



# **Rôle du Récepteur Hépatique LXR dans le Transport de Glucose des Macrophages Humains**

**Mémoire**

**Jorge Armando Barreto-Reyes**

**Maîtrise en Biologie Cellulaire et Moléculaire**  
Maître ès sciences (M.Sc.)

Québec, Canada

© Jorge Armando Barreto-Reyes, 2014



## Résumé

Les récepteurs nucléaires LXRs sont associés aux métabolismes des lipides, du cholestérol et des hydrates de carbone. Ses agonistes naturels seraient des dérivés oxydés du cholestérol connus sous le nom d'oxystérols. Le cholestérol et les oxystérols sont associés au développement de l'athérosclérose une maladie cardiovasculaire qui a des graves conséquences sur les sociétés modernes. L'un des facteurs de risque majeurs de l'athérosclérose est le diabète de type II. Dans cette étude, qui essaye de faire un lien entre athérosclérose et diabète, nous avons étudié les effets des LXRs sur le transport du glucose en conditions d'hyperglycémie et d'hyperglycémie/hyperinsulinémie qui sont des caractéristiques du diabète de type II. Nous avons mis en évidence que les transporteurs des hydrates de carbone Glut1, Glut3, Glut5 et Glut9 sont exprimés dans le macrophage humain THP1. Glut5 est connu comme étant un transporteur de fructose et Glut9 comme un transporteur d'urée. Nous avons démontré que Glut1 est impliqué dans le transport glucose des macrophages humain THP-1 et que ce transport est sensible à l'insuline. Tant l'activation spécifique que l'activation non spécifique de LXRs augmentent le transport de glucose dans les conditions étudiées, mais d'une manière différente. Cette étude nous a permis de démontrer qu'il pouvait y avoir un lien entre l'activation des récepteurs nucléaires LXRs sensibles aux oxystérols et une amélioration du transport du glucose dans les macrophages humains.



## Abstract

LXRs are nuclear receptors involved in lipids, cholesterol and carbohydrates metabolism. Their natural agonists are believed to be oxidized derivatives of cholesterol known as oxysterols. Cholesterol and oxysterols are associated with the development of atherosclerosis a cardiovascular disease having devastating consequences in modern societies. One of the major risk factors for atherosclerosis is type II diabetes. In this report, trying to make a link between atherosclerosis and diabetes, we attempt to demonstrate that LXRs may have an effect on glucose transport in conditions of hyperglycemia or hyperglycemia/hyperinsulinemia, two specific characteristics of type II diabetes. We found that in the THP1 human macrophage Glut1, Glut3, Glut5 and Glut9 are expressed. Glut5 is known as a fructose transporter and Glut9 as a urea transporter. We unveil that Glut1 was involved in glucose transport in human THP1 macrophages, and it was sensible to induction with insulin. Both specific and less specific activation of LXR increased glucose transport in hyperglycemic and hyperglycemic/hyperinsulinemic conditions but in a different way. This study demonstrated that activation of LXRs nuclear receptors that are sensible to oxysterols have benefic effects on glucose transport in human macrophages.



# Table des Matières

Résumé .....	iii
Abstract .....	v
Table des Matières .....	vii
Liste de Tableaux .....	ix
Liste des Figures .....	xi
Liste des Abréviations .....	xiii
Avant-Propos .....	xix
INTRODUCTION .....	1
Chapitre 1 : Les récepteurs nucléaires hépatiques LXRs .....	3
1.1 Aspects généraux sur les LXRs .....	3
1.2. Expression tissulaire et structure protéique des LXRs .....	4
1.3 Mode d'activation de la transcription des gènes cibles par les LXRs .....	4
1.4 Agonistes et antagonistes des LXRs .....	7
1.4.1 Agonistes naturels des LXRs .....	7
A. Les oxystéroïls .....	7
B. Le glucose et le glucose 6 phosphate .....	8
1.4.2 Agonistes synthétiques des LXRs .....	10
1.4.3 Antagonistes des LXRs .....	11
1.5 Rôles biologiques des LXRs .....	12
1.5.1 Transport et métabolisme du cholestérol .....	12
A. Excrétion hépatique du cholestérol .....	12
B. Absorption intestinale du cholestérol .....	13
C. Synthèse de cholestérol .....	13
D. Le transport inverse du cholestérol .....	14
1.5.2 Métabolisme des acides gras .....	15
1.5.3 Métabolisme du glucose .....	17
A. Le LXR serait un senseur du glucose .....	17
B. Effets antidiabétiques des LXRs .....	18
C. Sécrétion d'insuline .....	19
1.5.4 Rôle dans l'inflammation et la réponse immunitaire dans le macrophage .....	19
1.6 Modifications post-traductionnelles des LXRs .....	21
1.6.1 La phosphorylation .....	21
1.6.2 O-N-acétylglucosaminylation .....	22
1.6.3 L'acétylation .....	22
Chapitre 2 : Les Gluts, facilitateurs du transport des hydrates de carbone et des polyols .....	25
2.1 Structure des Gluts .....	25
2.2 Différentes classes de la famille SLC2A .....	26
2.3 Mécanisme du transport .....	27
2.4 GLUTs présents dans le macrophage .....	28
2.4.1 GLUT1 .....	29
2.4.2 GLUT3 .....	30
2.4.3 GLUT5 .....	31
Chapitre 3 : Modèle utilisé : Le macrophage humain .....	32
3.1 Macrophage et résistance à l'insuline .....	32
3.1.1 Macrophage et tissu adipeux .....	32

3.1.2 Macrophage, foie et muscle .....	34
3.2 Macrophage et athérosclérose .....	35
ARTICLE.....	37
1. Hypothèse de travail.....	37
2. Role of liver x receptor (LXR) on glucose transport in human macrophages.....	38
CONCLUSIONS ET PERSPECIVES .....	71
BIBLIOGRAPHIE .....	73



# Liste de Tableaux

Tableau 1 Les Gluts. Caractéristiques des différents Gluts. ....	26
--	----



# Liste des Figures

Figure 1. Expression tissulaire de LXR $\alpha$ et LXR $\beta$ obtenu par Northern blot analysis. ....	4
Figure 2 Activation de gènes cibles par LXR.....	6
Figure 3. Différents oxystérols produits par réaction enzymatique ou par auto-oxydation .....	7
Figure 4. Le transport inverse du cholestérol. ....	15
Figure 5. Actions de LXR $\alpha$ dans la stimulation de la lipogenèses et dans la stéatose hépatique. ....	17
Figure 6. LXRs et la réponse immunitaire. ....	21
Figure 7. Modèle schématique de la structure des membres de la famille Glut. ....	26
Figure 8. Arbre phylogénétique des différents membres de la famille du gène SCL2A. ....	27
Figure 9. Mécanisme de transport du glucose par Glut1. ....	28
Figure 10. Facteurs régulant la polarité de macrophages et la résistance à l'insuline dans le tissu adipeux. ....	33
Figure 11. L'obésité induit de changements dans le tissu adipeux, foie et muscle qui résultent dans une résistance à l'insuline. ....	34
Figure 12. Développement de la plaque d'athérosclérose au cours du temps. ....	35



## Liste des Abréviations

<b>(IKK) <math>\beta</math>:</b>	Kinase inhibitrice du facteur nucléaire Kappa $\beta$ (inhibitor of nuclear factor $\kappa$ B kinase subunit $\beta$ )
<b>20(S)-OH:</b>	20(S)-hydroxycholestérol
<b>22(R)-OH:</b>	22(R)-hydroxycholestérol
<b>24(S)-25-epoxy:</b>	24(S)-25-époxycholestérol
<b>24(S)-OH:</b>	24(S)-hydroxycholestérol
<b>27-OH:</b>	27-hydroxycholestérol
<b>7<math>\alpha</math>-OH:</b>	7 $\alpha$ -hydrocholestérol
<b>ABCA1:</b>	Transporteur de cassette de liaison à l'ATP A1 (ATP Binding Cassette A1)
<b>ABCG1:</b>	Transporteur de cassette de liaison à l'ATP G1 (ATP Binding Cassette G1)
<b>ABCG2:</b>	Transporteur de cassette de liaison à l'ATP G2 (ATP Binding Cassette G2)
<b>ABCG5:</b>	Transporteur de cassette de liaison à l'ATP G5 (ATP Binding Cassette G5)
<b>ACAT-1:</b>	Acyl-CoA : cholestérol acyltransférase-1
<b>ACC:</b>	Acétyl-CoA carboxylase
<b>AF-1:</b>	Domaine d'activation de fonction (Activation Function domain-1)
<b>AF-2:</b>	Domaine d'activation de fonction (Activation Function domain-2)
<b>AIM:</b>	Inhibiteur de l'apoptose du macrophage (Apoptosis Inhibitor of Macrophages)
<b>ANGPTL3:</b>	Protéine ressemblant à l'angiopoétine 3 (angiopoietin-like protein 3)
<b>AP1 :</b>	Activateur de la protéine 1 (Activator Protein 1)
<b>Apo E:</b>	Apolipoprotéine E
<b>BRG1:</b>	Gène 1 apparenté à Brahma (brahma-related gene 1)
<b>CBP:</b>	Protéine liant CREB (CREB Binding Protein)
<b>CCL4 :</b>	Ligand de la chimiokine avec motif C-C 4 (Chemokine C-C motif Ligand 4)
<b>ChREBP:</b>	Protéine se liant à l'élément de réponse pour les hydrates de carbone (Carbohydrate Responsive Element Binding Protein)
<b>CK2 :</b>	Caséine kinase 2
<b>COX-2 :</b>	Cyclooxygénase 2
<b>Cyp7a1:</b>	Cholestérol 7- $\alpha$ -hydroxylase
<b>DBD:</b>	Domaine de liaison à l'ADN (DNA Binding Domain)
<b>DKO:</b>	Double knock-out
<b>DR4:</b>	Répétition directe 4 (Direct Repeat 4)
<b>EC<sub>50</sub>:</b>	Concentration effective 50 (Effective Concentration 50)
<b>FAS:</b>	Synthétase des acides gras (Fatty Acid Synthase)
<b>FAT/CD36:</b>	Translocase d'acides gras (Fatty Acid Translocase/CD36)
<b>fMLP :</b>	Formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine
<b>FRET:</b>	Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (Fluorescence resonance energy transfer)
<b>FXR:</b>	Récepteur farnésioïde X (Farnesoid X Receptor)
<b>G6Pase :</b>	Glucose 6-phosphatase
<b>GGPP:</b>	Genarylgénaryl pyrophosphate
<b>GLUTs :</b>	Transporteurs de glucose (glucose transporters)

<b>hBrm:</b>	L'homologue humain de la protéine Brahma (Human Brahma)
<b>HDL:</b>	Lipoprotéines de haute densité (High Density Lipoproteins)
<b>HG</b>	Hyperglycémique
<b>HG/HI</b>	Hyperglycémique/Hyperinsulinémique
<b>HMIT :</b>	Transporteur de proton et du myo-insitol (H(+)-Myo-Inositol Transporter)
<b>IC<sub>50</sub> :</b>	Concentration inhibitrice 50 (Inhibitory Concentration 50)
<b>IGF-1 :</b>	Le facteur de croissance semblable à l'insuline (Insulin Like Growth Factor 1)
<b>IL-1<math>\beta</math> :</b>	Interleukine-1 $\beta$
<b>iNOS :</b>	La forme inductible de la synthétase de l'oxyde nitrique (Inducible Nitric Oxide Synthase)
<b>IRS :</b>	Substrat du récepteur à l'insuline (Insulin Receptor Substrate)
<b>IRS-2 :</b>	Substrat du récepteur à l'insuline 2
<b>IRS-1 :</b>	Substrat du récepteur à l'insuline 1
<b>JNK:</b>	Kinases N-terminal Jun (Jun N-terminal Kinases)
<b>LBD:</b>	Domaine de liaison pour les ligands (Ligand Binding Domaine)
<b>LDL :</b>	Lipoprotéines de faible densité (Low Density Lipoproteins)
<b>LDLR :</b>	Récepteur des LDL
<b>LPS :</b>	Lipopolysaccharides
<b>LXR:</b>	Récepteur hépatique X (Liver X Receptor)
<b>LXRE:</b>	Élément de réponse aux LXRs (LXR response elements)
<b>LXR<math>\alpha</math>:</b>	Récepteur hépatique X isotype $\alpha$
<b>LXR<math>\beta</math>:</b>	Récepteur hépatique X isotype $\beta$
<b>MAPK :</b>	Protéines kinases activées par des mitogènes (Mitogen-Activated Protein Kinases)
<b>MCP-1 :</b>	Protéine chimiotactique des monocytes-1 (Monocyte Chemotactic Protein-1)
<b>MCP-3 :</b>	Protéine chimiotactique des monocytes-3 (Monocyte Chemotactic Protein-3)
<b>MMP9 :</b>	Métallopeptidase matricielle 9 (Matrix Metallopeptidase 9)
<b>NcoR/SMRT:</b>	Corépresseur de récepteur nucléaire / le médiateur d'atténuation des récepteurs de l'acide rétinoïque et de l'hormone thyroïdienne (Nuclear Receptor Corepressor/ Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid Hormone Receptors)
<b>NF-<math>\kappa\beta</math>:</b>	Facteur nucléaire Kappa $\beta$ (Nuclear Factor- $\kappa\beta$ )
<b>O-GlcNAc :</b>	O-N-acétylglucosaminylation
<b>O-GlcNAcase:</b>	N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (O-GlcNAcase)
<b>OGT :</b>	O-linked N-acétylglucosamine (O-GlcNAc) transférase
<b>oxLDL :</b>	LDL oxydé
<b>p/CAF:</b>	Facteur associé a CREBP (CREBP Associated Factor)
<b>PAP:</b>	3'-Phosphoadénosine 5'-phosphate
<b>PDGF :</b>	Facteur de croissance dérivé des plaquettes (Platelet Derived Growth Factor)
<b>PEPCK :</b>	Phosphoénolpyruvate carboxykinase
<b>PHA :</b>	Phytohémagglutinine
<b>PI-3 kinase :</b>	Phosphatidyl-inositol-3 phosphate kinase
<b>PLTP :</b>	Protéine de transfert de phospholipides (Phospholipid Transfer Protein)
<b>PMA :</b>	Phorbol-12-myristate-13-acétate
<b>PPAR:</b>	Récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor)
<b>PXR :</b>	Récepteur de prégnane X (Pregnane X Receptor)
<b>RBP4 :</b>	Protéine se liant au rétinol-4 (Retinol Binding Protein 4)
<b>ROS :</b>	Espèces réactives à l'oxygène (Reactive oxygen species)

<b>RXR:</b>	Récepteur de l'acide rétinoïque (Retinoid X receptor)
<b>SCAP:</b>	Protéine d'activation de clivage de SRBEP (SREBP-Cleavage Activating Protein)
<b>SCD :</b>	Stéaroyl-CoA désaturase
<b>SHP :</b>	Partenaire court de l'hétérodimère (Short Heterodimer Partner)
<b>SIRT1 :</b>	Sirtuine 1
<b>SLC2A :</b>	Famille de transport de solutés 2A (Solute Carrier Family 2A)
<b>SLGT1 :</b>	Cotransporteurs glucose sodium dépendant 1(sodium-glucose linked transporter 1)
<b>SLGT2 :</b>	Cotransporteurs glucose sodium dépendant 2(sodium-glucose linked transporter 2)
<b>SR :</b>	Récepteurs d'épurations (Scavenger Receptors)
<b>SRC-1:</b>	Coactivateur des récepteurs stéroïdes (Steroid Receptor Coactivator-1)
<b>SREBP:</b>	Protéine se fixant sur l'élément de régulation des stéroïdes (Sterol Regulatory Element Binding Proteins)
<b>SREBP-1c:</b>	Protéine se liant à l'élément régulateur des stéroïdes 1-c (Sterol Regulatory Element Binding Proteins 1-c)
<b>SULTs:</b>	Sulfotransférases
<b>TAFs:</b>	Les facteurs associés à la TBP (TBP Associated Factors)
<b>TF :</b>	Facteur tissulaire (Tissue Factor)
<b>TGF-<math>\beta</math> :</b>	Facteur de croissance transformant bêta (Transforming Growth Factor $\beta$ )
<b>TLR-4 :</b>	Récepteur du type toll 4 (Toll-Like Receptor 4)
<b>TNF<math>\alpha</math> :</b>	Facteur de nécrose tumorale $\alpha$ (Tumor Necrosis Factor $\alpha$ )
<b>VDR:</b>	Récepteur de la vitamine D3 (Vitamin D Receptor)
<b>VLDL :</b>	Lipoprotéines de très faible densité (Very Low Density Lipoprotein)





**À Claudia et mes deux petits soleils Daniela et Guillaume**



## Avant-Propos

Très médiatisé dans des émissions de télévision, la presse spécialisée ou les publications pour le grand public, est la perception de que nous sommes en présence d'une augmentation des maladies cardiovasculaires. Nous tous, avons, autour de nous, dans nos familles ou parmi nos amis, des personnes qui ont été atteintes d'une manière ou d'une autre par cette affection, qui résulte de mauvaises habitudes de vie, d'une mauvaise alimentation, d'une prédisposition génétique et/ou d'un manque d'activité physique. Les maladies cardiovasculaires, l'obésité et le diabète de type II sont des maladies qui font souvent parti d'une triade car étroitement associées. Leurs effets sur la santé et l'économie, sans compter tous les drames personnels qu'elles génèrent, sont énormes. D'où l'intérêt de développer des études pour mieux les comprendre et les caractériser. L'étude que j'ai entreprise veut apporter un petit grain de sable à l'édifice des connaissances dont nous avons besoin pour combattre efficacement le diabète de type II et les maladies cardiovasculaires.

Je vais profiter aussi pour remercier mon directeur de maîtrise le docteur Christophe Garenc. C'est grâce à sa vision et ses connaissances approfondies dans la matière que cette étude a pu être réalisée. Je le remercie également pour sa patience envers moi et sa gentillesse. Aussi je voudrais remercier le docteur André Murette pour ses importantes suggestions et conseils ainsi que pour son appui au projet.



# INTRODUCTION

La littérature démontre que le diabète de type II augmente le risque de morbidité et le taux de mortalité des maladies cardiovasculaires (Beckman, Creager & Libby, 2002). L'athérosclérose, à l'origine des maladies cardiovasculaires, est un état inflammatoire chronique associée à un désordre lipidique (Ross, 1999). Les manifestations cliniques de l'athérosclérose se produisent principalement dans trois régions du système vasculaire : les artères coronaires, les extrémités inférieures et les artères carotidiennes extra-crâniennes. Le diabète de type II, quant à lui, est une maladie évolutive et métabolique de l'insuline qui entraîne une augmentation du taux de sucre dans le sang (hyperglycémie) et qui engendre de multiples dégradations à long terme sur le système vasculaire telles que les maladies microvasculaires (rétinopathies, néphropathies et neuropathies) et macrovasculaires (infarctus du myocarde et accident vasculaire cérébral) (Rahman et al., 2007). C'est surtout au niveau des artères coronaires que le diabète de type II cause les effets les plus néfastes. En effet, les altérations coronariennes sont la cause principale de morbidité et mortalité des patients diabétiques de type 2 puisque 75% d'entre eux vont décéder suite à des complications associées aux maladies cardiovasculaires (Lee et al., 2000; Booth et al., 2006). Aussi, les personnes diabétiques ont de 2 à 4 fois plus de risque de développer l'athérosclérose que les sujets non diabétiques (Beckman et al., 2002). Ainsi, il devient maintenant évident que le diabète de type II est fortement associé au développement précoce et à l'évolution de la lésion athérosclérotique (Bierman, 1992; Fisher, 2004; Krolewski et al., 1987). D'après des études d'analyses postmortem sur des sujets humains, 75 % des diabétiques qui ne présentaient pas de signes cliniques de maladies cardiovasculaires avaient en fait développé de l'athérosclérose coronarienne sévère et plus de la moitié avaient plusieurs vaisseaux sanguins affectés (Goraya et al., 2002).

En plus d'être la cause principale de mortalité et de morbidité chez les diabétiques, le diabète de type II et ses conséquences cardiovasculaires représentent un fardeau important sur les couts du système de santé (Jhonson, Pohar & Majumdar). En effet, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) prévoit qu'en 2030, au moins 180 millions de personnes seront atteintes du diabète de type II (Wild et al., 2004). La question qui se pose dès lors est la relation entre diabète et athérosclérose. Est-ce le diabète de type II qui est la cause de l'athérosclérose? Ou bien, est-ce un facteur impliqué dans la genèse du diabète de type II qui est aussi impliqué dans le développement de l'athérosclérose? Pour le moment, personne n'a de réponse exacte mais certaines études commencent à faire un lien entre les mécanismes associés au diabète de type II et à l'athérosclérose. Une étude réalisée par Mitro (Mitro et al., 2007) a proposé qu'un récepteur nucléaire, le récepteur hépatique X (LXR) qui est impliqué dans le métabolisme du cholestérol, serait également un senseur du glucose. Cette proposition est intéressante puisque les oxystérols, dérivés oxygénés du cholestérol et activateurs des LXRs, sont impliqués dans l'athérogénèse et que l'hyperglycémie est une

conséquence directe du diabète de type II, démontrant alors la possibilité que LXR soit le facteur commun de ces deux maladies.

Un dernier acteur impliqué dans la relation entre l'athérosclérose et le diabète de type II est le macrophage. D'une part, les macrophages sont impliqués dans plusieurs phénomènes liés à l'athérosclérose, tels que, la phagocytose lipidique, la réparation de la plaque, la rupture de la plaque, l'inflammation et le phénomène d'auto-immunité lié à l'athérosclérose. D'autre part, il est bien connu que plusieurs facteurs de risque tels que l'inflammation et l'hypercholestérolémie influencent le recrutement et l'activation des macrophages dans les plaques athérosclérotiques (Boyle, 2005). Également, des interactions entre macrophages pro-inflammatoires et adipocytes sont impliquées dans la résistance à l'insuline (l'une des étapes initiatrices du diabète de type II), au niveau des tissus périphériques. De la même manière, une mauvaise signalisation insulinique au niveau des cellules de la paroi vasculaire (incluant le macrophage) peut promouvoir le développement de l'athérosclérose (Liang et al., 2007).

Dans ce mémoire de maîtrise, nous allons essayer de mettre en évidence une possible relation entre le diabète de type II et l'athérosclérose par l'intermédiaire de l'étude du transport de glucose dans des macrophages humains. Dans un premier temps, nous avons testé si ce transport du glucose est en partie dépendant de l'activation des LXRs. Dans un second temps, nous avons vérifié si des conditions d'hyperglycémie ou hyperglycémie/hyperinsulinémie, qui imitent des états métaboliques associés au diabète de type II, peuvent affecter la signalisation des LXRs, et par conséquent limiter le transport du glucose des macrophages.

Avant d'aborder ces deux points importants et afin d'apporter une meilleure compréhension de la problématique, nous allons nous intéresser à quelques notions de base sur les différents acteurs dont les interactions font le pont entre le diabète de type II et l'athérosclérose.

# Chapitre 1 : Les récepteurs nucléaires hépatiques LXRs

## 1.1 Aspects généraux sur les LXRs

Les récepteurs hépatiques X (LXRs) sont des facteurs de transcription qui appartiennent à la super famille de récepteurs nucléaires dont l'activation dépend des ligands spécifiques de type lipidique, tels les oxysterols (Baranowski, 2008). Ils ont été ainsi nommés après avoir été identifiés dans des banques d'ADNc de foie de rat (Apfel et al., 1994; Willy et al., 1995). Les LXRs sont représentés par deux isotopes appelés LXR $\alpha$  et LXR $\beta$ , (Ulven et al., 2005). Une expression importante de LXR $\alpha$  est limitée aux tissus impliqués dans le métabolisme du cholestérol, alors que LXR $\beta$  est exprimé de façon ubiquitaire (Repa & Mangelsdorf, 2000) (Figure 1). Ces récepteurs forment un hétérodimère avec le récepteur de l'acide rétinoïque (RXR) avant de se lier à des sites spécifiques au niveau des promoteurs des gènes cibles, appelés élément de réponse aux LXRs (LXRE : LXR response elements). En absence des ligands, les LXRs recrutent des complexes de corépresseurs de la transcription. Suite à la liaison d'un ligand spécifique sur LXR, le complexe des corépresseurs est échangé pour des coactivateurs de la transcription (Figure 2) qui induisent alors la transcription du gène qu'ils régulent (Baranowski, 2008). Les agonistes endogènes des LXRs sont principalement des dérivés oxydés du cholestérol nommés oxystérols (Figure 3) (Lehmann et al., 1997). Au début, LXR a été signalé comme un important régulateur du métabolisme lipidique capable de protéger les cellules d'une surcharge de cholestérol puisqu'il stimule le rétro-transport du cholestérol vers le foie. Récemment, un rôle plus complexe a été attribué aux LXRs en tant que régulateurs du métabolisme des lipides et des hydrates de carbone (Baranowski, 2008). En effet, l'équipe de Mitro (Mitro et al., 2007) a suggéré que le glucose et le glucose-6-P peuvent activer les LXRs. Ces résultats restent malgré tout controversés puisque le glucose est incapable d'influencer l'interaction des cofacteurs avec les LXRs et que les LXRs ne sont pas impliqués dans la régulation de gènes clés du métabolisme du glucose dans le foie de souris (Denechaud et al., 2008). Bien que les agonistes endogènes des LXRs les mieux acceptés soient les oxystérols, plusieurs agonistes synthétiques des LXRs ont montré de puissantes activités anti-athérogéniques dans des modèles de souris (Joseph et al., 2002b), mais qui entraînent de la stéatose hépatique et de l'hypertriglycéridémie (Schultz et al., 2000; Chu et al., 2006). Fait intéressant tout de même, malgré leur activité lipogénique, les agonistes des LXRs possèdent aussi des propriétés antidiabétiques que nous aborderons plus tard (Baranowski, 2008).

## 1.2. Expression tissulaire et structure protéique des LXRs

Chez les mammifères, les LXRs sont représentés par deux isotypes, LXR $\alpha$  (NR1H3) et LXR $\beta$  (NR1H2). LXR $\alpha$  est abondamment exprimé dans des tissus en relation avec le métabolisme du cholestérol tels que les macrophages, les tissus adipeux brun et blanc, le rein, le foie et les intestins, alors que LXR $\beta$  est exprimé de façon ubiquitaire mais à un niveau d'expression plus faible (Figure 1) (Apfel et al.,1994; Willy et al., 1995). Dans le macrophage, LXR $\alpha$  y est moins exprimé que dans le foie, mais son expression est plus importante que celle de LXR $\beta$  (Quinet et al., 2006). Les deux isotypes partagent 80% d'homologie dans leur séquence d'acides aminés (Wójcicka et al.,2007). La structure protéique des LXRs possède 4 domaines principaux : 1) un domaine N-terminal indépendant du ligand qui peut stimuler la transcription en absence du ligand et qui est appelé domaine d'activation de fonction (AF-1 : Activation Function domain-1); 2) un domaine de liaison à l'ADN (DBD : DNA Binding Domain) contenant deux doigts zinc qui reconnaissent l'élément de réponse aux LXRs (LXRE); 3) un domaine de liaison pour les ligands (DBD : Ligand Binding Domain) constitué d'une pochette hydrophobe nécessaire à la liaison avec le ligand et la dimérisation du récepteur avec son partenaire RXR; et 4) un domaine C- terminal dépendant du ligand qui est connu sous le nom de AF-2 (activation fonction domain-2) qui stimule la machinerie de la transcription en réponse à l'activation par un ligand (Wójcicka et al.,2007).

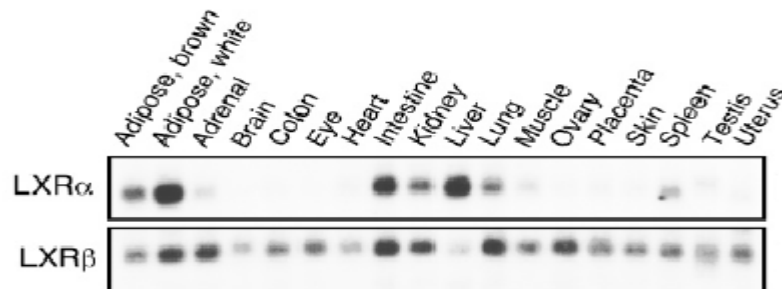


Figure 1. Expression tissulaire de LXR $\alpha$  et LXR $\beta$  obtenu par Northern blot analysis.

(Repa & Mangelsdorf, 2000)

## 1.3 Mode d'activation de la transcription des gènes cibles par les LXRs

LXR $\alpha$  et LXR $\beta$  forment tous les deux des hétérodimères avec le récepteur rétinoïde (RXR) qui est un partenaire commun pour plusieurs récepteurs nucléaires tels que le récepteur activé par les proliférateurs des peroxyosomes (PPAR), le récepteur à la vitamine D3 (VDR) et le récepteur farnesoïde X (FXR) (Willy et al., 1995). L'hétérodimère LXR/RXR est appelé « permissif » puisqu'il peut être activé soit par des agonistes de LXR, soit par l'acide 9-cis rétinoïque qui est le ligand spécifique de RXR. Lorsque les deux agonistes de LXR et RXR sont administrés en même temps, la réponse obtenue est additive et plus forte que pour chaque agoniste utilisé seul. Le complexe LXR-RXR reconnaît et se lie à une séquence consensus de l'ADN nommé



LXRE. Le LXRE idéal est une séquence répétée qui comprend deux hexamères (AGGTCA) séparés par 4 nucléotides, communément appelé DR4 (Direct Repeat 4). L'analyse fonctionnelle des LXREs en amont des gènes cibles a montré que la séquence consensus présente dans certaines positions des nucléotides qui ne changent pas ou peu et dans d'autres positions des nucléotides avec une grande variabilité (Wójcicka et al., 2007). La régulation de la transcription de gènes cibles par LXR se base sur le modèle de l'hétérodimère formé par le récepteur de l'hormone thyroïdienne/RXR qui a été proposé par Wong et al (Wong, Shi & Wolffe, 1995). Lorsque leurs ligands ne sont pas présents, l'hétérodimère LXR/RXR se lie au LXRE situé au niveau du promoteur du gène cible et interagit directement ou indirectement avec des corépresseurs incluant les protéines du complexe formé par le corépresseur de récepteur nucléaire et le médiateur d'atténuation de l'acide rétinoïque et de l'hormone thyroïdienne (NcoR/SMRT), le gène 1 apparenté à Brahma (BRG1) et l'homologue humain de la protéine Brahma (hBrm) (figure 2A). Dans ces circonstances, la transcription du gène cible n'est pas effective. Lorsqu'un ligand se lie à un des partenaires de l'hétérodimère, un changement de configuration spatiale de l'hétérodimère va déplacer les corépresseurs et des coactivateurs vont s'y lier, tels que les protéines impliquées dans l'acétylation comme le couple p300/protéine liant CREB (CBP), le facteur associé à CREBBP (p/CAF) et aussi des protéines du remodelage de la chromatine comme le complexe médiateur et les facteurs associés à la TBP (TAFs). C'est alors que la transcription basale peut avoir lieu (Figure 2B). Quand les deux partenaires de l'hétérodimère se lient à leurs ligands respectifs, d'autres coactivateurs sont mobilisées (coactivateur des récepteurs stéroïdes (SRC-1) et P220/205) stabilisant le complexe protéique ainsi formé qui est alors nommé l'enhanceosome. Dans ces conditions, la transcription est fortement activée (Figure 2C) (Glass & Witztum, 1997; Edwards, Kennedy & Mak, 2002). Ce modèle propose que les niveaux d'expressions des ARN des gènes cibles doivent être faibles dans les cellules non exposées aux agonistes de LXR et doivent être élevés pour les mêmes cellules traitées par des activateurs de LXR ou de RXR. Le modèle propose également que la délétion des deux gènes des LXRs va permettre un niveau d'expression basal identique en présence ou en absence d'agonistes. D'ailleurs, le modèle suggère que le niveau des ARNm des gènes cibles dans les souris  $LXR\alpha/LXR\beta^{DKO}$  va être intermédiaire entre un état de transcription non effectif et l'état activé de la souris sauvage, et que ce niveau n'est pas augmenté suite à l'action de LXR par son agoniste (Edwards et al., 2002). Des preuves en faveur du modèle ont été apportées dans des études de la régulation des ARNm de ABCG1 (Venkateswaran et al., 200), de ABCA1 (Repa et al., 2000b), de l'apolipoprotéine E (Apo E) (Laffitte et al., 2001) et de la protéine se fixant sur l'élément de régulation des stéroïdes (SREBP) (Repa et al., 2000a).

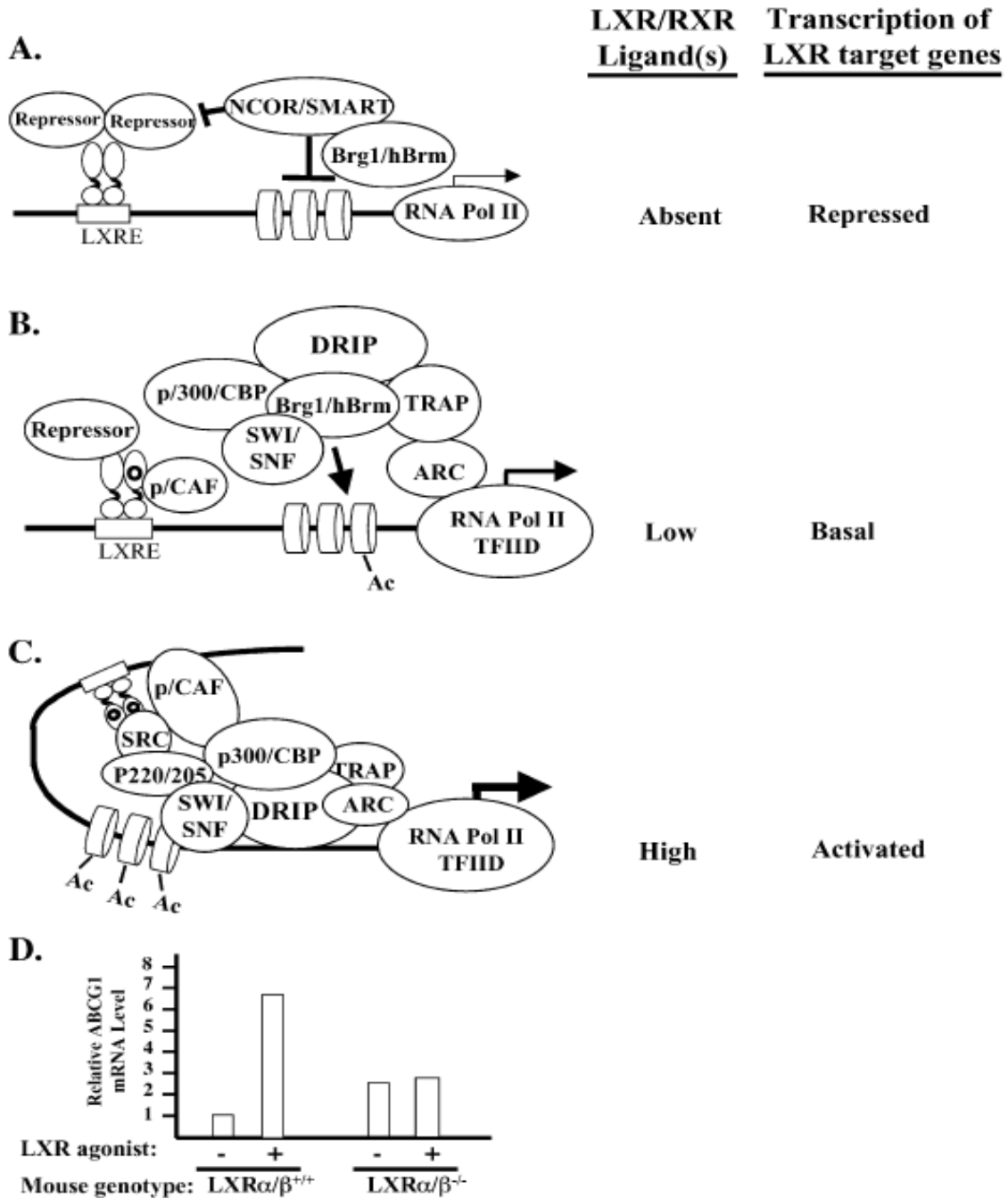


Figure 2 Activation de gènes cibles par LXR

A. En absence de ligand, la transcription est non effective.

B. Lorsqu'un ligand se lie, les corépresseurs sont déplacés par les coactivateurs, ce qui induit une transcription basale.

C. Les deux ligands se lient, l'enhanceosome est stabilisé avec induction d'une forte transcription (Edwards et al., 2002).

## 1.4 Agonistes et antagonistes des LXR

### 1.4.1 Agonistes naturels des LXR

#### A. Les oxystérols.

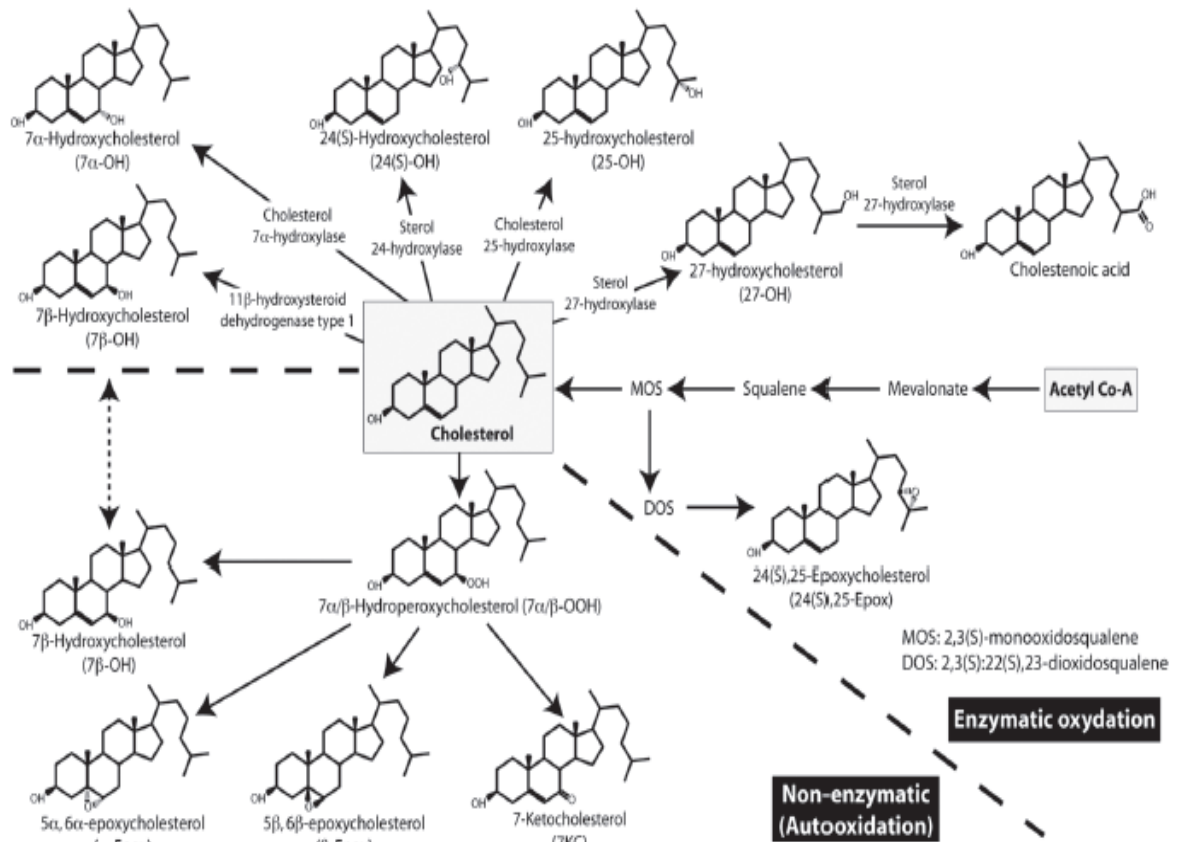


Figure 3. Différents oxystérols produits par réaction enzymatique ou par auto-oxydation (Garenc et al., 2010)

La littérature montre que les ligands physiologiques les plus importants de LXR sont des dérivés oxygénés du cholestérol connus sous le nom d'oxystérols (Janowski et al., 1996 ; Lehmann et al., 1997). La valeur du EC50 (qui est la concentration d'une drogue, anticorps ou molécule toxique, qui induit une réponse à mi-chemin entre le maximum et la réponse basale) pour la plupart des oxystérols est de l'ordre du  $\mu\text{M}$  correspondant à des concentrations physiologiques de ces molécules dans le plasma et les tissus (Wójcicka et al., 2007). Les oxystérols proviennent de trois sources principales: 1) production enzymatique endogène; 2) production endogène générée par interaction avec des ROS (reactive oxygen species) et 3) oxystérols provenant de l'alimentation (Wójcicka et al., 2007). De façon générale, les oxystérols produits par des réactions enzymatiques sont des activateurs de LXR alors que ceux produits de façon non enzymatique sont de faibles

activateurs (Wójcicka et al., 2007). La biosynthèse enzymatique des oxystérols génère trois types d'intermédiaires : **1**) des intermédiaires de la voie de biosynthèse du cholestérol, comme par exemple, 24(S),25-epoxycholestérol (24(S)-25-epox); **2**) des intermédiaires de la synthèse d'hormones stéroïdes tels que le 22(R)-hydroxycholestérol (22(R)-OH) et le 20(S)-hydroxycholestérol (20(S)-OH) et **3**) des hydroxycholestérols tels que le 27-hydroxycholestérol (27-OH), le 25-hydroxycholestérol (25-OH), le 7 $\alpha$ -hydroxycholestérol (7 $\alpha$ -OH) et le 24(S)-hydroxycholestérol (24(S)-OH) produits à partir du cholestérol par des stérols hydroxylases (Wójcicka et al., 2007). Dans la plupart des études, les oxystérols qui activent les LXRs sont le 22(R)-OH, le 20(S)-OH (intermédiaires de la synthèse des hormones stéroïdes), le 24(S)-OH (appelé aussi cérébrostérol qui est produit dans le cerveau et très abondant dans le plasma), et le 24(S)-25-epox. Le 25-OH et le 27-OH ont une plus faible affinité (Janowski et al., 1999; 1996; Baranowski, 2008) bien que le 27-OH soit reconnu comme étant l'activateur endogène principal des LXR dans les conditions physiologiques (Garenc, Julien & Levy, 2010; Fu et al., 2001). Le groupe hydroxyle de la chaîne latérale de la molécule de cholestérol de même que le groupe 3 $\beta$ -hydroxyle sont essentiels pour l'activation des LXRs. Les oxystérols avec un groupe 3 $\alpha$ -hydroxyle présentent quant à eux une affinité moindre (Wójcicka et al., 2007).

Les oxystérols se forment par hydroxylation de chaînes latérales de la molécule de cholestérol. Chez l'humain, les oxystérols les plus abondants dans la circulation sanguine sont le 24(S)-OH et le 27-OH (Björkhem, 2007; Babiker & Diczfalusy, 1998; Garenc et al., 2010). La biosynthèse de ces oxystérols est beaucoup plus rapide que celle du cholestérol et c'est pour cette raison que leurs concentrations plasmatiques peuvent être perçues comme un bon indicateur du stress oxydatif associé au métabolisme du cholestérol en plus d'être de possibles candidats en tant que molécules régulatrices (Wójcicka et al., 2007). En complément de leur implication dans la régulation de l'expression des gènes associés à la biosynthèse de lipides et stérols (Peet et al., 1998), à l'efflux du cholestérol (Costet et al., 2000; Sabol, Brewer & Santamarina-Fojo, 2005) et à la diminution de l'absorption du cholestérol intestinale (Yu et al., 2003; Garenc et al., 2010), les oxystérols ont des fonctions très importantes en tant que : (a) substrats pour la formation des acides biliaires et (b) activateurs du rétrotransport du cholestérol des tissus périphérique vers le foie (Garenc et al., 2010). Malheureusement, des états pathologiques sont également associés aux oxystérols lorsque leurs concentrations deviennent plus importantes, tels que leur implication dans l'athérosclérose (Takahashi, Takeya & Sakashita, 2002; Garenc et al., 2010) et dans la maladie d'Alzheimer (Jamroz-Wiśniewska et al., 2007; Garenc et al., 2010).

Bien que des nombreux arguments démontrent que les oxystérols sont des ligands physiologiques des LXRs, des chercheurs mettent en doute le rôle régulateur de ces molécules puisque, par rapport au cholestérol, nous retrouvons dans le système tout au plus 1 molécule d'oxystérols pour 1000 molécules de cholestérol (Björkhem, 2002).

### *B. Le glucose et le glucose 6 phosphate*

En plus de leurs actions sur le métabolisme du cholestérol et des lipides, les LXR agissent sur le métabolisme du glucose. C'est ainsi que leurs ligands synthétiques GW3965 et T0901317 induisent des effets antidiabétiques en diminuant le flux de glucose provenant du foie et augmentant son utilisation périphérique (Laffitte et al., 2003; Cao et al., 2003). Puisque les LXRs sont des récepteurs nucléaires dont les agonistes sont des métabolites impliqués dans les voies qu'ils contrôlent, il devient logique de se poser la question si le glucose ou un de ses métabolites peuvent les activer. Cette possibilité a été abordée par l'équipe de Mitro (Mitro et al., 2007). Dans une première série d'expériences, des cellules hépatiques humaines HepG2 ont été transfectées avec des constructions chimériques contenant le domaine de liaison au ligand (LBD) des LXRs et le domaine de liaison à l'ADN (DBD) du gène Gal4 de levure avant de tester plusieurs molécules pour l'induction d'un gène rapporteur. Une réponse très forte a été obtenue avec le D-glucose et le glucose 6-P. Par la suite, l'induction de la formation de l'hétérodimère LXR-RXR par le glucose ainsi que l'activation de la transcription de gènes cibles des LXRs a été examinée en transfectant le même type de cellules avec des vecteurs d'expression des LXRs et de RXR avec un gène rapporteur contenant deux copies du LXRE. Le D-glucose et le D-glucose 6-phosphate ont été capables d'induire le gène rapporteur. Le D-glucose et le D-glucose 6-phosphate, induisent une meilleure réponse de la part de LXR $\beta$  que de LXR $\alpha$ . Suite à des expériences voulant tester le recrutement de coactivateurs, ces auteurs ont conclu que le D-glucose, mais également D-glucose-6-phosphate, sont capables de se lier directement aux LXRs. Des expériences de compétitions ont aussi été réalisées en présence de D-glucose et d'agoniste synthétique et ont suggéré que les agonistes synthétiques bien connus des LXRs ne déplacent que partiellement le D-Glucose. Ces résultats suggèrent la présence de deux sites de liaison donc un site commun aux agonistes connus de LXR et un autre site non compétitif. En fait, dans ces expériences le D-glucose est capable de se lier à plus d'un site et est ainsi capable d'agir en synergie avec d'autres agonistes synthétiques. Finalement, des expériences voulant vérifier l'importance physiologique du glucose dans l'activation des LXRs ont été réalisées. Les profils d'expressions de gènes cibles des LXR ont été comparés suite à une activation avec le D-glucose ou l'agoniste synthétique spécifique (GW3965) des LXRs dans des cellules HepG2. Pour des cellules cultivées en absence de glucose (ou en faible concentration), les deux molécules ont stimulé l'expression de gènes associés avec la synthèse d'acides gras et ont réprimé l'expression de gènes de gluconéogenèse. Finalement, chez des souris dont l'alimentation contenait le GW3965 et des souris dont le glucose ou le sucrose était la seule source d'hydrates de carbone, les deux groupes ont présenté une induction du profil d'expression hépatique similaire tendant à limiter le flux de glucose du foie et augmentant la synthèse d'acides gras. Dans leur discussion, Mitro et ses collaborateurs suggèrent que l'effet sur la lipogenèse de l'insuline serait dû aux LXRs : l'insuline augmenterait la concentration intracellulaire de glucose qui activerait LXR, qui à son tour, induirait la transcription de la protéine se liant à l'élément régulateur des stérols 1-c (SREBP-1c) et ChREBP qui sont des éléments régulateurs des différents gènes impliqués dans la lipogenèse et qui sont des gènes cibles de LXR (Repa et al., 2000a). Également, ces mêmes auteurs soutiennent que les LXRs pourraient

influencer le destin du glucose hépatique grâce à leur action sur la protéine se liant à l'élément de réponse pour les hydrates de carbone (ChREBP) qui est aussi un élément régulateur de la glycolyse. Les LXRs seraient alors considérés comme étant des commutateurs métaboliques qui moduleraient le métabolisme glucidique hépatique et la synthèse des acides gras. Quelques-uns de ces résultats ont été contestés par Denechaud et son équipe (Denechaud et al., 2008). Plus spécifiquement, ils mettent en doute l'hypothèse que les LXRs soient les facteurs déterminants de la régulation de la voie métabolique du glucose dans le foie, puisqu'ils affirment que c'est ChREBP qui en est responsable, et ceci, d'une façon totalement indépendante des LXRs. Leur première interrogation est le choix des cellules HepG2 par l'équipe de Mitro et al, qui est une lignée cellulaire qui ne répond pas bien au glucose. Bien que ChREBP soit un gène cible des LXRs, lorsque Denechaud et son équipe ont utilisé un agoniste des LXRs avec des souris de type sauvage, ils ont constaté qu'il n'y avait pas de phosphorylation de ChREBP et de translocation nucléaire en absence d'un flux hépatique de glucose. D'autre part, l'induction de ChREBP et des gènes cibles par le D-glucose est similaire chez les souris sauvages et les souris invalidées pour LXR $\alpha$  et LXR $\beta$ , ce qui suggère que l'activation de ses gènes par le glucose se fait par un mécanisme indépendant des LXRs. Cette équipe de recherche a également signalé que le glucose n'a pas pu induire l'interaction entre les LXRs et des cofacteurs spécifiques. Récemment Anthonisen et al. (Anthonisen et al., 2010) ont proposé que l'action du D-glucose sur les LXRs ne se fait pas directement sur le récepteur mais est réalisé suite à des changements post-transcriptionnels de la protéine associés à une réaction de O-N-acétylglucosaminylation ou O-GlcNAc que nous aborderons en détail un peu plus loin.

#### 1.4.2 Agonistes synthétiques des LXRs

Deux agonistes synthétiques non stéroïdes sont communément utilisés pour activer les LXRs. Le T0901317 active LXR $\alpha$  et LXR $\beta$  avec une EC<sub>50</sub> de 20 nM (Schultz et al., 2000) alors que le GW3965 a une plus grande affinité pour LXR $\beta$  (EC<sub>50</sub> = 30 nM) que pour LXR $\alpha$  (EC<sub>50</sub> = 190 nM), cependant cette différence est trop petite pour permettre d'activer sélectivement les deux isotypes (Wójcicka et al., 2007). Le T0901317 n'est pas un agoniste totalement sélectif de LXR puisqu'il est capable d'activer également le récepteur de pregnane X (PXR) (Edwards et al., 2002) et le récepteur farnesoïde X FXR (Farnesoid X Receptor). Fait important tout de même, l'affinité de T0901317 pour ces deux récepteurs nucléaires (EC<sub>50</sub> = 4 – 7 $\mu$ M) est beaucoup plus faible que pour LXR (Houck et al., 2004). récemment, un nouveau groupe d'agonistes sélectif de LXR $\beta$ , les N-acylthiadiazolines, a été identifié (Molteni et al., 2007).

### 1.4.3 Antagonistes des LXRs

Le geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP), un des produits de la voie métabolique du mévalonate, inhibe l'activité transcriptionnelle induite par LXR $\alpha$  et LXR $\beta$  puisqu'il entrave l'interaction entre LXR et ses coactivateurs (Gan et al., 2001). Les acides gras polyinsaturés de familles des  $\omega$ 3 et  $\omega$ 6 sont des antagonistes compétitifs des ligands synthétiques des LXRs (Ou et al., 2001). Finalement, les sulfonates-3 d'oxystérol, tel que 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epoxycholestérol-3-sulfonate, entravent l'activité transcriptionnelle induite par les LXRs. Ils peuvent être le résultat de l'auto-oxydation du cholestérol-3-sulfonate ou de la sulfonation du 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epoxycholestérol suite à l'activité des sulfotransférases (SULTs) (Song, Hiipakka & Liao, 2000; Wójcicka et al., 2007). Les SULTs sont une famille d'enzymes qui peuvent se localiser dans le cytosol ou qui s'associent à des membranes biologiques et qui métabolisent des substrats très variés en allant des xénobiotiques jusqu'aux oxystérols. Lorsqu'elles agissent sur les oxystérols, ces enzymes transfèrent un groupe  $-\text{SO}_3^-$  provenant du cofacteur 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAP) sur la position 3-hydroxyl du substrat. C'est ainsi que la surexpression d'une cholestérol sulfotransférase, la SULT2B1b, génère des ligands qui inactivent la signalisation des LXRs et réduisent l'expression de ses gènes cibles tant *in vitro* (cellules rénales humaines HEK 293) que *in vivo* (chez la souris) (Chen et al., 2007). Tout récemment, Cook et ses collaborateurs ont signalé que le 24-(S)-OH pourrait être une molécule importante dans la régulation de l'activité des LXRs, puisqu'en plus d'être un agoniste du récepteur nucléaire, cet oxystérol devient un puissant inhibiteur de l'activité du récepteur nucléaire suite à une réaction de sulfonation par la sulfotransférase (Cook et al., 2009). Cette équipe de recherche a démontré que le 24-(S)-OH peut subir une réaction de sulfonation sous l'action de trois isoformes des SULTs soient les SULT2A1, SULT1E1 et SULT2B1b. Les SULT2A1 et SULT1E1 sont capables de sulfonyler le 24(S)-OH aux positions 3-hydroxy et 24-hydroxy pour former les monosulfates 24-hydrocholestérol-3sulfate (24-OH-3S) et le 24-hydrocholestérol-24 sulfate (24-OH-24S) tout comme le disulfate 24-hydroxycholestérol-3,24-disulfate (24-OH-3S,24S). Le produit de la réaction avec la SULT2B1b est par contre uniquement le monosulfate (24-OH-3S). Ensuite, les auteurs ont testé la sensibilité des dérivés sulfonylés vis-à-vis d'une sulfatase. Les formes sulfonylées 24-OH-3S,24S et 24-OH-3S ont été testées par la sulfatase stéroïdienne humaine placentaire. Cette enzyme hydrolyse le 24-OH-3S totalement, régénérant ainsi le 24-(S)-OH. Par contre, son action sur le 24-OH-3S,24S n'est que partielle puisqu'elle produit le monosulfate 24-OH-24S indiquant que le 24-OH-24S est une forme résistante à l'action de cette sulfatase. Comme déjà mentionné, le 24(S)-OH est un agoniste de LXR mais ses deux dérivés monosulfatés, les 24-OH-3S et 24-OH-24S, n'ont pas démontré de propriété activatrice de LXR. Au contraire, ils sont présentés comme des antagonistes de l'activation de LXR par T0901317 avec des IC<sub>50</sub> de 0,15  $\mu\text{M}$  (24-OH-3S) et de 0,31  $\mu\text{M}$  (24-OH-24S) (Cook et al., 2009). Pris ensemble, ces données indiquent que les SULTs, la sulfatase, le 24(S)-OH et ses dérivés sulfonylés sont importants dans la régulation de LXR. Le 24(S)-OH active LXR alors que les SULTs en transformant le 24(S)-OH en un dérivé sulfonylé, l'inhibent. La sulfatase peut alors être amenée à

produire des oxystérols permettant une réactivation des LXRs par la reformation de 24(S)-OH à partir du dérivé sulfonyle. Un système de régulation de type phosphorylation-déphosphorylation est ainsi suggéré.

## 1.5 Rôles biologiques des LXRs

### 1.5.1 Transport et métabolisme du cholestérol

L'identification des oxystérols comme étant les ligands endogènes des LXRs a été un des indices impliquant LXR dans l'homéostasie du cholestérol. En effet, les connaissances cumulées à ce jour démontrent que les LXRs régulent les niveaux d'expressions d'un ensemble de gènes associés au transport inverse du cholestérol (Baranowski, 2008).

#### *A. Excrétion hépatique du cholestérol*

Une étude démontre que des souris traitées par l'agoniste T0901317 augmentent la sécrétion de cholestérol biliaire (Yu et al., 2003). D'autre part, des souris déficientes en LXR $\alpha$  et soumises à une alimentation riche en cholestérol développent une accumulation hépatique importante d'esters de cholestérol avec apparition d'une hépatomégalie et une hypercholestérolémie. Ce phénotype résulte de l'incapacité de LXR $\alpha$  à augmenter l'expression du cholestérol 7- $\alpha$ -hydroxylase (Cyp7a1) qui est l'enzyme limitante clé de la synthèse des acides biliaires. Bien que LXR $\beta$  soit fonctionnel dans le foie, il ne peut pas compenser complètement l'absence de LXR $\alpha$ , en premier lieu parce que l'expression hépatique de LXR $\beta$  est très faible (voir Figure 1), mais aussi parce que le LXRE de Cyp7a1 a une réponse beaucoup plus forte pour LXR $\alpha$  que pour LXR $\beta$  (Peet et al., 1998). Les souris déficientes en LXR $\beta$  présentent un métabolisme du cholestérol normal et peuvent s'adapter à un excès de cholestérol dans leur alimentation, renforçant ainsi le rôle clé de LXR $\alpha$  dans la gestion hépatique du cholestérol (Alberti et al., 2001). Contrairement aux rongeurs, le promoteur du gène Cyp7a1 humain n'est pas induit par LXR $\alpha$ , puisque le LXRE n'y est pas présent. L'activation de LXR $\alpha$  aurait même un effet opposé à celui de rongeurs, puisque LXR $\alpha$  serait capable de diminuer le niveau d'expression de Cyp7a1 humain par l'intermédiaire d'un de ses gènes cibles, la protéine partenaire courte de l'hétérodimère (SHP) (Goodwin B et al., 2003). Chez la souris en plus de stimuler la synthèse des acides biliaires, LXR potentialise l'excrétion de cholestérol en augmentant les niveaux de transcription des transporteurs de cassette de liaison à l'ATP G5 et G2 (ABCG5 et ABCG8) dans le foie (Repa et al., 2002; Yu et al., 2003). Ces transporteurs se situent au niveau des membranes des hépatocytes qui délimitent les canalicules responsables de transporter le cholestérol vers la bile (Yu et al., 2002; Baranowski, 2008).



### *B. Absorption intestinale du cholestérol*

ABCG5 et ABCG8 jouent également un rôle très important dans l'absorption intestinale du cholestérol. Ces transporteurs se situent dans la membrane apicale des entérocytes et leur fonction primaire est de transporter à rebours le cholestérol absorbé en excès par l'intestin vers la lumière intestinale (Wang, 2007). L'expression de ABCG5 et ABCG8 est fortement augmentée lors de l'activation de LXR chez la souris, mais aussi avec la lignée cellulaire d'entérocytes humains CaCo-2 (Duval et al., 2006; Repa et al., 2002). Cette activation par des agonistes entraîne une réduction de l'absorption nette de cholestérol par l'intestin (Repa et al., 2000b; 2002). L'ABCA1 est aussi exprimé dans l'intestin, mais son action se limite dans la production des particules de lipoprotéines à haute densité (HDL : high density lipoprotein), puisque ce transporteur contrôle l'étape fondamentale de la formation des HDL, l'assemblage de phospholipides et le cholestérol libre avec la lipoprotéine Apo-AI (un des constituants principaux des particules HDL) (Brunham et al., 2006).

### *C. Synthèse de cholestérol*

Les protéines SREBPs sont une famille de facteurs de transcription qui sont synthétisés sous la forme de précurseurs inactifs. Lors de leur activation, ces protéines sont clivées afin de relâcher un fragment mature qui se dirige vers le noyau cellulaire pour ainsi stimuler l'action de gènes cibles (Eberlé et al., 2004). Les précurseurs inactifs de SREBPs sont associés à la protéine d'activation de clivage de SREBPs (SCAP), qui est un senseur du cholestérol. Lorsque la concentration en cholestérol est basse, SCAP est activée et clive le précurseur SREBP. Il existe trois isoformes de SREBP : SREBP-2 contrôle les gènes impliqués dans la synthèse du cholestérol, SREBP-1c régule les gènes impliqués dans la synthèse d'acides gras, phospholipides et triglycérides et SREBP-1a agit sur les deux groupes de gènes spécifiques de SREBP-2 et SREBP-1c. (Gill, Chow & Brown, 2008). Bien que SREBP-1c soit directement régulé par les LXRs (Repa et al., 2000a), les relations entre les LXR et SREBP-2 sont plus complexes. Des souris invalidées pour LXR $\alpha$  présentent une expression hépatique plus élevée de SREBP2 et de plusieurs de ses gènes cibles tels que l'hydroxyméthyl glutaryl-coenzyme A synthase, l'hydroxyméthyl glutaryl-coenzyme A reductase, la farnesyl diphosphate synthase et la squalène synthase (Peet et al., 1998). Une invalidation de LXR $\beta$  induit le même effet, mais de façon moins prononcée (Alberti et al., 2001). En accord avec ces résultats, des souris sauvages traitées avec l'agoniste synthétique T0901317 présentent une réduction de l'expression hépatique de gènes cholestérogéniques comme la squalène synthase et l'hydroxyméthyl glutarylcoenzyme A synthase (gènes cibles de SREBP 2) (Schultz et al., 2000). Il est important de noter que lors d'une alimentation riche en cholestérol, la réduction de l'expression des gènes cholestérogéniques n'est pas empêchée dans les souris avec LXR $\alpha$  et LXR $\beta$  invalidés. Ceci indique que c'est plutôt l'inhibition de clivage de SREBP2 induite par des stéroïdes (leur action sur SCAP), et non l'activation des LXRs, qui a le rôle prépondérant sur la régulation de la

synthèse du cholestérol (Peet et al., 1998; Alberti et al., 2001; Eberlé et al., 2004). Les données présentées plus haut suggèrent que les LXRs inhibent la synthèse du cholestérol, mais d'autres données mettent en doute cette voie de régulation. Par exemple, une forte expression des enzymes de synthèse du cholestérol dans le foie de souris n'exprimant pas LXR $\alpha$  n'augmente pas la synthèse du cholestérol (Peet et al., 1998). Également, les agonistes T0901317 et GW3965 sont capables d'induire la synthèse de cholestérol dans les cellules d'hépatome humain HepG2 (Aravindhan et al., 2006). Les interactions entre les LXRs et la synthèse du cholestérol sont encore mal comprises et doivent continuer à être investiguées (Baranowski, 2008).

#### *D. Le transport inverse du cholestérol*

L'élimination du cholestérol de l'organisme se fait presque exclusivement par le foie, qui le transforme en acides biliaires éliminés par les fèces. Le cholestérol produit par les tissus périphériques est retourné au foie par l'intermédiaire des HDL. Ce processus est appelé transport inverse du cholestérol, et les LXRs sont impliqués dans l'activation de l'expression de la plupart de gènes qui sont concernés (Baranowski, 2008). La première étape du transport inverse du cholestérol est l'efflux de cholestérol des cellules périphériques qui s'effectue principalement grâce aux transporteurs ABCA1 et ABCG1 (Figure 4). ABCA1 transfère le cholestérol et les phospholipides de la membrane vers l'apolipoprotéine A-I (l'apo A-I est l'apolipoprotéine la plus abondante des particules HDL) (Schwartz, Lawn & Wade, 2000). D'autre part, au niveau des cellules périphériques, ABCG1 transfère uniquement du cholestérol aux HDL matures (figure 4) (Cavelier et al., 2006). LXR $\alpha$  et LXR $\beta$  sont capables d'induire l'expression d'ABCA1 et d'ABCG1 chez les rongeurs (macrophages RAW264.7, entérocytes primaires, hépatocytes primaires), mais également chez l'homme (hépatocytes HepG2, macrophages THP1) (Repa et al., 2000b; Sabol et al., 2005; Costet et al., 2000). Des agonistes naturels et artificiels des LXRs sont eux aussi capables d'induire l'expression d'ABCA1 et d'ABCG1 dans plusieurs types cellulaires tels que les macrophages, les fibroblastes primaires, les cellules intestinales de type CaCo-2, les myotubes, les hépatocytes primaires, les adipocytes de type 3T3-L1 et les cellules hépatiques de type HepG2 (Zhao & Keating, 2007; Mitro et al., 2007; Kotokorpi et al., 2007; Schwartz et al., 2000; Muscat et al., 2002). Par ailleurs, Naik et al. ont signalé que des souris injectées avec du  $^3\text{H}$ -cholestérol puis traitées avec le ligand synthétique des LXRs GW3965 présentent une augmentation très forte de l'excrétion fécale du traceur, apportant une évidence directe de l'action des LXRs dans le transport inverse du cholestérol *in vivo* (Naik et al., 2006). Il faut tenir en compte que cette augmentation de l'excrétion fécale peut être due non seulement à l'action de LXR sur ABCA1 et ABCG1 mais aussi au fait que chez la souris, LXR augmente l'expression de CYP7a1 (Yu et al. 2003).

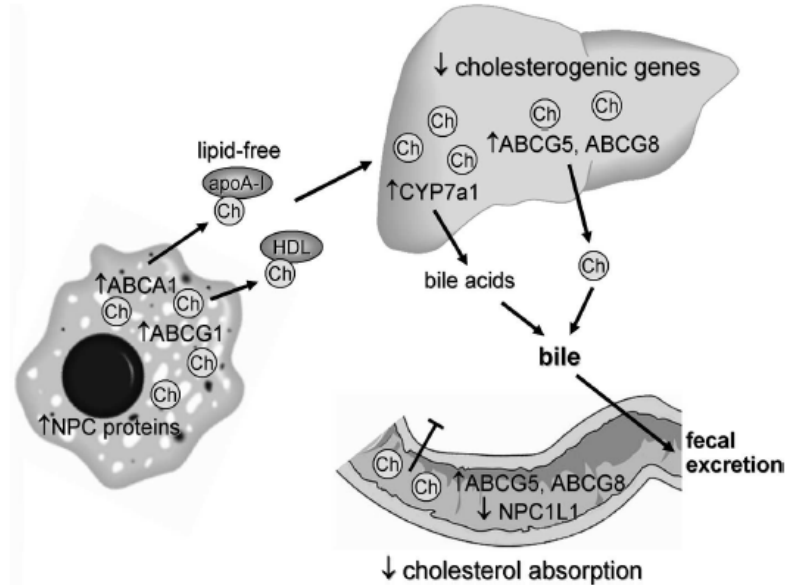


Figure 4. Le transport inverse du cholestérol.  
(Baranowski, 2008).

Dans des cultures de macrophages primaires, les agonistes synthétiques de LXR (T0901317 et GW3965) peuvent augmenter la disponibilité du cholestérol pour les récepteurs extracellulaires par l'intermédiaire de la protéine Niemann-Pick, dont l'expression est induite par LXR et qui est responsable du transport du cholestérol des compartiments intracellulaires vers la membrane cellulaire (Rigamonti et al., 2005). Un autre gène impliqué dans le transport inverse du cholestérol et qui est sous le contrôle de LXR $\alpha$  et LXR $\beta$  est l'apolipoprotéine-E (apoE). Cette protéine est présente à la surface de lipoprotéines plasmatiques (principalement lipoprotéines à très faible densité : VLDL, chylomicrons et lipoprotéines à haute densité : HDL) et a une haute affinité pour le récepteur des LDL (LDLR). L'apo E est requise pour la captation hépatique des résidus de chylomicrons, des lipoprotéines de très faible densité (VLDL) et des lipoprotéines de faible densité (LDL). Elle peut servir à capter du cholestérol efflué par la cellule (Wouters et al., 2005; Baranowski, 2008).

### 1.5.2 Métabolisme des acides gras

En plus de son action dans le métabolisme du cholestérol, les LXRs contrôlent également la biosynthèse hépatique des acides gras par l'intermédiaire de SREBP-1c qui régule les gènes impliqués dans cette voie de synthèse, dont l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), l'acide gras synthétase (FAS) et la stéaryl-CoA désaturase (SCD) (Eberlé et al., 2004) (Figure 5). Les souris invalidées pour LXR $\alpha$  présentent une forte diminution de SREBP-1c et de ses gènes cibles (Peet et al., 1998). Par contre, les souris invalidées pour LXR $\beta$  ont une expression normale de SREBP-1c (Alberti et al., 2001), indiquant que l'isoforme des LXRs responsable de la

lipogénèse hépatique serait principalement LXR $\alpha$ . En accord avec ces résultats, des souris de types sauvages traitées avec l'agoniste synthétique T0901317 présentent une forte induction de la lipogénèse qui résulte d'une accumulation hépatique de triglycérides (qui finalement vont produire une hypertriglycéridémie et une stéatose hépatique). Par contre, chez les souris invalidées pour LXR $\alpha$ , ce phénomène n'a pas lieu (Schultz et al., 2000; Quinet et al., 2006) suggérant que même si l'utilisation *in vivo* d'un agoniste synthétique est favorable au transport inverse du cholestérol, un effet délétère est aussi induit au niveau hépatique par l'induction d'une hypertriglycéridémie. L'activation de la lipogénèse hépatique a été supposée au départ être le résultat exclusif de l'action de SREBP-1c étant donné que son promoteur possède un LXRE fonctionnel dans les hépatocytes de type HepG2 (Repa et al., 2000a; Yoshikawa et al., 2001). Aussi, les souris invalidées pour SREBP1c présentent une absence des activités transcriptionnelles de ses gènes lipogéniques avec une accumulation hépatique de triglycérides et une hypertriglycéridémie fortement réduites (Chu et al., 2006; Liang et al., 2002). Mais bien que les augmentations de la transcription d'ACC, de FAS et de SCD-1 soient réduites, elles sont toujours présentes, suggérant un mécanisme d'activation de la transcription indépendant de la voie de SREBP-1c (Chu et al., 2006; Joseph et al., 2002a; Talukdar & Hillgartner, 2006). Comme il a été mentionné précédemment, le ChREBP est un gène cible de LXR, et dont l'expression génique répond aux agonistes de ce récepteur nucléaire chez la souris. Chez les souris invalidées pour le gène ChREBP, l'effet de l'agoniste T0901317 sur l'expression hépatique de gènes lipogéniques est diminué (Cha & Repa, 2007), suggérant un rôle de ChREBP dans la lipogénèse hépatique qui pourrait ainsi promouvoir la conversion de l'excès de glucose en lipides (Baranowski, 2008). Des expériences sur des hépatocytes primaires de souris ont montré qu'une augmentation de l'internalisation cellulaire du glucose est nécessaire pour expliquer l'action de LXR $\alpha$  par le T0901317 sur ChREBP (Denechaud et al., 2008). Grefhorst et son équipe ont montré que l'hypertriglycéridémie induite par LXR résulte d'une augmentation de la sécrétion des VLDL hépatiques (figure 5) (Grefhorst et al., 2002). Cette équipe a observé que ce n'est pas le nombre des particules qui augmente, mais leur diamètre, puisque la quantité de triglycérides par particule augmente. Cette hypertriglycéridémie associée à la sécrétion des VLDL, serait due à l'activation de l'expression de la protéine de transfert de phospholipides (PLTP). Cette protéine non seulement est impliquée dans le transport de phospholipides de lipoprotéines contenant de l'apo B vers les HDLs, mais elle stimule aussi la sécrétion des VLDL du foie (Albers & Cheung, 2004). Il a été démontré que l'addition de T0901317 augmente l'expression hépatique et l'activité plasmatique de la PLTP chez la souris (Cao et al., 2002). D'autre part Okazaki et son équipe ont montré que LXR en induisant la synthèse hépatique de triglycérides et la transcription de PLTP, permet qu'il y ait incorporation de triglycérides dans des VLDL anormalement grands qui sont ensuite éliminés du sang par les récepteurs LDL ( Okazaki et al., 2009) La protéine ressemblant à l'angioprotéine 3 (ANGPTL3) a aussi été signalée comme étant un acteur important dans l'hypertriglycéridémie induite par LXR. ANGPTL3 est une protéine exprimée exclusivement dans le foie et qui joue un rôle important dans le métabolisme des lipides. Des souris KK hyperglycémiques, hyperinsulinémiques et hypertriglycéridémiques, vont présenter un niveau

plasmatique de triglycérides bas lorsque le gène de ANGPTL3 est invalidé (souris KK san). De plus, une surexpression de ANGPTL3 induit une augmentation plasmatique de triglycérides dans ces souris KK san (Koishi et al., 2002). L'action d'ANGPTL3 dans le métabolisme de lipides passe par la lipoprotéine lipase (LPL) puisque ANGPTL3 inhibe LPL (Shimizugawa et al., 2002). Dans des modèles animaux et des lignées cellulaires, l'addition de l'agoniste synthétique de LXR T0901317 augmente l'expression d'ANGPTL3 (Kaplan et al., 2003). Récemment Zhou et al (Zhou et al., 2008) ont identifié le gène de la protéine translocase d'acides gras (FAT/CD36), un récepteur membranaire capable de capter des LDL modifiés et des acides gras de la circulation, comme étant une cible de LXR $\alpha$ . Ils ont démontré que des souris invalidées pour FAT/Cd36 et traitées avec des agonistes de LXR présentaient une forte diminution de la stéatose et de l'hypertriglycéridémie. Ces résultats suggèrent qu'en plus de leurs effets sur la stimulation de l'expression des gènes impliqués dans la lipogenèse, les LXRs ont un rôle dans la captation d'acides gras par le foie et donc interviennent par deux voies distinctes dans la stéatose hépatique (Baranowski, 2008).

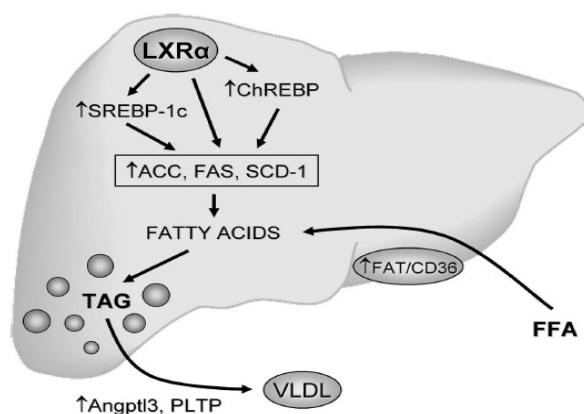


Figure 5. Actions de LXR $\alpha$  dans la stimulation de la lipogenèses et dans la stéatose hépatique. (Baranowski, 2008).

### 1.5.3 Métabolisme du glucose

#### A. Le LXR serait un senseur du glucose

Comme mentionné auparavant (section agonistes naturels : le glucose), Mitro et al., ont proposé que le D-glucose et le D-glucose-6-phosphate sont des agonistes directes de LXR $\alpha$  et de LXR $\beta$ . Dans la lignée cellulaire humaine HepG2, ils ont suggéré que le glucose à des concentrations physiologiques active LXR et induit l'expression des gènes cibles des LXRs avec une efficacité comparable à celle des oxystérols. Ils ont proposé non seulement que le glucose est un agoniste direct de LXR mais qu'il peut aussi se lier à plus d'un site sur la molécule de LXR et l'activer en combinaison avec d'autres ligands de LXR. Finalement, ils

suggèrent que chez des souris soumises à une alimentation riche en glucose, les niveaux d'expressions des gènes associés à l'homéostasie du cholestérol dont les inductions dépendent des LXRs sont augmentées, indiquant que le glucose peut-être un ligand endogène des LXRs (Mitro et al., 2007). Il est toutefois important de rappeler que ces nombreuses observations ont été remises en question par Denechaud (voir section agonistes naturels : le glucose) (Denechaud et al., 2008).

### *B. Effets antidiabétiques des LXRs*

Plusieurs études montrent que les LXRs ont des effets antidiabétiques. Par exemple, lorsque des souris db/db ou des rats diabétiques Zucker, deux modèles de rongeurs qui développent spontanément du diabète de type II, ont été traités avec du T0901317 pendant 7 jours, leur niveau plasmatique de glucose diminue par rapport aux contrôles (Cao et al., 2003; Loffler et al., 2006). Le mécanisme par lequel les agonistes de LXR améliorent le métabolisme du glucose est sûrement complexe, mais doit être associé à une augmentation de la sensibilité à l'insuline. (Jamroz-Wiśniewska et al., 2007). En effet, bien que T0901317 n'ai pas d'effet sur l'insuline plasmatique, il réduit la concentration plasmatique du glucose dans les souris db/db et les rats Zucker, ce qui suggère une amélioration à long terme de la sensibilité à l'insuline (Cao et al., 2003) (Jamroz-Wiśniewska et al., 2007).

Les ligands synthétiques des LXRs T0901317 et GW3965 sont capables de réduire les niveaux d'expression des enzymes clés de la néoglucogenèse hépatique telles que la pyruvate carboxylase, la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK), la fructose 1,6-bisphosphatase et la glucose 6 phosphatase (G6Pase), ce qui entraîne une réduction du débit hépatique du glucose et donc une diminution du niveau de glucose sanguin, (Laffitte et al., 2003; Stulnig et al., 2002). D'autre part, sur des cultures d'adipocytes humains et des adipocytes de type 3T3-L1 induits par T0901317, Dalen et al. ont observé une stimulation de l'expression de GLUT4 et une augmentation du transport de glucose induit par l'insuline (Dalen et al., 2003). Ils ont également identifié un LXRE fonctionnel dans la région promotrice du gène GLUT4 humain. Aussi, les deux agonistes de LXR T0901317 et GW3965 augmentent l'expression de GLUT4 dans des adipocytes du tissu adipeux épидидymaire de souris saines (Dalen et al., 2003; Laffitte et al., 2003). Toutes ces données semblent indiquer que LXR pourrait stimuler la captation du glucose périphérique par les tissus sensibles à l'insuline (Jamroz-Wiśniewska et al., 2007).

Le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF $\alpha$ ) est synthétisé par les adipocytes (mais aussi produit par les macrophages, cellules endothéliales et fibroblastes) et sa production augmente avec le développement de l'obésité. Plusieurs études ont démontré que TNF $\alpha$  entrave des étapes critiques de la signalisation de l'insuline telles que la phosphorylation du substrat du récepteur à l'insuline 1 et 2 (IRS1 et 2), de même que la phosphorylation et l'activité de la protéine kinase B/AKT et contribue ainsi à la résistance à l'insuline associée avec l'obésité (Hotamisligil et al., 1994; Engelman et al., 2000; Teruel, Hernandez & Lorenzo, 2001; Jamroz-

Wiśniewska et al., 2007). Fernandez-Veledo et son équipe ont montré que le T0901317, le GW3965 et le 22(R)-OH restaurent la captation insulino-dépendante bloquée par TNF $\alpha$  dans les adipocytes bruns fœtaux ((Fernandez-Veledo et al., 2006). Les effets de TNF $\alpha$  sont inhibés par l'action de T0901317 puisque cet agoniste réduit l'expression de la protéine tyrosine phosphatase-1B qui est une enzyme qui déphosphoryle de résidus tyrosine de IRS et agit ainsi comme un modulateur négatif de la voie de signalisation de l'insuline par TNF $\alpha$ . Par contre, les agonistes de LXR n'ont pas d'effet dans la captation du glucose en absence de TNF $\alpha$  (Fernandez-Veledo et al., 2006).

### C. Sécrétion d'insuline

Des cellules primaires  $\beta$  pancréatiques incubées en présence de T0901317 présentent une stimulation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose, tout comme l'expression de la glucokinase (Efanov et al., 2004) et le transporteur de glucose Glut2 (Zitzer et al., 2006). Ces résultats suggèrent que, l'activation de LXR améliore le métabolisme du glucose en potentialisant la sécrétion d'insuline induite par le glucose.

Bien que le glucose n'ait pas d'effet sur les niveaux d'expressions des LXRs dans les cellules  $\beta$ , il pourrait influencer leur localisation intracellulaire. En effet, il a été démontré que dans des conditions de normoglycémie, LXR $\alpha$  est localisé au niveau du cytosol alors que dans des conditions de glycémie de 8 mM, il est déplacé vers le noyau (Helleboid-Chapman et al., 2006).

#### 1.5.4 Rôle dans l'inflammation et la réponse immunitaire dans le macrophage

Dans les macrophages tant humains que de souris, les LXRs agissent en tant que régulateurs de la réponse inflammatoire (figure 6). Lorsque ces cellules sont stimulées soit par des bactéries, des lipopolysaccharides (LPS), le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) ou l'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), il en résulte une activation des LXRs qui sont alors capables de réprimer des gènes impliqués dans l'inflammation selon un mécanisme encore mal caractérisé (Rigamonti, Chinetti-Gbaguidi & Staels, 2008). Parmi ces gènes pro-inflammatoires, nous retrouvons la forme inductible de l'oxyde nitrique synthétase (iNOS), la cyclooxygenase 2 (COX-2), l'interleukine-6 (IL-6), l'IL-1 $\beta$ , la protéine chimiotactique des monocytes-1 et -3 (MCP-1, MCP-3), la metallopeptidase matricielle 9 (MMP9), le facteur tissulaire (TF) et l'ostéopontine (Joseph et al., 2003; Castrillo et al., 2003; Ogawa et al., 2005; Terasaka et al., 2005). Les deux isotypes de LXR possèdent des activités anti-inflammatoires puisque la répression de ces gènes n'est pas observée dans les macrophages de souris invalidées pour LXR $\alpha$  et LXR $\beta$  (Joseph et al., 2003; Castrillo et al., 2003). Dans les macrophages de souris, LXR a été récemment rapporté comme étant un activateur positif de l'expression de l'arginase II qui agit comme anti-inflammatoire en déviant le métabolisme de l'arginine vers la synthèse de polyamines au

détriment de la production de NO par iNOS (Marathe et al., 2006). Les mécanismes impliqués dans l'inhibition de l'expression des gènes de l'inflammation par LXR ne sont pas totalement bien compris et aucun LXRE n'a été identifié dans les régions des promoteurs des gènes réprimés. Certains résultats expérimentaux indiquent que la voie métabolique de facteur nucléaire-kappa B (NF- $\kappa$ B) pourrait être impliquée. La trans-répression de NF- $\kappa$ B est probablement en relation avec un événement nucléaire, la sumoylation de LXR qui préviendrait NF- $\kappa$ B d'échanger ses corépresseurs par des coactivateurs, ce qui laisserait le promoteur des gènes cibles dans un état réprimé (Ghisletti et al., 2007; Rigamonti et al., 2008).

En plus de leur action dans la réponse inflammatoire, les LXRs sont aussi d'importants régulateurs de la réponse immunitaire innée. Dans des macrophages humains, les agonistes T0901317 et GW3965 de LXR sont capables d'induire l'expression du récepteur du type toll 4 (TLR-4) (Figure 6 A) qui résulte en une plus grande sensibilité au LPS (Fontaine et al., 2007) et entraînent une augmentation de la synthèse des espèces réactives à l'oxygène (ROS) dépendantes du NADPH, et ceci, aussi bien dans des macrophages au repos que ceux activés avec du LPS (Rigamonti et al., 2008). Ces résultats suggèrent un rôle important de LXR dans la modulation de la réponse antibactérienne des macrophages humains (Fontaine et al., 2007). En fait, LXR peut contribuer à l'élimination des infections d'origine bactérienne en recrutant des monocytes/macrophages ou en activant les cellules environnantes par une production de ROS. Nonobstant un co-traitement de macrophages humains avec des agonistes de LXR et du LPS ou de l'IFN $\gamma$ , résulte dans une réduction de la sécrétion de TNF $\alpha$  et de MCP-1 (Fontaine et al., 2007; Walcher et al., 2006). Ainsi, il apparaît que LXR prépare le macrophage vis-à-vis d'une réponse efficace contre les infections bactériennes, par l'induction de la voie TLR-4, une fois le signal d'inflammation activé, LXR exercerait alors des activités anti-inflammatoires afin de promouvoir la résolution de l'inflammation (Rigamonti et al., 2008).

Dans le macrophage de souris, LXR module aussi la réponse immunitaire innée, en prolongeant essentiellement la survie cellulaire (Figure 6 B). C'est ainsi que des macrophages de souris qui n'expriment pas LXR sont plus susceptibles à des infections bactériennes parce que les cellules présentent un niveau d'apoptose élevée. Cette apoptose élevée résulterait, en partie, de la perte de la régulation de l'inhibiteur d'apoptose du macrophage (AIM) par LXR $\alpha$  (Joseph et al., 2004).



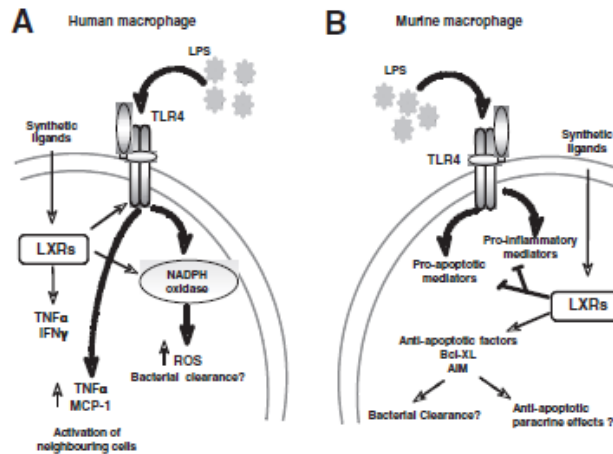


Figure 6. LXRs et la réponse immunitaire. A. Chez les humains, l'activation de LXR augmente la réponse antibactérienne par la voie TLR-4. B. Chez la souris, LXR stimule la survie cellulaire. (Rigamonti et al., 2008)

## 1.6 Modifications post-traductionnelles des LXRs

### 1.6.1 La phosphorylation

Dans des cellules humaines et de souris, Chen et al ont été les premiers à démontrer, suite à des analyses de mutations dirigées et de marquages métaboliques, que la protéine LXR pouvait être phosphorylée (Chen et al., 2006). Ils ont déterminé que LXR $\alpha$  est phosphorylé sur la sérine 198 qui est un site consensus pour les protéines de la famille de protéines kinases activées par des mitogènes (MAPK). Ce site est aussi bien conservé entre les différentes espèces qu'entre LXR $\alpha$  et LXR $\beta$  (Wójcicka et al., 2007). Les auteurs ont également mis en évidence la fonction de cette phosphorylation et ont été surpris par le fait que le mutant non phosphorylable (par délétion des sérines 197,198 et 207) : 1) conserve la capacité de la protéine de se fixer sur son LXRE ; 2) sa localisation nucléaire n'est pas affectée ; 3) la protéine est capable de transactiver un gène rapporteur et 4) les expressions des gènes cibles connues de LXR ne sont pas altérées. Dans le même ordre d'idées, Pineda-Torra et al, ont constaté que dans des macrophages à l'état basal, LXR $\alpha$  est faiblement phosphorylé sur la sérine 198 alors que suite à un traitement avec le ligand des LXRs T0901317 ou l'activation de RXR, la phosphorylation est augmentée. LXR est également phosphorylé dans des macrophages chargés en cholestérol. La phosphorylation diminue en présence d'inhibiteurs de la caséine kinase 2 (CK2). Les auteurs ont aussi constaté que la phosphorylation de LXR peut déterminer la spécificité des cibles de ce récepteur nucléaire.

C'est ainsi que pour les cellules avec le mutant non phosphorylable (S198A), les niveaux d'expressions de certains gènes cibles bien établis de LXR comme (AIM et LPL) sont augmentés alors que pour d'autres gènes (ABCA1 or SREBPc1), les niveaux d'expressions restent inchangés. De manière surprenante, un gène qui ne

s'exprime pas normalement dans le macrophage, la protéine ligand de la chemokine avec motif C-C (CCL4), est activé spécifiquement dans les cellules exprimant le mutant S198A. En outre, des inhibiteurs de la phosphorylation en S198 mimant le mutant S198A et induisent l'expression de CCL4. La phosphorylation de LXR peut être perçue comme un système qui affecte de manière sélective la transcription des gènes cibles (Pineda-Torra et al., 2008).

### 1.6.2 O-N-acétylglucosaminylation

L'O-N-acétylglucosaminylation (O-GlcNAc) est une modification post-traductionnelle qui consiste en l'addition d'un résidu N-acétylglucosamine sur une sérine ou une thréonine des protéines cytoplasmiques ou nucléaires. Tout comme la phosphorylation, l'O-GlcNAc est dynamique et réversible en fonction des signaux cellulaires et change les fonctions et les associations avec d'autres protéines des protéines ainsi modifiées. L'O-GlcNAc n'est pas un système redondant de la phosphorylation puisqu'elle possède ses propres sites de glycosylation (bien que quelques-uns soient partagés avec ceux pour la phosphorylation) et des protéines peuvent être glycosylées et phosphorylées en même temps. Contrairement à la phosphorylation, une enzyme d'addition (O-GlcNAc transférase : OGT) et une de suppression (*N*-Acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase : O-GlcNAcase) de l'O-GlcNAc ont été mises à jour (Slawson, Housley & Hart, 2006).

Tout récemment Anthonisen et son équipe ont observé que LXR $\alpha$  et LXR $\beta$  sont des cibles de l'O-GlcNAc (Anthonisen et al., 2010). L'O-GlcNAc est induite chez des souris à jeun puis réalimentées, ainsi que chez des souris dont le diabète est induit par la streptozotocine. Dans ces deux types de souris, l'O-GlcNAc a été concomitante avec une augmentation de l'expression de SREBP-1c qui est une cible bien connue des LXRs. Les auteurs suggèrent que l'O-GlcNAc est un nouveau mécanisme par lequel LXR agirait comme un senseur du glucose et contredis la vision de Mitro selon laquelle les LXRs sont des senseurs directs du glucose (avec un site spécifique pour celui-ci) (Mitro et al., 2007). De plus, Anthonisen et son équipe argumentent que les LXRs ne peuvent pas être des senseurs directs du glucose puisque les agonistes de LXR s'y lient à des sites de liaisons hydrophobes en C-terminal.

### 1.6.3 L'acétylation

De plus en plus d'évidences lient les réactions d'acétylation-déacétylation à des changements de fonctions des protéines cibles, qui induisent des actions très variées sur la physiologie cellulaire. La sirtuine 1 (SIRT1) est une déacétylase dépendante de NAD<sup>+</sup> qui déacétyle un grand nombre de protéines en réponse à la balance énergétique de la cellule et à son état oxydatif (Yu & Auwerx, 2010).

Li et ses collaborateurs ont été les premiers à mettre en évidence le rôle de régulateur positif de la déacétylase SIRT1 sur LXR (Li et al., 2007). Selon cette équipe, l'acétylation de LXR a lieu au niveau d'une seule lysine qui est conservée (K432 pour LXR $\alpha$  et K433 pour LXR $\beta$ ) et qui est adjacente du domaine d'activation AF-2. SIRT1 interagirait avec LXR et induirait sa déacétylation suivie d'une réaction d'ubiquitination. Des mutations localisées sur la région codante pour K432 élimineraient l'activation de LXR $\alpha$  par SIRT1. L'invalidation de l'expression de SRT1 réduit l'expression de plusieurs cibles connues de LXR telles que ABCA1, SREBP-1c, ABCG1 et ABCG5 (Li et al., 2007).



## Chapitre 2 : Les Gluts, facilitateurs du transport des hydrates de carbone et des polyols

La diffusion facilitée du glucose et des hexoses apparentés à travers la membrane plasmique est réalisée par les membres de la famille de transports de solutés 2 (SLC2A : Solute Carrier Family 2), appelés également les facilitateurs du transport des hydrates de carbone et des polyols et également transporteurs de glucose (Gluts) ((Hans-Georg et al., 2002). Par un mécanisme de transport facilité, ces transporteurs aident les hexoses à traverser les membranes plasmiques selon un gradient électrochimique. Une structure commune de tous les membres de la famille SCL2A est la présence de 12 domaines transmembranaires. Les Gluts sont exprimés dans toutes les cellules de l'organisme étant donné le rôle fondamental du glucose dans l'apport énergétique et comme molécules de structure (glycoprotéines par exemple) (Uldry & Thorens, 2004). La première protéine des Gluts a été clonée en 1985, contient 492 acides aminés et est exprimée dans la plupart de cellules (Mueckler et al., 1985). Mais des différences dans les paramètres cinétiques et la spécificité de substrats associées à certains tissus ont révélé l'existence possible d'isoformes. Des expériences de clonage ont confirmé cette possibilité et la famille des Glut a compté très rapidement 5 isoformes (Burant et al., 1992; Colville, Seatter & Gould, 1993a; Colville et al., 1993b) qui semblaient satisfaire aux paramètres cinétiques et spécificités de substrat. Le séquençage du génome humain et d'autres espèces a permis d'agrandir la liste de la famille à 14 isoformes (Manolescu et al., 2007).

### 2.1 Structure des Gluts

L'analyse du profil d'hydropathique de Glut1 a montré que la protéine est repliée selon un mode de 12 hélices  $\alpha$  transmembranaires (Figure 7) qui se positionnent ensemble afin de former un canal central à travers duquel le substrat peut traverser la bicouche lipidique. La conformation de la surface du canal comprend 8 des 12 hélices alpha (Mueckler & Makepeace, 2006; Manolescu et al., 2007). L'extrémité N-terminal, tout comme l'extrémité C-terminale de tous les membres de la famille SLC2A, se trouve orientée vers le cytoplasme et une N-Glycosylation est présente sur la première ou la quatrième boucle. Des séquences communes conservées à tous les membres de la famille ou à une classe sont présentes dans différentes régions de la structure primaire de la protéine. La présence de ces séquences ne prédit pas la spécificité de substrat de ces transporteurs (Uldry & Thorens, 2004)

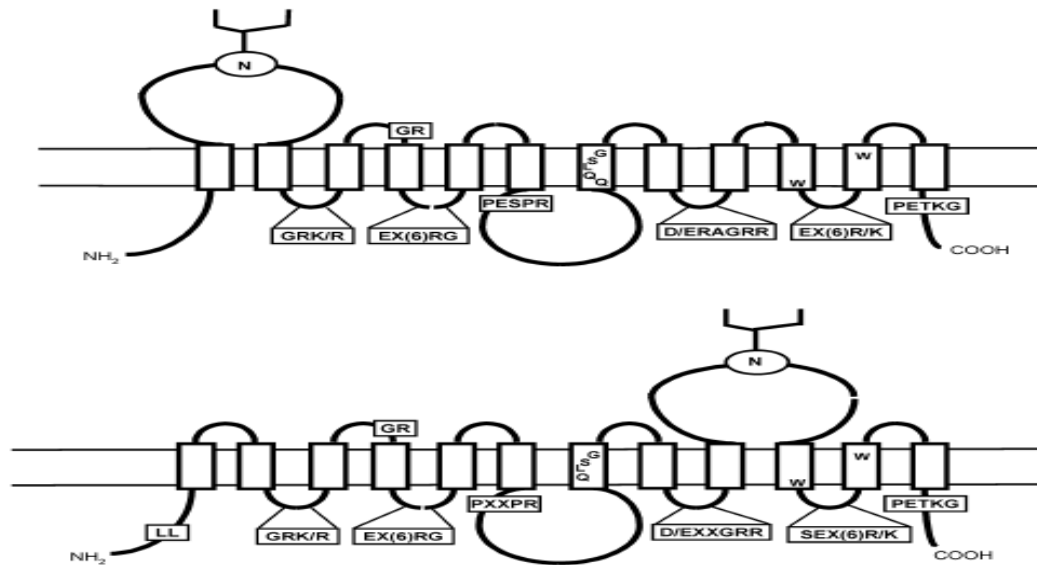


Figure 7. Modèle schématique de la structure des membres de la famille Glut. Classe I et II (en haut) et III(en bas). (Uldry & Thorens, 2004)

## 2.2 Différentes classes de la famille SLC2A

GLUT	Km (Oocyte)	Tissue	Special Feature	Substrate Specificity
<b>Class I</b>				
GLUT1	5 mM	Ubiquitous; red cells		Glucose/galactose
GLUT3 (GLUT14)	1 mM (high affinity)	Neurons		Glucose/galactose
GLUT4	5 mM	Fat, muscle including heart	Trafficking regulated by insulin (LL motif)	Glucose, not galactose
GLUT2	11 mM (low affinity)	Intestine, kidney, liver, beta-cell	Mediates both uptake and efflux	Glucose/galactose/fructose
<b>Class II</b>				
GLUT5	6 mM	Intestine, sperm	Found primarily in fructose-metabolizing tissues	Fructose (glucose)
GLUT7	0.3 mM	Intestine	Apical membrane targeting	Glucose/fructose, not galactose
GLUT9a and 9b	0.3 mM	Kidney BLM	Liver expression co-localizes with GLUT2 but not kidney	Glucose/fructose, not galactose
GLUT11	0.2 mM	Muscle, heart, fat, placenta, kidney, and pancreas	Three isoforms (A, B, and C) with differing tissue distribution	Glucose/fructose, not galactose
<b>Class III</b>				
GLUT6 (GLUT9)	High Km	Brain and spleen	Has LL targeting motif	Glucose/?
GLUT8	2.4 mM (2DG)	Testis, brain, fat, liver, and spleen	Has LL targeting motif	Glucose/(fructose)
GLUT10	0.3 mM (2DG)	Heart and lung		Glucose/galactose, not fructose
GLUT12	4-5 mM	Insulin-sensitive tissues	Has LL targeting motif	Glucose, galactose, fructose
HMIT (GLUT13)	0.1 mM	Brain	Proton-coupled substrate movement	Myoinositol

Tableau 1 Les Gluts. Caractéristiques des différents Gluts. (Manulesco et al., 2007).

D'un point de vue structural, les différents membres de la famille SLC2A peuvent être divisés en 3 classes (Tableau 1, Figure 8). La classe I comprend les Glut1 à 4, la classe II est composée par Glut5, 7, 9 et 11 alors que la classe III contient Glut6, 8, 10, 12 et le transporteur de proton et du myo-insitol (HMIT). Les Glut1 à 4, les premiers transporteurs de la famille à avoir été caractérisés, ont été définis comme des transporteurs du glucose. Glut5 est principalement un transporteur du fructose et les autres membres de la classe II présentent de fortes analogies avec lui, ce qui pourrait faire d'eux des transporteurs du fructose bien que leur spécificité de substrat ne soit pas encore très bien caractérisée, Glut9 est un transporteur d'Urée (Preitnera., 2009). Parmi les membres de transporteurs de la classe III, les fonctions de Glut8 et Glut10 ont été clairement établies comme des transporteurs de glucose alors que HMIT est un transporteur du myo-inositol couplé au gradient électrochimique du protons (Uldry & Thorens, 2004).

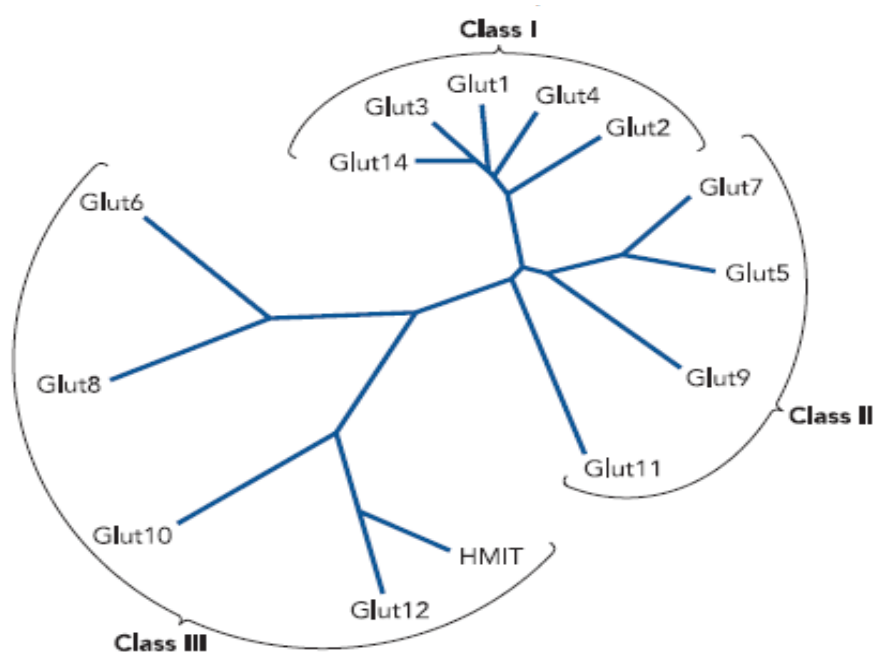


Figure 8. Arbre phylogénétique des différents membres de la famille du gène SCL2A. (Manolescu et al., 2007).

## 2.3 Mécanisme du transport

Dans l'érythrocyte (Widdas, 1954), l'épithélium placentaire (Widdas, 1952) et l'intestin (Fisher & Parsons, 1952), l'utilisation de la cinétique de Michaelis-Menten appliquée au transport du glucose a conduit à l'élaboration de la théorie du «transporteur simple (simple carrier)» qui affirme que deux événements apparentés, mais séparés, doivent avoir lieu lors du transport. La première étape débute lorsque le glucose se lie à son site spécifique sur la protéine. Cette interaction est du même type que celle entre une enzyme et son substrat, mais ici le substrat (l'hexose) ne subit aucun changement. Lors de la deuxième étape, qui consiste à

la translocation, un changement de conformation du transporteur se produit : le site de liaison se réoriente vers l'intérieur de la cellule et le substrat est ainsi libéré vers l'intérieur de la cellule. Finalement, le cycle est complété avec un deuxième changement de conformation qui amène à nouveau le site de liaison vers l'extérieur de la cellule (Figure 9). Le transport se fait selon un gradient de concentration (Manolescu et al., 2007). L'interaction entre l'hexose et le site de liaison se ferait grâce à l'action des ponts d'hydrogène entre groupes hydroxyles spécifiques de l'hexose et certaines chaînes latérales hydrophiles des acides aminés qui entourent le canal (Barnett, Holman & Munday, 1973). Ces liaisons seraient modifiées lorsque la protéine subit un changement de conformation d'une telle façon que le site orienté vers l'intérieur de la cellule est totalement différent de celui dirigé vers l'extérieur (ce qui permettrait la libération du substrat) (Barnett, Holdman & Munday, 1973; Manolescu et al., 2007).

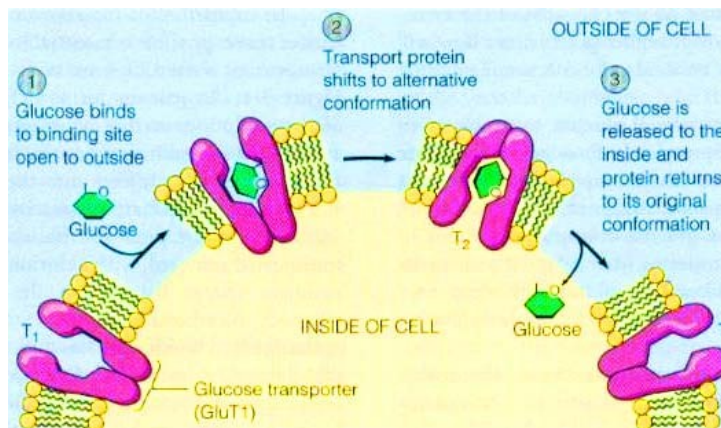


Figure 9. Mécanisme de transport du glucose par Glut1.

[http://219.221.200.61/ywwy/zbsw\(E\)/pic/ech5-6.jpg](http://219.221.200.61/ywwy/zbsw(E)/pic/ech5-6.jpg)

## 2.4 GLUTs présents dans le macrophage

La présente étude a été réalisée avec un type cellulaire spécifique, le macrophage humain et nous allons nous concentrer sur les Gluts qui s'y expriment. Fu et ses collaborateurs ont analysé les niveaux d'expression des ARNm et des protéines pour les Glut1-5 extraits à partir de lymphocytes et de monocytes d'échantillons sanguins humains ainsi que de la lignée de monocytes/macrophages THP1 (Fu et al., 2003). Ils ont observé que les monocytes expriment les protéines Glut1 et Glut3. Leur activation par du LPS induit une augmentation de l'expression protéique de Glut1. Quant à l'expression génique des Gluts dans les monocytes, l'ARNm de Glut3 est l'isoforme le plus exprimé. La différenciation des monocytes THP1 en macrophages par le phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) induit une augmentation importante de l'expression protéique de Glut3 et de Glut5 ainsi que leurs niveaux d'abondances protéiques. Le niveau d'expression des ARNm de Glut5 est le



plus fortement exprimé dans les macrophages alors que les niveaux des ARNm de Glut3 est intermédiaire et celui de Glut1 le moins exprimé. Dans une autre étude, Malide *et al.* ont étudié les niveaux d'expressions et la localisation cellulaire de Glut1, Glut3 et Glut5 dans des cultures primaires de macrophage humain (Malide *et al.*, 1998). Des analyses d'immunobuvardage de type Western ont montré que lors de la différenciation en macrophages, les niveaux d'expressions de Glut1 sont augmentés alors que ceux de Glut3 sont diminués, ce qui contredit les résultats de Fu *et al.* Quant à Glut5, son expression est augmentée avec un certain un délai (5 jours après le début de la différenciation de macrophages). À l'aide de la microscopie confocal, il a été démontré que chaque isoforme a une localisation cellulaire particulière. Glut1 se trouve préférentiellement au niveau de la surface cellulaire et au niveau périnucléaire dans un motif typique de recyclage d'endosomes. Glut3 est localisé essentiellement avec les vésicules intracellulaires, et ce, seulement dans les monocytes. Glut5, quant à lui, est surtout observé à la surface cellulaire et est aussi détectable à un niveau intracellulaire (Malide *et al.*, 1998). Ni Malide *et al.*, ni Fu *et al.* n'ont détecté la présence dans le macrophage du transporteur Glut4 (Malide *et al.*, 1998 ; Fu *et al.*, 2003).

#### 2.4.1 GLUT1

Glut1 a été le premier Glut à être identifié en 1985 par Mueckler (Mueckler *et al.*, 1985) dans les érythrocytes dont il compose de 3 à 5% des protéines de la membrane plasmique. Glut1 est exprimé dans une grande variété de cellules animales et humaines avec une prépondérance au niveau des barrières endothéliales et épithéliales du cerveau, de l'œil, des nerfs périphériques, du placenta et des glandes mammaires lors de la lactation (Takata *et al.*, 1990; Zhao, Glimm & Kennely, 1993). Au niveau des muscles squelettiques et du tissu adipeux qui sont des structures sensibles à l'insuline, Glut1 qui est localisé au niveau membranaire agit de façon coopérative avec Glut4 qui se trouve dans des compartiments intracellulaires et en réponse à l'insuline, est mobilisé vers la membrane plasmique (Marette *et al.*, 1992). Il a aussi été démontré par Jensen *et al* que Glut1 est essentiel pour le développement du cerveau des vertébrés (Jensen, Gitlin & Carayannopoulos, 2007). L'affinité de Glut1 pour le 2-déoxy-D-Glucose est de 5 mM alors que celle du glucose est de 3 mM (Vera & Rosen, 1989). L'affinité du 2-déoxy-D-Glucose proche de celle du glucose pour ses transporteurs a permis son utilisation dans la technique de transport du glucose. Les autres substrats que Glut1 peut transporter sont : le galactose, le mannose et la glucosamine (Uldry *et al.*, 2002). Ce transporteur est l'isoforme la mieux conservée et présente une homologie que varie entre 74 % et 98 % chez les poissons, le poulet, la souris, le rat, les bovins et l'humain. La région la plus variable est située au niveau du loop1 près de l'extrémité N-terminal, région sensible à la glycosylation. (Zhao & Keating, 2007).

## 2.4.2 GLUT3

GLUT3 comme son nom l'implique a été le troisième transporteur de glucose à être cloné (Kayano et al., 1988). Il a été premièrement caractérisé au niveau des neurones et la question qui s'est posée aussitôt a été de savoir pourquoi ce tissu a besoin d'un transporteur spécifique du glucose. Glut3 doit donc présenter des caractéristiques qui lui permettent de s'adapter aux besoins métaboliques et oxydatifs avec les hautes demandes en glucose des cellules nerveuses. Cette caractéristique sera confirmée lorsque les autres types cellulaires qui ont des besoins énergétiques élevés tels que les spermatozoïdes, les embryons avant implantation, les globules blancs, et une grande variété de lignées cellulaires carcinomateuses seront observées et dans lesquels Glut3 est également exprimée (Simpson et al., 2008). Il est tout de même important de noter que Glut3 possède une affinité plus forte envers le glucose que les autres membres de la classe II avec des  $K_m$  plus faibles de l'ordre de 1.4 mM pour 2-déoxy-D-Glucose (Arbuckle et al., 1996) et de 1 mM pour le glucose (Hauguel de Mauzon et al., 1997). Glut3 est aussi capable de transporter du mannose, du galactose et du xylose mais pas de fructose. Ainsi, Glut3 présente la meilleure affinité envers le glucose que les autres membres de la classe I mais également à une capacité de transport (définie par  $K_{cat}$ ) 5 fois plus élevée. Cette observation est très importante tenant compte du rôle de Glut3 dans le transport du glucose au niveau neuronal puisque la concentration de glucose dans l'environnement péri-neuronal est seulement de 1 à 2 mM (Simpson et al., 2008). Au niveau des cellules mononucléées, Glut3 est exprimé dans les lymphocytes, les monocytes/macrophages, les neutrophiles et les plaquettes. Un aspect très intéressant de l'expression de Glut3 dans ces cellules est qu'il est présent dans les compartiments intracellulaires alors que suivant une activation de la voie métabolique de l'insuline, il est déplacé du cytoplasme à la membrane plasmique de la même façon que Glut4 dans le muscle et tissu adipeux blanc (Daneman et al., 1992; Estrada et al., 1994; Fu et al., 2003; Maratou et al., 2007). Suite à une stimulation des leucocytes avec du PMA ou du LPS des neutrophiles, monocytes/macrophages par le formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (fMLP), des lymphocytes par la phytohémagglutinine (PHA) et des plaquettes par la thrombine, il en résulte la migration de Glut3 vers la membrane plasmique (Craik, Stewart & Cheeseman, 1995; Ferreira et al., 2003; Fu et al., 2003; Heijnen et al., 1997; Jacobs et al., 1989; Simpson et al., 2008). Dans les plaquettes, les vésicules qui contiennent Glut3 sont les granules  $\alpha$  qui ont également le facteur d'adhésion P-sélectine et plusieurs facteurs de croissance tels que le facteur de croissance dérivé de plaquettes (PDGF), le facteur de croissance semblable à l'insuline (IGF-1) et le facteur de croissance transformant bêta (TGF- $\beta$ ) (Heijnen et al., 1997). De façon analogue à l'action de l'insuline dans l'adipocyte, la thrombine semble engager le recrutement des granules  $\alpha$  par l'intermédiaire d'un mécanisme où Akt est phosphorylé par la phosphatidyl-inositol-3 phosphate kinase (PI-3) (Ferreira et al., 2003). Dans toutes ces cellules, la translocation de Glut3 se produit en réponse à une augmentation des besoins énergétiques nécessaire à une activation cellulaire (Simpson et al., 2008).

### 2.4.3 GLUT5

Glut5 a été isolé à partir des banques d'ADNc de cellules intestinales épithéliales humaines (Kayano et al., 1988) et de cellules du jéjunum de lapin (Rand et al., 1993). Glut5 n'est pas un transporteur du glucose mais plutôt un transporteur du fructose avec un Km d'environ 6 mM (Burant et al., 1992). Ce transporteur n'est pas inhibé par la cytochalasine B (qui inhibe le transport des Glut1, Glut2, Glut3 et Glut4 (Bernhart, 2003)) la phlorétine ou phlorizine (qui inhibent le transport active de glucose par les cotransporteurs glucose sodium dépendants SGLT1 et SGLT2 (Chan,1962)), ce qui indique que Glut5 est un transporteur spécifique du fructose (Mate et al., 2001). Glut5 est exprimé principalement dans la région jéjunale de l'intestin grêle qui a un rôle prépondérant dans l'absorption intestinale du fructose. Il est également présent en quantités moins importantes dans les reins, les muscles squelettiques, les adipocytes blancs, les spermatozoïdes, les cellules microgliales du cerveau et les leucocytes (Uldry & Thorens, 2004). Le rôle physiologique de Glut5 dans le macrophage n'est pas encore bien compris puisque les concentrations sanguines de fructose et dans les tissus sont très faibles (concentration plasmatique de l'ordre de 31  $\mu\text{mol/l}$  (Pitkänen, 1996), dans le nerf sciatique 0,13  $\mu\text{mol/l}$  (Mayhew, Gillon & Hawthorne, 1983), et que Glut5 est un mauvais transporteur du glucose (Calder, Dimitriadis & Philip, 2007).

## Chapitre 3 : Modèle utilisé : Le macrophage humain

Le macrophage est aujourd'hui considéré comme un acteur très important dans les pathophysiologie de l'athérosclérose et de la résistance à l'insuline. L'échange des signaux entre macrophages inflammatoires et adipocytes peut être en relation avec la résistance à l'insuline des tissus périphériques (Liang et al., 2007). D'autre part, lors de l'athérogénèse, les macrophages jouent un rôle crucial dans le processus inflammatoire de la paroi vasculaire (Boyle, 2005).

### 3.1 Macrophage et résistance à l'insuline

#### 3.1.1 Macrophage et tissu adipeux

Un élément très important dans la genèse de l'inflammation en réponse à l'obésité est le tissu adipeux. Ce dernier sert non seulement à accumuler des lipides, mais également agit en tant que glande capable de produire des signaux paracrines et endocrines. Le tissu adipeux est composé d'une grande variété de cellules parmi lesquelles on trouve des adipocytes, des macrophages, des lymphocytes, des preadipocytes et des cellules endothéliales (Olefsky & Glass, 2010). Le tissu adipeux contient des macrophages (Figure 11) et leur quantité est corrélée positivement avec le degré d'obésité de l'individu (Weisberg et al., 2003; Xu et al., 2003). Les adipocytes sécrètent des adipokines telles que la leptine et l'adiponectine (Wang et al., 2008; Scherer, 2006; Halberg, Wernstedt & Scherer, 2008) qui augmentent la sensibilité à l'insuline dans les tissus périphériques (Hennige et al., 2006; Yamauchi et al., 2002) et d'autres hormones qui diminuent la sensibilité périphérique à l'insuline telles que la résistine chez les rongeurs (Steppan et al., 2001)) et la protéine se liant au rétinol-4 (RBP4) chez l'humain et la souris (Yang et al., 2005). On peut donc dire que les différentes adipokines sécrétées par le tissu adipeux dans un état physiopathologique donné ont des effets importants sur la sensibilité systémique à l'insuline. Les macrophages du tissu adipeux sont une source majeure des cytokines pro-inflammatoires qui peuvent induire une réduction de la sensibilité à l'insuline. L'activation des macrophages du tissu adipeux conduit à la libération de toute une variété de chimiokines qui vont à leur tour recruter des macrophages supplémentaires. Ce cercle vicieux favorise la mobilisation de macrophages dans le tissu adipeux et maintient ainsi un état d'inflammation dit chronique (Olefsky & Glass, 2010). TNF $\alpha$ , IL-6 et IL-1 $\beta$  exercent des effets paracrines qui activent des voies inflammatoires à l'intérieur des cellules cible. C'est ainsi que les kinases N-terminal Jun (JNK) (Hirosumi et al., 2002; Bandyopadhyay et al., 2005) et la kinase inhibitrice du facteur nucléaire kappa B (IKK) $\beta$ , (Hotamisligil et al., 1995), sont activées. À leur tour, ces kinases activent des facteurs de transcription tels que l'activateur de la protéine 1 (AP1) (c-Jun/Fos) et le

facteur nucléaire kappa  $\beta$  (NF- $\kappa$  $\beta$ ) qui vont induire la transcription d'un nombre important de gènes impliqués dans des voies inflammatoires (Nguyen et al., 2007). Ces kinases peuvent également phosphoryler le substrat du récepteur d'insuline (IRS), les récepteurs d'insuline eux-mêmes et possiblement d'autres molécules de la voie insulinaire, ce qui va conduire à l'inhibition de l'action de l'insuline et générer un état de résistance cellulaire à l'insuline (Olefsky & Glass, 2010). Chez l'homme, la résistine est produite principalement par les macrophages (et non par le tissu adipeux comme dans le cas des rongeurs) (Figure 10) ce qui soulève la question de savoir si la résistine produite par les macrophages peut diminuer la sensibilité systémique à l'insuline. L'expression de la résistine par les macrophages humains est induite par le lipopolysaccharide (LPS) et l'endotoxémie (présence d'endotoxines dans le sang) et en général par des états pro-inflammatoires (Lehrke et al., 2004). De plus, les personnes ayant un diabète de type II présentent une corrélation positive entre l'augmentation des niveaux plasmatiques de résistine et les niveaux du récepteur soluble à TNF (Lehrke et al., 2004). D'autre part, lorsque des souris KO pour la résistine sont humanisées par l'insertion du transgène de la résistine sous le contrôle d'un promoteur spécifique du macrophage, il apparaît une induction de l'inflammation au niveau du tissu adipeux et de la résistance à l'insuline (Qatanani et al., 2009). Ces observations suggèrent que l'induction de la résistine produite par les macrophages contribue à la résistance à l'insuline lors de l'endotoxémie, l'obésité et autres états inflammatoires chez l'humain (Olefsky & Glass, 2010).

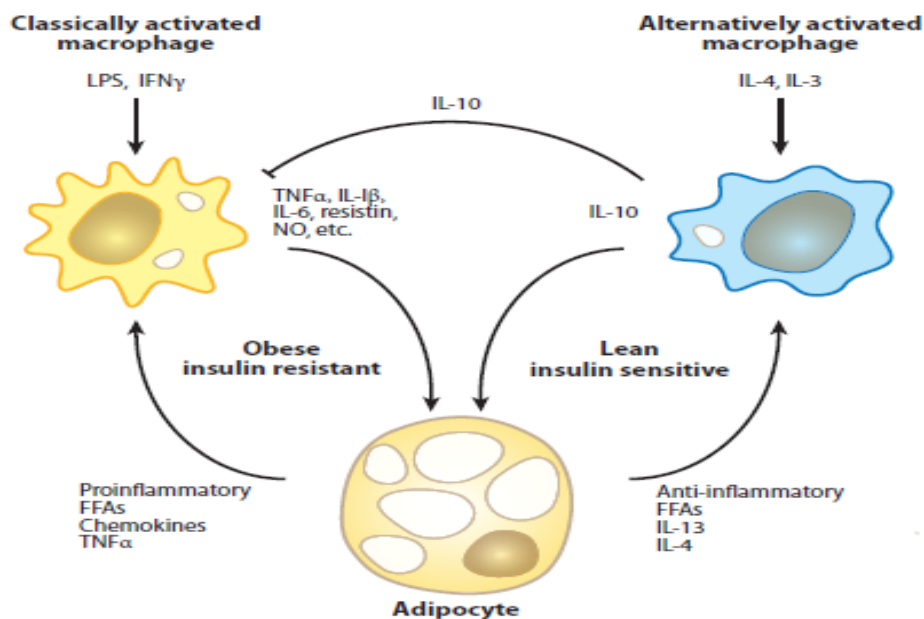


Figure 10. Facteurs régulant la polarité de macrophages et la résistance à l'insuline dans le tissu adipeux. (Olefsky & Glass, 2010).

### 3.1.2 Macrophage, foie et muscle

La résistance à l'insuline hépatique associée à l'obésité est caractérisée par une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires et une accumulation massive des lipides dans les hépatocytes (stéatose) (Figure 11). Le principal type de macrophage observé dans le foie est la cellule de Kupffer qui communique avec les hépatocytes d'une façon analogue à celle des macrophages et ses adipocytes (Olefsky & Glass, 2010). Ces cellules de Kupffer contribuent à la production de médiateurs de l'inflammation qui induisent la résistance à l'insuline hépatique. En effet, chez les souris knock-out pour IKK $\beta$ , gène dont le produit contribue à la réponse inflammatoire des cellules de Kupffer, une atténuation de la résistance à l'insuline due à une alimentation riche en gras est observée (Arkan et al., 2005). Également, au niveau du muscle (Figure 11) squelettique de souris, une accumulation de macrophages pro-inflammatoires résultant d'une alimentation avec un contenu riche en gras a été constaté (Nguyen et al., 2007; Patsouris et al., 2008). Ces macrophages se localisent dans des dépôts intramusculaires du tissu adipeux qui s'accumulent dans les muscles squelettiques chez les personnes obèses. Cette accumulation des macrophages dans le muscle soulève la possibilité que ces macrophages puissent localement contribuer à la résistance à l'insuline (Olefsky & Glass, 2010).

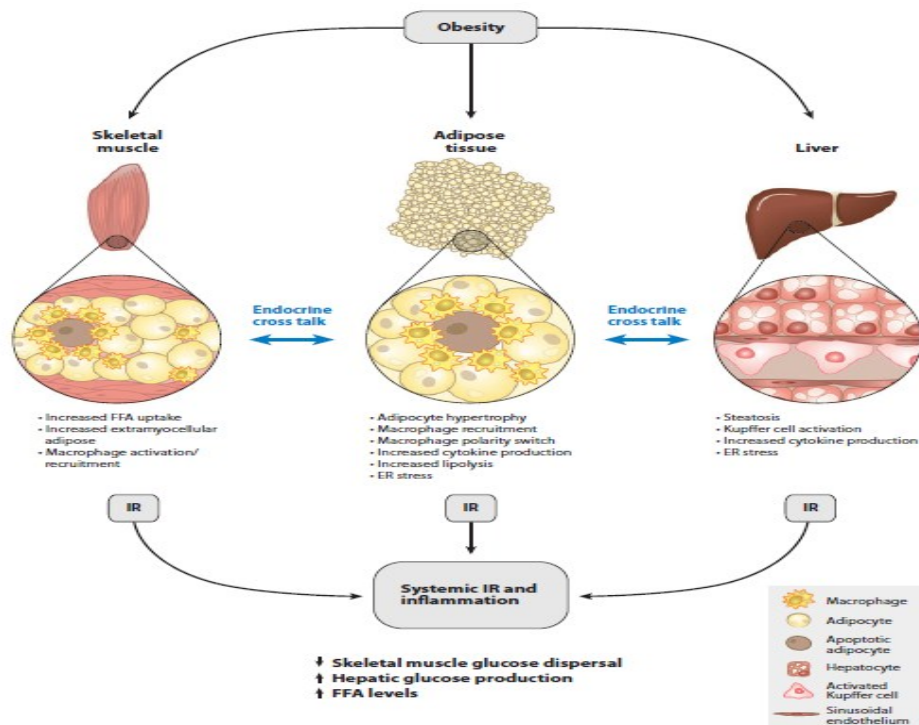


Figure 11. L'obésité induit de changements dans le tissu adipeux, foie et muscle qui résultent dans une résistance à l'insuline. (Olefsky & Glass, 2010).

## 3.2 Macrophage et athérosclérose

ainsi à la formation supplémentaire de cellules spumeuses, et à la synthèse de protéines de la matrice extracellulaire conduisant à la formation de la plaque fibreuse (Glass & Witztum, 2001). Le développement de cette plaque produit un rétrécissement progressif de la lumière artérielle. La sécrétion de metalloprotéinase responsable de la fragilisation de cette matrice extracellulaire associée à une augmentation de la pression sanguine (rétrécissement de la lumière vasculaire) va conduire à la rupture de la plaque. La rupture de la plaque expose les lipides de la plaque et des facteurs tissulaires au sang et une cascade de coagulation est générée avec la formation d'un caillou sanguin qui va bloquer l'artère (Glass & Witztum, 2001). Cette obstruction de la lumière vasculaire provoquera un arrêt soudain de la circulation sanguine et a des accidents cardiovasculaires (J Davies et al., 1993). La plupart des plaques fibreuses sont asymptomatiques, et restent stables pour longtemps, mais certaines d'entre elles vont devenir vulnérables ou instables. Tout une série d'événements vont générer une plaque instable : l'amincissement de la plaque fibreuse; l'apparition d'un noyau nécrotique, la présence de macrophages en apoptose, différents débris de macrophages et des lipides extracellulaires; un état inflammatoire important associé à la présence de leucocytes activés et de cytokines inflammatoires (Tabas, 2004). Ainsi, le macrophage est très impliqué dans cette déstabilisation de la plaque, non seulement en tant qu'agent inducteur de l'inflammation et cellule productrice de cytokines inflammatoires, mais également par la production de protéases de la matrice qui parallèlement à la mort des cellules musculaires lisses vasculaires entraîne un amincissement significatif de la plaque fibreuse (Libby, 2002; Tabas, 2004).

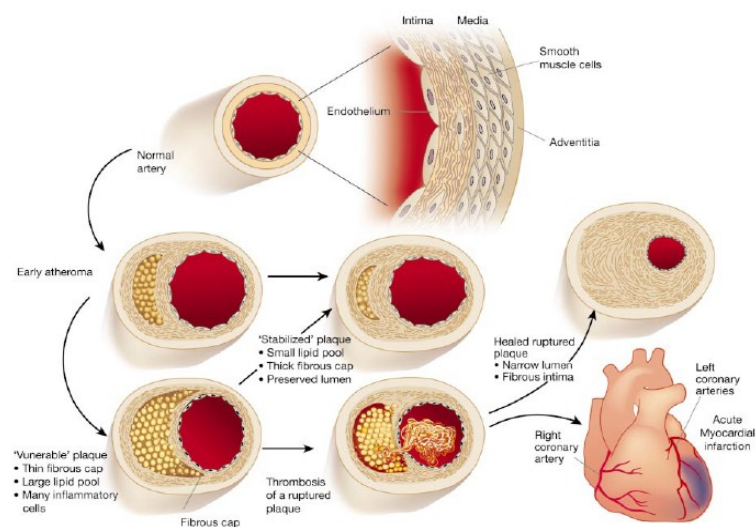


Figure 12. Développement de la plaque d'athérosclérose au cours du temps. (Libby, 2002)





# ARTICLE

## 1. Hypothèse de travail

Une interrelation entre le diabète et l'athérosclérose semble exister (Beckman, Creager & Libby, 2002), et bien que beaucoup des travaux soient dédiés à l'étude tant du diabète que de l'athérosclérose, le facteur commun aux deux pathologies n'a pas encore été élucidé. Ce facteur commun pourrait bien être le récepteur hépatique X (LXR), qui intervient dans le métabolisme du cholestérol, des lipides et du glucose (Baranowski., 2008). D'autre part, cette hypothèse de travail est appuyée par le fait que le rôle du macrophage dans le développement de l'athérosclérose et du diabète a été bien établi.

C'est ainsi que nous pensons que LXR doit avoir une influence sur le transport du glucose dans le macrophage humain et que cette influence doit être affectée dans des conditions que favorisent le diabète et l'athérosclérose telle que l'hyperglycémie et l'hyperglycémie/hyperinsulinémie.

## 2. Role of liver x receptor (LXR) on glucose transport in human macrophages

Jorge A. Barreto-Reyes<sup>1</sup>, André Marette<sup>2</sup> and Christophe Garenc

1 Centre de recherché du CHUL, Québec city, Canada

2 Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec, Québec City, Canada

3 Institut National de Santé Publique du Québec, Québec City, Canada

### Correspondence to:

Christophe Garenc, Ph.D.

Institut national de santé publique du Québec

945, avenue Wolfe

Quebec City, Québec G1V 5B3, Canada

Tel: (418) 650-5115 ext. 5527

Email: [Christophe.garenc@inspq.qc.ca](mailto:Christophe.garenc@inspq.qc.ca)

**Keywords:** Diabetes, atherosclerosis, LXR, Gluts, glucose transport.

## **ABSTRACT**

LXRs are nuclear receptors involved in lipids, cholesterol and carbohydrates metabolism. Their natural agonists are believed to be oxidized derivatives of cholesterol known as oxysterols. Cholesterol and oxysterols are associated with the development of atherosclerosis a cardiovascular disease having devastating consequences in modern societies. One of the major risk factors for atherosclerosis is type II diabetes. In this report, trying to make a link between atherosclerosis and diabetes, we attempt to demonstrate that LXRs may have an effect on glucose transport in conditions of hyperglycemia or hyperglycemia/hyperinsulinemia, two specific characteristics of type II diabetes. We found that in the THP1 human macrophage Glut1, Glut3, Glut5 and Glut9 are expressed. Glut 5 is known as a fructose transporter and Glut9 as a urea transporter. We unveil that Glut1 was involved in glucose transport in human THP1 macrophages, and it was sensible to induction with insulin. Both specific and less specific activation of LXR increased glucose transport in hyperglycemic and hyperglycemic/hyperinsulinemic conditions but in a different way. This study demonstrated that activation of LXRs nuclear receptors that are sensible to oxysterols have benefic effects on glucose transport in human macrophages.

## INTRODUCTION

Atherosclerosis, a component of cardiovascular diseases is a chronic inflammatory disease associated to a lipid disorder [1]. Type II diabetes is an important risk factor that increases morbidity and mortality rate for patients suffering from cardiovascular diseases [2]. Coronary complications are the principal cause of death for type II diabetic patients since 75% of them die because of complications related to cardiovascular diseases [3,4], and diabetics are 2 to 4 times more susceptible to develop atherosclerosis than non-diabetics [2]. Additionally of being the principal cause of mortality for type II diabetic patients, cardiovascular diseases consequences of diabetes represent a huge burden for the Canadian health care system [5].

Liver X receptors (LXRs) are members of the nuclear receptor family of transcription factors that are ligand dependent for their activation [6]. Two LXR isoforms have been identified and are referred to as LXR $\alpha$  and LXR $\beta$  [7]. When activated, the LXR receptor form a heterodimer with the obligate partner retinoic acid receptor (RXR) and thereafter bind to specific sites called LXRE (LXR response elements) located in the promoter region of target genes. Their endogen agonists comprise a series of oxidized cholesterol derivatives known as oxysterols [8]. It has also been suggested that glucose could be an endogen agonist [9], but this claim has been subject to several controversies [10]. Another possibility has been proposed in which glucose is seen as an indirect activator of LXR via a postraductional regulation system known as O-linked glycosylation within cytoplasmic and nuclear compartments [11]. It is clear now that LXR receptors are important regulating factors in the carbohydrate, cholesterol and lipid metabolisms [6].

Usually, two synthetic agonists are commonly used as LXRs activators. First, the T0901317, which is not an exclusive LXRs activator because it is able to induce the activity of PXR (Pregnane X Receptor) [12] and FXR (Farnesoid X Receptor) [13]. Secondly, the GW3965 is specific of LXRs with a little better affinity for LXR $\beta$  than for LXR $\alpha$  but not sufficiently to activate LXR isoforms separately [12].

Initially, atherosclerosis was viewed as a lipidic disease with a predominant role of cholesterol, but a modern view emphasizes inflammation as an important factor as cholesterol itself [14, 15, 16, 17, 18]. The identification of numerous monocyte-derived macrophages within atherosclerotic plaques, and the gradual recognition of their importance in atherogenesis, provided the missing link between cholesterol and the biology of this disease [19]. Briefly, the path conducting to the development and progression of atherosclerosis is as follows. Following an arterial wall lesion, atherogenic lipoproteins from circulating blood infiltrate the intima and accumulate beneath the arterial wall [20]. Once in place, the atherogenic particles referring in majority as small and dense LDL particles (Low Density Lipoprotein) could undergo oxidation that thereafter induce endothelial and smooth muscle cells to produce inflammatory and adhesion molecules that are able to attract and allow other monocytes to infiltrate the wall vessel [21]. These monocytes are thereafter transformed into macrophages that in turn produce inflammatory molecules which can enhance the oxidation and attraction of

LDL particles leading to a vicious local effect [22]. As the number of macrophages begins to build up within the intima, they can avidly internalize the oxidized LDL via scavenger receptors [23]. The repetition of this process generates macrophages loaded with lipids, called foam cells, which are a prominent feature of the atherosclerotic plaque. By capturing these lipid particles, intimal macrophages can follow different pathways, ranging from those that promote local vascular damage through various secreted mediators, to cell apoptosis that can contribute to atheroma progression by adding antigenic and thrombogenic debris to the lesion [18]. At the beginning, the lesion is called a fatty streak that in time will be transformed into the atherosclerotic plaque with a central atheromatous core that narrows the vessel lumen, and that is covered by a fibrous capsule called the fibrous cap [22, 24]. The center of the plaques become necrotic, instable and consists of amorphous necrotic glue-like lipid materials and cholesterol crystals. Atherosclerotic plaques develop into advanced complicated lesions, accompanied by plaque rupture, ulceration, thrombosis, and calcification [19].

LXR is known to have a protection effect against atherosclerosis since LXR agonists increase reverse cholesterol transport from macrophages by increasing expression of macrophage apolipoprotein E and cholesterol efflux transporters ABCA1 and ABCG1 (ATP-binding cassette, subfamily A, member 1 and ATP-binding cassette, subfamily G, member 1, respectively). This is likely an important part of the mechanism for LXR-dependent protection from atherosclerosis because these effects are not observed in agonist-treated LXR knockout mice or their isolated macrophages. Indeed, excess accumulation of cholesterol within macrophages at sites of atherosclerotic lesions converts them into foam cells and accounts for the major fraction of lesion deposited cholesterol. LXR interferes with the pathology of atherosclerosis by two complementary agonist dependent signaling pathways in macrophages. One is through directly by activating genes to promote reverse cholesterol transport and limit cholesterol deposition while the other is through inhibition of proinflammatory gene expression, which reduces lesion-associated inflammation. [25, 26, 27]. However, one question comes to mind: why there is atherosclerosis at all, if LXR is able to respond to the insults cholesterol induces in the macrophage? It is probable that, at a specific point in time during the progression of the atherosclerotic plaque, the adaptive mechanisms LXR employs to counter the cholesterol-oxysterol accumulation are overwhelmed by its increasing influx, leading to an accelerated formation of foam cells [28].

Facilitated diffusion of glucose and other hexoses through the plasma membrane is possible because of the catalytic action of a family of proteins called Gluts (gene symbol SLC2A (solute carrier family 2)) [29]. Several members of this family are present in macrophages, such as Glut1, Glut3 and Glut5 [30, 31]. Glut 1 is a protein with a molecular weight of 55 kDa present in a wide variety of cells and is an isoforme very conserved through evolution [32, 33, 34]. The affinity of Glut1 for glucose is intermediate, with a  $K_m$  of approximately 3mM. Glut3 is an isoforme present in cell types with considerable energetic needs as spermatozoids, embryos before implantation, leukocytes nervous cells and cancerous cells [35], it has a strong affinity for glucose, with a  $K_m$  of 1,4 mM [36]. Glut5 is not a glucose transporter but was proposed as a fructose one with a  $K_m$  of 6 mM [37].

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Cell culture and challenge***

THP1 human monocytes were maintained in suspension culture using RPMI-1640 media (Invitrogen) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS) at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Monocytes were differentiated into adherent macrophages following a 24 hours incubation period with 100 nm of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). Then, two sets of experiences were performed. First, THP-1 macrophages were tested for their responsiveness to insulin using a glucose transport assay. Different insulin concentrations (0, 50, 100, 200, 300, 400 and 500 nM) and incubation times (0, 5, 10, 15, 30, 45 and 60 min) were tested. In the second set of experiences, glucose transport was determined in THP-1 macrophages after a 48 hours incubation with either the LXR agonists T0901317 or GW3965 in two glyceic conditions: hyperglycemic conditions using hyperglycemic medium RPMI-1640 supplemented with glucose to reach a final glucose concentration of 17 mM of glucose, and hyperglycemic/hyperinsulinemic conditions using hyperglycemic and hyperinsulinemic medium MSFM 17 mM of glucose and 350 nM of insulin (technical support from invitrogen). To minimize fatty acids interference with LXRs, RPMI-1640 medium supplemented with 2% fetal bovine serum was used for the hyperglycemic condition, whereas the serum free media Macrophage-SFM (Invitrogen) was used for the hyperglycemic/hyperinsulinemic condition. Before the measurement of glucose transport, THP-1 macrophages were incubated with an acute exposure of insulin (100 nM) for 30 min to mimic the increase of insulin after a meal. Finally, monocytes and macrophages were cultured without any treatment to determine the effect of macrophage differentiation on the expression levels of GLUT1, GLUT3, GLUT5 and GLUT9. Expression levels of GLUTs of interest were also determined either in hyperglycemic or hyperglycemic/hyperinsulinemic conditions with or without LXR synthetic activators.

### ***Glucose Transport***

Glucose transport was determined using the 2-deoxyglucose uptake assay described by Yamanishi [38]. Briefly, THP-1 macrophages were washed with HEPES buffer and incubated with a [<sup>3</sup>H]-2-deoxyglucose solution (1μCi/ml) (Perkin-Elmer, Boston, USA) for 8 minutes. Reaction was stopped by pumping out the radioactive medium and the addition of a chilled NaCl solution (0.15 M). Then, cells were lysed using 500 μl of NaOH (0.05 M). A volume of 400 μl was incubated overnight with 7 ml of scintillation liquid whereas a volume of 40 μl was used to determine total protein content using BSA protein assay. Radioactivity was determined by liquid scintillation counting and results corrected for glucose residual transport determined following a cytochalasin B treatment (10 nM) (which inhibits glucose transport of Glut1, Glut2, Glut3 and Glut4 [39]) and

cell total protein content was determined. Results were expressed as pmol of [<sup>3</sup>H]-2-deoxyglucose/mg of protein/min.

### ***Western blot analysis***

A total of 2.10<sup>6</sup> macrophages/well were washed twice with cold PBS and solubilised with 400 µl of lysis buffer. After centrifugation (1 400 rpm for 10 min), pellet was eliminated and a supernatant fraction was collected to determine total protein content using BCA protein assay. On an 8 % SDS-PAGE gel, each well was charged with 25 µg of total protein diluted in Laemmli buffer (1X). The first well was charged with the molecular weight marker. Electrophoresis was conducted at 100 V for 2 hours and thereafter, proteins were transferred electrophoretically onto nitrocellulose membranes at 20 V overnight. Non-specific antibody binding to membranes proteins was blocked following incubation with a 5 % (w/v) non-fat dried milk in TBST for 1 hour at room temperature and steady agitation. Primary antibodies (produced in rabbits) were prepared in 5 % (w/v) non-fat dried milk (dilution: 1/10 000) and used to incubate overnight at 4°C. Then, membranes were washed three times with TBST for 5 min followed by incubation with the horseradish-conjugated anti-rabbit secondary antibody (dilution: 1/20 000 in 5% (w/v) non-fat dried milk in TBST) for 1 hour at room temperature. Finally, membranes were washed three times with TBST for 10 min and incubated with 5 ml for 5 min chemiluminescent HRP substrate kit (Millipore, Billerica, USA). Luminescence was determined using the fusion FX7 imaging system (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, France). The internal control used was α tubulin. Membranes were dried overnight and washed three times with TBS for 10 minutes and incubated with the mouse α tubulin antibody overnight and revealed with horseradish-conjugated anti-mouse secondary antibody.

### ***mRNA expression level***

Total RNA was extracted using the Trizol method (Invitrogen). A total of 5.10<sup>6</sup> THP-1 cells per well were cultured and RNA extracted according to the manufacturer protocol. Total RNA was treated with DNase I before cDNA generation by reverse transcriptase using oligo dT primer and Expand reverse transcriptase (Roche Applied Sciences). Expression levels were measured by quantitative real time PCR using appropriate primers (for primers sequences, refer to Stuart et al. [40]) and Cyber Green Fast Start (Roche Applied Sciences, Canada) in the Rotogen RG 3000A (Corbett Research, Australia). Expression levels of Glut1, Glut2, Glut3, Glut4, Glut5, Glut8, Glut9 and Glut11 were measured in triplicate and expressed relative to Basal transcription factor 3 (BTF3).

### ***Statistical tests***

Statistical analyses were conducted using Student's t test. A p-value ≤ 0.05 was considered as significant.

## **RESULTS**

### **Expression of GLUTs in human THP-1 macrophages**

To determine which GLUT are expressed during macrophage differentiation, the mRNA expression levels of Glut1, Glut2, Glut3, Glut4, Glut5, Glut7, Glut8, Glut9 and Glut11 were determined in monocytes and differentiated THP-1 macrophages. Only Glut1, Glut3, Glut5 and Glut9 were expressed in THP-1 monocytes and in a greater extent in macrophages. The Glut4 expression was not observed and this observation corroborates with previous reports [41, 42]. mRNA expression levels increase following monocyte-macrophage differentiation and was important for Glut1 and Glut5, moderate for Glut3 and there was no significant change of Glut9 mRNA level compared to the control (figure 1).

### **Insulin sensibility of human macrophages**

To test whether there is a facilitative glucose transport in human macrophages, a glucose transport assay was conducted. After background transport subtraction, facilitative glucose transport was determined in human THP-1 macrophages (control bars in figure 2 and 3). To test whether a glucose transport is responsive to insulin, a concentration course (insulin concentration between 0 and 500 nM for 30 minutes) was performed. The concentration course demonstrated that insulin-sensitive glucose transport is significantly increased from 50 nM ( $P = 0.02$ ) to 500 nM of insulin ( $P = 0.0001$ ), with 100 nM as the optimal concentration (60% increase,  $p = 0.0005$ ). At greater concentrations of insulin than 100 nM, glucose transport return close to values equivalent to basal level (figure 2). Also a time course (times between 0-60 minutes using 100 nM of insulin) was performed. In the insulin time course, a significant increase in the insulin-sensitive glucose transport is only observed at 30 min ( $p = 0.045$ ).

### **mRNA expression of GLUT1, GLUT3 GLUT5 and GLUT9 under conditions of hyperglycemia or hyperglycemia hyperinsulinemia and LXRs activation by synthetic agonists**

In the attempt to emulate pathological conditions in which macrophages could be involved, the mRNA expression of Glut1, Glut3, Glut5 and Glut9 in THP1 macrophages were measured under hyperglycemia (HG) or hyperglycemia/hyperinsulinemia (HG/HI) conditions. When investigating the mRNA expression level of all Gluts studied under the different conditions we can say that overall, their mRNA expression level (figure 4) mimic the similar expression levels already observed following monocyte to macrophage induction where Glut1 expression is the strongest, followed by Glut5. A difference is observed for the expression levels of Glut3 and Glut9 where Glut9 levels are moderate and Glut3 are marginal (figure 4). Figure 5 shows the effect of HG/HI conditions relative to HG conditions without any treatment with the agonists T0901317 or GW3965. Although only Glut1 has a statistically significant difference between HG/HI conditions ( $p = 0.011$ ) there is a trend of the different Gluts to increase mRNA expression in HG/HI conditions. Figures 6 to 10 show each Glut



expression levels under HG or HG/HI conditions and the effect of the synthetic agonists T0901317 and GW3965. In the case of Glut1 (figure 6) the two synthetic agonists GW3965 and T0901317 elicited a significant expression induction of mRNA expression level under HG conditions (T0901317:  $p = 0.07$  and GW3965:  $p = 0.023$ ). Under HG/HI conditions, no statistically significant was observed for the induction relative to DMSO. Glut3 RNA expression (figure 7) shows an inhibition trend under HG/HI conditions and stable expression relative to control under HG conditions. However, its expression level is so marginal (figure 4) that no statistical significance may be associated with this inhibition trend. For both T0901317 and GW3965, the Glut5 RNA expression levels were reduced under HG/HI conditions ( $p = 0.13$  and  $0.003$  respectively). On the other hand under HG conditions, there is a tendency (no statistically significant) to increase expression following T0901317 activation and a slight depletion following GW3965 activation (figure 8). Finally Glut9 (figure 9) shows a reduction in the mRNA expression levels under HG/HI conditions using either T0901317 or GW3965 ( $p = 0.022$  and  $0.044$  respectively) and an inhibition trend with T0901317 and induction trend for GW3965 under hyperglycemic conditions but without any statistically significant difference.

#### **Protein abundance of Glut1 and Glut3 under hyperglycemic and hyperglycemic/hyperinsulinemic conditions**

In an attempt to correlate gene expression levels with protein abundance, a western blot was performed for Glut1 and Glut3. The conditions used for the western blot were either HG or HG/HI, both in presence of synthetic antagonists. From all Gluts we tested and that are expressed in macrophages, Glut1 was chosen because its mRNA expression level was the most abundant. Glut3 was included also because it has been reported to be present in the monocyte-macrophage and be able to be translocated in response to insulin to the plasma membrane [30, 31]. The second greatest level in mRNA expression that we observed was Glut5 but we did not consider it for western blot test since it has been attributed to be a fructose transporter [43]. The low levels of Glut3 mRNA expression were in this case correlated with a very low level of protein abundance (the western blot did not show detectable presence of this glucose transporter in human THP1 differentiated macrophage). On the other hand, Glut1 was detected with a signal at 55 kda (Figure 10). The quantification of the western blot did not show any statistically significant change under the conditions tested, but we can observe a trend for an increase in Glut1 protein abundance under conditions of hyperglycemia/hyperinsulinemia with both agonists (figure 11).

#### **Glucose transport under hyperglycemia or hyperglycemia/hyperinsulinemia conditions followed by activation of LXRs by synthetic agonists**

In an attempt to determine whether LXR could affect the glucose transport in human differentiated macrophage, a series of glucose transport tests were performed using the specific LXR agonist GW3965 and

the less specific T0901317 to mimic the pathological conditions of hyperglycemia or hyperglycemia/hyperinsulinemia. For instance, 30 minutes previous to the glucose transport tests (see materials and methods) an extra burst of insulin was given to mimic the increase of insulin level after a meal.

### ***Hyperglycemic conditions***

In hyperglycemic medium, T0901317 increases glucose transport as compared to control for all the agonist concentrations used, and the increment was of the same order for each one of them (between 19.5% and 34%) (Figure 12). When insulin was added 30 minutes before transport, T0901317 increased glucose transport statistically and significantly only at a concentration of 0.1  $\mu\text{M}$  as compared to control ( $p = 0.011$ ) (figure 12). Of interest, addition of insulin alone increased glucose transport in macrophages (ctrl and DMSO, Figure 12).

When hyperglycemic medium was used with increased concentration of GW3965, we observed an increase in the glucose transport both with and without a burst of insulin 30 minutes previous to transport. However, glucose transport tends to plateau at higher agonist concentrations, a tendency that was very clear when insulin was added 30 minutes before transport. This response is stronger without previous 30 minutes supplement with insulin (figure 13).

### ***Hyperglycemic/hyperinsulinemic conditions***

In HG/HI condition and in presence of increasing concentrations of T0901317 (figure 14), glucose transport was induced followed by a return to control levels at higher agonist concentrations. This is very clear when using agonist without insulin 30 minutes before transport. The higher response was obtained for a T0901317 concentration of 25  $\mu\text{M}$  ( $p = 0.001$ ). When using acute insulin treatment before glucose transport, the response is weaker but at higher concentrations we observed a convergence between the two sets (with and without acute insulin treatment before transport). Of interest, the effect of acute insulin alone, did not change glucose transport in HG/HI conditions (ctrl in Figure 14) whereas it rather trigger a statistically significantly ( $p = 0.023$ ) decrease in glucose transport with the vehicle (DMSO, figure 14).

Finally, in HG/HG conditions using increasing concentrations of GW3965, we observed an induction in glucose transport with a plateau as LXR agonist concentrations increase. Here again the transport is stronger using acute insulin treatment before testing glucose transport (figure15)

## DISCUSSION

### ***Different Gluts are present in THP1 human macrophages***

Several members of the Glut family are present in the macrophage THP1. Glut1, Glut3 and Glut5 have already been described in the literature as carbohydrate transporters expressed in macrophages [30, 31]. In the present study, we found mRNA expression of another transporter, Glut9. Interesting, Glut9 is not believed as a glucose transporter but rather as an urate transporter, and have an important role in the homeostasis of this molecule (normal plasma range is 1.8 to 7.1 mmol urea per liter [44]), which is an important anti-oxidant agent [45, 46]. If macrophages are able to uptake urate in the intima, then it would increase the oxidant characteristics of the blood vessel wall in favour of a greater oxidation processing of internalized LDL particles, a condition which favours atherogenesis. The LXR regulation on the expression of this transporter could have positive or negative implications in the onset and development of the atherosclerotic lesion, depending on the influence of LXR as it reduces or enhances the expression of Glut9. In HG/HI conditions only, Glut9 mRNA expression level was statistically significantly reduced (T0901317:  $p = 0.023$  and GW3965:  $p = 0.044$ ) (figure 9). This observation lead to the speculation that in pathological conditions, elevated concentrations of glucose and insulin lead to a diminution in the uptake of urate resulting in a less oxidative effect in the intima of the arteries. Nevertheless patients with chronic kidney disease have a likelihood to suffer from myocardial infarcts that is incremental with progression of renal insufficiency and could reach a 65 fold increase risk, and a consequence of chronic kidney disease, hyperurecemia appears to be pro-atherogenic [47]. The urea influence over atherogenesis would be due to the modification of LDL particles into carbamylated LDL (LDLc) that participate in arterial vessel damage [47, 48]. It could be possible that in subjects with normal level of urea, its antioxidant effect is beneficial but if the level becomes too important, then its effect is atherogenic. Another intriguing point regarding the Gluts mRNA expression in macrophages is the relative high mRNA expression of Glut5. The presence of Glut5 in macrophages is somehow a mystery since serum and tissues fructose concentrations are very low and Glut 5 does not exhibited a good affinity for glucose [49]. Remarkably, in hyperglycaemic/hyperinsulinemic conditions, both agonists, but in a greater extend GW3965, depleted the expression of Glut 5 (figure 8).

Even if Glut3 RNA was detected, it was the less represented of all the Gluts we measured in THP1 human macrophage, and only trace protein abundance was detected.

Glut1 is probably the quantitatively most important carbohydrate transporter among all the Gluts in human THP-1 macrophages. We speculate that LXR induce mRNA expression of Glut1 in response to an increase in glucose availability, whereas, in conditions of HG/HI, this effect disappears, suggesting a plateau in glucose macrophage influx. One possibility is that the insulin pathway may interfere with LXR at some point reaching a plateau in its induction effects on Glut1 RNA. Indeed, this assertion needs to be investigated further. The Glut1

protein abundance did not show a statistically significant difference under the conditions studied, and this could indicate that a post-transcriptional regulation should take place for Glut1.

#### ***Glucose transport in macrophages THP1 appears to be sensitive to insulin***

The human THP1 macrophage responded to stimulation by insulin with an optimal insulin concentration of 100 nm and a time of 30 minutes (figure 2 and 3). One of the reasons to carry out western analysis with Glut3 was that we believed that this transporter was responsible for the insulin dependent glucose transport in human THP1 macrophages. Indeed, Glut3 is known to be present in intracellular pool of white cells and may be recruited to the plasma membrane upon insulin activation in a manner entirely analogous to that of Glut4 translocation in muscle and adipose tissue [50]. Given the low levels of mRNA expression of Glut3 (figure 4) and that only protein abundance traces were observed, we speculate that the insulin dependent glucose transport in the THP1 macrophage occurs under the influence of Glut1. Glut1 has been seen as a basal transporter of glucose and its translocation from endosomal compartments to the plasma membrane was demonstrated to be insulin independent [51]. However, in the 3T3-L1 cells, it has been shown that Glut1 could be sensible to insulin activation [52, 53] and then it is possible that the insulin dependent glucose transport observed in this study is under the influence of Glut1 (Figure and figure 10 and 11).

#### ***Glucose transport in the THP1 macrophage is increased under the influence of the nuclear receptor LXR***

In HG conditions, LXRs activation increased the glucose transport, a phenomenon reinforced in presence of acute hyperinsulinemia. In pathological condition, LXRs could influence glucose transport in two different ways. First, as a transcription factor, LXR could induce an increment of Glut1 mRNA abundance (figure5) leading to an increase in insulin independent glucose transport. A surprising result was that Glut1 protein abundance was not modulated as Glut1 mRNA. One possible answer is that Glut1 should be saturated, and another unidentified Glut is committed by LXR to help Glut1. Secondly, LXR could have some influence in the insulin pathway since the presence of acute insulin triggers a greater glucose transport following LXR activation by T0901317. Time of 30 minutes is too short for LXR to induce an overproduction of Glut1 protein abundance suggesting that the action of the nuclear receptor have to be somewhere else, for example, at phosphorylation at the effectors level, such as those implicated in glucose transport triggered by insulin. The differential way in which the two agonists act reflects their specificity for LXR. For T0901317, the activation with low agonist concentrations or high ones have little effect. For GW3965, the high concentrations do not increase the transport more, but it reaches a plateau. The difference in the action of the two agonists indicates potentially an interference of T0901317 with other nuclear receptors targets such as PXR (Pregnane X Receptor) [12] and FXR (Farnesoid X Receptor) [13]. The fact that the glucose transport under high glucose

concentrations is increased, and that the two LXRs isoforms are present in most tissues of the body [6], indicates that this nuclear receptor could be a pharmacological target for the protection against diabetes.

Comparing glucose transport under HG/HL and HG conditions, we noticed that in general, the former is stronger than the later (figures 14 and 15 against figures 12 and 13) indicating that the insulin resistance hallmark of pathological high glucose and high insulin concentrations is not present in these macrophages. Several explanations come to mind; it is possible that 48 hours (time of incubation with the different conditions) is not long enough to induce any insulin resistance. It is also possible that macrophages are not susceptible to insulin resistance; despite the fact that they are well known to have an important role in the onset of insulin resistance for liver, muscle, and adipose tissue because of their influence in the development of inflammation states in these tissues [54], little is known about their own insulin resistance under these circumstances, it is reasonable to think that as they are inflammation agents, they are protected, until a certain point, against the deleterious effects of inflammation. However it is important to remember that in an *in vitro* environment, macrophages, could react different than in their normal endocrinal environment.

Even with the high concentrations of glucose and insulin, GW3965 is able to induce an increase and sustain glucose transport. Thus a specific activation of LXR could increase the input of glucose into the cell, and a high intracellular glucose concentration that in turn induces the production of reactive oxygen species (ROS) [55] that are able to induce inflammation [56] and cell apoptosis [57]. It could be postulated that the increase in glucose transport, it is not necessarily a good thing for macrophages located beneath the arterial wall. Given that LXR is probably either a direct [9] or indirect [11] glucose sensor, it would be interesting to see whether glucose by itself is able to induce an LXR dependent increment in glucose transport in human macrophages as suggested by Mitro et al, [9], and its effects in inflammation and apoptosis.

LXR is in the crossroads of lipids, cholesterol, and carbohydrates pathways, all of them important in insulin resistance, type II diabetes and atherosclerosis. Understanding how the intracellular glucose concentration, due to the facilitative glucose transport through the plasma membrane, can affect LXR in the regulation of the different pathways could be very helpful in the understanding of the relationship between diabetes and atherosclerosis.

## REFERENCES

1. Ross, R., *Atherosclerosis -- An Inflammatory Disease*. New England journal of medicine, 1999. 340(2): p. 115-126
2. Beckman, J.A., M.A. Creager, and P. Libby, *Diabetes and Atherosclerosis: Epidemiology, Pathophysiology, and Management*. The journal of the american medical association, 2002. 287(19): p. 2570-2581.
3. Lee, W.L., et al., *Impact of Diabetes on Coronary Artery Disease in Women and Men*. , 2000. 23(7): p. 962-968.
4. Booth, G.L., et al., *Relation between age and cardiovascular disease in men and women with diabetes compared with non-diabetic people: a population-based retrospective cohort study*. The lancet, 2006. 368: p. 29-36.
5. Jhonson, J. A., Pohar, S. L. & Majumdar, S. R. (2006). *Health Care Use and Costs in the Decade After Identification of Type 1 and Type 2 Diabetes A population-based study*. Diabetes care 29, 2403-2408.
6. Baranowski, M. *Biological Role Of Liver X Receptors*. *Journal of physiology and pharmacology*. 2008, 59, 31-55.
7. Ulven, S. M., Dalen, K. T., Gustafsson, J.-A. & Nebb, H. I.(2005). *LXR is crucial in lipid metabolism. Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids* 73, 59-63
8. Lehmann, J. M., Kliewer, S. A., Moore, L. B., Smith-Oliver, T. A., Oliver, B. B., Su, J.-L., Blanchard, D. E., Spencer, T. A. & Willson, T. M. (1997). *Activation of the Nuclear Receptor LXR by Oxysterols Defines a New Hormone Response Pathway*. The journal of biological chemistry 272, 3137-3140.
9. Mitro, N., Mak, P. A., Vargas, L., Godio, C., Hampton, E., molteni, V., Kreusch, A. & Saez, E. (2007). *The nuclear receptor LXR is a glucose sensor*. Nature 445, 219-223
10. Denechaud, P.-D., Bossard, P., A, L. J.-M., Millatt, L., Staels, B., Girard, J. & Postic, C. (2008). *ChREBP, but not LXRs, is required for the induction of glucose-regulated genes in mouse liver*. The journal of clinical investigation 118, 841-964.
11. Anthonisen, E. H., Berven, L., Holm, S., Nygård, M., Nebb, H. I. & Grønning-Wang. *Nuclear Receptor Liver X Receptor Is O-GlcNAc-modified in Response to Glucose*. The journal of biological chemistry, 2010, 285: p. 1607-1615.
12. Houck, K. A., Borchert, K. M., Hepler, C. D., Thomas, J. S., Bramlett, K. S., Michael V, B. & Burris, T. P. *T0901317 is a dual LXR/FXR agonist*. Molecular genetics and metabolism, 2004, 83: p. 184-187.

13. Wójcicka, G., Jamroz-wiśniewska, A., Horoszewicz, K. & Beltowski, J. (2007). *Liver X receptors (LXRs). Part I: Structure, function, regulation of activity, and role in lipid metabolism*. *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej* 61, 736-759.
14. Steinberg, D. *The Pathogenesis of Atherosclerosis, An interpretive history of the cholesterol controversy, part V: The discovery of the statins and the end of the controversy*. *Journal of lipid research*, 2006, 47: p. 1339-1351.
15. Steinberg, D. *The Pathogenesis of Atherosclerosis An interpretive history of the cholesterol controversy, part IV: The 1984 Coronary Primary Prevention Trial ends it almost*. *Journal of lipid research*, 2006, 47: p. 1-14.
16. Steinberg, D. *The Pathogenesis of Atherosclerosis An interpretive history of the cholesterol controversy, part III: mechanistically defining the role of hyperlipidemia*. *Journal of lipid research*, 2005, 46: p. 2037-2051
17. Steinberg, D. *The Pathogenesis of Atherosclerosis An interpretive history of the cholesterol controversy: part II: the early evidence linking hypercholesterolemia to coronary disease in humans*. *Journal of lipid research*, 2005, 46 : p. 179-190
18. Steinberg, D. *The Pathogenesis of Atherosclerosis An interpretive history of the cholesterol controversy: part I*. *Journal of lipid research*, 2004, 45: 1583-1593.
19. Rocha, V., Libby, P , *obesity, inflammation, and atherosclerosis*. *nature reviews cardiology*, 2009, 6: p. 399-409.
20. Takahashi, K., Takeya, M., Sakashita, N. *Multifunctional roles of macrophages in the development and progression of atherosclerosis in humans and experimental animals*. *Medical electron microscopy*, 2002, 35: p. 179-203.
21. witztum, J. L. & steinberg, D. *Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis*. *Journal of clinical investigation*, 1991, 88: p. 1785–1792.
22. Libby, P. *Inflammation in atherosclerosis*. *Nature*, 2002, 420: p. 868–874 .
23. Ross, R. *Atherosclerosis: defense mechanisms gone awry*. *The american journal of pathology*, 1993, 143: p. 987–1002.
24. Ross, R. *Atherosclerosis – an inflammatory disease*. *New England journal of medicine*, 1999, 340: p.115–126.
25. Tangirala, R.K., Bischoff E.D., Joseph, S.B., Wagner B.L., Walczak, R., Laffitte B.A., Daige C.L., Thomas D., Heyman R.A., Mangelsdorf D.J., Wang X., Lusis A.J., Tontonoz P., Schulman I.G. *Identification of macrophage liver X receptors as inhibitors of atherosclerosis*. *Proceedings of the National Academy of sciences Sci U S A*. 2002,99:p.11896 –11901.

26. Im, S.S., Osborn, T.F. *Liver X Receptor in atherosclerosis and inflammation*. *Circulation research*, 2011, 108: p. 996-1001.
27. Seubg-Soon, I., Osborn, T.F. *Liver X Receptors in Atherosclerosis and Inflammation*. *Circulation research*, 108(8), 2011: p. 996-1001.
28. Garenc, C., Julien, P., Levy, E. *Oxysterols in biological systems: The gastrointestinal tract, liver, vascular wall and central nervous system*. 44(1), 2010: P. 47-73.
29. Hans-georg, J., Bell, G. I., Best, J. D., Birnbaum, M. J., Charron, M. J., Chen, Y. T., Doege, H., James, D. E., Lodish, H., Moley, K. H., Moley, J. F., Mueckler, M., Rogers, S., Schürmann, A., Seino, S. & Thorens, B. *Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators*. *American journal of physiology endocrinology and metabolism* 282, 2002: p.974–976.
30. Fu, Y., Maianu, L., Melbert, B. R. & Garvey, T. W. (2003). *Facilitative glucose transporter gene expression in human lymphocytes, monocytes, and macrophages: a role for GLUT isoforms 1, 3, and 5 in the immune response and foam cell formation*. *Blood cells, molecules, and diseases*, 2003: p. 182–190.
31. Malide, D., Davies-hill, T. M., Levine, M. & Simpson, I. A. (1998). *Distinct localization of GLUT-1, -3, and -5 in human monocyte-derived macrophages: effects of cell activation*. *American journal of physiology endocrinology and metabolism*, 274: p.516-526.
32. Takata, K., Kasehara, T., Kasahara, M., Ezaki, O. & Hirano, H. *Erythrocyte/HepG2-Type Glucose Transporter Is Concentrated In Cells Of Blood-Tissue Barriers*. *Biochemical and biophysical research communications*, 1990: p. 173, 67-73.
33. Zhao, F. Q., Glimm, D. R. & Kennely, J. J. . *Distribution Of Mammalian Facilitative Glucose Transporter Messenger RNA In Bovine Tissues*. *The international journal of biochemistry & cell biology* 25, 1993: p. 1897-1903.
34. Zhao, F.-Q. & Keating, A. F. *Functional Properties and Genomics of Glucose Transporters*. *Current Genomics* 8, 2007: p. 113-128.
35. Simpson, I. A., Dwyer, D., Vannucci, S. J., Malide D, Moley, K. H., TRAVIS, A. & VANNUCCI, S. J.). *The Facilitative Glucose Transporter GLUT3: 20 Years of Distinction*. *American journal of physiology endocrinology and metabolism*. 2008, 295: p. E242–E253.
36. Arbuckle M.I., Kane S., Porter L.M., Seatter MJ & Gould, W. G. *Structure-function analysis of liver-type (GLUT2) and brain-type (GLUT3) glucose transporters: expression of chimeric transporters in Xenopus oocytes suggests an important role for putative transmembrane helix 7 in determining substrate selectivity*. *Biochemistry*, 1996, 35:p.16519–16527.



37. Burant, C. F., Takeda, J., Brot-laroche, E., Bell, G. I. & Davidson, N. O. *Fructose transporter in human spermatozoa and small intestine is GLUT5*. The journal of biological chemistry. 1992, 267: p. 14523-14526.
38. Yamanishi, K., H. Nishino, and A. Iwashima, *Possible role of calmodulin in stimulation of hexose transport by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, a tumor promoter*. Experientia, 1983. 39(9): p. 1036-1037.
39. Bernhardt, I. *Red Cell Membrane Transport in Health and Disease*. Springer. J. Clive editions. 2003.
40. Stuart, C.A., Yin, D., Howell, M.A.E., Dykes,R.J., Laffan, J.J., Ferrando, A.A. *Hexose Transporter mRNAs for GLUT4, GLUT5, and GLUT12 predominate in human muscle*. American journal of physiology: endocrinology and metabolism. 2006. 291: p. E 1067-E 1073.
41. Stuart, C.A., et al., *Hexose transporter mRNAs for GLUT4, GLUT5, and GLUT12 predominate in human muscle*. American journal of physiology endocrinology and metabolism, 2006. 291: p. 1067–1073,.
42. Dalen, T.K., et al., *Expression of the Insulin-responsive Glucose Transporter GLUT4 in Adipocytes Is Dependent on Liver X Receptor*. The journal of biological chemistry, 2003. 278(48,): p. 48283–48291.
43. Rand, E. B., Depaoli, A. M., Davidson, N. O., Bell, G. I.,& Burant, C. F. *Sequence, tissue distribution, and functional characterization of the rat fructose transporter Glut5*.The American physiological society. 1993, 264(6): p. G1169-G1176.
44. Hosten, A. *Clinical methods the history, physical and laboratory examinations*. 1990. Edited by H Kenneth Walker, MD, W Dallas Hall, MD, and J Willis Hurst, MD. 3rd edition. Boston: Butterworths.
45. Bibert, S., Kharoubi, S., Firsov,S. D., Thorens,B., Geering,K., Horisberger,J.,D. and Bonny,O. *Mouse GLUT9: evidences for a urate uniporter*. The American journal of physiology . 2009, 297: F612–F619.
46. Preitnera,F., Bonnyc,O., Laverrière, A., Rotmane, S., Firsovc, D., Da Costa,A., Metrefa,S., and Thorens, B. *Glut9 is a major regulator of urate homeostasis and its genetic inactivation induces hyperuricosuria and urate nephropathy*.PNAS, 2009, 106 (36): p. 15501–15506.
47. Albert, C., Mertens, P. R., Bartsch, P. *Urea and atherosclerosis—evidence for a direct link involving apolipoprotein B protein modifications*. International urology and nephrology, 2011, 43(3): 933-936.
48. Apostolov, P. O., Ray, D., Savenka, A.V., Shah, S.V., Basnakian, A. G. *Chronic Uremia Stimulates LDL Carbamylation and Atherosclerosis*. Journal of the american society of neurology.2010. 21(11): p. 1852-1857.
49. Calder, P. C., Dimitriadis, G. & Philip, N. *Glucose metabolism in lymphoid and inflammatory cells and tissues*. Current opinion in clinical nutrition and metabolic care. 2007. 10: p. 531-40.

50. Simpson, I.A., Dwyer, D., Malide, D., Moley, K.H., Travis, A., and Vannucci, S. *The facilitative glucose transporter GLUT3: 20 years of distinction*. *Endocrinology and metabolism. American journal of physiology*, 2008, 295: p. E242–E253.
51. Carruthers, A., DeZutter, J., Ganguly, A., and Devaskar, S.U. *Will the original glucose transporter isoform please stand up?* *Endocrinology and metabolism. American journal of physiology*, 2009, 297: p. E836–E848.
52. Liao, W., a Nguyen, A., Imamura, T., Singer, O., Verma, I. M. and Olefsky J.M. *Lentiviral Short Hairpin Ribonucleic Acid-Mediated Knockdown of GLUT4 in 3T3-L1 Adipocytes*. *Endocrinology*, 2006, 147(5):p. 2245–2252.
53. Liao, W., Nguyen, A., Yoshizaki, T., Favellyukis, S., Patsouris, D., Imamura, T., Verma, I. M., and Olefsky, J.M. *Suppression of PPAR gamma attenuates insulin-stimulated glucose uptake by affecting both GLUT1 and GLUT4 in 3T3-L1 adipocytes*. *Endocrinology and metabolism. American journal of physiology*, 2007, 293: p. E219–E227, 2007.
54. Olefsky, J. M. and Glass, C. K. *Macrophage, inflammation and insulin resistance*. *Annual Review of Physiology*, 2010, Vol. 72:p. 219-246.
55. Yu, t., Jhun, B.K., Yoon, Y. *High-Glucose Stimulation Increases Reactive Oxygen Species Production Through the Calcium and Mitogen-Activated Protein Kinase-Mediated Activation of Mitochondrial Fission*. *Antioxidants and redox signaling*. 2011. 14 (3): p. 425-437.
56. Naik, E., Dixit, V.M. *Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production*. *The journal of experimental medicine*. 2011. 208 (3). P. 417-420.
57. Tabas, I. *Apoptosis and plaque destabilization in atherosclerosis: the role of macrophage apoptosis induced by cholesterol*. *Cell death and differentiation*. 2004. 11. P. S11-S16.

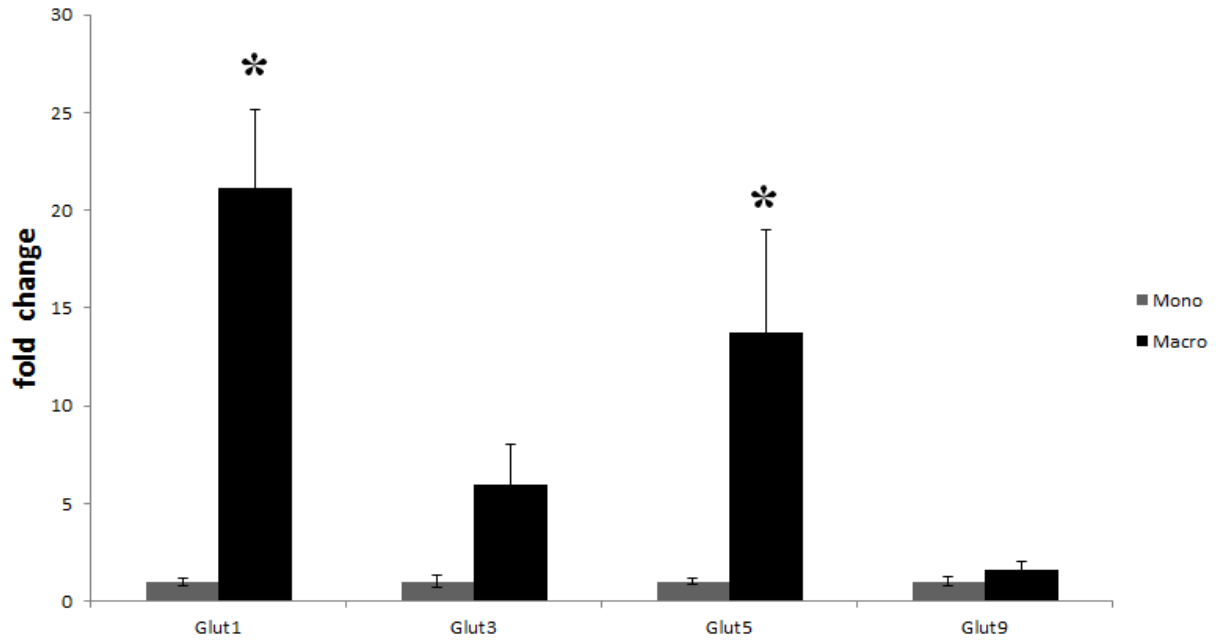


Figure 1. mRNA expression of Glut1, Glut3, Glut5 and Glut9 in monocytes (Mono) and differentiated macrophage (Macro). Results are expressed as Mean  $\pm$  SEM. Monocytes were differentiated into macrophage using phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) (see materials and methods) and mRNA expression levels expressed relative to Basal transcript factor 3 (BTF3). \*  $p < 0.05$  against monocytes. ✱  $P < 0.015$ .

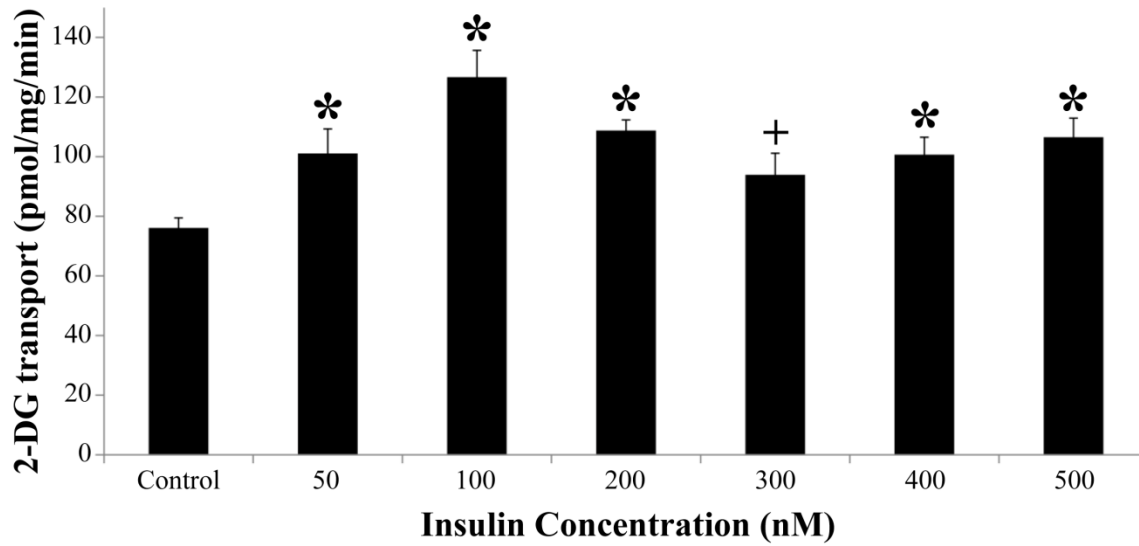


Figure 2. Insuline concentration course (n = 3). Glucose transport in THP1 macrophages was tested with different concentrations of insulin, 30 minutes incubation. Results are expressed as Mean  $\pm$  SEM. mRNA expression levels expressed relative to Basal transcriptorfactor 3 (BTF3). (\* p < 0.05, + p < 0.01).

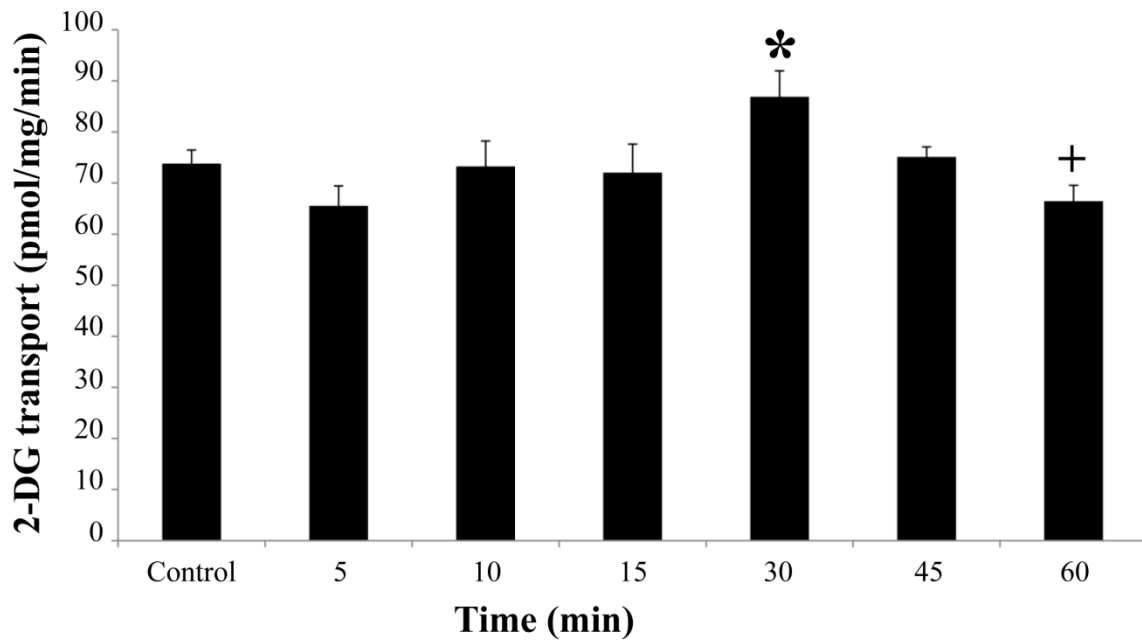


Figure 3. Insulin time course (n = 3) Glucose transport in THP1 macrophages was tested with an insulin concentration of 100 nM and different incubation times. Results are expressed as Mean  $\pm$  SEM. mRNA expression levels expressed relative to Basal transcriptor factor 3 (BTF3). (\* p < 0.05, + p < 0.01 against control).

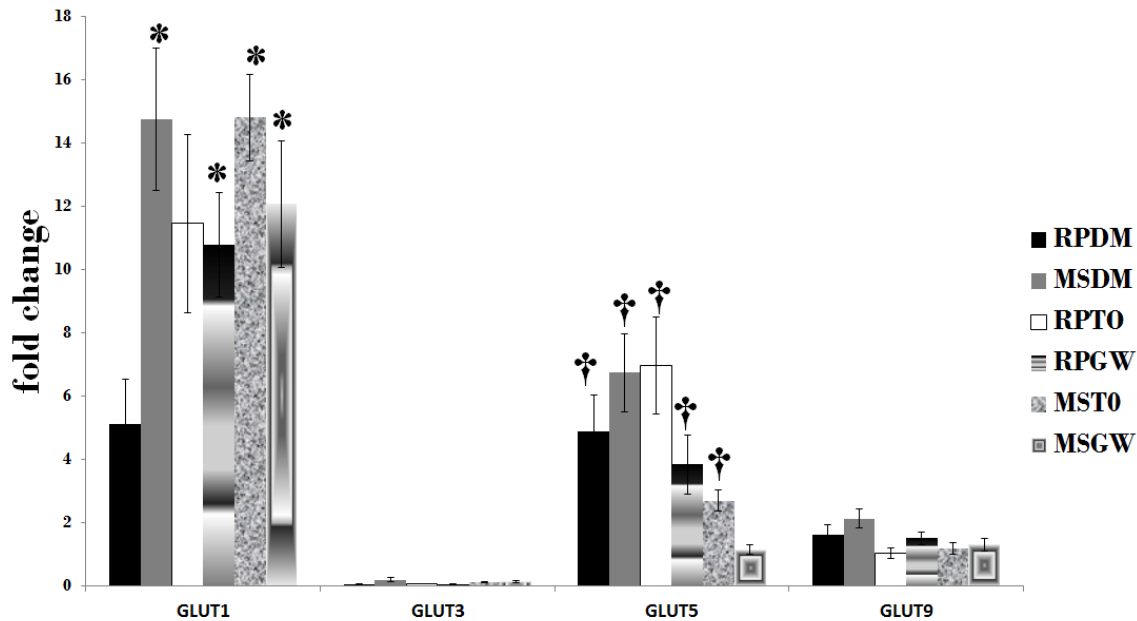


Figure 4. Glut 1, Glut 3, Glut 5 and Glut 9 RNA expression of macrophages THP1 relative to BTF3 (n=3). Expression levels were tested under different conditions, a) RPDM: hyperglycemic (HG) control, RPMI1640 and vehicle (DMSO), b) MSDM: hyperglycemic/hyperinsulinemic (HG/HI) control MSFM and vehicle, c) RPTO: HG conditions (RPMI1640) with agonist T0901317, d) RPGW: HG conditions (RPMI1640) with agonist GW3965, e) MST0: HG/HI conditions (MSFM) with agonist T0901317, f) MSGW: HG/HI conditions with agonist GW3965. Results are expressed as Mean  $\pm$  SEM. mRNA expression levels expressed relative to Basal transcript factor 3 (BTF3). +  $p < 0.05$  between different conditions of Glut1 and the respective conditions of Glut3. †  $p < 0.05$  between different conditions of Glut1 and the respective conditions of Glut5.  $\Delta$   $p < 0.05$  between different conditions of Glut1 and the respective conditions of Glut9.

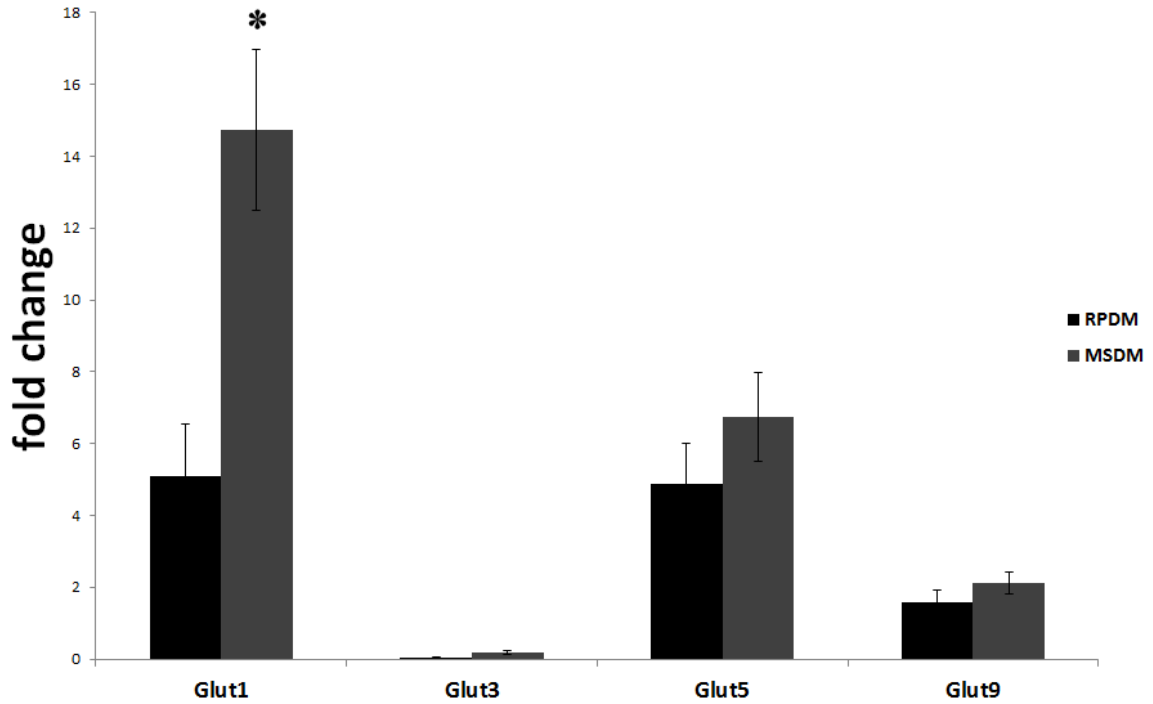


Figure 5. Glut1, Glut3, Glut5 and Glut9 mRNA expression under HG (RPDM) and HG/HI (MSDM) conditions. . Results are expressed as Mean  $\pm$  SEM. mRNA expression levels relative to Basal transcription factor 3 (BTF3). \*  $p < 0.05$  between HG/HI conditions and HG conditions.

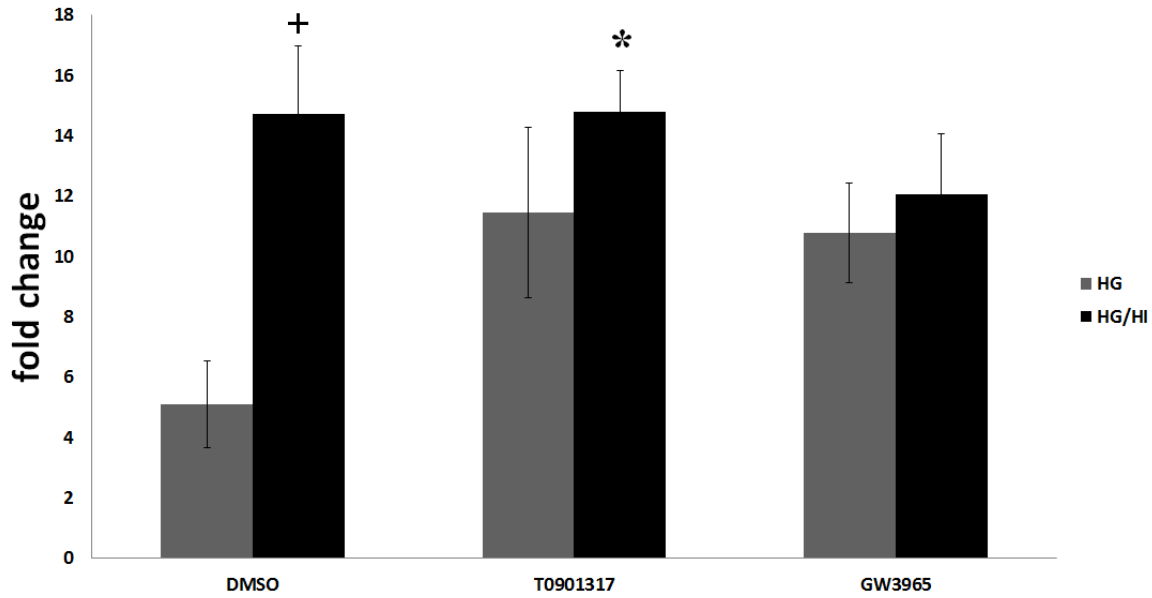


Figure 6. Expression of Glut1 mRNA in THP1 macrophage, under HG (RPMI1640) or HG/HI (MSFM) conditions (n = 3). Each condition tested with agonists T0901317 or GW3965. Results are expressed as Mean $\pm$  SEM. + p < 0.1 against control, \* p < 0.05 against control.



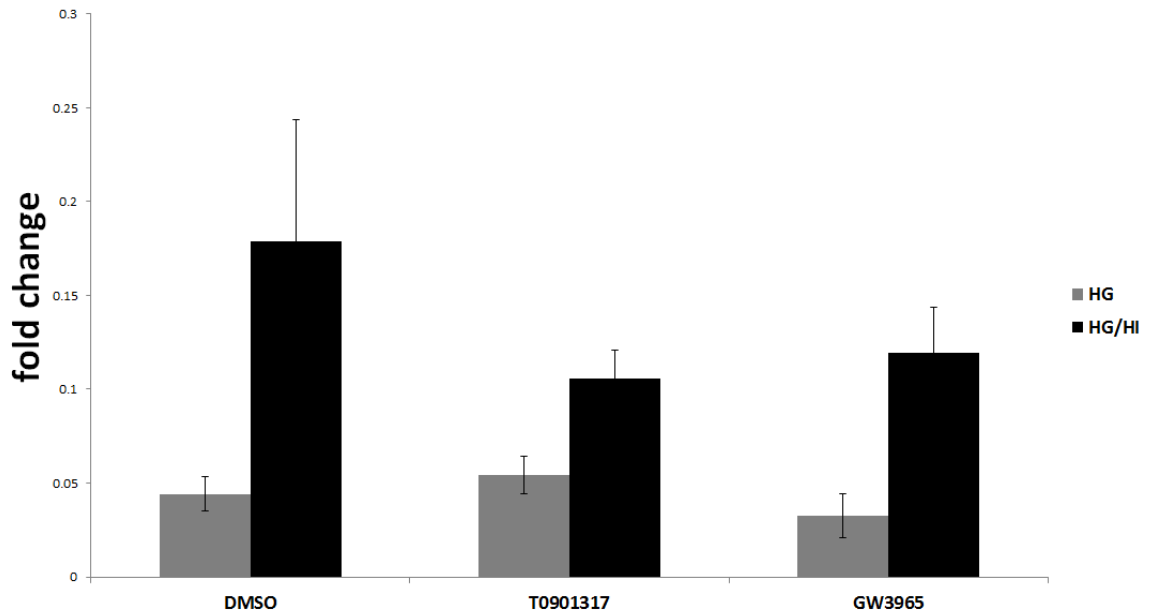


Figure 7. Expression of Glut3 RNA in THP1 macrophage, under HG (RPMI1640) or HG/Hi (MSFM) conditions (n = 3). Each condition tested with agonists T0901317 or GW3965. Results are expressed as Mean  $\pm$  SEM.

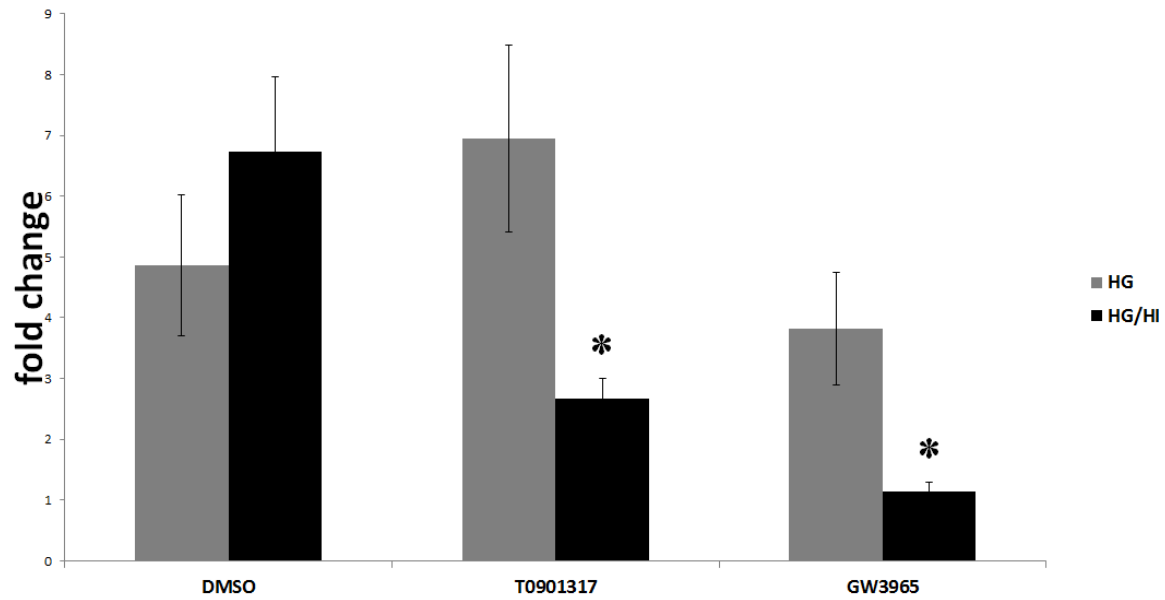


Figure 8. Expression of Glut5 RNA in macrophage THP1, under HG (RPMI1640) or HG/Hi (MSFM) conditions (n = 3). Each condition tested with agonists T0901317 or GW3965. Results are expressed as Mean ± SEM. \* p < 0.05 against control.

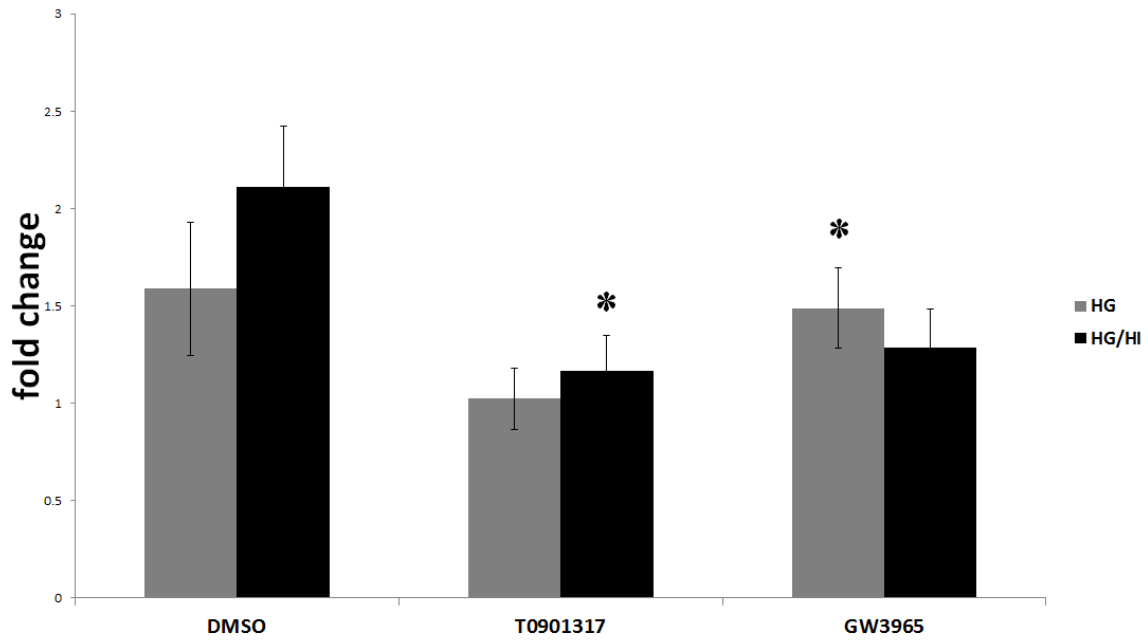


Figure 9. Expression of Glut 9 RNA in macrophage THP1, under HG (RPMI1640) or HG/Hi (MSFM) conditions (n = 3). Each condition tested with agonists T0901317 or GW3965. Results are expressed as Mean ± SEM. \* p < 0.05 against control.

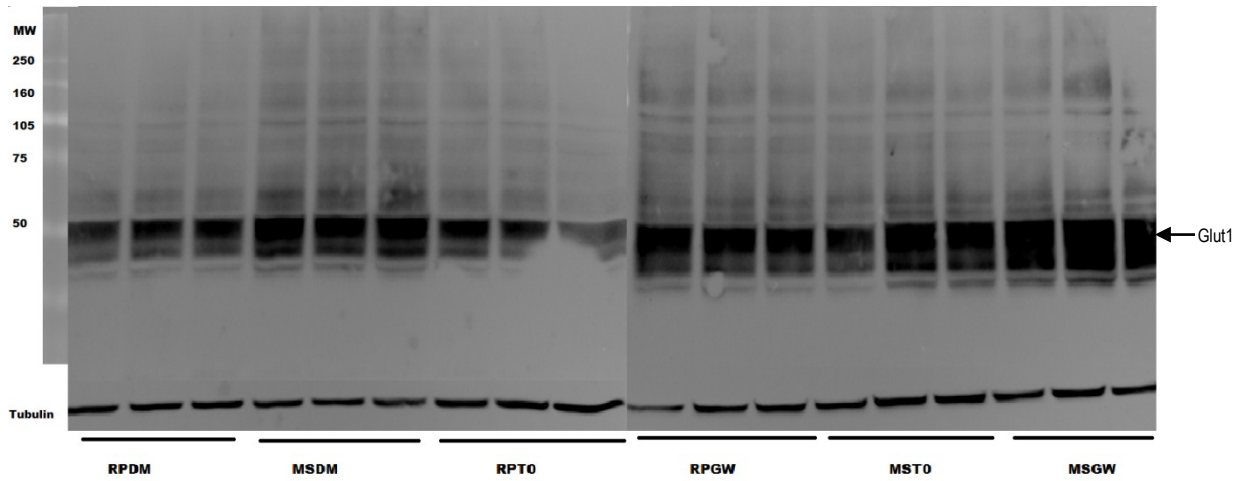


Figure 10. Glut1 western blot. Different conditions were used for the western blot: RPDM: HG control, RPMI1640 and vehicle (DMSO), MSDM: HG3HI control MSFM and vehicle, RPTO: HG (RPMI1640) with agonist T0901317, RPGW: HG (RPMI1640) with agonist GW3965, MSTO: HG/Hi conditions (MSFM) with agonist T0901317, f) MSGW: HG/Hi conditions with agonist GW3965.

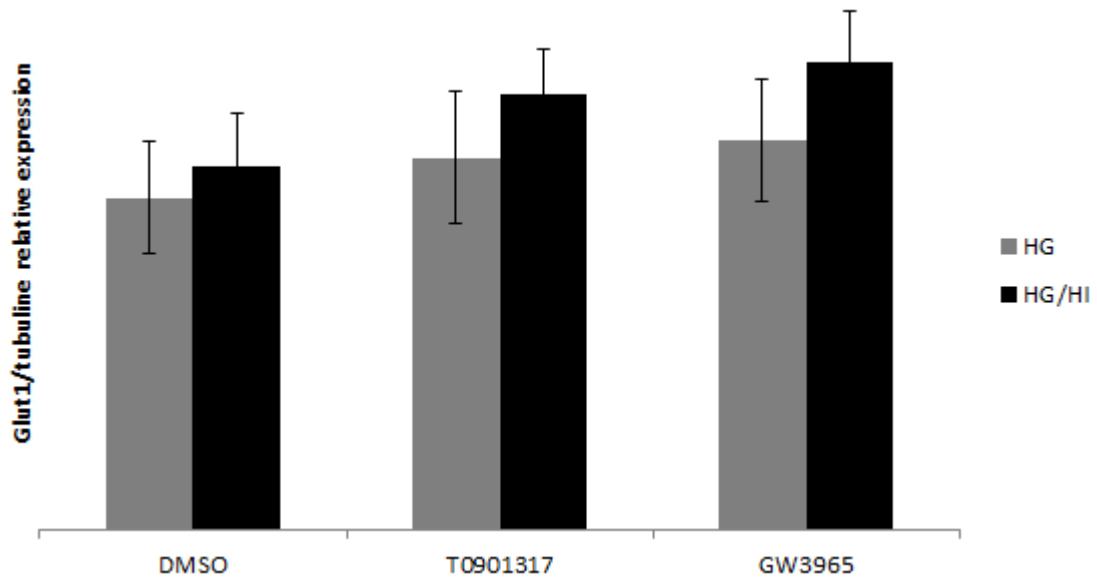


Figure 11. Glut1 western blot quantification (n = 4). The volume is the sum of all the intensities included in the defined area of each spot (fusion Fx7 manual). Results are expressed as relative to tubulin and Mean  $\pm$  SEM.

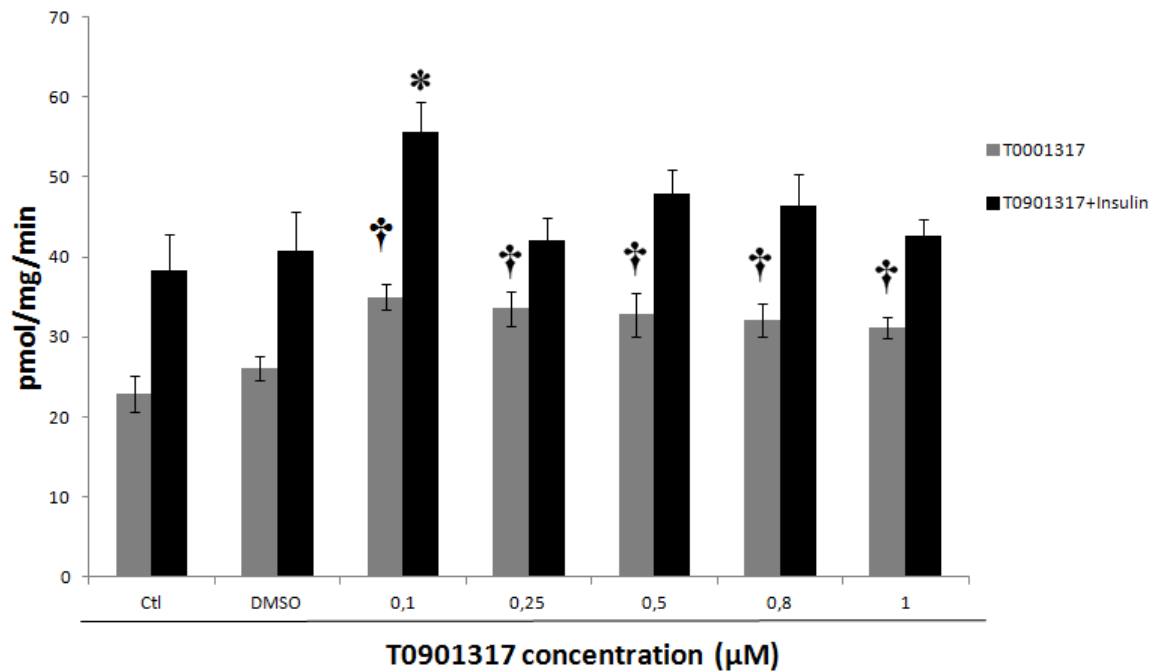


Figure 12. Glucose transport with a T0901317 concentration course and under HG conditions (n = 3). A burst of 100nm of insulin was given or not 30 minutes before the transport. Results are expressed as Mean  $\pm$  SEM. \* p < 0.05 against vehicle (DMSO). † P < 0.05 against vehicle (DMSO + insulin burst).

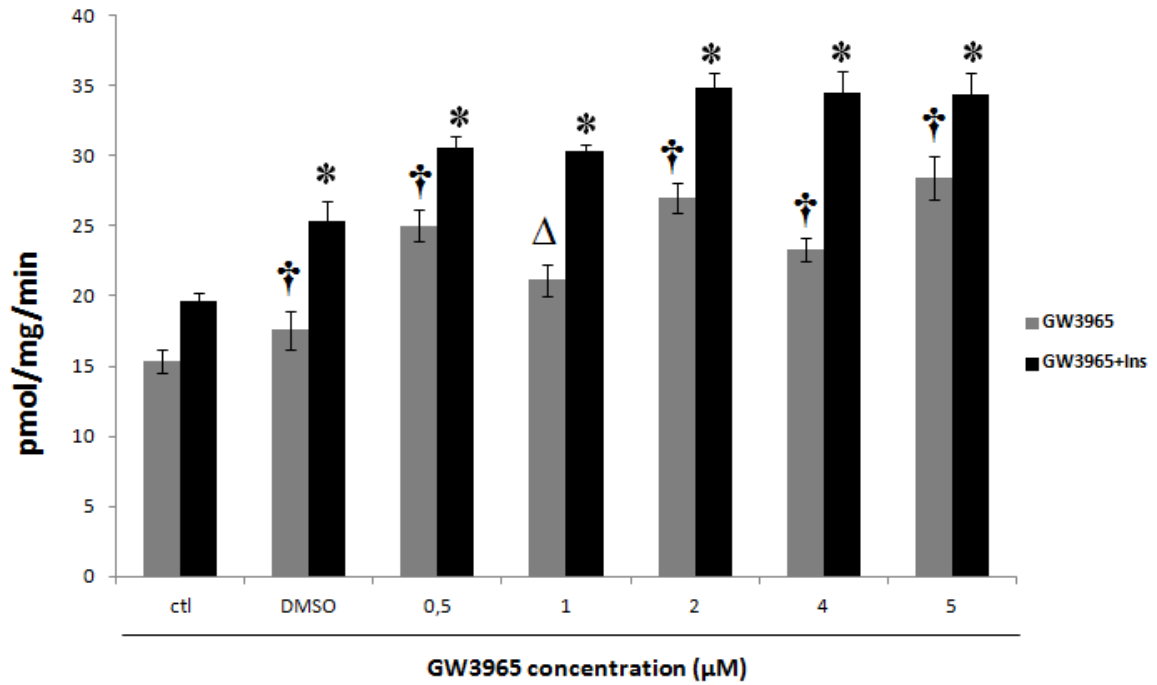


Figure 13. Glucose transport with a GW3965 concentration course and under HG (n = 3). A burst of 100nm of insulin was given or not 30 minutes before the transport. Results are expressed as Mean  $\pm$  SEM. \* p < 0.01 against vehicle (DMSO). † P < 0.01 against vehicle (DMSO) + insulin burst.  $\Delta$  P < 0.10.

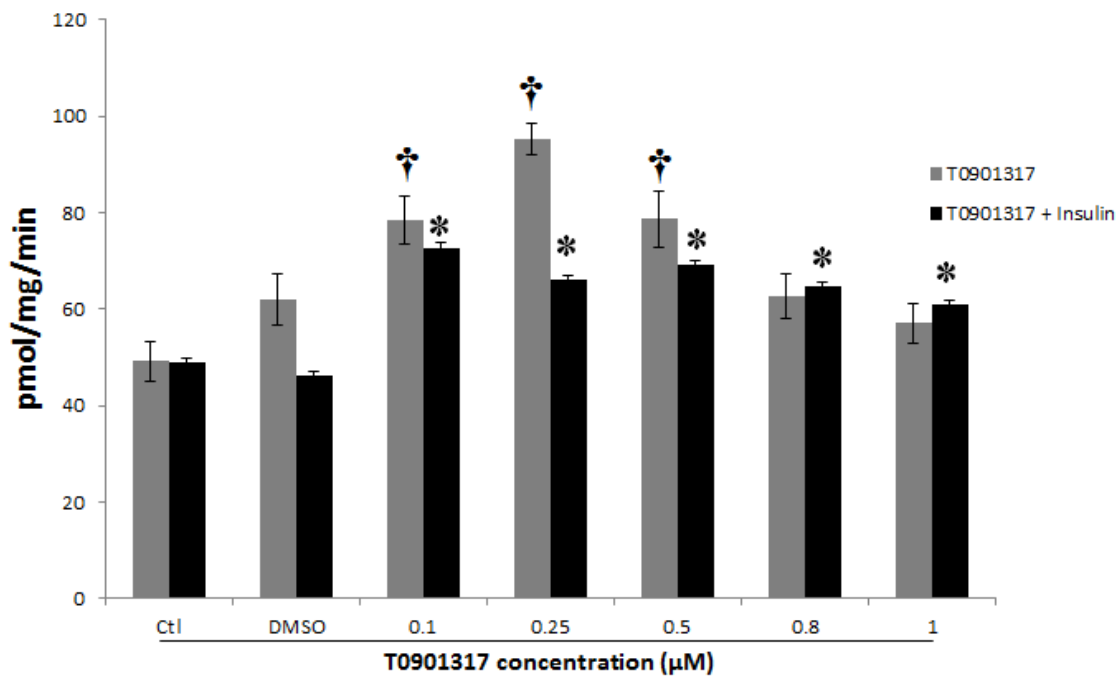


Figure 14. Glucose transport with a T0901317 concentration course and under HG/HI conditions (n = 4). A burst of 100nm of insulin was given or not 30minutes before the transport. Results are expressed as Mean ± SEM. \* p < 0.05 against vehicle (DMSO). † P < 0.05 against vehicle (DMSO) + insulin burst.



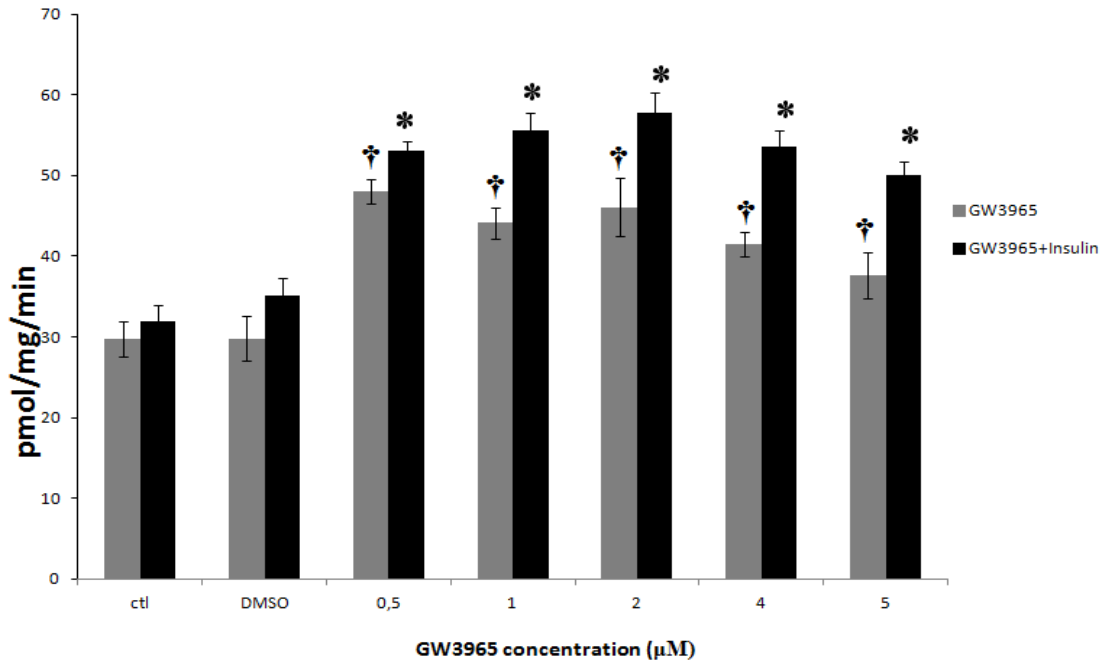


Figure 15. Glucose transport with a GW3965 concentration course and under HG/HI conditions (n = 3). A burst of 100nm of insulin was given or not 30minutes before the transport. Results are expressed as Mean  $\pm$  SEM. \* p < 0.05 against vehicle (DMSO). † P < 0.05 against vehicle (DMSO) + insulin burst.



## CONCLUSIONS ET PERSPECIVES

Dans la présente étude, plusieurs transporteurs d'hydrates de carbone de la famille des Gluts ont été identifiés comme étant exprimés dans les macrophages humains THP1. Parmi les membres de cette famille, nous avons constaté la présence des ARN messagers pour Glut1, Glut3, Glut5 et Glut9. À notre connaissance, c'est la première fois qu'une étude fait mention du transporteur Glut9 dans le macrophage humain. Le fait que Glut9 soit un transporteur d'urée, qui est un antioxydant puissant, ouvre des perspectives intéressantes dans l'étude du macrophage et son rôle dans l'athérosclérose. La présence de Glut5 qui a déjà été mentionnée auparavant dans d'autres études continue à être un mystère étant donné que ce Glut est un transporteur de fructose (Fu et al., 2003., Malide et al., 1998).

Malgré une expression génique de Glut3 qui a été marginal et une présence peu significative de la protéine, Glut1 et Glut3 restent tout de même les candidats les plus plausibles pour être responsable du transport de glucose dans le macrophage humain. Ces dernières observations font penser que le transporteur du glucose se fait majoritairement en employant Glut1 ou bien, par le biais d'un autre Glut non identifié.

Nos travaux ont permis de démontrer que le macrophage humain est sensible à l'action de l'insuline. En effet, nous avons observé une augmentation du transport lorsque les cellules sont incubées à long terme avec de l'insuline mais aussi avec un ajout supplémentaire d'insuline une demi-heure avant de quantifier le transport. Ces résultats suggèrent un mécanisme de régulation rapide telle que l'activation d'une cascade de phosphorylation protéique et un autre mécanisme de régulation plus lente telle qu'une régulation au niveau de la synthèse ou du transport des Gluts vers la membrane cellulaire.

L'activation des LXRs par des agonistes spécifiques ou non exclusifs induit une augmentation du transport du glucose dans les conditions étudiées d'hyperglycémie et d'hyperglycémie/hyperinsulinémie. Les conditions d'hyperglycémie/hyperinsulinémie induisent une réponse quantitativement plus forte pour les deux agonistes : le fait d'ajouter l'effet de l'hyperperinsulinémie à l'hyperglycémie pour ainsi obtenir les conditions hyperglycémie/hyperinsulinémie augmente le transport quand on le compare aux conditions hyperglycémiques toutes seules, indiquant que l'hyperinsulinémie a un effet qui augmente l'effet de l'hyperglycémie, LXR peut avoir une certaine influence dans la voie métabolique de l'insuline et il serait intéressant d'étudier l'action de LXR dans les principales protéines de cette voie métabolique. Sous l'influence de T0901317, le transport de glucose a tendance de revenir aux niveaux de départ lorsque les concentrations de cet agoniste augmentent, alors que pour GW3965, le résultat est plutôt un plafonnement de l'effet. Ceci

sous-entend que T0901317 étant un agoniste non spécifique, il est possible que d'autres voies soient activées et interfèrent négativement son action dans le transport de glucose.

Selon nos résultats qui démontrent une amélioration du transport du glucose sous l'influence de LXR dans le macrophage humain, il peut s'avérer intéressant d'étudier ce récepteur nucléaire d'un point de vue pharmaceutique afin de trouver des molécules qui soient non seulement spécifiques à LXR mais également spécifiques au tissu (cellules spumeuses), pour ainsi éviter tous les problèmes de toxicité que présentent les agonistes de LXR (Wójcicka et al., 2007.,Feldman et al., 2013)

Également il serait intéressant de vérifier si l'amélioration du transport de glucose dans le macrophage a des effets désirables ou indésirables. D'un côté nos résultats laissent penser que LXR aurait des influences positives sur le diabète de type II (meilleure sensibilité à l'insuline des macrophages). Mais d'un autre côté, il est important de se rappeler que dans les macrophages (et non dans le tissu musculaire ou adipeux), une trop grande entrée de glucose dans ces cellules pourrait induire la production de ROS qui pourrait favoriser la transformation du macrophage en cellule spumeuse avec toutes les conséquences négatives que ceci entraînerait (Cheng et al 2013).

Il serait donc pertinent de poursuivre cette étude en approfondissant nos résultats sur plusieurs volets. Le premier étant d'identifier le transporteur de Glucose exprimé dans les macrophages THP1 et qui est sensible à l'insuline et/ou LXR, par des études d'ARN d'interférence ciblés spécifiquement envers chaque Glut que nous avons identifié dans des macrophages différenciés. Le second serait de mieux comprendre la régulation des phosphorylations des protéines impliquées dans le transport insulino-dépendant du glucose et qui semble être influencé par LXR. Enfin, un troisième volet, serait de mieux évaluer le rôle des LXRs au niveau des macrophages sur la pathophysiologie du diabète de type II avec l'utilisation du modèle animal.

## BIBLIOGRAPHIE

- ALBERS, J. J. & CHEUNG, M. C. (2004). Emerging roles for phospholipid transfer protein in lipid and lipoprotein metabolism. *Current opinion in lipidology* **15**, :255–260.
- ALBERTI, S., SCHUSTER, G., FELTKAMP, D., DICZFALUSY, U., RUDLING, M., ANGELIN, B., BJÖRKHEM, I., PETTERSSON, S. & GUSTAFSSON, J.-A. K. (2001). Hepatic cholesterol metabolism and resistance to dietary cholesterol in LXRb-deficient mice. *the journal of clinical investigation* **107**, 565-573.
- ANTHONISEN, E. H., BERVEN, L., HOLM, S., NYGÅRD, M., NEBB, H. I. & GRØNNING-WANG. (2010). Nuclear Receptor Liver X Receptor Is O-GlcNAc-modified in Response to Glucose. *The journal of biological chemistry* **285**, 1607–1615.
- APFEL, R., BENBROOK, D., LERNHARDT, E., ORTIZ, M. A., SALBERT, G. & PFAHL, M. (1994). A Novel Orphan Receptor Specific for a Subset of Thyroid Hormone-Responsive Elements and Its Interaction with the Retinoid/Thyroid Hormone Receptor Subfamily. *Molecular and cellular biology* **14**, 7025-7035.
- ARAVINDHAN, K., WEBB, C. L., JAYE, M., GHOSH, A., WILLETTE, R. N., DINARDO, N. J. & JUCKER, B. M. (2006). Assessing the effects of LXR agonists on cellular cholesterol handling: a stable isotope tracer study. *Journal of lipid research* **47**.
- ARBUCKLE MI, KANE S, PORTER LM, SEATTER MJ & GW, G. (1996). Structurefunction analysis of liver-type (GLUT2) and brain-type (GLUT3) glucose transporters: expression of chimeric transporters in *Xenopus* oocytes suggests an important role for putative transmembrane helix 7 in determining substrate selectivity. *Biochemistry* **35**, 16519–16527.
- ARKAN, M. C., HEVENER, A. L., GRETEN, F. R., MAEDA, S., LI, Z.-W., LONG, J. M., WYNshaw-BORIS, A., POLI, G., OLEFSKY, J. M. & KARIN, M. (2005). IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nature medicine* **11**, 191-198.
- BABIKER, A. & DICZFALUSY, U. (1998). Transport of side-chain oxidized oxysterols in the human circulation. *Biochimica et biophysica acta* **1392**, 333-339.
- BANDYOPADHYAY, G. K., YU, J. G., OFRECIO, J. & OLEFSKY, J. M. (2005). Increased p85/55/50 Expression and Decreased Phosphatidylinositol 3-Kinase Activity in Insulin-Resistant Human Skeletal Muscle. *Diabetes* **54**, 2351–2359.
- BARANOWSKI, M. (2008). Biological Role Of Liver X Receptors. *Journal of physiology and pharmacology* **59**, 31-55.

- BARNETT, J. E. G., HOLDMAN, G. D. & MUNDAY, K. A. (1973). An Explanation of the Asymmetric Binding of Sugars to the Human Erythrocyte Sugar-Transport Systems. *Biochemical journal* **135**, 539-541.
- BARNETT, J. E. G., HOLMAN, G. D. & MUNDAY, K. A. (1973). Structural Requirements for Binding to the Sugar-Transport System of the Human Erythrocyte. *Biochemical journal* **131**, 211-221.
- BECKMAN, J. A., CREAGER, M. A. & LIBBY, P. (2002). Diabetes and Atherosclerosis: Epidemiology, Pathophysiology, and Management. *The journal of the american medical association* **287**, 2570-2581.
- BERNHARDT, I., ELROY, J.C. (2003). Red Cell Membrane Transport in Health and Disease. Springer, premiere edition. Berlin Heidelberg.
- BIERMAN. (1992). Atherogenesis in Diabetes. *Arteriosclerosis thrombosis and vascular biology* **12**, 647-656.
- BJÖRKHEM, I. (2002). Do oxysterols control cholesterol homeostasis? *The journal of clinical investigation* **110**, 725-730.
- BJÖRKHEM, I. (2007). Rediscovery of Cerebrosterol. *Lipids* **42**, 5-14.
- BOOTH, G. L., KAPRAL, M. K., FUNG, K. & TU, J. V. (2006). Relation between age and cardiovascular disease in men and women with diabetes compared with non-diabetic people: a population-based retrospective cohort study. *The lancet* **368**, 29-36.
- BOYLE, J. J. (2005). Macrophage Activation in Atherosclerosis: Pathogenesis and Pharmacology of Plaque Rupture. *Current Vascular Pharmacology* **3**, 63-68.
- BRUNHAM, L. R., KRUIT, J. K., IQBAL, J., FIEVET, C., TIMMINS, J. M., PAPE, T. D., COBURN, B. A., BISSADA, N., STAELS, B., GROEN, A. K., HUSSAIN, M. M., PARKS, J. S., KUIPERS, F. & HAYDEN, M. R. (2006). Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo. *The Journal of clinical investigation* **116**, 1052-1062.
- BURANT, C. F., TAKEDA, J., BROU-LAROCHE, E., BELL, G. I. & DAVIDSON, N. O. (1992). Fructose transporter in human spermatozoa and small intestine is GLUT5. *The journal of biological chemistry* **267**, 14523-14526.
- CALDER, P. C., DIMITRIADIS, G. & PHILIP, N. (2007). Glucose metabolism in lymphoid and inflammatory cells and tissues. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* **10**, 531-40.
- CAO, G., BEYER, T. P., YANG, X. P., SCHMIDT, R. J., ZHANG, Y., BENSCH, W. R., F. KAUFFMAN, R., GAO, H., RYAN, T. P., LIANG, Y., EACHO, P. I. & JIANG, X.-C. (2002). Phospholipid Transfer Protein Is Regulated by Liver X Receptors in Vivo. *The journal of biological chemistry* **277**.
- CAO, G., LIANG, Y., BRODERICK, C. L., OLDHAM, B. A., BEYER, T. P., SCHMIDT, R. J., ZHANG, Y., STAYROOK, K. R., SUEN, C., OTTO, K. A., MILLER, A. R., DAI, J., FOXWORTHY, P., GAO, H., RYAN, T. P., JIANG, X.-C., BURRIS, T. P., EACHO, P. I. & ETGEN, G. J. (2003). Antidiabetic Action of a Liver X Receptor Agonist

- Mediated By Inhibition of Hepatic Gluconeogenesis. *The journal of biological chemistry* **278**, 1131–1136.
- CASTRILLO, A., JOSEPH, S. B., MARATHE, C., MANGELSDORF, D. J. & TONTONNOZ, P. (2003). Liver X Receptor-dependent Repression of Matrix Metalloproteinase-9 Expression in Macrophages. *The journal of biological chemistry* **278**, 10443–10449.
- CAVELIER, C., LORENZI, I., ROHRER, L. & ECKARDSTEIN, A. V. (2006). Lipid efflux by the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1. *Biochimica et biophysica acta* **1761**, 655–666.
- CHA, J.-Y. & REPA, J. J. (2007). The Liver X Receptor (LXR) and Hepatic Lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *The journal of biological chemistry* **282**, 743–751.
- CHAN, S.S., LOTSPEICH, W.D. (1962). Comparative effects of phlorizin and phloretin on glucose transport in the cat kidney. *American journal of physiology*. **203** (6), 975-979.
- CHEN, M., BRADLEY, M., BEAVEN, S. W. & TONTONNOZ, P. (2006). Phosphorylation of the liver X receptors. *FEBS Letters* **580**, 4835–4841.
- CHEN, W., CHEN, G., HEAD, D. L., MANGELSDORF, D. J. & RUSSELL, D. W. (2007). Enzymatic Reduction of Oxysterols Impairs LXR Signaling in Cultured Cells and the Livers of Mice. *Cell metabolism* **5**, 73–79.
- CHENG, Y., FENG, Y., ZHU, M., YAN, B., FU, S., GUO, J., HU, J., SONGG, X., GUO, S., LIUC, G. (2013) Synthetic liver X receptor agonist T0901317 attenuates high glucose-induced oxidative stress, mitochondrial damage and apoptosis in cardiomyocytes. *Acta Histochemica*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2013.07.007>
- CHU, K., MIYAZAKI, M., MAN, W. C. & NTAMBI, J. M. (2006). Stearoyl-Coenzyme A Desaturase 1 Deficiency Protects against Hypertriglyceridemia and Increases Plasma High-Density Lipoprotein Cholesterol Induced by Liver X Receptor Activation. *Molecular and Cellular Biology* **26**, 6786–6798.
- COLVILLE, C. A., SEATTER, M. J. & GOULD, G. W. (1993a). Analysis of the structural requirements of sugar binding to the liver, brain and insulin-responsive glucose transporters expressed in oocytes. *Biochemical journal* **294**, 753-760.
- COLVILLE, C. A., SEATTER, M. J., JESS, T. J., GOULD, G. W. & THOMAS, H. M. (1993b). Kinetic analysis of the liver-type (GLUT2) and brain-type (GLUT3) glucose transporters in *Xenopus* oocytes: substrate specificities and effects of transport inhibitors. *Biochemical journal* **290**, 701-706.
- COOK, I. T., DUNIEC-DMUCHOWSKI, Z., KOCAREK, T. A., RUNGE-MORRIS, M. & FALANY, C. N. (2009). 24-Hydroxycholesterol Sulfation by Human Cytosolic Sulfotransferases: Formation of Monosulfates and Disulfates, Molecular Modeling, Sulfatase Sensitivity and Inhibition of LXR activation. In *Drug metabolism and disposition*, vol. 37, pp. 2069–2078.

- COSTET, P., LUO, Y., WANG, N. & TALL, A. R. (2000). Sterol-dependent Transactivation of the ABC1 Promoter by the Liver X Receptor/Retinoid X Receptor. *The journal of biological chemistry* **275**, 28240–28245.
- CRAIK, J. D., STEWART, M. & CHEESEMAN, C. I. (1995). GLUT-3 (brain-type) glucose transporter polypeptides in human blood platelets. *Thrombosis research* **79**, 461–469.
- DALEN, T. K., ULVEN, S. M., BAMBERG, K., GUSTAFSSON, J.-Å. & NEBB, H. I. (2003). Expression of the Insulin-responsive Glucose Transporter GLUT4 in Adipocytes Is Dependent on Liver X Receptor. *The journal of biological chemistry* **278**, 48283–48291.
- DANEMAN, D., ZINMAN, B., ELLIOTT, M. E., BILAN, P. J. & KLIP, A. (1992). Insulin stimulated glucose transport in circulating mononuclear cells from nondiabetic and IDDM subjects. *Diabetes* **41**, 227–234.
- DENECHAUD, P.-D., BOSSARD, P., A, L. J.-M., MILLATT, L., STAELS, B., GIRARD, J. & POSTIC, C. (2008). ChREBP, but not LXRs, is required for the induction of glucose-regulated genes in mouse liver. *The journal of clinical investigation* **118**, 841-964.
- DUVAL, C., TOUCHE, V., TAILLEUX, A., FRUCHART, J. C., FIEVET, C., CLAVEY, V., STAELS, B. & LESTAVEL, S. (2006). Niemann–Pick C1 like 1 gene expression is down-regulated by LXR activators in the intestine. *Biochemical and biophysical research communications* **277**, 1259–1263.
- EBERLÉ, D., HEGARTY, B., BOSSARD, P., FERRÉ, P. & FOUFELLE, F. (2004). SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* **86**, 839–848.
- EDWARDS, P. A., KENNEDY, M. A. & MAK, P. A. (2002). LXRs; Oxysterol-activated nuclear receptors that regulate genes controlling lipid homeostasis. *Vascular pharmacology* **38**, 249– 256.
- EFANOV, A. M., SEWING, S., BOKVIST, K. & GROMADA, J. (2004). Liver X Receptor Activation Stimulates Insulin Secretion via Modulation of Glucose and Lipid Metabolism in Pancreatic  $\beta$ -Cells. *Diabetes* **53**, S75-S78.
- ENGELMAN, J. A., BERG, A. H., LEWIS, R. Y., LISANTI, M. P. & E. SCHERER, P. (2000). Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ -Mediated Insulin Resistance, but Not Dedifferentiation, Is Abrogated by MEK1/2 Inhibitors in 3T3-L1 Adipocytes. *Molecular endocrinology* **14**, 1557–1569.
- ESTRADA, D. E., ELLIOTT, E., ZINMAN, B., POON, I., LIU, Z., AMIRA., K. & DANEMAN, D. (1994). Regulation of glucose transport and expression of GLUT3 transporters in human circulating mononuclear cells: studies in cells from insulindependent diabetic and nondiabetic individuals. *Metabolism* **43**, 591–598.
- FELDMANN, R., GEIKOWSKI, A., WEIDNER, C., WITZKE, A., Kodelja, V., SCHWARZ, T., Gabriel, M., Erker, T., Sauer, S. (2013). Foam Cell Specific LXRA Ligand. *Plos one* **8(2)**, e57311. doi:10.1371/journal.pone.0057311.



- FERNANDEZ-VELEDO, S., NIETO-VAZQUEZ, I., RONDINONE, C. M. & LORENZO, M. (2006). Liver X receptor agonists ameliorate TNF alpha-induced insulin resistance in murine brown adipocytes by downregulating protein tyrosine phosphatase-1B gene expression. *Diabetologia* **49**, 3038-3048.
- FERREIRA, I. A., MOCKING, A. I., URBANUS, R. T., VARLACK, S., WNUK M & AKKERMAN, J. W. (2003). Glucose uptake via glucose transporter 3 by human platelets is regulated by protein kinase B. *Journal of biological chemistry* **280**, 32625–32633.
- FISHER, M. (2004). Diabetes and atherogenesis. *Heart* **2004**, 336–340.
- FISHER, R. B. & PARSONS, D. S. (1952). Glucose movements across the wall of the rat small intestine. *The journal of physiology* **119**, 210-223.
- FONTAINE, C., RIGAMONTI, E., NOHARA, A., GERVOIS, P., TEISSIER, E., FRUCHART, J.-C., STAELS, B. & CHINETTI-GBAGUIDI, G. (2007). Liver X Receptor Activation Potentiates the Lipopolysaccharide Response in Human Macrophages. *Circulation research* **101**, 40-49.
- FU, X., MENKE, J. G., CHEN, Y., ZHOU, G., MACNAUL, K. L., WRIGHT, S. D., SPARROW, C. P. & LUND, E. G. (2001). 27-Hydroxycholesterol Is an Endogenous Ligand for Liver X Receptor in Cholesterol-loaded Cells. *The journal of biological chemistry* **276**, 38378-38387.
- FU, Y., MAIANU, L., MELBERT, B. R. & GARVEY, T. W. (2003). Facilitative glucose transporter gene expression in human lymphocytes, monocytes, and macrophages: a role for GLUT isoforms 1, 3, and 5 in the immune response and foam cell formation. *Blood cells, molecules, and diseases* **2003**, 182–190.
- GAN, X., KAPLAN, R., MENKE, J. G., MACNAUL, K., CHEN, Y., SPARROW, C. P., ZHOU, G., WRIGHT, S. D. & CAI, T.-Q. (2001). Dual Mechanisms of ABCA1 Regulation by Geranylgeranyl Pyrophosphate. *The journal of biological chemistry* **276**.
- GARENC, C., JULIEN, P. & LEVY, E. (2010). Oxysterols in biological systems: The gastrointestinal tract, liver, vascular wall and central nervous system. *Free radical research* **44**, 44-73.
- GHISLETTI, S., HUANG, W., OGAWA, S., GABRIEL PASCUAL, MU-EN LIN, TIMOTHY M. WILLSON, MICHAEL G. ROSENFELD & GLASS, C. K. (2007). Parallel SUMOylation-Dependent Pathways Mediate Gene- and Signal-Specific Transrepression by LXRs and PPAR $\gamma$ . *Molecular cell* **25**, 57-70.
- GILL, S., CHOW, R. & BROWN, A. J. (2008). Sterol regulators of cholesterol homeostasis and beyond: The oxysterol hypothesis revisited and revised. *Progress in lipid research* **47**, 391–404.
- GLASS, C. K. & WITZTUM, J. L. (1997). Nuclear receptor coactivators. *Current Opinion in Cell Biology* **9**, 222-232.
- GLASS, C. K. & WITZTUM, J. L. (2001). Atherosclerosis: The Road Ahead. *Cell* **104**, 503-516.

- GOODWIN B, WATSON MA, KIM H, MIAO J, KEMPER JK & SA., K. (2003). Differential Regulation of Rat and Human CYP7A1 by the Nuclear Oxysterol Receptor Liver X Receptor-alpha *Endocrinology* **17**, 386-394.
- GORAYA, T. Y., LEIBSON, C. L., PALUMBO, P. J., WESTON, S. A., KILLIAN, J. M., PFEIFER, E. A., JACOBSEN, S. J., FRYE, R. L. & ROGER, V. R. L. (2002). Coronary Atherosclerosis in Diabetes Mellitus A Population-Based Autopsy Study. *Journal of the american college of cardiology* **40**, 946-53.
- GREFHORST, A., ELZINGA, B. M., VOSHOL, P. J., PLÖSCH, T., KOK, T., BLOKS, V. W., VAN DER SLUIJS, F. H., HAVEKES, L. M., ROMIJN, J. A., VERKADE, H. J. & KUIPERS, F. (2002). Stimulation of Lipogenesis by Pharmacological Activation of the Liver X Receptor Leads to Production of Large, Triglyceride-rich Very Low Density Lipoprotein Particles. *the journal of biological chemistry* **277**.
- HALBERG, N., WERNSTEDT, I. & SCHERER, P. E. (2008). The Adipocyte as an Endocrine Cell. *Endocrinology and metabolism clinics of north america* **37**, 37:753-68, x-xi.
- HANS-GEORG, J., BELL, G. I., BEST, J. D., BIRNBAUM, M. J., CHARRON, M. J., CHEN, Y. T., DOEGE, H., JAMES, D. E., LODISH, H., MOLEY, K. H., MOLEY, J. F., MUECKLER, M., ROGERS, S., SCHÜRMAN, A., SEINO, S. & THORENS, B. (2002). Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. *American journal of physiology endocrinology and metabolism* **282**, E974-E976.
- HAUGUEL DE MAUZON, S., CHALLIER, J. C., KACEMI, A., CAÜZAC, M., MALEK, A. & GIRARD, J. (1997). The GLUT3 Glucose Transporter Isoform Is Differentially Expressed within Human Placental Cell Types. *Journal of clinical endocrinology and metabolism* **82**, 2689-2694.
- HEIJNEN, H. F. G., OORSCHOT, V., SIXMA, J. J., SLOT, J. W. & JAMES, D. E. (1997). Thrombin Stimulates Glucose Transport in Human Platelets via the Translocation of the Glucose Transporter GLUT-3 from  $\alpha$ -Granules to the Cell Surface. *The journal of cell biology* **138**.
- HELLEBOID-CHAPMAN, A., HELLEBOID, S., JAKEL, H., TIMMERMAN, C., SERGHERAERT, C., PATTOU, F., FRUCHART-NAJIB, J. & FRUCHART, J.-C. (2006). Glucose regulates LXR $\alpha$  subcellular localization and function in rat pancreatic  $\beta$ -cells. *Cell reaserch* **16**, 661-670.
- HENNIGE, A. M., STEFAN, N., KAPP, K., LEHMANN, R., WEIGERT, C., BECK, A., MOESCHEL, K., MUSHACK, J., SCHLEICHER, E. & HÄRING, H.-U. (2006). Leptin down-regulates insulin action through phosphorylation of serine-318 in insulin receptor substrate 1. *The FASEB journal* **20**.
- HIROSUMI, J., TUNCMAN, G., CHANG, L., GÖRGÜN, C. Z., UYSAL, K. T., MAEDA, K., KARIN, M. & HOTAMISLIGIL, G. S. (2002). A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* **420**, 353-356.
- HOTAMISLIGIL, G. S., ARNER, P., CARO, J. F., ATKINSON, R. L. & SPIEGEL, B. M. (1995). Increased Adipose Tissue Expression of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in Human Obesity and Insulin resistance. *The journal of clinical investigation* **95**, 2409-2415.

- HOTAMISLIGIL, G. S., BUDAVARI, A., MURRAY, D. & SPIEGELMAN, B. M. (1994). Reduced Tyrosine Kinase Activity of the Insulin Receptor in Obesity-Diabetes Central Role of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ . *The journal of clinical investigation* **94**, 1543-1549.
- HOUCK, K. A., BORCHERT, K. M., HEPLER, C. D., THOMAS, J. S., BRAMLETT, K. S., MICHAEL V, B. & BURRIS, T. P. (2004). T0901317 is a dual LXR/FXR agonist. *Molecular genetics and metabolism* **83**, 184–187.
- ITANI, S. I., RUDERMAN, N. B., SCHMIEDER, F. & BODEN, G. (2002). Lipid-Induced Insulin Resistance in Human Muscle Is Associated With Changes in Diacylglycerol, Protein Kinase C, and I $\kappa$ B- $\alpha$ . *Diabetes* **51**, 2005–2011.
- J DAVIES, M., RICHARDSON, P. D., WOOLF, N., KATZ, D. R. & MANN, J. (1993). Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *British hearth journal* **69**, 377–381.
- JACOBS, D. B., LEO, T.-P., JUNG, C. Y. & MOOKERQEE, B. K. (1989). Mechanism of Mitogen-induced Stimulation of Glucose Transport in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Evidence of an Intracellular Reserve Pool of Glucose Carriers and Their Recruitment. *The journal of clinical investigation* **83**, 437-443.
- JAMROZ-WIŚNIEWSKA, A., WÓJCICKA, G., HOROSZEWICZ, K. & BELTOWSKI, J. (2007). Liver X receptors (LXRs). Part II: Non-lipid effects, role in pathology, and therapeutic implications. *Postepy higieny i medycyny doswiadczałnej (Online)* **61**, 760-785.
- JANOWSKI, B. A., GROGAN, M. J., JONES, S. A., WISELY, G. B., KLIEWER, S. A., COREY, E. J. & MANGELSDORF, D. J. (1999). Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRA and LXR $\beta$ . *Proceedings of the national academy of sciences* **96**, 266–271.
- JANOWSKI, B. A., WILLY, P. J., THOTA RAMA, D., J.R., F. & MANGELSDORF, D. J. (1996). An oxysterol signaling pathway mediated by the nuclear receptorLXR $\alpha$ . *Nature* **383**, 728-731.
- JENSEN, P. J., GITLIN, J. D. & CARAYANNOPOULOS, M. O. (2007). GLUT1 Deficiency Links Nutrient Availability and Apoptosis during Embryonic Development. *Journal of biological chemistry* **281**, 13382–13387.
- JHONSON, J. A., POHAR, S. L. & MAJUMDAR, S. R. (2006). Health Care Use and Costs in the Decade After Identification of Type 1 and Type 2 Diabetes A population-based study. *Diabetes care* **29**, 2403-2408.
- JOSEPH, S., LAFFITTE, B. A., PATEL, P. H., WATSON, M. A., MATSUKUMA, K. E., WALCZAK, R., COLLINS, J. L., OSBORNE, T. F. & TONTONOZ, P. (2002a). Direct and Indirect Mechanisms for Regulation of Fatty Acid Synthase Gene Expression by Liver X Receptors. *The jornal of biological chemistry* **277**, 11019–11025.
- JOSEPH, S., MCKILLING, E., PEI, L., WATSON, M. A., COLLINS, A., LAFFITTE, B. A., CHEN, M., NOH, G., GOODMAN, J., HAGGER, G. N., TRAN, J., TIPPIN, T. K., WANG, X., LUSIS, A., HSUEH, W. A., LAW, R. E., COLLINS, J.

- L., WILLSON, T. M. & TONONZOZ, P. (2002b). Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proceedings of the national academy of sciences* **99**, 7604–7609.
- JOSEPH, S. B., BRADLEY, M. N., CASTRILLO, A., BRUHN, K. W., MAK, P. A., PEI, L., HOGENESCH, J., O'CONNELL, R. M., CHENG, G., SAEZ, E., MILLER, J. F. & TONONZOZ, P. (2004). LXR-Dependent Gene Expression Is Important for Macrophage Survival and the Innate Immune Response. *Cell* **119**, , 299–309.
- JOSEPH, S. B., CASTRILLO, A., LAFFITTE, B. A., MANGELSDORF, D. J. & TONONZOZ, P. (2003). Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nature medicine* **9**, 213–219.
- KAPLAN, R., ZHANG, T., HERNANDEZ, M., GAN, F. X., WRIGHT, S. D., WATERS, M. G. & CAI, T.-Q. (2003). Regulation of the angiopoietin-like protein 3 gene by LXR. *journal of lipid research* **44**, 136-143.
- KAYANO, T., FUKUMOTO, H., EDDY, R. L., FAN, Y. S., BYERS, M. G., SHOWS, T. B. & G.I., B. (1988). Evidence for a family of human glucose transporter-like proteins. Sequence and gene localization of a protein expressed in fetal skeletal muscle and other tissues. *Journal of biological chemistry* **263**, 15245–15248.
- KOISHI, R., ANDO, Y., ONO, M., SHIMAMURA, M., YASUMO, H., FUJIWARA, T., HOROKOSHI, H. & FURUKAWA, H. (2002). Angptl3 regulates lipid metabolism in mice. *Nature genetics* **30** (2), 151-157.
- KOTOKORPI, P., ELLIS, E., PARINI, P., NILSSON, L.-M., STROM, S., STEFFENSEN, K. R., GUSTAFSSON, J.-A. & MODE, A. (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] propyloxy] phenylacetic Acid Hydrochloride (GW3965). *Molecular pharmacology* **72**, 947–955.
- KROLEWSKI, A. S., KOSINSKI, E. J., H., W. J., LELAND, S., BUSICK, E. J., ASMAL, A. C., RAND, L. I., CHRISTLIEB, A. R., BRADLEY, R. F. & KAHN, R. (1987). Magnitude and Determinants of Coronary Artery Disease in Juvenile-Onset, Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *The american journal of cardiology* **59**, 750-755.
- LAFFITTE, B. A., CHAO, L. C., LI, J., WALCZAK, R., HUMMASTI, S., JOSEPH, S., CASTRILLO, A., WILPITZ, D., MANGELSDORF, D. J., COLLINS, J. L., SAEZ, E. & TONONZOZ, P. (2003). Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue. *Proceedings of the national academy of sciences* **100**, 5419–5424.
- LAFFITTE, B. A., REPA, J. J., JOSEPH, S., WILPITZ, D., KAS, T. R., MANGELSDORF, D. J. & TONONZOZ, P. (2001). LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proceedings of the national academy of sciences* **98**, 507–512.
- LEE, W. L., CHEUNG, A. M., CAPE, D. & ZINMAN, B. (2000). Impact of Diabetes on Coronary Artery Disease in Women and Men. *Diabetes care* **23**, 962–968.

- LEHMANN, J. M., KLIEWER, S. A., MOORE, L. B., SMITH-OLIVER, T. A., OLIVER, B. B., SU, J.-L., BLANCHARD, D. E., SPENCER, T. A. & WILLSON, T. M. (1997). Activation of the Nuclear Receptor LXR by Oxysterols Defines a New Hormone Response Pathway. *The journal of biological chemistry* **272**, 3137–3140.
- LEHRKE, M., REILLY, M. P., MILLINGTON, S. C., IQBAL, N., RADER, D. J. & LAZAR, M. A. (2004). An Inflammatory Cascade Leading to Hyperresistinemia in Humans. *Plos medicine* **1**, 161-168.
- LI, X., ZHANG, S., BLANDER, G., TSE, J. G., KRIEGER, M. & GUARENTE, L. (2007). SIRT1 Deacetylates and Positively Regulate the Nuclear Receptor LXR. *Molecular cell* **21**, 98-106.
- LIANG, C.-P., HAN, S., SENOKUCHI, T. & TALL, A. R. (2007). The Macrophage at the Crossroads of Insulin Resistance and Atherosclerosis. *Circulation research* **100**, 1546-1555.
- LIANG, G., YANG, J., HORTON, J. D., HAMMER, R. E., GOLDSTEIN, J. L. & BROWN, M. S. (2002). Diminished Hepatic Response to Fasting/Refeeding and Liver X Receptor Agonists in Mice with Selective Deficiency of Sterol Regulatory Element-binding Protein-1c. *The journal of biological chemistry* **277**, 9520–9528.
- LIBBY, P. (2002). Inflammation in atherosclerosis. *Nature* **420**, 868-874.
- LOFFLER, M., BILBAN, M., REIMERS, M., WALDHÄUSL, W. & STULNIG, T. M. (2006). Blood Glucose-Lowering Nuclear Receptor Agonists Only Partially Normalize Hepatic Gene Expression in db/db Mice. *the journal of pharmacology and experimental therapeutics* **316**, 797-804.
- MALIDE, D., DAVIES-HILL, T. M., LEVINE, M. & SIMPSON, I. A. (1998). Distinct localization of GLUT-1, -3, and -5 in human monocyte-derived macrophages: effects of cell activation. *American journal of physiology endocrinology and metabolism* **274**, 516-526.
- MANOLESCU, A. R., WITKOWSKA, K., KINNAIRD, A., CESSFORD, T. & CHEESEMAN, C. (2007). Facilitated Hexose Transporters: New Perspectives on Form and Function. *Physiology* **22**, 234–240.
- MARATHE, C., BRADLEY, M. N., HONG, C., LOPEZ, F., RUIZ DE GALARRETA, C. M., TONTONNOZ, P. & ANTONIO, C. (2006). The Arginase II Gene Is an Anti-inflammatory Target of Liver X Receptor in Macrophages. *the journal of biological chemistry* **281**, 32197–32206.
- MARATOU, E., DIMITRIADIS, G., KOLLIAS, A., BOUTATI, E., LAMBADIARI, V., MITROU, P. & RAPTIS, S. A. (2007). Glucose transporter expression on the plasma membrane of resting and activated white blood cells. *European journal of clinical investigation* **37**, 282–290.
- MARETTE, A., RICHARDSON, J. M., RAMLAL, T., BALON, T. W., VRANIC, M., PESSIN, J. E. & AMIRA, K. (1992). Abundance, localization, and insulin-induced translocation of glucose transporters in red and white muscle. *American journal of physiology* **263**, 443-452.

- MATE, A., DE LA HERMOSA, M. A., BARFULL, A., PLANAS, J. M. & VAZQUEZ, C. M. (2001). Characterization of D-fructose transport by rat kidney brush-border membrane vesicles: changes in hypertensive rats. *Cellular and molecular life sciences* **58**, 1961–1967.
- MAYHEW, J. A., GILLON, K. R. W. & HAWTHORNE, J. N. (1983). Free and Lipid Inositol, Sorbitol and Sugars in Sciatic Nerve Obtained Post-Mortem from Diabetic Patients and Control Subjects. *Diabetologia* **24**, 13-15.
- MITRO, N., MAK, P. A., VARGAS, L., GODIO, C., HAMPTON, E., MOLTENI, V., KREUSCH, A. & SAEZ, E. (2007). The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature* **445**, 219-223.
- MOLTENI, V., LI, X., NABAKKA, J., LIANG, F., WITYAK, J., KODER, A., VARGAS, L., ROMEO, R., MAK, P. A., MITRO, N., SEIDEL, H. M., HASLAM, J. A., CHOW, D., TUNTLAND, T., SPALDING, T. A., BROCK, A., BRADLEY, M., CASTRILLO, A., TONTONNOZ, P. & SAEZ, E. (2007). N-Acylthiadiazolines, a New Class of Liver X Receptor Agonists with Selectivity for LXRA. *Journal of medicinal chemistry* **50**, 4255-4259.
- MUECKLER, M., BALDWIN, C., PANICO, S. A., BLENCH, I., MORRIS, H. R., ALLARD, W. J., LIENHARD, G. E. & LODISH, H. F. (1985). Sequence and structure of human glucose transporter. *Science* **229**, 941, 945.
- MUECKLER, M. & MAKEPEACE, C. (2006). Transmembrane Segment 12 of the Glut1 Glucose Transporter Is an Outer Helix and Is Not Directly Involved in the Transport Mechanism. *The journal of biological chemistry* **281**, 36993–36998.
- MUSCAT, G. E. O., WAGNER, B. L., HOU, J., TANGIRALA, R., BISCHOFF, E. D., ROHDE, P., PETROWSKI, M., LI, J., SHAO, G., MACONDRAY, G. & SCHULMAN, I. G. (2002). Regulation of Cholesterol Homeostasis and Lipid Metabolism in Skeletal Muscle by Liver X Receptors. *the journal of biological chemistry* **277**, 40722–40728.
- NAIK, S. U., WANG, X., DA SILVA, J. S., JAYE, M., MACPHEE, C. H., REILLY, M. P., BILLHEIMER, J. T., ROTHBLAT, G. H. & RADER, D. J. (2006). Pharmacological Activation of Liver X Receptors Promotes Reverse Cholesterol Transport In Vivo. *Circulation* **113**, 90-97.
- NGUYEN, M. T. A., FAVELYUKIS, S., NGUYEN, A.-K., REICHART, D., SCOTT, P. A., JENN, A., LIU-BRYAN, R., GLASS, C. K., NEELS, J. G. & OLEFSKY, J. M. (2007). A Subpopulation of Macrophages Infiltrates Hypertrophic Adipose Tissue and Is Activated by Free Fatty Acids via Toll-like Receptors 2 and 4 and JNK-dependent Pathways. *Journal of biological chemistry* **282**, 35279-35292.
- OKAZAKI, H., GOLDSTEIN, G.L., BROWN, M. S., & LIANG, G. (2009). LXR-SREBP-1c- phospholipid transfer protein axis controls ery low density lipoprotein (VLDL) particle size. *Journal of biological chemistry*. **285**(9), 6801-6810
- OGAWA, D., STONE, J. F., TAKATA, Y., BLASCHKE, F., CHU, V. H., TOWLER, D. A., LAW, R. E., HSUEH, W. A. & BRUEMME, R. D. (2005). Liver X Receptor Agonists Inhibit Cytokine-Induced Osteopontin Expression in Macrophages Through Interference With Activator Protein-1 Signaling Pathways. *Circulation research* **96**, e59-e67.

- OLEFSKY, J. M. & GLASS, C. K. (2010). Macrophages, Inflammation, and Insulin Resistance. *Annual review of physiology* **72**, 219-246.
- OU, J., TU, H., SHAN, B., LUK, A., DEBOSE-BOYD, R. A., BASHMAKOV, Y., GOLDSTEIN, J. L. & BROWN, M. S. (2001). Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand dependent activation of the LXR. *Proceedings of the national academy of sciences* **98**, 6027–6032.
- PATSOURIS, D., LI, P.-P., THAPAR, D., CHAPMAN, J., OLEFSKY, J. M. & NEELS, J. G. (2008). Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals. *Cell metabolism* **8**, 301–309.
- PEET, D. J., TURLEY, S. D., MA, W., JANOWSKI, B. A., LOBACCARO, J.-M. A. & MANGELSDORF, D. J. (1998). Cholesterol and Bile Acid Metabolism Are Impaired in Mice Lacking the Nuclear Oxysterol Receptor LXRA. *Cell* **93**, 693–704.
- PREITNERA, F., BONNYC, O., LAVERRIÈRE, A., ROTMANE, S., FIRSOVC, D., DA COSTA, A., METREFA, S., AND THORENS, B. 2009 Glut9 is a major regulator of urate homeostasis and its genetic inactivation induces hyperuricosuria and urate nephropathy. *PNAS*, **106** (36): p. 15501–15506.
- PINEDA-TORRA, I., ISMAILI, N., FEIG, J. E., XU, C.-F., CAVASOTTO, C., PANCRATOV, R., ROGATSKY, I., NEUBERT, T. A., FISHER, E. A. & GARABEDIAN, M. J. (2008). Phosphorylation of Liver X Receptor  $\alpha$  Selectively Regulates Target Gene Expression in Macrophages. *Molecular and cellular biology* **28**, 2626–2636.
- PITKÄNEN, E. (1996). Mannose, mannitol, fructose and 1,5-anhydroglucitol concentrations measured by gas chromatography/mass spectrometry in blood plasma of diabetic patients. *Clinica chimica acta* **251**.
- QATANANI, M., SZWEGOLD, N. R., GREAVES, D. R., AHIMA, R. S. & LAZAR, M. A. (2009). Macrophage-derived human resistin exacerbates adipose tissue inflammation and insulin resistance in mice. *The journal of clinical investigation* **119**, 531-539.
- QUINET, E. M., SAVIO, D. A., HALPERN, A. R., CHEN, L., SCHUSTER, G., GUSTAFSSON, J.-A., BASSO, M. D. & NAMBI, P. (2006). Liver X Receptor (LXR)- Regulation in LXR-Deficient Mice: Implications for Therapeutic Targeting. *Molecular pharmacology* **70**, 1340–1349.
- RAHMAN, S., RAHMAN, T., AZIZ AL-SHAFI, I. & RASHID, A. R. A. (2007). Diabetes-associated macrovasculopathy: pathophysiology and pathogenesis. *Diabetes, obesity and metabolism* **9**, 767–780.
- RAND, E. B., DEPAOLI, A. M., DAVIDSON, N. O., BELL, G. I. & BURANT, C. F. (1993). Sequence, tissue distribution, and functional characterization of the rat fructose transporter GLUT5. *American journal of physiology* **264**, G1169–1176.

- REPA, J. J., BERGE, K. E., POMAJZL, C., RICHARDSON, J. A., HOBBS, H. & MANGELSDORF, D. J. (2002). Regulation of ATP-binding Cassette Sterol Transporters ABCG5 and ABCG8 by the Liver X Receptors alpha and beta. *the journal of biological chemistry* **277**, 18793-18800.
- REPA, J. J., LIANG, G., OU, J., BASHMAKOV, Y., LOBACCARO, J.-M. A., SHIMOMURA, I., SHAN, B., BROWN, M. S., GOLDSTEIN, J. L. & MANGELSDORF, D. J. (2000a). Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXR and LXR. *Genes and development* **14**, 2819–2830.
- REPA, J. J. & MANGELSDORF, D. J. (2000). The Role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annual review of cell and developmental biology* **16**, 459–81.
- REPA, J. J., TURLEY, S. D., LOBACCARO, J.-M. A., MEDINA, J. C., LI, L., LUSTIG, K. D., SHAN, B., HEYMAN, R. A., DIETSCHY, J. M. & MANGELSDORF, D. J. (2000b). Regulation of Absorption and ABC1-Mediated Efflux of Cholesterol by RXR Heterodimers. *Science* **289**.
- RIGAMONTI, E., CHINETTI-GBAGUIDI, G. & STAELS, B. (2008). Regulation of Macrophage Functions by PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\gamma$ , and LXRs in Mice and Men. *Arteriosclerosis thrombosis and vascular biology* **28**, 1050-1059.
- RIGAMONTI, E., HELIN, L., LESTAVEL, S., MUTKA, A. L., LEPORE, M., FONTAINE, C., BOUHLEL, M. A., BULTEL, S., FRUCHART, J. C., IKONEN, E., CLAVEY, V., STAELS, B. & CHINETTI-GBAGUIDI, G. (2005). Liver X Receptor Activation Controls Intracellular Cholesterol Trafficking and Esterification in Human Macrophages. *Circulation research* **97**, 682-689.
- ROCHA, V. Z. & LIBBY, P. (2009). obesity, inflammation, and atherosclerosis. *Nature reviews cardiology* **6**, 399–409.
- ROSS, R. (1999). Atherosclerosis -- An Inflammatory Disease. *New England journal of medicine* **340**, 115-126.
- SABOL, S. L., BREWER, B. J. & SANTAMARINA-FOJO, S. (2005). The human ABCG1 gene: identification of LXR response elements that modulate expression in macrophages and liver. *Journal of lipid research* **46**, 2157-2167.
- SCHERER, P. E. (2006). Adipose Tissue From Lipid Storage Compartment to Endocrine Organ. *Diabetes* **55**, 1537-1545.
- SCHULTZ, J. R., TU, H., LUK, A., REPA, J. J., MEDINA, J. C., LI, L., SUSAN, S., WANG, S., THOOLEN, M., MANGELSDORF, D. J., LUSTIG, K. D. & SHAN, B. (2000). Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes and development* **14**, 2831–2838.
- SCHWARTZ, K., LAWN, R. M. & WADE, D. P. (2000). ABC1 Gene Expression and ApoA-I-Mediated Cholesterol Efflux Are Regulated by LXR. *Biochemical and biophysical research communications* **274**, 794-802.



- SHIMIZUGAWA, T., ONO, M., SHIMAMURA, M., YOSHIDA, K., ANDO, Y., KOISHI, R., UEDA, K., INABA, T., MINEKURA, H., KOHAMA, T. & FURUKAWA, H. (2002). ANGPTL3 Decreases Very Low Density Lipoprotein Triglyceride Clearance by Inhibition of Lipoprotein Lipase. *the journal of biological chemistry* **277**, 33742–33748.
- SIMPSON, I. A., DWYER, D., VANNUCCI, S. J., MALIDE DANIELA, MOLEY, K. H., TRAVIS, A. & VANNUCCI, S. J. (2008). The Facilitative Glucose Transporter GLUT3: 20 Years of Distinction. *American journal of physiology endocrinology and metabolism* **295**, E242–E253.
- SLAWSON, C., HOUSLEY, M. P. & HART, G. W. (2006). O-GlcNAc Cycling: How a Single Sugar Post-Translational Modification Is Changing the Way We Think About Signaling Networks. *The journal of cellular biology* **97**, 71–83.
- SONG, C., HIIPAKKA, R. A. & LIAO, S. (2000). Auto-oxidized cholesterol sulfates are antagonistic ligands of liver X receptors: implications for the development and treatment of atherosclerosis. *Steroids* **66**, 473–479.
- STEPPAN, C. M., BAILEY, S. T., BHAT, S., BROWN, E. J., BANERJEE, R. R., WRIGHT, C. M., PATEL, H. R., AHIMA, R. S. & LAZAR, M. A. (2001). The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* **409**, 307-312.
- STULNIG, T. M., STEFFENSEN, K. R., GAO, H., REIMERS, M., DAHLMAN-WRIGHT, K., SCHUSTER, G. & GUSTAFSSON, J.-A. (2002). Novel Roles of Liver X Receptors Exposed by Gene Expression Profiling in Liver and Adipose Tissue. *Molecular pharmacology* **62**, 1299-1305.
- TABAS, I. (2004). Apoptosis and plaque destabilization in atherosclerosis: the role of macrophage apoptosis induced by cholesterol. *Cell death and differentiation* **11**, S12–S16.
- TAKAHASHI, K., TAKEYA, M. & SAKASHITA, N. (2002). Multifunctional roles of macrophages in the development and progression of atherosclerosis in humans and experimental animals. *Medical electron microscopy* **35**, 179–203.
- TAKATA, K., KASEHARA, T., KASAHARA, M., EZAKI, O. & HIRANO, H. (1990). Erythrocyte/HepG2-Type Glucose Transporter Is Concentrated In Cells Of Blood-Tissue Barriers. *Biochemical and biophysical research communications* **173**, 67-73.
- TALUKDAR, S. & HILLGARTNER, F. B. (2006). The mechanism mediating the activation of acetylcoenzyme A carboxylase-a gene transcription by the liver X receptor agonist T0-901317. *Journal of lipid research* **47**, 2451-2461.
- TERASAKA, N., HIROSHIMA, A., ARIGA, A., HONZUMI, S., KOIEYAMA, T., INABA, T. & FUJIWARA, T. (2005). Liver X receptor agonists inhibit tissue factor expression in macrophages. *The FEBS journal* **272**, 1546–1556.
- TERUEL, T., HERNANDEZ, R. & LORENZO, M. (2001). Ceramide Mediates Insulin Resistance by Tumor Necrosis Factor- in Brown Adipocytes by Maintaining Akt in an Inactive Dephosphorylated State. *Diabetes* **50**, 2563–2571.

- ULDRY, M., IBBERSON, M., HOSOKAWA, M. & THORENS, B. (2002). GLUT2 is a high affinity glucosamine transporter. *FEBS Letters* **524**, 199-203.
- ULDRY, M. & THORENS, B. (2004). The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *European journal of applied physiology* **447**, 480–489.
- ULVEN, S. M., DALEN, K. T., GUSTAFSSON, J.-A. & NEBB, H. I. (2005). LXR is crucial in lipid metabolism. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids* **73**, 59-63
- VENKATESWARAN, A., REPA, J. J., LOBACCARO, J.-M. A., BRONSON, A., MANGELSDORF, D. J. & EDWARDS, P. A. (200). Human White/Murine ABC8 mRNA Levels Are Highly Induced in Lipid-loaded Macrophages. A Transcriptional Role For Specific Oxysterols. *the journal of biological chemistry* **275**, 14700–14707.
- VERA, J. C. & ROSEN, O. M. (1989). Functional Expression of Mammalian Glucose Transporters in *Xenopus laevis* Oocytes: Evidence for Cell-Dependent Insulin Sensitivity. *Molecular and cellular biology* **9**, 4187-4195.
- WALCHER, D., KÜMMEL, A., KEHRLE, B., BACH, H., GRÜB, M., DURST, R., HOMBACH, V. & MARX, N. (2006). LXR Activation Reduces Proinflammatory Cytokine Expression in Human CD4-Positive Lymphocytes. *Arteriosclerosis thrombosis and vascular biology* **26**.
- WANG, D. Q.-H. (2007). Regulation of Intestinal Cholesterol Absorption. *Annual review of physiology* **69**, 221–248.
- WANG, P., MARIMAN, E., RENES, J. & KEIJER, J. (2008). The Secretory Function of Adipocytes in the Physiology of White Adipose Tissue. *Journal of cellular physiology* **216**, 3-13.
- WEISBERG, S. P., MCCANN, D., DESAI, M., ROSENBAUM, M., LEIBEL, R. L. & FERRANTE, A. W. J. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The journal of clinical investigation* **112**, 1796–1808.
- WIDDAS, W. F. (1952). Inability of diffusion to account for placental glucose transfer in the sheep and consideration of the kinetics of a possible carrier transfer. *The journal of physiology* **118**, 23-39.
- WIDDAS, W. F. (1954). Facilitated Transfer of hexoses across the human erythrocyte membrane. *The journal of physiology* **125**, 163-180.
- WILD, S., ROGLIC, G., GREEN, A., SICREE, R. & KING, H. (2004). Global Prevalence of Diabetes. *Diabetes care* **27**, 1047-1053
- WILLY, P. J., UMESONO, K., ONG, E. S., EVANS, R., HEYMAN, R. A. & MANGELSDORF, D. J. (1995). LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes and development* **9**, 1033-1045.

- WITZTUM, J. L. & STEINBERG, D. (1991). Role of Oxidized Low Density Lipoprotein in Atherogenesis. *The journal of clinical investigation* **88**, 1785–1792.
- WÓJCICKA, G., JAMROZ-WIŚNIEWSKA, A., HOROSZEWICZ, K. & BELTOWSKI, J. (2007). Liver X receptors (LXRs). Part I: Structure, function, regulation of activity, and role in lipid metabolism. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej* **61**, 736-759.
- WONG, J., SHI, Y. B. & WOLFFE, A. P. (1995). A role for nucleosome assembly in both silencing and activation of the Xenopus TR beta A gene by the thyroid hormone receptor. *Genes development* **9**, 2696–2711.
- WOUTERS, K., SHIRI-SVERDLOV, R., VAN GORP, P. J., VAN BILSEN, M. & HOFKER, M. H. (2005). Understanding hyperlipidemia and atherosclerosis: lessons from genetically modified apoe and ldlr mice. *Clinical chemistry and laboratory medicine* **43**, 470–479.
- XU, H., BARNES, G. T., YANG, Q., TAN, G., YANG, D., CHOU, C. J., SOLE, J., NICHOLS, A., ROSS, J. S., TARTAGLIA, L. A. & CHEN, H. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *The journal of clinical investigation* **112**, 1821–1830.
- YAMAUCHI, T., KAMON, J., MINOKOSHI, Y., ITO, Y., WAKI, H., UCHIDA, S., YAMASHITA, S., NODA, M., KITA, S., UEKI, K., ETO, K., AKANUMA, Y., FROGUEL, P., FOUFELLE, F., FERRE, P., CARLING, D., KIMURA, S., NAGAI, R., KAHN, B. B. & KADOWAKI, T. (2002). Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature medicine* **8**, 1288 - 1295.
- YANG, Q., GRAHAM, T. E., MODY, N., PREITNER, F., PERONI, O. D., ZABOLOTNY, J. M., KOTANI, K., QUADRO, L. & KAHN, B. B. (2005). Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* **436**, 356-362.
- YOSHIKAWA, T., SHIMANO, H., AMEMIYA-KUDO, M., YAHAGI, N., HASTY, A. H., MATSUZAKA, T., OKAZAKI, H., TAMURA, Y., IIZUKA, Y., OHASHI, K., JOSUGA, U.-I., HARADA, K., GOTODA, T., KIMURA, S., ISHIBASHI, S. & NOBUHIRO, Y. (2001). Identification of Liver X Receptor-Retinoid X Receptor as an Activator of the Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1c Gene Promoter. *Molecular and cellular biology* **21**, 2991–3000.
- YU, J. & AUWERX, J. (2010). Protein deacetylation by SIRT1: An emerging key post-translational modification in metabolic regulation. *Pharmacological research*.
- YU, L., HAMMER, R. E., LI-HAWKINS, J., BERGMANN, K. V., LUTJOHANN, D., COHEN, J. C. & HOBBS, H. (2002). Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proceedings of the national academy of sciences* **99**, 16237–16242.
- YU, L., YORK, J., BERGMANN, K. V., LUTJOHANN, D., COHEN, J. C. & HOBBS, H. H. (2003). Stimulation of Cholesterol Excretion by the Liver X Receptor Agonist Requires ATP-binding Cassette Transporters G5 and G8. *The journal of biological chemistry* **278**, 15565–15570.

- ZHAO, F.-Q. & KEATING, A. F. (2007). Functional Properties and Genomics of Glucose Transporters. *Current Genomics* **8**, 113-128.
- ZHAO, F. Q., GLIMM, D. R. & KENNELLY, J. J. (1993). Distribution Of Mammalian Facilitative Glucose Transporter Messenger RNA In Bovine Tissues *The international journal of biochemistry & cell biology* **25**, 1897-1903.
- ZHOU, J., FEBBRAIO, M., WADA, T., ZHAI, Y., KURUBA, R., HE, J., LEE, J. H., KHADEM, S., REN, S., LI, S., SILVERSTEIN, R. L. & XIE, W. (2008). Hepatic Fatty Acid Transporter Cd36 Is a Common Target of LXR, PXR, and PPAR in Promoting Steatosis. *Gastroenterology* **134**, 556–567.
- ZITZER, H., WENTE, W., BRENNER, M. B., SEWING, S., BUSCHARD, K., GROMADA, J. & EFANOV, A. M. (2006). Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1 Mediates Liver X Receptor--Induced Increases in Insulin Secretion and Insulin Messenger Ribonucleic Acid Levels. *Endocrinology* **147**, 3898–3905.