. Wong, and H.C. Frenkel. 1987. Advances in our understanding of thyroid hormone action at the cellular level. *Endocr Rev*. 8:288-308.
- Oscarson, M., U.M. Zanger, O.F. Rifki, K. Klein, M. Eichelbaum, and U.A. Meyer. 2006. Transcriptional profiling of genes induced in the livers of patients treated with carbamazepine. *Clin Pharmacol Ther*. 80:440-456.
- Osmundsen, H., J. Bremer, and J.I. Pedersen. 1991. Metabolic aspects of peroxisomal beta-oxidation. *Biochim Biophys Acta*. 1085:141-58.
- Paulauskis, J.D., and H.S. Sul. 1989. Hormonal regulation of mouse fatty acid synthase gene transcription in liver. *J Biol Chem*. 264:574-7.
- Pawar, A., D. Botolin, D.J. Mangelsdorf, and D.B. Jump. 2003. The role of liver X receptor-alpha in the fatty acid regulation of hepatic gene expression. *J Biol Chem*. 278:40736-43.
- Peet, D.J., S.D. Turley, W. Ma, B.A. Janowski, J.M. Lobaccaro, R.E. Hammer, and D.J. Mangelsdorf. 1998. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell*. 93:693-704.
- Pegorier, J.P., C. Le May, and J. Girard. 2004. Control of gene expression by fatty acids. *J Nutr*. 134:2444S-2449S.
- Pihlajamaki, J., T. Boes, E.Y. Kim, F. Dearie, B.W. Kim, J. Schroeder, E. Mun, I. Nasser, P.J. Park, A.C. Bianco, A.B. Goldfine, and M.E. Patti. 2009. Thyroid hormone-related regulation of gene expression in human fatty liver. *J Clin Endocrinol Metab*. 94:3521-9.
- Piriou, A., J.M. Warnet, A. Jacqueson, J.R. Claude, and R. Truhaut. 1979. Fatty liver induced by high doses of rifampicin in the rat: possible relation with an inhibition of RNA polymerases in eukaryotic cells. *Arch Toxicol Suppl*:333-7.
- Postic, C., R. Dentin, P.D. Denechaud, and J. Girard. 2007. ChREBP, a transcriptional regulator of glucose and lipid metabolism. *Annu Rev Nutr*. 27:179-92.
- Quinet, E.M., D.A. Savio, A.R. Halpern, L. Chen, G.U. Schuster, J.A. Gustafsson, M.D. Basso, and P. Nambi. 2006. Liver X receptor (LXR)-beta regulation in LXRalpha-deficient mice: implications for therapeutic targeting. *Mol Pharmacol*. 70:1340-9.
- Radenne, A., M. Akpa, C. Martel, S. Sawadogo, D. Mauvoisin, and C. Mounier. 2008. Hepatic regulation of fatty acid synthase by insulin and T3: evidence for T3 genomic and nongenomic actions. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 295:E884-94.
- Ran, J., T. Hirano, and M. Adachi. 2004. Chronic ANG II infusion increases plasma triglyceride level by stimulating hepatic triglyceride production in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 287:E955-61.
- Repa, J.J., G. Liang, J. Ou, Y. Bashmakov, J.M. Lobaccaro, I. Shimomura, B. Shan, M.S. Brown, J.L. Goldstein, and D.J. Mangelsdorf. 2000. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev*. 14:2819-30.
- Ross, R. 1971. The smooth muscle cell. II. Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers. *J Cell Biol*. 50:172-86.
- Savage, D.B., K.F. Petersen, and G.I. Shulman. 2007. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiol Rev*. 87:507-20.
- Schoonjans, K., B. Staels, and J. Auwerx. 1996. Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J Lipid Res*. 37:907-25.

- Schwarz, J.M., P. Linfoot, D. Dare, and K. Aghajanian. 2003. Hepatic de novo lipogenesis in normoinsulinemic and hyperinsulinemic subjects consuming high-fat, low-carbohydrate and low-fat, high-carbohydrate isoenergetic diets. *Am J Clin Nutr.* 77:43-50.
- Shafir, E., E. Ziv, and R. Kalman. 2006. Nutritionally induced diabetes in desert rodents as models of type 2 diabetes: *Acomys cahirinus* (spiny mice) and *Psammomys obesus* (desert gerbil). *ILAR J.* 47:212-24.
- Skovbro, M., M. Baranowski, C. Skov-Jensen, A. Flint, F. Dela, J. Gorski, and J.W. Helge. 2008. Human skeletal muscle ceramide content is not a major factor in muscle insulin sensitivity. *Diabetologia.* 51:1253-60.
- Song, C., J.M. Kokontis, R.A. Hiipakka, and S. Liao. 1994. Ubiquitous receptor: a receptor that modulates gene activation by retinoic acid and thyroid hormone receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:10809-13.
- Staiger, K., U. Schatz, H. Staiger, P. Weyrich, C. Haas, A. Guirguis, F. Machicao, H.U. Haring, and M. Kellerer. 2009. Protein kinase C δ mediates lipid-induced apoptosis of human coronary artery endothelial cells. *Microvasc Res.* 78:40-4.
- Stapleton, S.R., D.A. Mitchell, L.M. Salati, and A.G. Goodridge. 1990. Triiodothyronine stimulates transcription of the fatty acid synthase gene in chick embryo hepatocytes in culture. Insulin and insulin-like growth factor amplify that effect. *J Biol Chem.* 265:18442-6.
- Steinberg, G.R., S.L. Macaulay, M.A. Febbraio, and B.E. Kemp. 2006. AMP-activated protein kinase--the fat controller of the energy railroad. *Can J Physiol Pharmacol.* 84:655-65.
- Stulnig, T.M., K.R. Steffensen, H. Gao, M. Reimers, K. Dahlman-Wright, G.U. Schuster, and J.A. Gustafsson. 2002. Novel roles of liver X receptors exposed by gene expression profiling in liver and adipose tissue. *Mol Pharmacol.* 62:1299-305.
- Talukdar, S., and F.B. Hillgartner. 2006. The mechanism mediating the activation of acetyl-coenzyme A carboxylase- α gene transcription by the liver X receptor agonist T0-901317. *J Lipid Res.* 47:2451-61.
- Tangirala, R.K., E.D. Bischoff, S.B. Joseph, B.L. Wagner, R. Walczak, B.A. Laffitte, C.L. Daige, D. Thomas, R.A. Heyman, D.J. Mangelsdorf, X. Wang, A.J. Lusis, P. Tontonoz, and I.G. Schulman. 2002. Identification of macrophage liver X receptors as inhibitors of atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:11896-901.
- Terasaka, N., A. Hiroshima, T. Koieyama, N. Ubukata, Y. Morikawa, D. Nakai, and T. Inaba. 2003. T-0901317, a synthetic liver X receptor ligand, inhibits development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *FEBS Lett.* 536:6-11.
- Tobin, K.A., S.M. Ulven, G.U. Schuster, H.H. Steineger, S.M. Andresen, J.A. Gustafsson, and H.I. Nebb. 2002. Liver X receptors as insulin-mediating factors in fatty acid and cholesterol biosynthesis. *J Biol Chem.* 277:10691-7.
- Ulven, S.M., K.T. Dalen, J.A. Gustafsson, and H.I. Nebb. 2004. Tissue-specific autoregulation of the LXRA gene facilitates induction of apoE in mouse adipose tissue. *J Lipid Res.* 45:2052-62.
- Uyeda, K., and J.J. Repa. 2006. Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis. *Cell Metab.* 4:107-10.
- Valasek, M.A., and J.J. Repa. 2005. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ.* 29:151-9.
- Viguerie, N., L. Millet, S. Avizou, H. Vidal, D. Larrouy, and D. Langin. 2002. Regulation of human adipocyte gene expression by thyroid hormone. *J Clin Endocrinol Metab.* 87:630-4.
- Voss, A., M. Reinhart, S. Sankarappa, and H. Sprecher. 1991. The metabolism of 7,10,13,16,19-docosapentaenoic acid to 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid in rat liver is independent of a 4-desaturase. *J Biol Chem.* 266:19995-20000.
- Wilson, S.B., D.W. Back, S.M. Morris, Jr., J. Swierczynski, and A.G. Goodridge. 1986. Hormonal regulation of lipogenic enzymes in chick embryo hepatocytes in culture. Expression of the fatty acid synthase gene is regulated at both translational and pretranslational steps. *J Biol Chem.* 261:15179-82.

- Wrobel, J., R. Steffan, S.M. Bowen, R. Magolda, E. Matelan, R. Unwalla, M. Basso, V. Clerin, S.J. Gardell, P. Nambi, E. Quinet, J.I. Reminick, G.P. Vlasuk, S. Wang, I. Feingold, C. Huselton, T. Bonn, M. Farnegardh, T. Hansson, A.G. Nilsson, A. Wilhelmsson, E. Zamaratski, and M.J. Evans. 2008. Indazole-based liver X receptor (LXR) modulators with maintained atherosclerotic lesion reduction activity but diminished stimulation of hepatic triglyceride synthesis. *J Med Chem.* 51:7161-8.
- Yamamoto, T., H. Shimano, N. Inoue, Y. Nakagawa, T. Matsuzaka, A. Takahashi, N. Yahagi, H. Sone, H. Suzuki, H. Toyoshima, and N. Yamada. 2007. Protein kinase A suppresses sterol regulatory element-binding protein-1C expression via phosphorylation of liver X receptor in the liver. *J Biol Chem.* 282:11687-95.
- Zhang, Y., J.J. Repa, K. Gauthier, and D.J. Mangelsdorf. 2001. Regulation of lipoprotein lipase by the oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *J Biol Chem.* 276:43018-24.
- Zhang, Y., L. Yin, and F.B. Hillgartner. 2003. SREBP-1 integrates the actions of thyroid hormone, insulin, cAMP, and medium-chain fatty acids on ACCalpha transcription in hepatocytes. *J Lipid Res.* 44:356-68.
- Zhou, J., M. Febbraio, T. Wada, Y. Zhai, R. Kuruba, J. He, J.H. Lee, S. Khadem, S. Ren, S. Li, R.L. Silverstein, and W. Xie. 2008. Hepatic fatty acid transporter Cd36 is a common target of LXR, PXR, and PPARGgamma in promoting steatosis. *Gastroenterology.* 134:556-67.
- Zhou, J., Y. Zhai, Y. Mu, H. Gong, H. Uppal, D. Toma, S. Ren, R.M. Evans, and W. Xie. 2006. A novel pregnane X receptor-mediated and sterol regulatory element-binding protein-independent lipogenic pathway. *J Biol Chem.* 281:15013-20.
- Zoltowska, M., E. Delvin, E. Ziv, N. Peretti, M. Chartre, and E. Levy. 2004. Impact of in vivo glycation of LDL on platelet aggregation and monocyte chemotaxis in diabetic psammomys obese. *Lipids.* 39:81-5.
- Zoltowska, M., J. St-Louis, E. Ziv, B. Sicotte, E.E. Delvin, and E. Levy. 2003. Vascular responses to alpha-adrenergic stimulation and depolarization are enhanced in insulin-resistant and diabetic Psammomys obese. *Can J Physiol Pharmacol.* 81:704-10.
- Zoltowska, M., E. Ziv, E. Delvin, M. Lambert, E. Seidman, and E. Levy. 2004. Both insulin resistance and diabetes in Psammomys obese upregulate the hepatic machinery involved in intracellular VLDL assembly. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24:118-23.
- Zoltowska, M., E. Ziv, E. Delvin, D. Sinnett, R. Kalman, C. Garofalo, E. Seidman, and E. Levy. 2003. Cellular aspects of intestinal lipoprotein assembly in Psammomys obese: a model of insulin resistance and type 2 diabetes. *Diabetes.* 52:2539-45.
- Zoltowska, M., E. Ziv, E. Delvin, S. Stan, H. Bar-On, R. Kalman, and E. Levy. 2001. Circulating lipoproteins and hepatic sterol metabolism in Psammomys obese prone to obesity, hyperglycemia and hyperinsulinemia. *Atherosclerosis.* 157:85-96.

ANNEXES

Tableau I. Amorces utilisées chez l'homme

Gène	Sens	Antisens	Taille de l'amplicon	Température d'hybridation
ACC-1	acatccctacgctaaaca	agaacatcgctgacacta	85	50
ChREBP	tcggcaatgctgacatg	gaggcgggagttggtaaa	98	55
FAS	cccaatgccttgttccc	ctgtggtcccacttgatgag	87	60
SREBP1-c	tgaagacagacggagcca	ggactgttgccaagatgggt	120	60

Tableau II. Amorces utilisées chez le rat Zucker

Gène	Sens	Antisens	Taille (pb)	Température d'hybridation
ACC-1	caacgcaggcatcagaa	caagtattccacagtccc	138	50
ChREBP	cgggacatgtttgatgactatgtc	aataaaggctcggatgaggatgct	86	55
FAS	ggtgctaccattcgtg	ggatgtatcattcttgactt	115	60
SREBP1-c	cgctaccgttcctctatcaa	ttcgcagggtcaggttctcc	164	60
VLDLr	tctggagttcctagctcat	ccagtgaatttattggcacc	108	60
FAT	aggaagtggcaaagaat	tgaaggctcaaagatgg	155	60
LPL	cctgaagacacagctgagga	caccaactctcatattc	141	60
LXRα	tgcccatggacacctacat	gcggatctgttcttctgaca	112	60
SCD-1	ttcttctctacgtgggttg	ttgtagtacctcctctggaa	125	60
18S	tgaggccatgattaagaggg	agtcggcatcgtttatggtc	190	60

Tableau III. Amorces utilisées chez *Psammomys obesus*

Gènes	sens	Anti-sens	taille	Température d'hybridation
ACC-1	acatccctacgctaaaca	agaacatcgctgacacta	85	50
FAS	cccaatgccttgttccc	ctgtggtcccacttgatgag	87	60
ChREBP	cgggacatgtttgatgactatgtc	aataaaggctcggatgaggatgct	86	55
SREBP1-c	cgctaccgttcctctatcaa	ttcgcagggtcaggttctcc	81	60
LXRα	tgcccatggacacctacat	gcggatctgttcttctgaca	112	60
SCD-1	ttcttctctacgtgggttg	ttgtagtacctcctctggaa	125	60
18S	tgaggccatgattaagaggg	agtcggcatcgtttatggtc	190	60

Tableau IV. Amorces utilisées chez la souris

Gènes	Sens	Anti-sens	Taille (pb)	Température d'hybridation
ACC-1	cgctggctcttagaagttga	tccctgcygatgtatttgat	149	60
FAS	tgctgccgtgtccttctacca	gcaccaagtcctcgccata	128	60
ChREBP	gtccgatatctcgacacactc	cattgccaacataagcatgttctg	91	60
SREBP1-c	ggcactaagtgccctcaacct	gccacatagatctcttgccagtgt	81	60
FATP	cctgcggcttcaaca	tcagtggctccatcgt	84	60
FAT	ggaactgtgggctcattgc	catgagaatgcctccaaacac	68	60
ABCA-1	tcctgtgccatttattc	gttacttagtggctccttctt		60
ABCG-1	atgaatcagcgaatgttg	gttctaattgggtgcctct		60
18S	tgaggccatgattaagaggg	agtcggcatcgtttatggtc	190	60

Séquences partielles des ARNm de *Psammomys obesus*

ACC1 *Psammomys obesus* :

**TTCTACTATCCCTACGCTAAACAGAATGTCGTTTGCCTCCAACCTCAACCACTA
TGGCATGACTCAAGTAGCTAGTGTCAAGCCGATGTTCAAG**

FAT *Psammomys obesus* :

**TAGGAGNNGGCAGAATAGACGACGAATACAGGTAAACAGAGAGGTCCTTACA
CATACAGAGTTTCGTTATTTAGCCAAGGAAAATATAACTCAGGACCCCAAGGAC
AGCACTGTCTCTTTTGTACAACCCAATGGAGCCATCTTTGAT**

LPL *Psammomys obesus* :

**CACTGAAGACACAGCTGAGGACACATTGTCATCTGATTCCTGGATTAGCAGAC
TCTGTGTCTAACTGCCATTAAACCACAGCAGCAAACATTTCTGTGATCCAGGA
GAGGGTGATGCCGCTG**

LXR alpha *Psammomys obesus* :

**TTGCCCCATGGACACCTACATGCGGCGGAAATGCCAGGAGTGTGGGCTTCGC
AAATGCCGCCAGGCGGGCATGCGGGAGGAGTGTGTCTTGTGAGAAGAACCAG
ATCCGCAC**

Srebp-1c *Psammomys obesus* :

**ACGTTCTCTATCAATGACAAGATTGTGGAGCTCAAGGACCTGGTGGTGGGCA
CTGAGGCAAAGCTGAATAAATCTGCTGTCTTGCGCAAGGCCATCGACTACATC
CGCTTCTTACAGCACAGCAACCAGAACTCAAGCAGGAGAACCTGACCCTGC
GAAAGGCG**

VLDLr *Psammomys obesus* :

**TCTGGAGTTCCTAGCTCATCCTCTTGCACTCACTATATTTGAGGATCGTGTCTA
CTGGATAGACTGGAGAAAATGAAGCGGTGTATGGTGCCAATAAATTCACTGG
CA**

ChREBP *Psammomys obesus* :

**ACAANCAAGACACCACGCATGATCCNTCTNATGCCGCTTGATAATCTACACCT
ACTACCTAGACAATTATT**

RESUME en anglais

We investigated the expression and regulation of lipogenesis in aortas and VSMC and determined if it is modified during metabolic abnormalities. Zucker obese (ZO), diabetic (ZDF) rats, and the high fat diet fed *Psammomys obesus* accumulated more triglycerides in their aortas than control rats. However the expression of lipogenic genes, or of genes involved in fatty acids uptake, was not increased. Lipogenesis was not increased in human carotid endarterectomy of diabetic compared to non-diabetic patients. The adipogenic medium (ADM), glucose or insulin stimulated moderately lipogenesis but only in VSMC from control rats. No effect was observed in VSMC from ZO. We showed that the lipogenic effects of TO901317 observed in VSMC from Zucker control rats are due solely to the nuclear receptor LXR α , PXR agonist had no effect. Conclusion: Lipogenesis is not increased in arterial wall during insulin-resistance and diabetes.

Keywords: Lipogenesis; Fatty acid synthase; *Psammomys obesus*; Diabetes; Glucose; Vascular smooth muscle cells

تنظيم و تعبير الليبوجناز في الشريان الاورطي في حالة مقاومة الأنسولين و السكري ملخص

درسنا تعبير و تنظيم الليبوجناز في الشريان الاورطي و الخلايا العضلية الملساء و تحديد إذا كانت متغيرة في حالة مقاومة الأنسولين و السكري . عند الفئران من فئة زوكر البدنية و ذات السكري وكذلك فئران الصحراء هناك تراكم عال للدهون في الأوعية مقارنة مع الفئران السليمة . لكن تعبير جينات الليبوجناز الجينات المسؤولة عن امتصاص الأحماض الدهنية لم يزد عند الإنسان مقارنة مع غير مرضي السكري نتيجة مشابهة عثرنا عليها في أجزاء من الشريان اندركتومي الوسط الغني بالعوامل الدهنية الجلوكوز و الأنسولين توحدهم لهم تحفيز معتدل لليبوجناز لكن فقط في الخلايا العضلية الملساء للفئران السليمة لم يلاحظ أي تأثير في خلايا الفئران ذات السكري

لقد اثبتن أن آثار 0901317 علي الليبوجناز في الخلايا العضلية الملساء تعود فقط إلي تنشيط المستقبل النووي RX L و ان المستقبل PXR لم يكن له أي تأثير. في الأخير ليس هناك زيادة في الليبوجناز في جدران الشرايين اثناء السكري و مقاومة الأنسولين.

الكلمات الرئيسية : الليبوجناز; الأحماض الدهنية ; السكري ؛ الوعائية خلايا العضلات الملساء

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE

INSERM/ERI 22-EA4173 « Agressions vasculaires et Réponses tissulaires » Faculté de médecine Rockefeller, 8 Avenue Rockefeller 69373 Lyon cedex 08 France.

Physiologie et Physiopathologie Cellulaire et Moléculaire, Faculté des Sciences Biologiques, USTHB, BP N°32 EL ALIA Bab Ezzouar Alger, ALGERIE.
