



Stéatohépatite et adaptations métaboliques: Effets d'un régime enrichi en lipides saturés, ou carencé en choline et méthionine, sur la bioénergétique et le métabolisme hépatique de rat

Caroline Romestaing

► To cite this version:

Caroline Romestaing. Stéatohépatite et adaptations métaboliques: Effets d'un régime enrichi en lipides saturés, ou carencé en choline et méthionine, sur la bioénergétique et le métabolisme hépatique de rat. Physiologie [q-bio.TO]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2007. Français. <NNT : >. <tel-00262387>

HAL Id: tel-00262387

<https://theses.hal.science/tel-00262387v1>

Submitted on 11 Mar 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON 1

Année 2007

n° 106-2007

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD

Discipline : Physiologie

présentée et soutenue publiquement le 6 Juillet 2007 par

Caroline ROMESTAING

Stéatohépatite et adaptations métaboliques:

Effets d'un régime enrichi en lipides saturés, ou carencé en choline et méthionine, sur la bioénergétique et le métabolisme hépatique de rat.

Directeurs de thèse : *Brigitte SIBILLE et Marie Astrid PIQUET*

JURY

<i>Mr Claude DUCHAMP</i> , Professeur de l'Université Claude Bernard, LYON 1	Président
<i>Mr Michel RIGOULET</i> , Professeur de l'Université BORDEAUX 2	Rapporteur
<i>Mr Bernard FROMENTY</i> , DR2 INSERM, PARIS	Rapporteur
<i>Mr Michel BEYLOT</i> , DR2 INSERM, LYON 1	Examineur
<i>Mme Brigitte SIBILLE</i> , MCU de l'Université Claude Bernard, LYON 1	Directeur
<i>Mme Marie Astrid PIQUET</i> , PUPH, CAEN	Directeur



Président de l'Université

Vice-Président du Conseil Scientifique

Vice-Président du Conseil d'Administration

Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Secrétaire Général

M. le Professeur L. COLLET

M. le Professeur J.F. MORNEX

M. le Professeur J. LIETO

M. le Professeur D. SIMON

M. G. GAY

SECTEUR SANTE

Composantes

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec

UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche

UFR de Médecine Lyon-Nord

UFR de Médecine Lyon-Sud

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut Techniques de Réadaptation

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur D. VITAL-DURAND

Directeur : M. le Professeur X. MARTIN

Directeur : M. le Professeur F. MAUGUIERE

Directeur : M. le Professeur F.N. GILLY

Directeur : M. O. ROBIN

Directeur : M. le Professeur F. LOCHER

Directeur : M. le Professeur MATILLON

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

SECTEUR SCIENCES

Composantes

UFR de Physique

UFR de Biologie

UFR de Mécanique

UFR de Génie Electrique et des Procédés

UFR Sciences de la Terre

UFR de Mathématiques

UFR d'Informatique

UFR de Chimie Biochimie

UFR STAPS

Observatoire de Lyon

Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon

IUT A

IUT B

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur A. HOAREAU

Directeur : M. le Professeur H. PINON

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur A. BRIGUET

Directeur : M. le Professeur P. HANTZPERGUE

Directeur : M. le Professeur M. CHAMARIE

Directeur : M. le Professeur M. EGEA

Directeur : Mme. le Professeur H. PARROT

Directeur : M. le Professeur R. MASSARELLI

Directeur : M. le Professeur R. BACON

Directeur : M. le Professeur J. LIETO

Directeur : M. le Professeur M. C. COULET

Directeur : M. le Professeur R. LAMARTINE

Directeur : M. le Professeur J.C. AUGROS

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Physiologie Intégrative, Cellulaire et Moléculaire, UMR 5123 CNRS-LYON1 dirigé par le Pr. Jean Marc Pequignot, au sein de l'équipe Thermorégulation Et Adaptations Métaboliques du Pr. Claude Duchamp, sous la direction du Dr. Brigitte Sibille et du Pr. Marie-Astrid Piquet.

Je remercie tout d'abord l'ensemble des membres du jury qui m'ont fait l'honneur de bien vouloir lire et juger ce travail (il est vrai que le manuscrit est un peu volumineux mais c'est en raison des nombreux graphiques et schémas !) et d'avoir animé une discussion scientifique qui fut pour moi très enrichissante. Je suis presque prête à recommencer !

Je tiens également à remercier le président du jury, qui se trouve être également mon chef d'équipe ! Merci Claude d'avoir permis mon transfuge du monde du « cerveau » vers celui du « froid », qui c'est en fait averé être celui du gras!

Je voudrais surtout remercier Brigitte Sibille (alias Briou) et Marie-Astrid Piquet (alias MAP), mes deux chefs ! Merci de m'avoir fait confiance pour cette thèse et de m'avoir encadré au cours de ces 5 années. MAP je vais regretter nos rendez-vous scientifiques, que ce soit à Paris ou entre deux conférences de la SFN ! Briou, la première fois qu'on s'est croisées tu écrivais ta thèse. C'est un peu grâce à toi que j'ai découvert le foie et son métabolisme (et michel rigoulet par la même occasion !). Le hasard a voulu que l'on se retrouve à Lyon. Il a fallu être persuasif (merci MAP) mais tu as accepté de me prendre comme thésarde. La boucle est bouclée. Grâce à toi j'ai réalisé une thèse dans les meilleures conditions qui soient. Merci pour tout, merci d'être plus qu'une chef.

Merci aussi à Plume et Amélie de m'avoir accueilli chez eux et de m'avoir prêté Briou à la fin de cette thèse, ça m'a bien aidé ! La prochaine fois que je viens c'est pour plonger et se goinfrer chez Fenocchio !

Cette thèse n'aurait pas pu se faire non plus sans tout les illustres membres de la T.E.A.M., anciens (Elo, Yann, Stéphane, Benji, Maud, Dom) ou nouveau (Loïc) ! Merci pour tout vos coup de mains avant, pendant et après les manips et vive le foie !

Merci Elo pour ton soutien lors de la préparation de ce fichu oral, sans toi ...

Yann, nos discussions cinématographiques, sportives, culinaires, un peu scientifiques aussi vont me manquer. Tu as le mérite de m'avoir sorti la tête de ma mitochondrie et de m'avoir fait réaliser que la grenouille peut être vraiment intéressante autrement qu'en persillade ! Monsieur le Professeur, tu m'as presque converti aux bébêtes à sang froid ! Je suis à ta disposition pour une exploration plus en profondeur du proté !

Stéphane, que dire, que tu es un modèle pour nous tous ! Thèse, postdoc, MCU, à quand professeur ! Non sérieusement ce fut un honneur pour moi que de partager le même bureau que toi. Tes petites remarques sur mes topos ou mes articles, même si ça me stressait extrêmement, m'ont permis de progresser. Tu es, et tu resteras toujours de bon conseil.

Benji, alias Monsieur Manchot, tout un programme ! Tu es le brin de fantaisie de ce labo ! Jamais stressé, toujours de bonne humeur ! Vive la vie (en tongues !!!). Grace à toi j'ai découvert le monde fascinant des manchots et un début d'envie d'aller visiter Crozet commence sérieusement à me chatouiller !! Tu es aussi et restera le seul à m'avoir fais décoller !!!

Dom alias Mr Bio Mol ! Merci pour toutes les PCR que tu m'as faites mais aussi pour tous les autres coups de mains lors des manips. Ca va me manquer te te croiser en short et crampons dans les couloirs du labo ! Merci aussi pour tout les « extérieurs » du labo.

Maud, tu as été ma première véritable stagiaire. Pleine de surprise ! Clampeuse professionnelle ! J'espère t'avoir appris quelques petites choses ! Merci de m'avoir accepté dans ton bureau pour la rédaction de ma thèse et de m'avoir supporté, ça n'a pas du être facile tout les jours ! Je suis fière de toi, la succession est assurée (gestion du labo, organisation du barbecue ...)

Loïc, le petit dernier, bienvenu dans le groupe ! Le futur Mr Canard ! Merci pour l'hébergement, pour la découverte de speed burger et tout le reste. Bon courage pour la suite !

Ce fut un fut vraiment génial de travailler et partager le bureau avec vous tous. Vous allez tous me manquer. Peut être un jour nos route se re-croiseront. En attendant j'espère vous voir aux States !

Je tiens également à remercier tous les autres membres de l'équipe : Harry, Jean-Louis, Guy, Daniel, Roger, Dominique, Marie-Hélène, Damien. Grâce à vous le 4° a retrouvé une nouvelle jeunesse et de nouveaux fournisseurs pour nos petits repas !!

Je n'oublie pas notre mère à tous, MTB, sans toi le labo tournerait nettement moins bien !

Je ne les citerai pas tous mais un grand merci à tout mes logeurs. Grâce à vous j'ai pu mener une double vie entre grenoble et Lyon. A charge de revanche !

Un merci tout particulier à Vincent, mon anapath' perso ! Merci pour tout le boulot que tu as fais sur mes bouts de foie et pour les jolies photos.

Je tiens également à remercier mon sponsor officiel, Fujitsu Siemens France. Ils ne le savent pas mais ils ont grandement participé à la rédaction de ce manuscrit ! Merci également à Ptiluc pour sa collection Rat's et pour toutes ses illustrations. Elles sont parfaites !

Merci à ma famille, merci maman, tu m'as laissé choisir la voie qui me plaisait, même si elle n'était pas forcément la plus simple et la plus sûre. Si j'ai cette thèse c'est aussi grace à toi. Merci Doudou, Juju, à la cagolle, et maintenant au gaillou, pour les clougs, les fondants chocolat et toutes ces petites choses qui me sortait la tête du labo. Et enfin merci à Franck pour tout, c'est toi qui a le plus souffert puisque que tu me supportais au quotidien. Pour tout ça tu auras bien mérité tes vacances postdoctorales !

Mimi cette thèse est pour toi, pour que tu sois fier de moi.

LA NASHEUSE

Allo, les rats
Y a un gueleton bâtiment Dubois
Beurre etttttt, cocoooo ad liiiiibitummm à se faire péter l'duodénum.

Caro, Caaro
J'ai trop maaaaal
Au hepatoooooos
Et mes mitos
Sont découplées, elles répondent pluuuus au FCCP

Ref : Eh Caro, mais qu'est c'que tu m'as fait ?
J'suis stéatosé,
J'ai le foie tout inflammé
Eh Caroooo, j'suis tout cirrrosé,
Le MCDD, c'est pas bon pour la santé.
Eh Caro, mais qu'est c'que tu m'as fait ?
J'suis stéatosé,
J'ai le foie tout inflammé
Eh Caroooo, j'suis tout cirrrosé,
Le MCDD, c'est pas bon pour la santé.

Ecoute, petit,
Je n'aiiii que nnnnn=4,
Je doiiviiiiis publier,
J'ai touuuuut essayéeeee, rest' qu'AJP.

Briou, elle t'a lâché
Et MAP, on n'sait même pas qui c'est
Quant à Claude..... Faut l'attraper !!!!
Oùùùùùù j'avais passer ce papier.

Ref : Eh Caro, t'es sans domicile fixe,
De Lyon à Grenoble,
Tu squattees de potes en potes.
Eh Caroooo t'es sans domicile fixe,
T'innnquiètes paaas ça dééérange pas.
Eh Caroooo t'es sans domicile fixe,
De Lyon à Grenoble,
Tu squattees de potes en potes.
Eh Caroooo t'es sans domicile fixe,
Tuuuu reviennnnns quannnnnd tu veux

AHIIIIIIIAI, AHIIIIIAOU, AHIIIIIAE, AHIIIIIAAAA A (X2)

Et maint'nannnt nous voudrions te dire,
Caaaro Bravo, Caaro Merci pour tout,
Et maint'nannnt qui va nous materner ?
Va-t-on pouvoiiiir te reeeemplacer ?

Et maint'nannnt nous voudrions te dire,
Bon vent bon courage pour ton postdoc Amerloc
Et Shulmannnn nous voudrions lui dire
Tâaaaaache de paaas nous l'aaaaabîmer.

AHIIIIIIAI, AHIIIIIAOU, AHIIIIIAE, AHIIIIIAAAA A (X2)

Abréviations

$\Delta\Psi$	différence de potentiel de part et d'autre de la membrane mitochondriale
1,3-DPG	1,3-diphosphoglycérate
2-PG	2-phosphoglycérate
3-PG	3-phosphoglycérate
AcAc	acétoacétate
ACC	acétyl coA carboxylase
ADN	acide désoxyribonucléique
ADP	adénosine-5'-diphosphate
ALT	alanine aminotransférase
AMP	adénosine-5'-monophosphate
AMPc	adénosine-5'-monophosphate cyclique
AMPK	AMP-activated protein kinase
ATP	adénosine-5'-triphosphate
ATPase	F ₀ -F ₁ ATP synthase
BSA	albumine de sérum bovin
Ca ²⁺	ion calcium
CCCP	carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone
CoCl ₂	chlorure de cobalt
DHA	dihydroxyacétone
DHAP	dihydroxyacétone phosphate
DPG	diphosphatidylglycérol
DTT	dithiothreitol
EDTA	acide éthylène diamine tétra-acétique
EGTA	acide éthylène glycol-bis (β-amino-éthyl éther) N,N, N',N'-tétraacétique
F1,6bP	fructose 1,6-biphosphate
F1,6bPase	fructose 1,6-biphosphatase
F1P	fructose 1-phosphate
F2,6bP	fructose 2,6-biphosphate
F2,6bPase	fructose 2,6-biphosphatase
F6P	fructose 6-phosphate
FAD ⁺ /FADH ₂	flavine adénine dinucléotide oxydée/réduite
FAS	fatty acid synthase
FK	fructokinase
G1P	glucose 1-phosphate
G3P	glycérol 3-phosphate
G3PdHc	glycérol 3-phosphate déshydrogénase cytosolique
G3PdHm	glycérol 3-phosphate déshydrogénase mitochondriale
G6P	glucose 6-phosphate
G6Pase	glucose 6-phosphatase
G6PdH	glucose 6-phosphate déshydrogénase
GAP	glycéraldéhyde 3-phosphate
GAPdH	glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
GDP	guanidine-5'-diphosphate
GK	glucokinase
GK	glycérate kinase
GlyK	glycérol kinase

GOT	glutamate oxaloacétate transaminase
GP	glycogène phosphorylase
GPK	glycogène phosphorylase kinase
GS	glycogène synthase
GSK-3	glycogène synthase kinase 3
GTP	guanidine-5'-triphosphate
HK	hexokinase
HPLC	chromatographie liquide à haute performance
IRS-1	insulin-receptor substrate 1
IRS-2	insulin-receptor substrate 2
K ⁺	ion potassium
K ₂ HPO ₄	hydrogénophosphate de potassium
KCl	chlorure de potassium
KH ₂ PO ₄	dihydrogénophosphate de potassium
KOH	hydroxyde de potassium
LDH	lactate déshydrogénase
LDL	low density lipoprotein
LPC	lysophosphatidylcholine
MdH	malate déshydrogénase
Mg ²⁺	ion magnésium
MgSO ₄	sulfate de magnésium
MOPS	acide 3 (N-morpholino)-propane sulfonique
MPTP	pore de transition de perméabilité
NaCl	chlorure de sodium
NAD ⁺	nicotinamide adénine dinucléotide oxydé
NADH+H ⁺	nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NaHCO ₃	hydrogénocarbonate de sodium
NASH	nonalcoholic steatohepatitis
NH ₄ ⁺	ion ammonium
OAA	oxaloacétate
PC	phosphatidylcholine
PC	pyruvate carboxylase
PDH	pyruvate déshydrogénase
PE	phosphatidyléthanolamine
PEP	phosphoénolpyruvate
PEPCK	phosphoénolpyruvate carboxykinase
PFK-1	phosphofructokinase 1
PFK-2	phosphofructokinase 2
PGK	phosphoglycérate kinase
Pi	phosphate inorganique
PI	phosphatidylinositol
PI3,4,5TP	phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate
PK	pyruvate kinase
pK _a	constante de dissociation
PKA	protéine kinase A
PPAR	peroxisome-proliférateur-activated receptor
PS	phosphatidylsérine
PYR	pyruvate
ROS	radicaux libres de l'oxygène
SDS-PAGE	sodium dodécyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	écart standard à la moyenne
SM	sphingomyéline

TK	triokinase
TMPD	N,N,N',N'-tétraméthyl-p-phénylenediamine
TNF- α	tumor necrosis factor α
VLDL	very low density lipoprotein
α -CG	α -cétoglutarate
β OH	β -hydroxybutyrate
β OHdH	β -hydroxybutyrate déshydrogénase

Résumé

Stéatohépatite et adaptations métaboliques: effets d'un régime enrichi en lipides saturés, ou carencé en choline et méthionine, sur la bioénergétique et le métabolisme hépatique de rat.

La stéatohépatite non alcoolique (NASH) est une pathologie émergente dans nos pays industrialisés du fait de l'obésité et de l'insulino-résistance. A ce jour, la pathogenèse de la NASH est mal connue et il n'existe pas de traitement prévenant son évolution cirrhogène chez certains patients. Le but de ce travail consistait à étudier les modifications bioénergétiques et métaboliques de mitochondries hépatiques et d'hépatocytes isolés de rats atteints de NASH.

Dans un premier temps, nous avons élaboré un régime alimentaire enrichi en acides gras saturés afin d'induire une NASH. Au terme de 14 semaines de régime, nous n'avons pas mis en évidence de surcharge lipidique au niveau du foie des animaux recevant ce régime enrichi. Les mesures effectuées avec des mitochondries isolées de foies et avec des hépatocytes isolés n'ont montré aucune différence au niveau de la bioénergétique ou du métabolisme hépatique entre les différents groupes de rats. En revanche, une modification de la répartition tissulaire a été observée, avec une augmentation des masses des tissus adipeux blanc et brun. Dans cette étude, l'absence de stéatose hépatique et de NASH semble due à une augmentation du stockage des lipides au niveau du tissu adipeux blanc, et à une augmentation de leur oxydation par un processus thermogène au niveau du tissu adipeux brun, permettant ainsi de « brûler » l'excès calorique.

La deuxième partie du travail concernait l'étude des modifications bioénergétiques et métaboliques induites par un régime carencé en choline et méthionine connu pour induire une stéatohépatite chez le rat. Nous avons montré que les mitochondries de foie et les hépatocytes isolés de rats traités, avaient une respiration augmentée. Cette stimulation de la respiration était due à un découplage de la chaîne respiratoire par un mécanisme de « proton leak » ET de « redox slipping » au niveau de la cytochrome c oxydase. Ce découplage avait pour conséquence de stimuler l'utilisation de substrats lipidiques et de diminuer la production de radicaux libres de l'oxygène. En parallèle, l'étude avec des hépatocytes isolés nous montre une augmentation de l'oxydation lipidique et de la néoglucogenèse.

Ces résultats suggèrent des adaptations des fonctions mitochondriales et métaboliques des foies de rats atteints de stéatohépatite qui permettraient de limiter la surcharge lipidique et le stress oxydant.

<i>Avant-propos</i>	- 7 -
<i>I. Introduction</i>	- 10 -
1. L'obésité	- 10 -
1.1 Etat des lieux	- 10 -
2. Pathologies associées.....	- 11 -
3. Les « Non Alcoholic Fatty Liver Disease » (NAFLD)	- 12 -
<i>II. La stéatohépatite non alcoolique (NASH)</i>	- 13 -
1. Historique.....	- 13 -
2. Diagnostic.....	- 13 -
<i>III. Pathogenèse de la NASH</i>	- 15 -
1. First hit: De l'insulinorésistance périphérique à la stéatose hépatique... -	16 -
1.1. Rappel : Métabolisme lipidique.....	- 18 -
1.2. Insulinorésistance du tissu adipeux et du muscle squelettique.....	- 21 -
1.3. Développement de la stéatose hépatique : rôle de l'hyperinsulinémie.....	- 26 -
1.4. Insulinorésistance du foie.....	- 28 -
1.5. Développement de la stéatose hépatique : rôle de la leptine	- 30 -
1.6. Adaptations mitochondriale du foie stéatosique.....	- 31 -
2. Second hit: De la stéatose hépatique à la NASH	- 33 -
2.1 Les sources possibles du stress oxydant	- 34 -
2.2 Lésions hépatiques	- 42 -
<i>IV. Traitement de la stéatose hépatique</i>	- 44 -
1. Modification du style de vie	- 44 -
2. L'exercice	- 45 -
3. La metformine	- 45 -
4. Les thiazolidinédiones (TZDs)	- 46 -

5. Autres traitements.....	- 47 -
<i>V. Métabolisme énergétique.....</i>	- 48 -
1. l'oxydation phosphorylante.....	- 48 -
2. Régulation de l'oxydation phosphorylante	- 50 -
2.1 Par la nature des équivalents réduits.....	- 50 -
2.2 Par la perméabilité membranaire (leak)	- 53 -
2.3 Par le patinage des pompes (slip).....	- 54 -
2.4 Par les transporteurs	- 60 -
2.5 Par le volume cellulaire.....	- 62 -
3. Caractéristiques des membranes mitochondriales	- 62 -
3.1 Composition membranaire	- 62 -
3.2 Fluidité membranaire.....	- 64 -
3.3 Interactions lipides - protéines.....	- 64 -
4. Relation entre la composition membranaire et la perméabilité passive aux protons	- 65 -
4.1 Perméabilité des membranes biologiques aux protons	- 65 -
4.2 Composition lipidique mitochondriale et leak.....	- 66 -
<i>VI. Métabolisme hépatique.....</i>	- 71 -
1. Régulation des voies métaboliques.....	- 72 -
1.1 Le carrefour du glucose 6-phosphate et le cycle G6P-Glucose	- 75 -
1.1.1 Glucokinase.....	- 76 -
1.1.2 Glucose 6-phosphatase.....	- 77 -
1.2 Le cycle F1,6bP-F6P et l'enzyme bi-fonctionnelle	- 77 -
1.2.1 Phosphofructokinase-1	- 77 -
1.2.2 Fructose 1,6-biphosphatase	- 78 -
1.2.3 Enzyme bi-fonctionnelle (PFK-2/F2,6bPase).....	- 78 -
1.3 Le carrefour du pyruvate et le cycle PEP-Pyruvate.....	- 79 -
1.3.1 Pyruvate kinase	- 80 -
1.3.2 Pyruvate carboxylase.....	- 80 -

1.3.3 Phosphoénolpyruvate carboxykinase	- 81 -
2. Contrôle de la néoglucogenèse	- 81 -
2.1 A partir de différents substrats.....	- 81 -
2.1.1 Dihydroxyacétone	- 81 -
2.1.2 Glycérol	- 83 -
2.1.3 Lactate et pyruvate	- 84 -
2.2 Les acides gras.....	- 84 -
2.3 Par les hormones pancréatiques.....	- 85 -
2.4 Par le métabolisme énergétique	- 85 -
2.5 Contrôle transcriptionnel de la néoglucogenèse	- 86 -
II. MATERIEL & METHODES.....	- 89 -
1. Traitement des animaux.....	- 89 -
1.1 Etude I : Régime enrichi en acides gras saturés.....	- 89 -
1.2. Etude II : Induction d'une NASH par un régime carencé en choline et méthionine..	- 91 -
2. Mesure de la dépense énergétique	- 93 -
3. Prélèvements tissulaires et sanguins.....	- 94 -
4. Préparation du matériel expérimental	- 94 -
4.1 Technique d'isolement des mitochondries hépatiques.....	- 94 -
4.2 Détermination de la quantité de protéines.....	- 95 -
4.3 Les hépatocytes isolés intacts	- 95 -
4.4. Les adipocytes isolés	- 98 -
5. Techniques d'étude utilisées sur mitochondries isolés	- 99 -
5.1 Analyse de la composition en acides gras des phospholipides membranaires	- 99 -
5.2 Mesure de la Consommation d'Oxygène.....	- 100 -
5.3 Détermination du rapport ATP/O.....	- 103 -
5.4 Dosage du glucose-6-phosphate.....	- 104 -
5.5 Mesure de la conductance membranaire protonique : proton leak.....	- 104 -
5.6 Mesure de la production mitochondriale de ROS par fluorimétrie	- 109 -
5.7 Dosages spectrophotométriques d'activités enzymatiques	- 110 -
5.8 Détermination de la concentration des cytochromes (aa3, b, cc1).....	- 113 -

6 Techniques d'étude utilisées avec les hépatocytes isolés.....	- 114 -
6.1 Incubation en flacons fermés.....	- 114 -
6.2 Oxygraphie.....	- 117 -
6.3 Dosage enzymatique des métabolites extracellulaires.....	- 117 -
7 Techniques d'étude utilisées avec les adipocytes isolés	- 119 -
7.1 Cellularité.....	- 119 -
7.2 Lipolyse	- 120 -
8 Techniques de biologie moléculaire	- 121 -
8.1 Extraction et dosage des ARN totaux.....	- 121 -
8.2 Rétro transcription des ARN messagers et réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR).....	- 121 -
8.3 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	- 121 -
8.4 analyse des produits PCR	- 122 -
8.5 Western blot	- 122 -
9. Dosages plasmatiques et tissulaires.....	- 124 -
9.1 Le glucose plasmatique.....	- 124 -
9.2 Les acides gras libres (AGL) plasmatiques	- 124 -
9.3 Le glycérol (Gly) plasmatique	- 124 -
9.4 Les triglycérides (TG)	- 125 -
10. Analyse des Résultats et Statistiques	- 126 -
<i>III-1. Effets d'un régime alimentaire enrichi en lipides saturés - 128 -</i>	
1. Introduction	- 128 -
2. Composition des régimes	- 129 -
3. Problèmes rencontrés	- 130 -
4. Prise alimentaire	- 130 -
5. Prise calorique	- 132 -
6. Poids des animaux et répartition tissulaire.....	- 134 -
7. Etude sur adipocyte isolés.....	- 136 -
7.1. Morphologie.....	- 136 -
7.2. Lipolyse	- 138 -

8. Profil plasmatique	- 141 -
9. Etude hépatique	- 142 -
9.1 Analyse histologique et triglycérides hépatiques.....	- 142 -
9.2 Respiration mitochondriale	- 144 -
9.3 Respiration cellulaire	- 146 -
9.4 Métabolisme d'hépatocytes isolés	- 148 -
9.5 Système d'exportation.....	- 158 -
10. Etude du tissu adipeux brun.....	- 161 -
11. Discussion	- 163 -
12. Conclusion	- 166 -

III-2. Effets d'un régime carencé en choline et méthionine - 172 -

1. Introduction	- 172 -
2. Description du modèle.....	- 172 -
3. Composition des régimes	- 173 -
4. Prise de poids et prise calorique	- 174 -
5. Dépense énergétique	- 175 -
6. Répartition tissulaire.....	- 177 -
7. Données plasmatiques	- 178 -
8. Données hépatiques	- 181 -
9. Morphologie des adipocytes isolés	- 183 -
10. Oxydation phosphorylante mitochondriale	- 184 -
10.1 Paramètres de l'oxydation phosphorylante	- 184 -
10.2 Efficacité de la synthèse d'ATP.....	- 188 -
10.3 Mécanismes de découplage de la chaîne respiratoire	- 190 -
10.4 Modulation de l'oxydation phosphorylante par ajout de cyanure	- 193 -
10.5 Volume mitochondrial.....	- 195 -
11. Causes possibles des pertes énergétiques des mitochondries MCDD .	- 196 -

11.2 Composition membranaire.....	- 196 -
11.2 Protéines découplantes (UCPs et ANT)	- 202 -
12. Conséquences fonctionnelles du découplage des mitochondries MCDD .	- 204 -
13. Discussion	- 206 -
14. Conclusion.....	- 210 -

III-3. Effets d'un régime carencé en choline et méthionine sur le métabolisme hépatocytaire

- 213 -

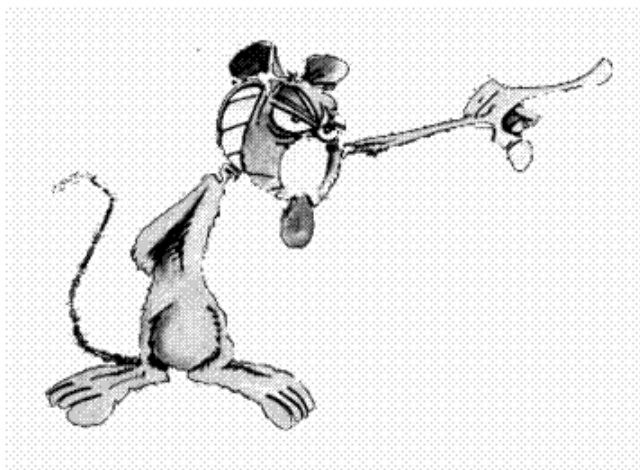
1. Introduction	- 213 -
2. Respiration cellulaire	- 214 -
3. Métabolisme d'hépatocytes isolés	- 217 -
3.1 Néoglucogénèse à partir de DHA en présence ou non d'acide gras.....	- 217 -
3.2 Production de corps cétoniques	- 221 -
3.3 Néoglucogénèse à partir de glycérol ou LPO.....	- 223 -
4. Lipogénèse hépatique	- 226 -
5. Discussion	- 229 -

III-4. Effet d'un traitement à l'almitrine ou à la metformine sur les rats MCDD.....

- 232 -

1. Rationnel	- 232 -
2. Prise de poids et prise calorique	- 233 -
3. Répartition tissulaire.....	- 235 -
4. Données plasmatiques	- 236 -
5. Paramètres de l'oxydation phosphorylante.....	- 238 -
6. Efficacité de la synthèse d'ATP	- 240 -
7. Efficacité de la chaîne respiratoire	- 242 -
8. Discussion	- 247 -

<i>IV. Conclusion & Perspectives</i>	- 250 -
<i>V. Bibliographie</i>	-257-



Avant-propos

Du fait de l'augmentation dramatique de sa prévalence au niveau mondial, l'obésité est un problème de santé publique en croissance dans nos pays industrialisés (prévalence en France de 10% chez l'adulte et de 15% chez l'enfant). La morbidité de l'obésité est liée entre autres à l'émergence de stéatohépatites. En 1980, Ludwig et coll. (Ludwig, Viggiano et al. 1980) ont rassemblé sous le terme de stéatohépatites non alcooliques (NASH : non alcoholic steatohepatitis) les altérations du parenchyme hépatique secondaires au surpoids et à l'insulino-résistance (stéatose, inflammation, nécrose hépatocytaire et fibrose). La NASH est une affection qui touche une large proportion de la population obèse, où la stéatose progresse vers une fibrose, une cirrhose et éventuellement dans les cas les plus extrêmes vers une défaillance hépatique terminale ou encore vers un hépatocarcinome. Une inflammation des tissus hépatiques est retrouvée et semble liée à une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène et à une peroxydation lipidique. Des projections faites aux Etats-Unis d'Amérique suggèrent que la prévalence de la NASH pourrait atteindre 40 % en 2025 en faisant ainsi de la NASH la première cause de cirrhose.

Les mécanismes conduisant au développement de la NASH sont à ce jour mal connus. Plusieurs mécanismes pourraient être associés à la NASH comme (i) une stimulation de la lipogenèse ou (ii) une inhibition de l'oxydation des acides gras soit par déficit de transport des acides gras à chaîne longue dans la mitochondrie soit par une diminution d'activité des enzymes mitochondriales impliquées dans la β -oxydation. L'implication d'un dysfonctionnement mitochondrial dans le développement de la NASH a également été avancée, des défauts structuraux et de dysfonctionnement de la chaîne respiratoire ayant été observé dans des mitochondries plaquettaires de patients atteints de NASH.

Il n'existe à ce jour aucun traitement efficace de cette affection hépatique émergente. La prise en charge de la NASH passe actuellement par le traitement de l'obésité (diète et perte de poids), mais les échecs de ce traitement sont nombreux, la plupart des obèses reprenant leur poids initial à moyen terme.

Afin de prévenir l'évolution cirrhogène de la NASH chez ces patients, il apparaît donc nécessaire de connaître les conséquences hépatocytaires (métaboliques et énergétiques) de la

NASH et de rechercher un traitement influençant le stockage des lipides hépatiques. Dans ce but, nous avons développé conjointement trois grands axes de recherche qui seront donc traités dans trois parties distinctes.

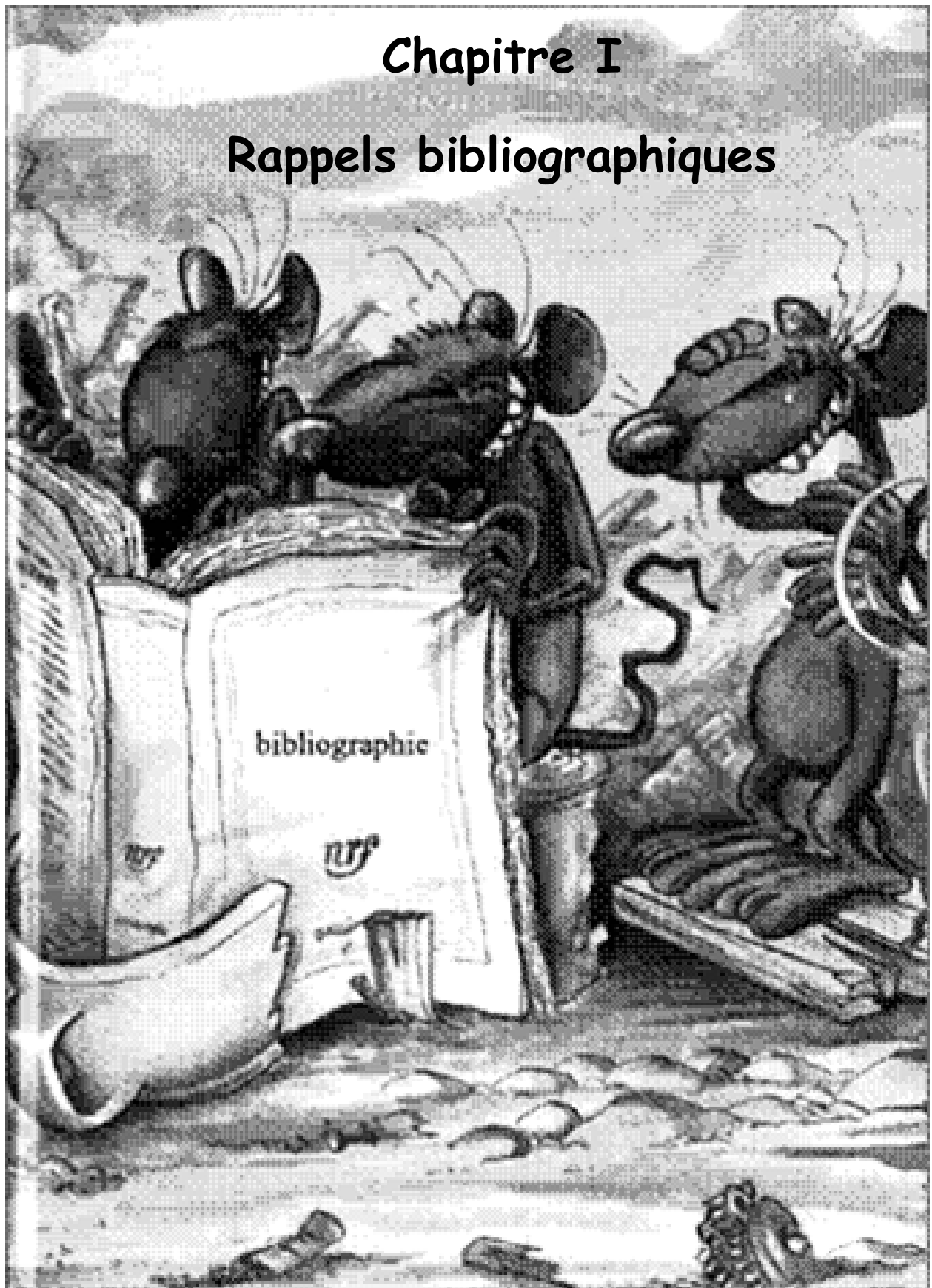
1) A ce jour, les études menées sur la NASH n'ont pas permis une caractérisation claire des mécanismes de mise en place de la NASH du fait d'un manque de modèles animaux présentant des caractéristiques identiques à la NASH humaine. La première partie de notre travail a consisté à tenter de mettre au point un régime alimentaire enrichi en lipides chez le rat Wistar. Pour se rapprocher au mieux des habitudes alimentaires des patients atteints de NASH, nous avons enrichi la nourriture des animaux avec deux corps gras riches en lipides saturés, l'huile de coco (86% AGS) et le beurre alimentaire (51% AGS et 0,2% cholestérol). Nous avons dans cette étude d'évaluer chez le rat les adaptations du métabolisme hépatique (métabolisme hépatocytaire et bioénergétique mitochondriale) en réponse à un régime à haute teneur en acides gras saturés

2) Dans un deuxième temps, nous avons choisi un modèle largement caractérisé et utilisé dans la littérature: un régime carencé en choline et méthionine ou MCDD pour « Methionine and Choline Deficient Diet ». Ce régime est connu pour induire chez le rat une stéatohépatite caractérisée par une stéatose massive et une inflammation du tissu hépatique. Dans cette étude, nous avons évalué les adaptations du métabolisme hépatique (métabolisme hépatocytaire et bioénergétique mitochondriale) en réponse à un régime MCDD chez le rat.

3) Il n'existe à ce jour aucun traitement de la NASH validé par les autorités de santé aux USA et en Europe, le but de la dernière partie de notre travail était de tester les effets de deux molécules pharmacologiques (almitrine et metformine) sur le développement d'une stéatohépatite chez des animaux recevant un régime carencé en choline et méthionine. Nous avons choisi l'almitrine de par son effet sur l'efficacité mitochondriale qui pourrait moduler l'utilisation des lipides dans le foie et limiter la stéatose. La metformine nous semblait également une cible thérapeutique de choix pour le traitement de la NASH car cette molécule, utilisée en clinique dans le traitement du diabète de type II, a des effets connus sur le métabolisme lipidique. Nous avons pour but dans cette étude d'évaluer l'impact des traitements à l'almitrine et à la metformine sur les adaptations du métabolisme hépatique (bioénergétique mitochondriale) en réponse à un régime carencé en choline et méthionine, inducteur de stéatohépatite chez le rat.

Chapitre I

Rappels bibliographiques



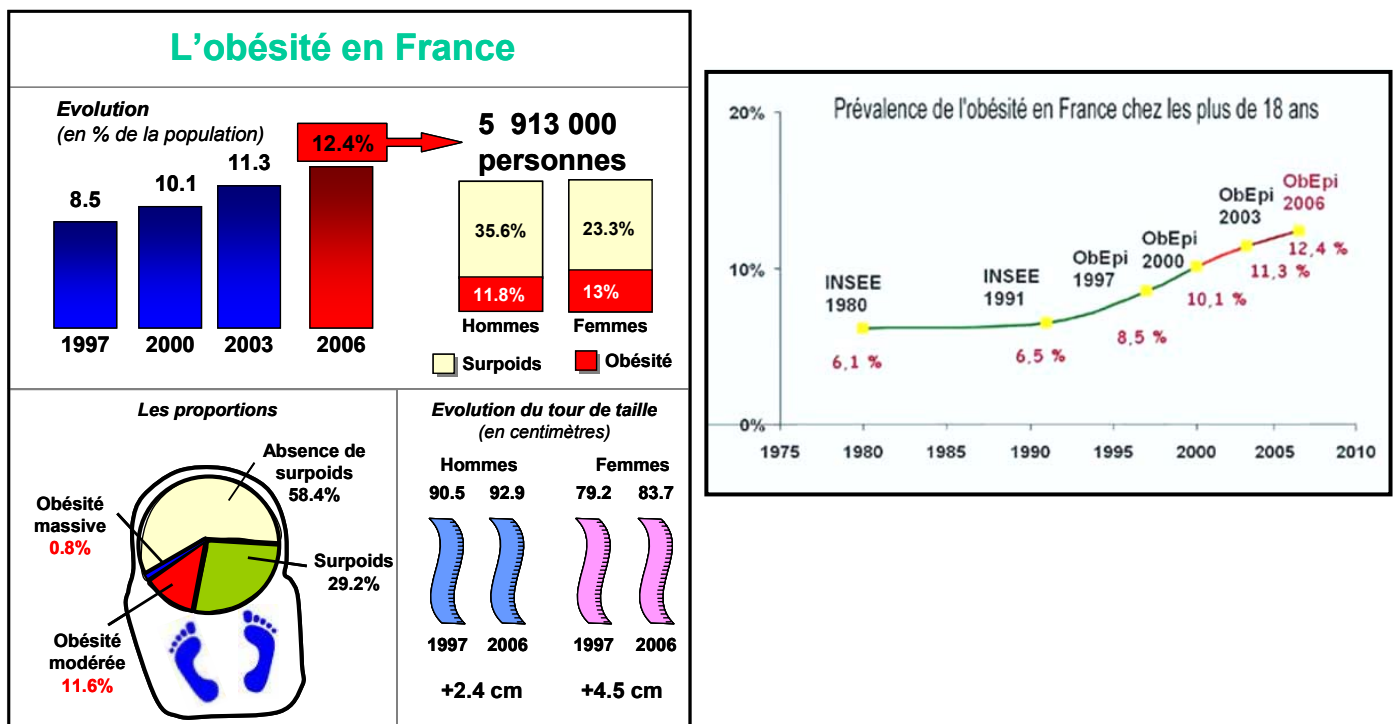
I. Introduction

1. L'obésité

1.1 Etat des lieux

Au cours du XXI^{ème} siècle, de nombreux pays industrialisés ont dû faire face à une véritable épidémie : l'obésité. De nombreux instituts et associations telles l'A.O.A. (American Obesity Association), l'INSERM et l'INS (Institut National de la Santé) ont lancé un cri d'alarme contre la stupéfiante progression de l'obésité dans le monde. Aux Etats-Unis l'augmentation du nombre d'obèses était de 75% entre 1980 et 1994 (Flegal, Carroll et al. 1998), de 61% entre 1991 et 2000 (Mokdad, Bowman et al. 2001). Aujourd'hui aux Etats-Unis, plus de 60% des adultes, 15% des adolescents de 12 à 19 ans et 13% des enfants de 6 à 11 ans sont en surpoids ou obèses (Flegal, Carroll et al. 2002). L'obésité augmente régulièrement depuis 20 ans, dans les deux sexes et dans toutes les classes d'âge et tout les groupes ethniques. L'augmentation la plus forte a été observée chez les adolescents pour lesquels le taux a triplé en vingt ans.

Figure I.1 : Prévalence de l'obésité en France



En France, d'après la dernière étude Obépi, le nombre de personnes obèses a été multiplié par deux au cours des 25 dernières années (figure I.1) (Basdevant 2006). Et cela touche aussi les enfants, dont le nombre atteint d'obésité a doublé depuis 1980. Aujourd'hui en France on estime entre 10 et 12 le pourcentage d'enfants de moins de 12 ans qui sont obèses.

L'obésité n'est pas seulement un problème qui touche les USA et la France, il touche tous les

pays « riches » et se répand comme une épidémie dans tous les pays en voie de développement à moyen ou faible revenu. Le "changement économique" génère un "changement nutritionnel", c'est à dire une modification des habitudes alimentaires (trop de graisses, de sucres, de calories), de la qualité des aliments, (la « mal-bouffe » industrielle et agroalimentaire) et la diminution de l'activité physique (Kopelman 2000). En effet, dans les pays industrialisés, l'ingestion calorique est restée constante durant ce dernier siècle alors que notre activité physique ne fait que diminuer (Ravussin 2005). De plus notre alimentation est devenue trop riche en terme calorique, trop riche en acides gras saturés et en sucres tel le saccharose ou le fructose (Bray, Nielsen et al. 2004). La balance énergétique, c'est-à-dire l'équilibre entre l'ingestion calorique et la dépense énergétique, est devenue positive, résultant en une augmentation de la masse grasse chez les individus (Spiegelman and Flier 2001).

Le surpoids touche 1,1 milliards de personnes dans le monde, dont 16 millions de Français parmi lesquels presque 6 millions d'obèses.

Quelques chiffres : En 2005, en Chine, 20% de la population est obèse, en Malaisie c'est 3 hommes sur 10, au Mexique 29% de la population est en surpoids (IMC >25) ou obèse (IMC >30) ; en Égypte 35% d'obèses, au Samoa 50% de la population ; au Koweït 32% d'homme et 40% de femme ; Arabie Saoudite 16% d'homme et 24% de femmes.

2. Pathologies associées

Outre le fait que notre société soit devenue une société « d'apparence », bien au delà du physique, l'augmentation de l'obésité et de l'adiposité représente un réel problème en terme de santé publique. Ce surpoids entraîne une augmentation des risques de plusieurs pathologies comme le diabète de type II, l'hyperlipidémie, des maladies cardiaques et certains cancers (Kopelman 2000). D'autres organes, tel le foie, peuvent également « souffrir » de cet état d'opulence (Angulo and Lindor 2002). Plusieurs études ont démontré que les personnes en surcharge pondérale, ou atteintes d'obésité, peuvent développer une stéatose hépatique, c'est-à-dire une accumulation de lipides, sous forme de triglycérides, au niveau du foie. Il a été estimé en Amérique du nord que 60 à 95% des obèses et 21 à 55% des diabétiques présentent une stéatose hépatique (Powell, Cooksley et al. 1990; Bacon, Farahvash et al. 1994; Angulo, Keach et al. 1999; Matteoni, Younossi et al. 1999), alors que la prévalence de celle-ci n'est que de 15 à 25% dans la population générale (Angulo 2002; Neuschwander-Tetri and Caldwell 2003; Browning and Horton 2004). Il est également important de noter que la stéatose touche aussi un grand nombre d'enfants obèses (jusqu'à 55% d'après certaines études) (Angulo and Lindor 2002; Roberts 2002). Mais la stéatose n'est qu'une seule des composantes observée lors d'atteintes hépatiques chez les patients obèses et diabétiques. L'ensemble de ces désordres hépatiques sont regroupés sous le terme de "Non Alcoholic Fatty Liver Disease» (NAFLD) (Diehl 1999)

3. Les « Non Alcoholic Fatty Liver Disease » (NAFLD)

Les NAFLD sont des pathologies communes dans les pays industrialisés, et tendront à devenir de plus en plus fréquentes dans le futur en raison de leur association avec l'insulinorésistance, le diabète et l'obésité. Elles présentent un large spectre de lésions hépatiques allant de la stéatose simple (accumulation de lipides), à une stéatose avec inflammation non spécifique, à la stéatohépatite (stéatose avec lésions hépatiques), à la cirrhose (présence de fibrose) et enfin l'hépatocarcinome (Brunt and Tiniakos 2002; Collantes, Ong et al. 2004).

Lors d'études effectuées chez des patients présentant une hypertransaminémie, des lésions de type NAFLD ont été trouvées dans 40-90% des cas (McCullough 2005), représentant ainsi la troisième cause d'augmentation des transaminases, après les infections virales et l'ingestion d'alcool. Il a été estimé que 17-33% de la population générale étaient atteints de NAFLD (Younossi, Diehl et al. 2002). D'autres études récentes montrent également que l'incidence et la prévalence de ces pathologies est en constante augmentation au cours de ces dernières années.

Les NAFLD sont associées à un grand nombre de conditions métaboliques, chirurgicales ou toxicologiques. Cependant, le facteur principal observé en association avec les NAFLD est le syndrome métabolique. Celui-ci est défini par la présence chez un même individu d'au moins trois des symptômes présentés dans le tableau suivant:

Tableau I.1 : Principaux critères du syndrome métabolique (d'après (Eckel, Grundy et al. 2005))

	OMS	NCEP ATP III
hypertension	≥ 140/90 mmHg	≥ 130/85 mmHg
tour de taille	> 90 cm (homme) > 85 cm (femme)	> 102 cm (homme) > 88 cm (femme)
glycémie à jeun	≥ 110 mg/dL (6,1 mmol/L)	≥ 100 mg/dL (5,6 mmol/L)
triglycérides	> 150 mg/dL (8,3 mmol/L)	> 1,50 g/L (1,7 mmol/L)
HDL cholestérol	< 35 mg/dL (homme) < 39 mg/dL (femme)	< 40 mg/dl (homme) < 50 mg/dl (femme)

National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III, 2005

La caractéristique physiopathologique classiquement observée dans ce syndrome est l'insulino-résistance (Marchesini, Brizi et al. 1999; McCullough 2005; Samuel 2005). Les NAFLD pourraient donc même être considérées comme la composante hépatique du syndrome d'insulinorésistance. Elles sont devenues à ce jour la cause la plus fréquente de lésions hépatiques dans les pays industrialisés, et les formes les plus agressives, c'est-à-dire la NASH et la cirrhose, représentent 6-17% des cas (Younossi, Diehl et al. 2002; McCullough 2005). Ce nombre tend à augmenter en parallèle du nombre croissant d'obèses de par le monde, justifiant ainsi l'intérêt de plus

en plus grand de la communauté scientifique pour la NASH au cours des dernières années.

II. La stéatohépatite non alcoolique (NASH)

1. Historique

Dès les années 50, Zelman (Zelman 1952) a décrit la présence de stéatose hépatique et de fibrose associées à des infiltrations inflammatoires dans le foie de patients obèses. De même, durant les années 60 et le début des années 70, Thaler rapporte en de nombreuses occasions la présence de lésions apparemment « alcooliques » chez des patients non buveurs. Thaler propose donc de remplacer le terme « alcoholic hepatitis » par « fatty hepatitis » ou par « steatohepatitis » (Thaler 1962). Des cas similaires ont également été décrits dans les années 70 chez des patients obèses (Kern, Heger et al. 1973; Galambos and Wills 1978; Adler and Schaffner 1979) et diabétiques (Creutzfeldt, Frerichs et al. 1970; Itoh, Tsukada et al. 1979; Falchuk, Fiske et al. 1980), aussi bien que chez des patients ayant subi une chirurgie entérique ou « by-pass » pour obésité morbide (DeWind and Payne 1976; Campbell, Hunt et al. 1977). Cependant tous ces rapports furent reçus avec scepticisme, et de nombreux auteurs étaient convaincus que les patients de ces études étaient en fait de gros buveurs. En 1980, Ludwig (Ludwig, Viggiano et al. 1980) utilise pour la première fois le terme « non alcoholic steatohepatitis » (NASH) pour désigner les lésions mimant celles induites par une ingestion d'alcool, mais chez des patients ne buvant pas.

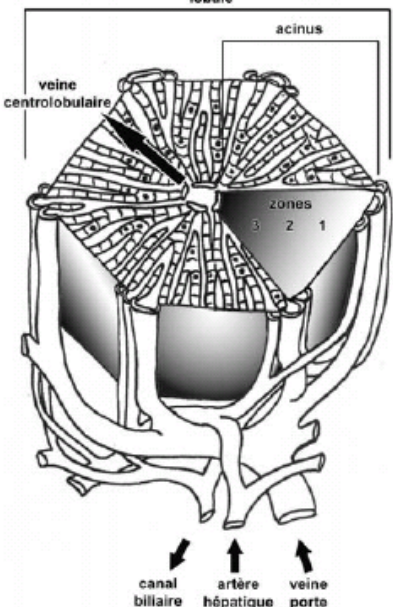
La NASH est souvent considérée comme une partie d'un large spectre de lésions, incluant, en plus de la NASH elle-même, les « fatty liver », l'inflammation et probablement un grand nombre des cas de cirrhoses cryptogéniques (Brunt 1999; Matteoni, Younossi et al. 1999). Cependant, l'importance et l'évolution de ces lésions restent très variables. La stéatose simple est une lésion stable chez la plupart des patients, au moins à court terme. A long terme, elle peut progresser en stéatohépatite non alcoolique dans 10 à 20% des cas (Angulo and Lindor 2002; Neuschwander-Tetri and Caldwell 2003) et 15-25% des cas de NASH évolue en cirrhose (Matteoni, Younossi et al. 1999). De nombreuses cirrhoses cryptogéniques ont probablement une NASH pour origine, avec disparition des signes de stéatohépatite au cours du temps (Caldwell, Oelsner et al. 1999; Poonawala, Nair et al. 2000; Ioannou, Weiss et al. 2003). Comme pour les cirrhoses d'origines autres, les cirrhoses issues d'une NASH peuvent également évoluer en carcinome hépatocellulaire (Ratziu, Bonyhay et al. 2002; Ioannou, Weiss et al. 2003).

2. Diagnostic

Le diagnostic de la NASH n'est pas basé sur la présence d'une lésion en particulier, mais plutôt sur la co-existence de plusieurs lésions incluant une stéatose, une dégénération hépatocytaire

et des infiltrations inflammatoires. De plus la présence de corps de Mallory, de mégamitochondries et de fibrose à différents degrés est communément observée. Un système de classification a été suggéré afin de graduer les différents niveaux de NAFLD et de permettre une estimation histologique de la NASH (Neuschwander-Tetri and Caldwell 2003; Portincasa, Grattagliano et al. 2005) (tableau I.2). Le principal critère de diagnostic d'une NASH est l'absence d'absorption abusive d'alcool. Cependant, même si la définition d'une consommation non abusive d'alcool n'est pas unanime, il est généralement accepté que celle-ci est non abusive lorsque l'ingestion d'éthanol est inférieur à 20-40g/jour pour les hommes et 20g/jour pour les femmes (Chitturi and Farrell 2001; Neuschwander-Tetri and Caldwell 2003).

Tableau I.2 : graduations et stade de classification de la NASH (d'après (Portincasa, Grattagliano et al. 2005))

Graduation		
Grade 1 légère	Stéatose: principalement macrovésiculaire, touchant moins de 33% des lobules Ballonisation: occasionnellement observé (zone 3) Inflammation lobulaire: isolée et légère (zone 1-2) Inflammation portale: absente ou légère	
Grade 2 modérée	Stéatose: macro- et microvésiculaire, touchant entre 33% et 66% des lobules Ballonisation: présente en zone 3 Inflammation lobulaire: polymorphes associée à une ballonisation des hépatocytes, avec fibrose péricellulaire; ± légère inflammation chronique Inflammation portale: légère à modérée	
Grade 3 sevère	Stéatose: macro- et microvésiculaire, touchant plus de 66% des lobules Ballonisation: marquée, principalement en zone 3 Inflammation lobulaire: inflammation chronique en zone 3 ; présence de ballonisation et de fibrose périsinusoïdale Inflammation portale: légère à modérée	
Stade		
Stade 1:	Zone 3 fibrose périveineuse, périsinusoïdale ou péricellulaire ; locale ou extensive	
Stade 2:	comme pour le stade 1, plus fibrose portale local ou extensive	
Stade 3:	fibrose avec de nombreux ponts, locale ou extensive	
Stade 4:	Cirrhose avec ou sans fibrose périsinusoïdale résiduelle	

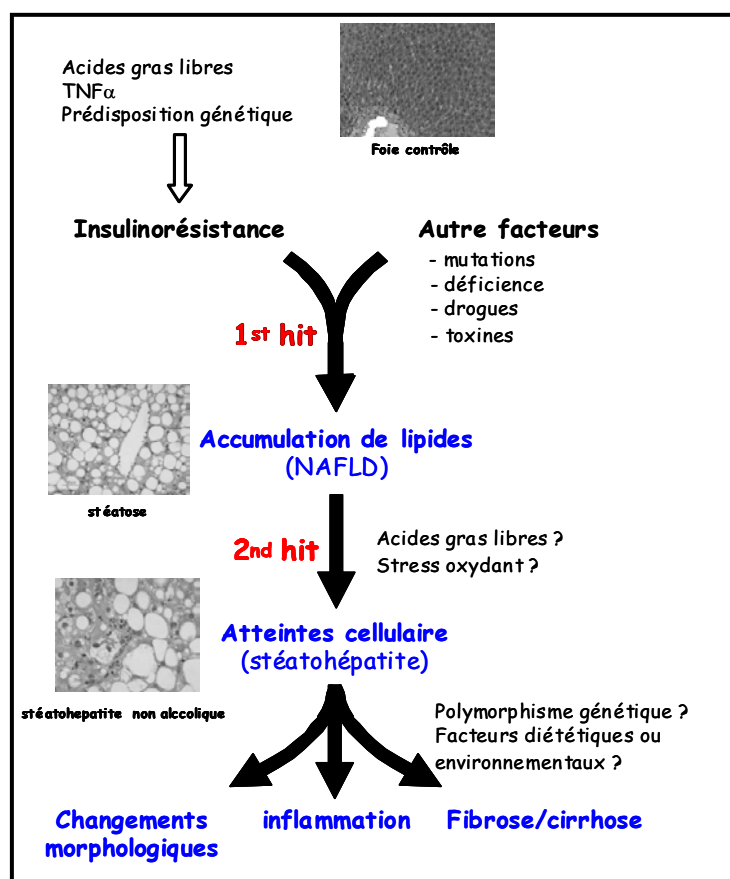
Comme indiqué précédemment, la NASH est très fréquemment observée chez des patients obèses et plus particulièrement chez ceux présentant une insulino-résistance et/ou une

hypertriglycémie. Cette forme de NASH est communément appelée NASH « primaire ». En fait, la NASH primaire est classiquement observée chez des patients souffrant de syndrome métabolique, qui combinent plusieurs désordres métaboliques connus pour induire un diabète de type II ainsi que des pathologies cardiovasculaires (Marchesini, Bugianesi et al. 2003; Eckel, Grundy et al. 2005). Avec l'augmentation de la prévalence de l'obésité et du syndrome métabolique, la NASH primaire est devenue la cause la plus fréquente de pathologies hépatiques aux USA (Angulo and Lindor 2002). Cependant, l'obésité et l'insulinorésistance ne sont pas les seules causes de NASH. La stéatohépatite peut se développer suite à une prise de médicaments, dans des cas de maladie de Wilson, de nutrition parentérale ou de « bypass » jéuno-iléal aboutissant à une NASH "secondaire" (Pessayre, Mansouri et al. 2002). De manière général, la stéatohépatite observée chez les patients atteints par cette deuxième forme de NASH, tout comme la stéatohépatite alcoolique (ASH), est souvent plus sévère que la stéatohépatite observée chez des patients ayant une NASH primaire (Pessayre, Mansouri et al. 2002).

III. Pathogenèse de la NASH

A ce jour, la pathogenèse de la NASH n'est pas encore complètement établie. En 1998, Day et James (Day and James 1998) ont proposé une théorie afin d'expliquer celle-ci, la théorie des deux atteintes ou « two hit hypothesis » (figure I.2 modifié d'après (Neuschwander-Tetri and Caldwell 2003)).

Figure I.2 : Hypothèse des « two hits » (d'après (Neuschwander-Tetri and Caldwell 2003))



D'après ces auteurs, la première atteinte ou « first hit » correspond à une accumulation de lipides au niveau du foie, plus particulièrement des acides gras et des triglycérides. Une fois la stéatose établie, des adaptations cellulaires se mettent en place. A ce stade, la cellule est devenue plus vulnérable face à son environnement. Une exposition chronique croissante de la cellule à un stress oxydant constitue le « second hit ». Cette deuxième atteinte peut être d'origine environnementale et/ou génétique, et entraîne un phénomène d'apoptose ou de nécrose cellulaire accompagnée d'inflammation qui aboutit au développement d'une stéatohépatite (Harrison, Kadam et al. 2002).

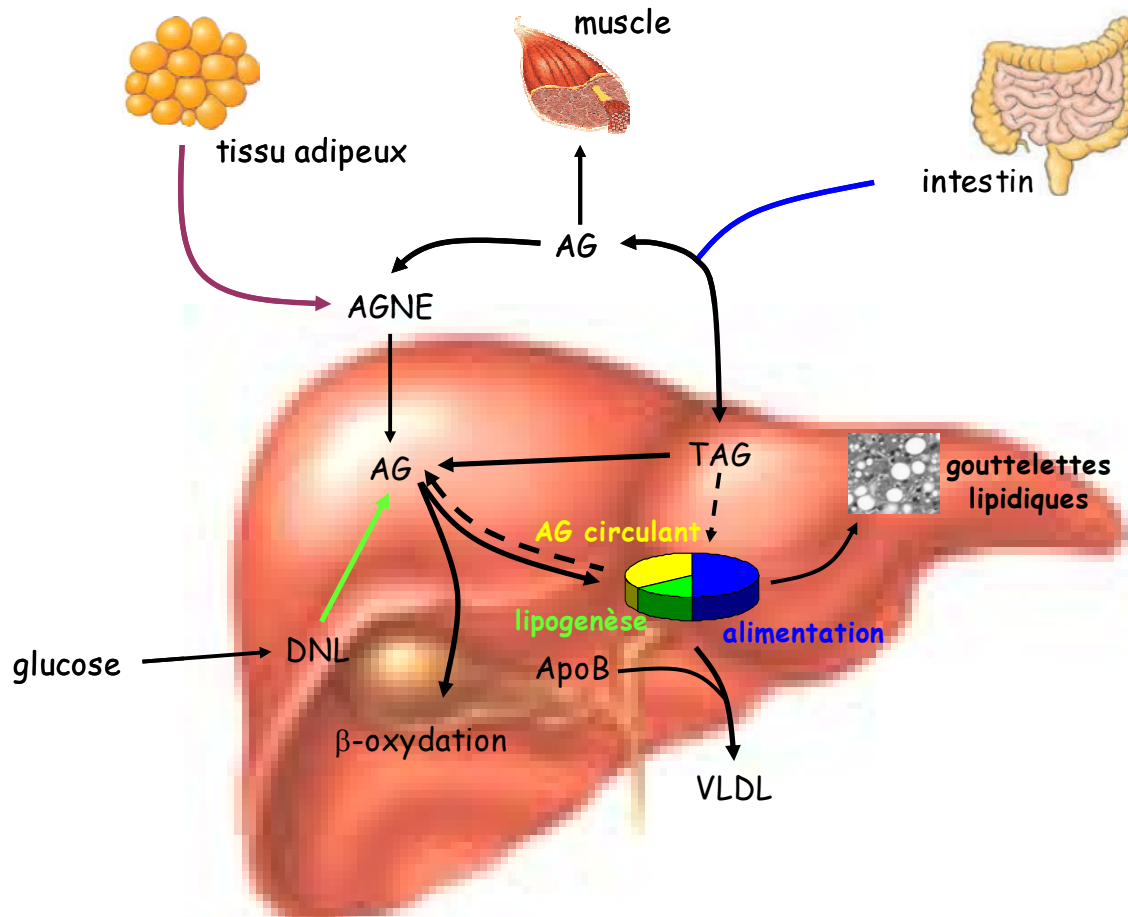
1. First hit: De l'insulinorésistance périphérique à la stéatose hépatique

Comme l'ont suggéré Day et James (Day and James 1998), la première étape de la pathogenèse de la NASH serait l'apparition d'une stéatose, suite à une modification de l'homéostasie lipidique au sein de l'organisme due au développement d'une insulinorésistance. En temps normal, en condition « nourri », les acides gras observés au niveau du foie, proviennent à 25-40% de l'absorption intestinale, 50% de la lipolyse adipocytaire, 10-13% de la lipogenèse hépatique (figure I.3) (Diraison and Beylot 1998; Barrows and Parks 2006). Les triglycérides, synthétisés à partir de ces acides gras, sont ensuite exportés du foie vers les tissus périphériques sous forme de VLDL (very low density lipoprotein).

Une modification de l'équilibre entre les acides gras délivrés au foie, la synthèse de triglycérides, l'exportation de ceux-ci ou leur oxydation, pourrait donc contribuer au développement d'une stéatose. Plusieurs études ont montré qu'une alimentation riche en graisse pouvait entraîner une accumulation lipidique au niveau du foie, tant chez l'animal (Kim, Ellmerer et al. 2003; Samuel, Liu et al. 2004) que chez l'homme (Westerbacka, Lammi et al. 2005). En plus des effets directs de l'alimentation sur l'accumulation de lipides au niveau du foie, l'augmentation de l'ingestion calorique peut provoquer une obésité associée à une insulinorésistance. Lors d'une insulinorésistance, l'action inhibitrice de l'insuline sur la lipolyse adipocytaire n'est plus observée, aboutissant à une augmentation de l'apport d'acides gras libres au foie (Marchesini, Brizi et al. 2001; Day and Saksena 2002). Cette hypothèse est appuyée par le fait qu'une absence d'inhibition de la lipolyse par l'insuline, ainsi qu'une concentration élevée d'acides gras circulants ont été observée sur des patients atteints de NAFLD (Marchesini, Brizi et al. 2001; Seppala-Lindroos, Vehkavaara et al. 2002; Bugianesi, Gastaldelli et al. 2005). Une étude menée sur des patients ayant une NAFLD, recevant une alimentation contrôlée, dont 30% des calories provenaient de lipides, a démontrée qu'environ 60% des triglycérides hépatiques provenaient des acides gras circulants, 26% de la lipogenèse *de novo* et 15% de l'alimentation (Donnelly, Smith et al. 2005). Ces résultats laissent suggérer, qu'en absence de régime hyper-lipidique, la production excessive d'acide gras due à l'insulinorésistance du tissu adipeux serait la source des triglycérides hépatiques. De plus, cette insulinorésistance pourrait

également induire une augmentation de la lipogenèse *de novo* (Donnelly, Smith et al. 2005), les mécanismes impliqués dans ce phénomène seront discutés plus loin dans le manuscrit.

Figure I.3: Sources des triglycérides hépatiques (d'après (Tamura and Shimomura 2005))



Les triglycérides hépatiques ont plusieurs sources, les triglycérides alimentaires, qui sont transportés, via des chylomicrons, de l'intestin vers le tissu adipeux ou le foie, ou les triglycérides synthétisés à partir d'acides gras libres et de glycérol présents au niveau du foie. Les acides gras nécessaires à la synthèse de triglycérides proviennent des acides gras non estérifiés plasmatiques et des acides gras néosynthétisés au niveau du foie (lipogenèse *de novo*). Les triglycérides ainsi formés peuvent être stockés sous forme de vésicules lipidiques au niveau du foie, ou sécrétés dans la circulation sanguine sous forme de VLDL. Ils peuvent également entrer dans la voie d'oxydation des lipides. AG: acides gras; AGNE: acide gras non estérifiés; ApoB: apolipoprotéine B; DNL: lipogenèse *de novo*; TAG: triacylglycérol; VLDL : very low density lipoprotein.

Il apparaît donc que les NAFLD sont très étroitement liées à une insulino-résistance périphérique (muscle et tissu adipeux) et hépatique (Marchesini, Brizi et al. 2001; Seppala-Lindroos, Vehkavaara et al. 2002; Bugianesi, Gastaldelli et al. 2005). Bien que les mécanismes responsables de la stéatose, lors du développement d'une NASH, ne soient pas encore complètement élucidés, l'augmentation de l'arrivée des AGNE au niveau du foie, ainsi que l'augmentation de la synthèse hépatique d'acides gras semblent jouer un rôle primordial.

1.1. Rappel : Métabolisme lipidique

Afin de bien comprendre les mécanismes mis en jeu lors du développement d'une stéatose, il faut tout d'abord resituer les principes du métabolisme lipidique hépatique en condition contrôle. Les acides gras libres (AGL) qui arrivent au niveau du foie ont plusieurs origines (figure I.3). Ils peuvent provenir de l'hydrolyse des lipides alimentaires, être issus de la lipolyse adipocytaire ou être directement synthétisés au niveau des hépatocytes par lipogenèse *de novo* (Pessayre, Mansouri et al. 2002; Diraison, Moulin et al. 2003). Leur orientation au sein de la cellule hépatique dépend ensuite du statut nutritionnel et hormonal. Les AGL vont soit i) entrer dans la mitochondrie et être β -oxydés pour fournir de l'énergie, soit ii) être estérifiés en triglycérides (TG) (la forme de stockage des AGL). Ces TG vont à leur tour soit être stockés au niveau du cytoplasme des hépatocytes et former des gouttelettes lipidiques, soit être sécrétés sous forme de VLDL (very low density lipoproteins) (Chao, Stiers et al. 1986; Heid, Moll et al. 1998), qui sont constitués par un groupement de triglycérides, entouré de phospholipides et d'une protéine appelée apolipoprotéine B (apo B).

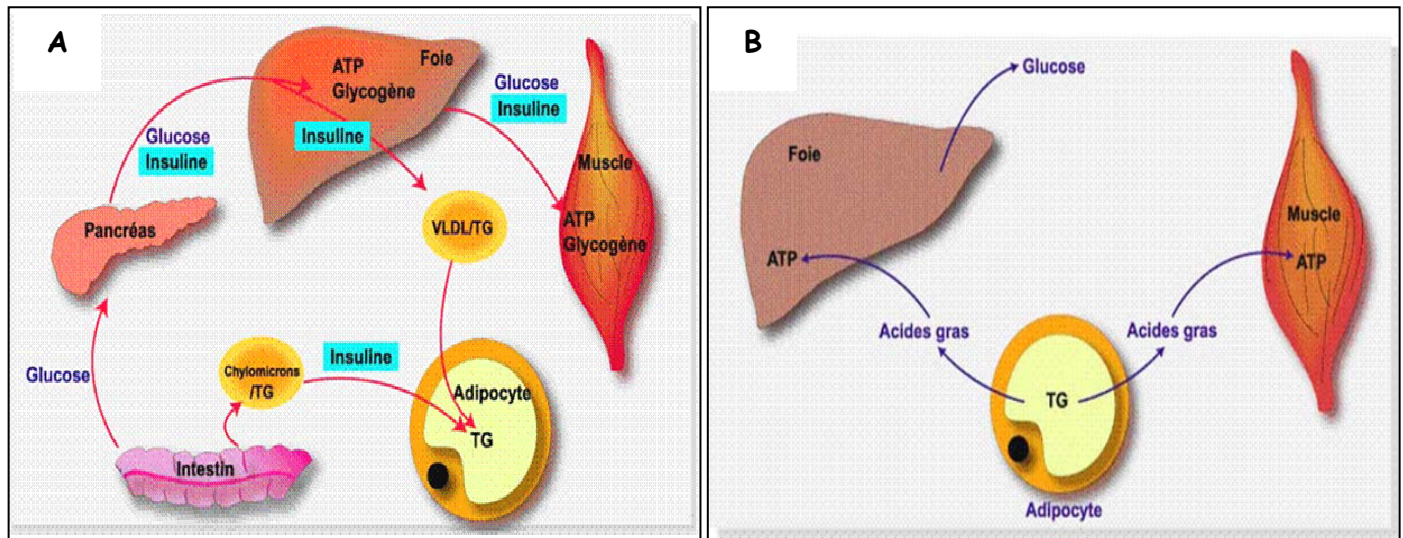
⇒ **L'oxydation mitochondriale** : La β -oxydation a lieu dans la matrice mitochondriale. L'entrée des AGL à l'intérieur de celle-ci se fait de deux manières. Lorsque les AGL ont une chaîne carbonée de courte ou moyenne taille ($C < 10-12$), ils passent directement à travers la membrane (Fromenty and Pessayre 1995). Par contre lorsque les AGL ont une chaîne longue ($C > 12$), ils nécessitent un transporteur pour pénétrer à l'intérieur de la mitochondrie. La protéine permettant ce transport est la carnitine palmitoyltransférase I (CPT-I). Elle se situe sur la membrane externe mitochondriale, et son activité est inhibée par le malonyl-CoA (McGarry and Foster 1980). Le malonyl-CoA est formé par l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) et constitue la première étape de la voie de synthèse des acides gras (McGarry and Foster 1980).

⇒ **La β -oxydation peroxisomale** : Elle a lieu dans les peroxisomes et entre en jeu dans l'oxydation de lipides à chaîne très longues comme l'acide hexacosanoïque, $C_{20:0}$ (VLCFA : very long chain fatty acid). La β -oxydation peroxisomale diffère en plusieurs points de la β -oxydation mitochondriale. Les peroxisomes ne possèdent pas de cycle de Krebs, et ne peuvent donc pas dégrader les acétyl-CoA et produire du CO_2 et de l'eau. La β -oxydation peroxisomale permet de raccourcir les acides gras mais pas de les dégrader en acétyl-CoA. Ces acides gras raccourcis sont ensuite exportés des peroxisomes par le système carnitine vers les mitochondries. Une autre différence se situe dans le fait que lors d'une β -oxydation peroxisomale, les oxydases donnent leur électron directement à la molécule d'oxygène et produisent du H_2O_2 , qui sera ensuite transformé en eau par les catalases.

⇒ **L'estérification** : Elle permet la synthèse de triglycéride en associant 3 AGL (sous forme d'acyl-CoA ester) à une molécule de glycérol (sous forme de glycérol 3-phosphate). Les acyl-CoA

forment tout d'abord des lysophosphatidates en se combinant avec le glycérol 3-phosphate, puis des phosphatidates, qui en perdant leur phosphate deviennent des diacylglycérides (DAG). La dernière étape consiste en la formation de triacylglycérides (TG) à partir de DAG, et est contrôlée par l'acyl-CoA : diacylglycérol transférase (DGAT). Les TG une fois synthétisés vont soit former des gouttelettes lipidiques et être stockés au niveau du foie ou être exportés sous forme de VLDL, soit entrer dans la composition des membranes et intégrer la voie de formation des phospholipides.

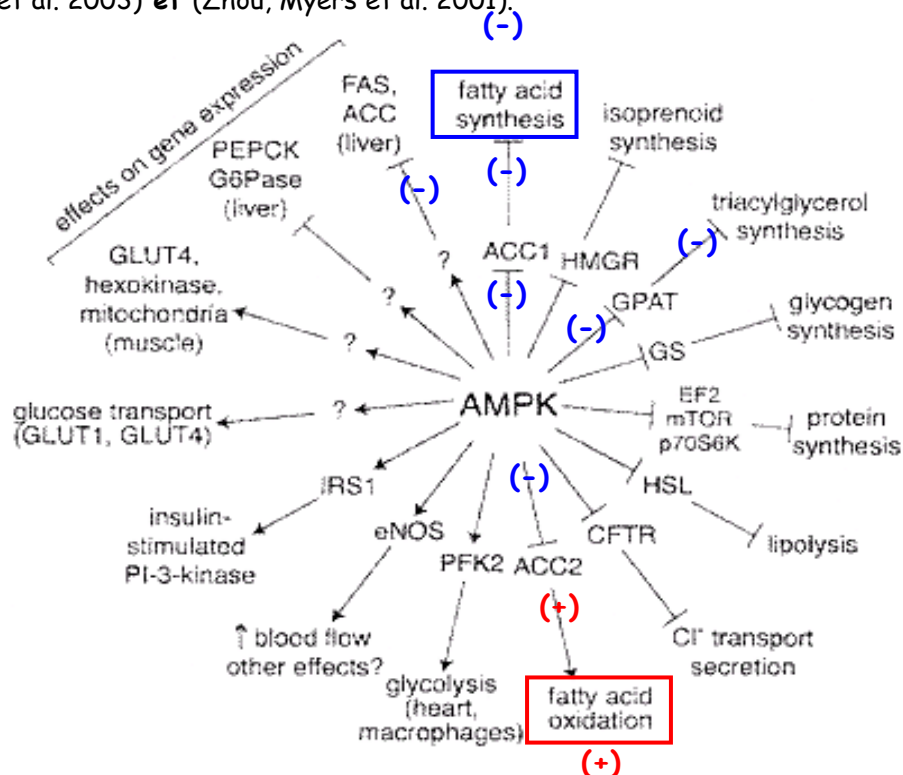
Figure I.4: Métabolisme énergétique en situation post-prandiale (A) ou à distance des repas (B)



L'orientation métabolique des acides gras, au sein de la cellule hépatique, dépend entre autre du statut nutritionnel (figure I.4). Ainsi lors d'une situation de jeûne, les acides gras vont être orientés préférentiellement vers l'oxydation afin de fournir de l'énergie à l'organisme. Dans cette condition, la faible concentration d'insuline plasmatique va favoriser l'hydrolyse des TG au niveau adipocytaire et de ce fait augmenter la libération d'AGL, qui vont être β -oxydés au sein des hépatocytes (Salway 1994). Parallèlement à la faible concentration d'insuline, l'augmentation de la sécrétion de glucagon, et la fixation à son récepteur, va induire l'activation de la PKA, qui va à son tour inhiber la transcription de ChREBP. En même temps, l'augmentation du rapport AMP/ATP, via l'Akt, va activer la voie de l'AMPK (AMP-activated protein kinase (AMPK), provoquant la phosphorylation et l'inactivation de l'ACC (Munday, Milic et al. 1991; Gonzalez, Kumar et al. 2004). Cette protéine est reconnue comme étant un « senseur » métabolique, réagissant à des variations de concentration intracellulaire d'AMP et d'ATP ou du rapport AMP/ATP, et jouant un rôle clé dans la régulation de l'oxydation lipidique. Ainsi, l'AMPK va phosphoryler et inactiver l'acétyl CoA carboxylase (ACC) et ainsi diminuer le niveau de malonyl-CoA, puissant inhibiteur de CPT-1 (Winder and Hardie 1999). Ainsi, en inhibant la synthèse de malonyl-CoA, le glucagon, via l'AMPK, favorise l'importation d'AGL à chaîne longue dans la mitochondrie et leur oxydation se fait donc de manière importante. La β -oxydation de ces AGL aboutit à la formation d'acétyl-CoA qui, en condition de jeûne, vont s'orienter vers la formation de corps cétoniques et être ensuite sécrétés par le foie pour être utilisés par les

muscles et d'autres tissus comme substrats énergétiques (McGarry and Foster 1980; Fromenty and Pessayre 1995). En plus de son action activatrice sur l'oxydation lipidique, l'activation de l'AMPK diminue également la synthèse d'acides gras en bloquant l'action de SREBP-1c et ChREBP (Foretz, Carling et al. 1998; You, Matsumoto et al. 2004), qui sont des activateurs de la transcription de gènes impliqués dans la lipogénèse (figure 1.5).

Figure I.5 : Schéma récapitulatif de la régulation du métabolisme lipidique par l'AMPK Tiré de (Hardie, Scott et al. 2003) et (Zhou, Myers et al. 2001).



L'augmentation de la β -oxydation hépatique ainsi que de la cétogenèse résulte également en partie de l'activation d'un facteur de transcription par les AGL, le peroxysome proliferator-activated receptor α (PPAR- α). L'activation de PPAR α augmente la transcription de nombreux gènes d'enzymes mitochondriales, comme la CPT-1, l'acyl-CoA déhydrogénase (impliquées dans la β -oxydation) et la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA synthase (HMG-CoA) (impliquée dans la cétogenèse) (Schoonjans, Staels et al. 1996; Kersten, Seydoux et al. 1999). En plus de l'activation de PPAR α , l'augmentation de la sécrétion de glucagon pendant le jeûne joue également un rôle important dans l'activation de la β -oxydation. En effet, en inhibant la phosphodiésterase (PDE), le glucagon augmente la concentration d'AMPc cytoplasmique, ce qui active la protéine kinase A (PKA). Cette PKA va à son tour phosphoryler et activer un facteur de transcription, le cAMP-response element-binding protein (CREB), qui en combinaison avec deux autres facteurs de transcription, l'hépatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α) et PPAR- γ coactivator 1 (PGC-1) (Louet, Hayhurst et al. 2002), va augmenter l'expression de la CPT-1.

A l'opposé, en situation postprandiale, la forte concentration de glucose plasmatique et d'insuline oriente plutôt le métabolisme vers une synthèse lipidique (McGarry and Foster 1980; Salway 1994). Le glucose capté est oxydé et forme du pyruvate (glycolyse), qui sera transformé en acétyl-CoA et en citrate par la mitochondrie. Ce dernier est ensuite régénéré en acétyl-CoA au niveau du cytosol, puis utilisé pour la synthèse de malonyl-CoA et d'AG par la fatty acid synthase (FAS). Ce haut niveau de malonyl-CoA induit une inhibition de la CPT-1, et donc diminue l'entrée des acides gras dans les mitochondries et les capacités de β -oxydation hépatiques (McGarry and Foster 1980). Les AGL néo-synthétisés ne sont pas dégradés et sont orientés vers la formation de triglycérides qui seront sécrétés sous forme de VLDL (McGarry, 1980). De plus, la stimulation de la glycolyse et de la synthèse lipidique hépatique par le glucose et l'insuline est médiée par l'action synergique de deux facteurs de transcription : sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c) et carbohydrate responsive element-binding protein (ChREBP) (Dentin, Pegorier et al. 2004; Iizuka, Bruick et al. 2004). En effet, la transcription de ces deux facteurs augmente l'expression d'enzymes clés de la glycolyse comme la glucokinase, la pyruvate kinase, et de la lipogenèse comme l'acétyl-CoA carboxylase et la fatty acid synthase.

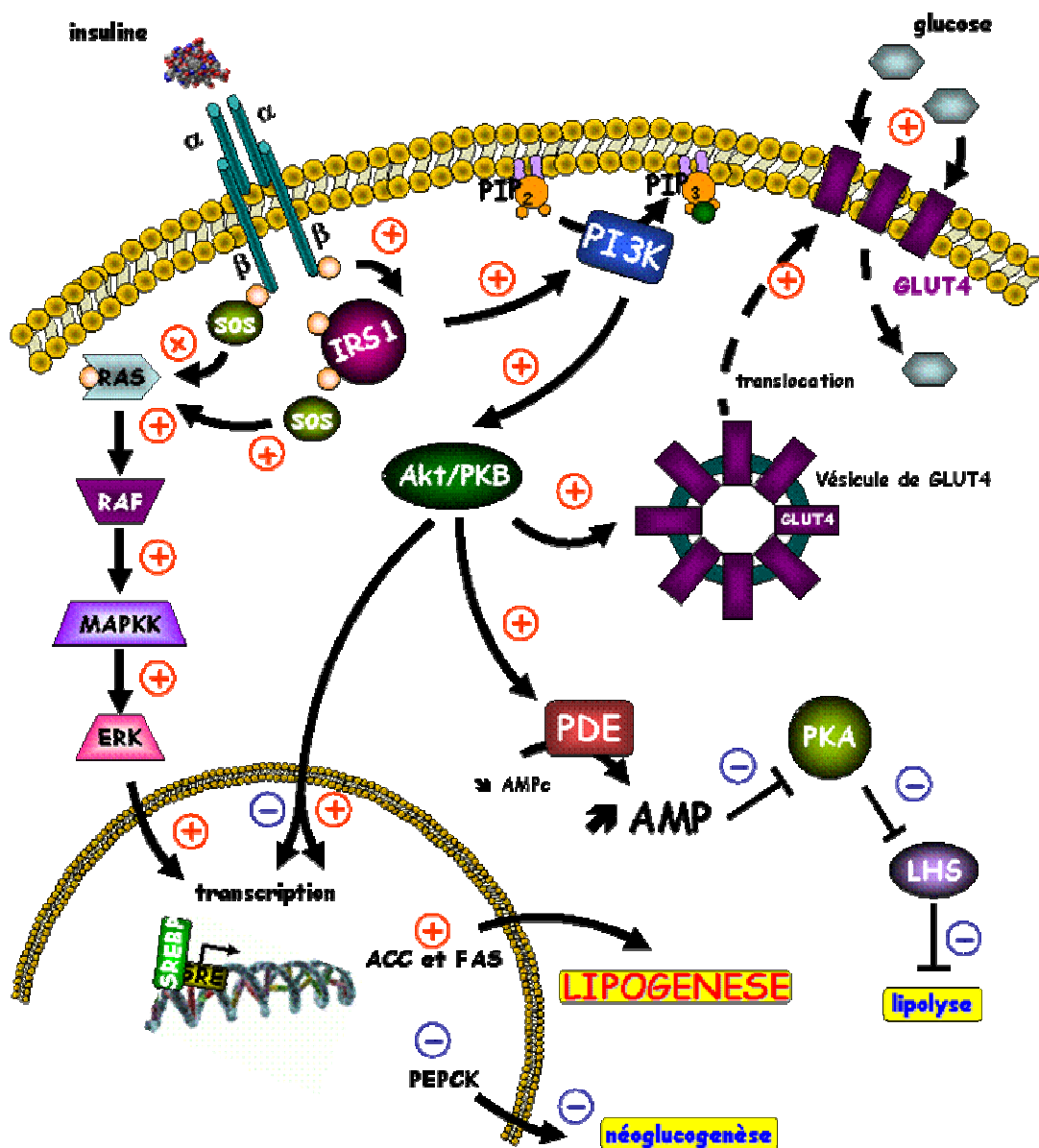
L'insuline tient une place prépondérante dans la régulation du métabolisme lipidique. Il a donc été suggéré que le développement d'une insulino-résistance, notamment au niveau du tissu adipeux, induirait un apport excessif d'acides gras au niveau du foie, provoquant ainsi une stéatose hépatique. La première étape dans la pathogenèse de la NASH serait donc le développement d'une résistance à l'insuline des tissus périphériques.

1.2. Insulino-résistance du tissu adipeux et du muscle squelettique

L'insuline est une hormone anabolisante du corps humain, et joue un rôle majeur, dans la mise en réserve et l'utilisation des substrats énergétiques au niveau de l'organisme, qu'ils soient glucidiques ou lipidiques: entrée de glucose, synthèse de glycogène et lipogenèse, inhibition de la glycogénolyse, de la néoglucogenèse et de la lipolyse. Elle exerce également des fonctions pléiotropes sur le métabolisme protéique (augmentation de la synthèse et inhibition de la protéolyse), la croissance, le contrôle de l'apoptose et le développement. Les mécanismes régulant ces fonctions variées ne sont que partiellement connus.

Le récepteur à l'insuline possède une activité tyrosine-kinase qui permet une autophosphorylation du récepteur puis la phosphorylation sur des résidus tyrosine des protéines substrats, les protéines IRS (insulin receptor substrates), et la création de complexes macromoléculaires d'activation à proximité du récepteur. Les deux voies majeures d'activation sont celles de la phosphatidylinositol-3 kinase, activant la protéine kinase B (PKB/Akt) et impliquée en priorité dans les effets métaboliques, et la voie des MAP (mitogenactivated protein)-kinases, impliquées en priorité dans les effets nucléaires, la croissance et la différenciation.

Figure I.5 : Principales voies de signalisation par l'insuline: voies PI3 kinase et MAP kinase.



L'insuline se fixe sur son récepteur spécifique. Il en résulte une autophosphorylation de la sous-unité α . Les protéines IRS (insulin receptor substrate) se fixent alors au récepteur. Les protéines IRS se trouvent alors à proximité du domaine tyrosine kinase du récepteur, qui phosphoryle des résidus tyrosines spécifiques sur les IRS. La PI3 kinase est l'une des protéines importantes activées par cette liaison des IRS. Elle phosphoryle les phosphoinositides membranaires, créant ainsi des sites de reconnaissance pour d'autres kinases cellulaires telles que la protéine kinase B (PKB)/Akt. La PKB activée par phosphorylation va à son tour phosphoryler et activer d'autres relais intracellulaires impliqués en priorité dans les effets métaboliques de l'hormone. Il en résulte une translocation des vésicules GLUT-4 (glucose transporter) du cytoplasme vers la membrane cellulaire, une inhibition de la lipoprotéine lipase et donc de la lipolyse. La voie PI3 kinase/PKB intervient également dans le contrôle de l'expression génique: elle empêche d'activer, au niveau nucléaire, certains gènes tels que celui de l'enzyme clé de la néoglucogenèse, la PEPCK. L'activation de la voie MAP kinase via les protéines IRS, active le facteur d'échange nucléotidique SOS (son of sevenless) qui active la petite protéine G Ras. Ras active la kinase Raf, qui phosphoryle alors et active la MAP kinase kinase (MEK) responsable de l'activation par phosphorylation de ERK (extracellular signal-regulated kinase). Celle-ci est impliquée dans la synthèse protéique et active des facteurs de transcription impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaire. (Bevan 2001; Kido, Nakae et al. 2001).

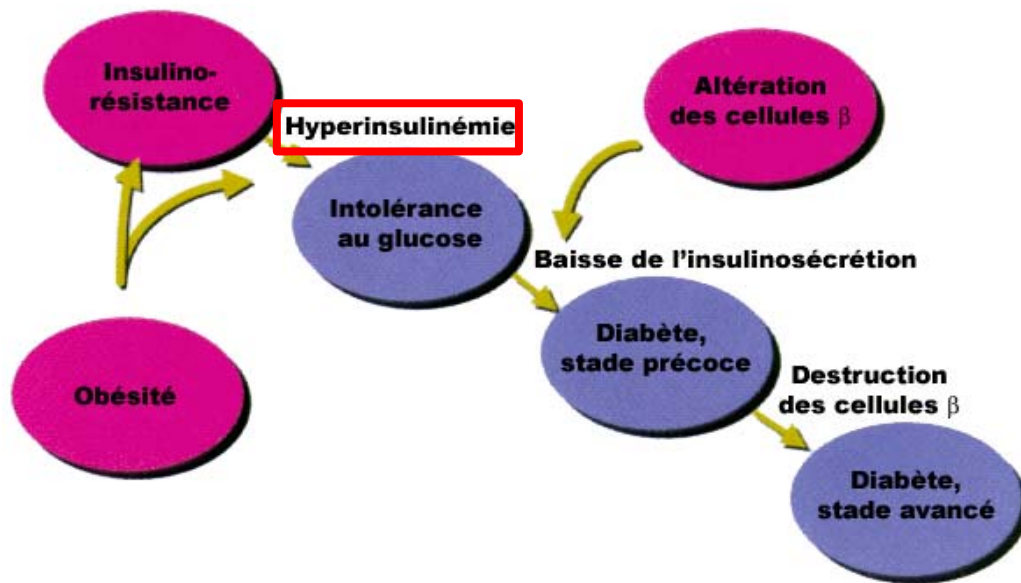
Dans les adipocytes ou les cellules musculaires la fixation de l'insuline à son récepteur spécifique induit une autophosphorylation de la sous unité β de celui-ci, ainsi que la phosphorylation de la tyrosine de l'IRS-1/2 (Insulin Receptor Substrat-1/2). Il s'en suit une activation de la PI3K (Phosphatidyl Inositol-3 Kinase), qui à son tour active le complexe Akt/PKB, qui induit la translocation de transporteurs spécifiques du glucose GLUT-4 (Glucose Transporter 4) de vésicules cytoplasmiques vers la membrane plasmique (figure I.5) (Shepherd and Kahn 1999; Virkamaki, Ueki et al. 1999; Samuel 2005). L'augmentation du nombre de transporteurs à la surface de la cellule va ainsi faciliter la captation de glucose. Ce glucose est utilisé par les cellules comme source d'énergie ou est stocké sous forme de glycogène lorsque les besoins en énergie sont faibles. Ce mécanisme permet également de réguler la quantité de glucose et d'insuline plasmatique.

Le phénomène de cascade de phosphorylation suivant la liaison de l'insuline à son récepteur est plus vaste qu'une simple translocation de vésicule. En effet, l'activation de la PI3K, après phosphorylation de IRS-1/2, entraîne l'activation d'une phosphodiesterase (PDE), ce qui a pour conséquence la dégradation et la déplétion en AMPc (figure I.5). L'absence d'AMPc au niveau cellulaire ne permet pas l'activation de la PKA (Protéine Kinase A), et de la lipoprotéine lipase (LHS) (Kitamura, Kitamura et al. 1999), empêchant de ce fait l'hydrolyse des TG au niveau du tissu adipeux, et le relargage d'AGL dans la circulation sanguine (Anthonsen, Ronnstrand et al. 1998). Les effets lipogénique et anti-lipolytique de l'insuline sont coordonnés par les effets de la PI3K sur le facteur de transcription SREBP (Sterol Regulatory Element Binding Protein). Celui-ci joue un rôle essentiel dans l'activation de différents gènes impliqués dans la lipogenèse (Acétyl-CoA Carboxylase : ACC, Fatty Acid Synthase : FAS, Glycérol 3-Phosphate acétyltransférase : GPAT), et dans l'excrétion de VLDL. Il existe à côté de la voie PI3 kinase une autre voie importante de signalisation par l'insuline, la voie MAP kinase, qui est commune à de nombreux facteurs de croissance et permet, *in fine*, d'activer l'expression génique et la prolifération cellulaire. Les voies PI3K/PKB et MAP kinase sont interconnectées entre elles et participent à l'activation l'une de l'autre.

Ainsi la PKA module l'activité de la protéine Raf qui est une sérine/thréonine kinase intervenant dans la voie mitogénique MAPK. Le récepteur à l'insuline, une fois phosphorylé, interagit avec la protéine Grb2 (growth factor receptor bound) qui, phosphorylée, interagit avec la protéine SOS (son of sevenless) qui est phosphorylée. Cette dernière active la protéine Ras qui de Ras-GDP inactive devient Ras-GTP active. La Ras-GTP, par activité sérine/thréonine kinase, phosphoryle et active la protéine Raf. Ce dernier active la MAPKK (mitogen-activated protein kinase kinase) qui, par phosphorylation de ERK, active des facteurs transcriptionnels tels que C-Myc, C-Jun, C-Fos, mais également SREBP (Roth, Kotzka et al. 2000).

La fin du signal insulinaire implique la dégradation de l'hormone après internalisation du complexe insuline-récepteur. La majorité de ces récepteurs sont recyclés au niveau de la membrane, tandis que les autres sont dégradés. La synthèse de nouveaux récepteurs permet de maintenir leur nombre sur la membrane cellulaire. La déphosphorylation des résidus tyrosine des récepteurs et des IRS a lieu pendant l'internalisation du complexe.

Figure I.6 : Différentes étapes du développement d'un diabète de type 2 (d'après (Saltiel 2000))



Dans les cas d'obésité ou lors d'une insulino-résistance, le transport de glucose par la cellule est diminué. En état post prandial, le glucose va s'accumuler dans l'espace extracellulaire provoquant ainsi une augmentation de la glycémie. Cette hyperglycémie va provoquer à terme une intolérance au glucose et va stimuler la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques. Dans un premier temps, l'hyperinsulinémie suffit à maintenir la glycémie normale, mais ensuite elle ne permet plus de compenser l'hyperglycémie, ce qui aboutit à un diabète de type 2. Au cours de l'évolution, une défaillance de cellules β pancréatiques peut survenir ne compensant plus l'hyperglycémie, aboutissant à rendre ce diabète de type 2 insulino-requérant.

Lors d'une hyperinsulinémie persistante, les cycles d'internalisation/recyclage peuvent aboutir à une diminution du nombre de récepteurs disponible à la surface des cellules, induisant un phénomène d'insulino-résistance secondaire. Il s'agit donc d'un cercle vicieux, l'hyperinsulinémie favorisant l'entretien de l'insulino-résistance. De plus, la phosphorylation de la tyrosine d'IRS n'a plus lieu. Le transport de glucose par la cellule est donc réduit. Le glucose va s'accumuler dans l'espace extracellulaire provoquant ainsi une hyperglycémie. Cette insulino-résistance rend nécessaire une hyperinsulinémie pour pouvoir contrôler la glycémie. La sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques augmente donc (Chitturi, Abeygunasekera et al. 2002). Dans un premier temps, l'hyperinsulinémie suffit à maintenir la glycémie normale, mais ensuite elle ne permet plus de compenser l'hyperglycémie, ce qui aboutit à un diabète de type 2 (défini par une glycémie $> 1,26$ g/l). Celui-ci peut être traité par des agents antidiabétiques oraux insulino-sensibilisants. Au cours de l'évolution, une défaillance de cellules β pancréatiques peut survenir, aboutissant à rendre ce diabète de type 2 insulino-requérant (nécessitant un traitement par insuline exogène) (figure I.6).

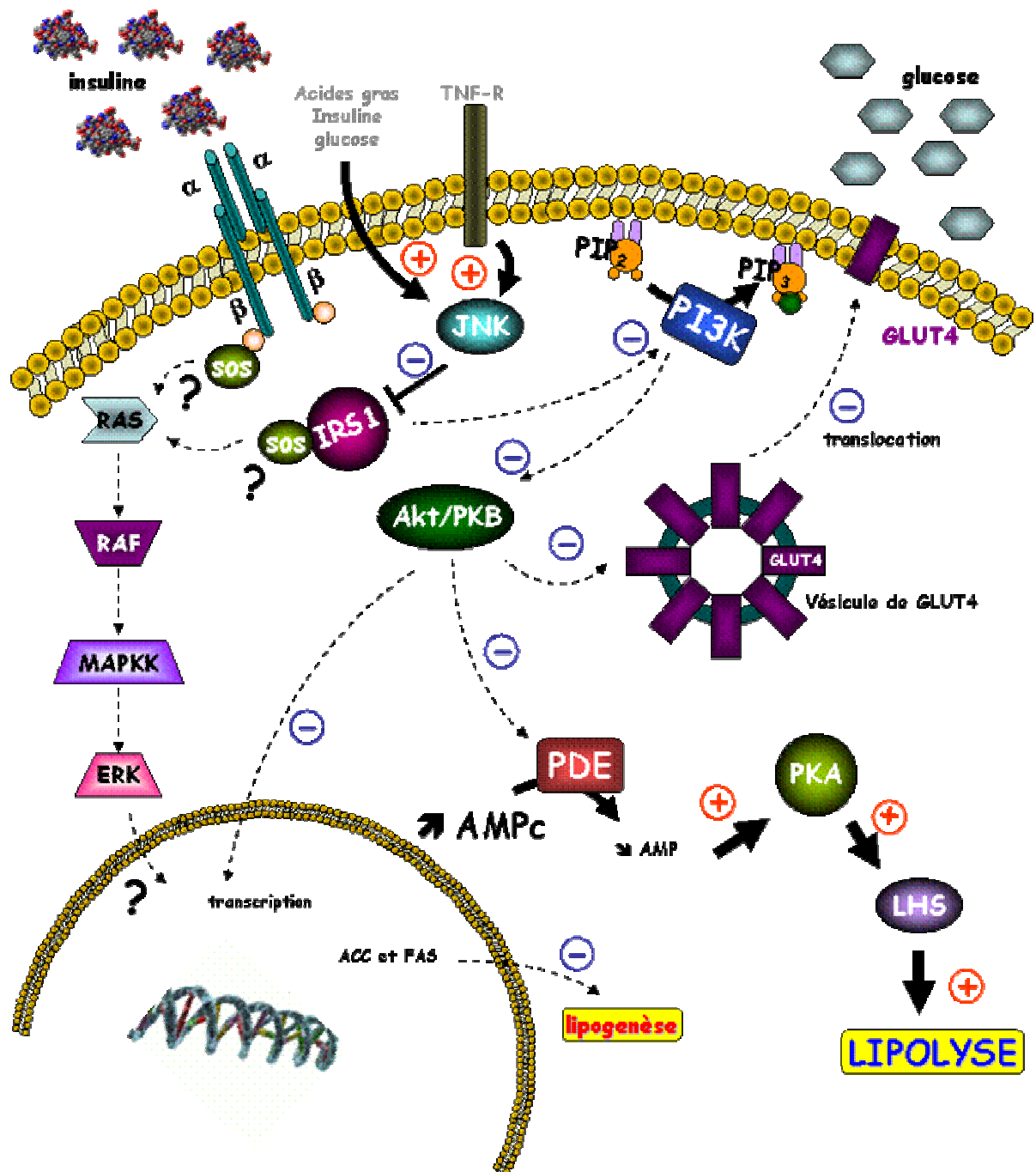
Une autre conséquence de l'insulino-résistance du tissu adipeux est le maintien d'un niveau élevé d'AMPc, ce qui va activer la PKA et la LHS. Il en résulte une stimulation de la lipolyse avec dégradation des triglycérides et libération d'une grande quantité d'AG dans la circulation sanguine. De plus, la diminution d'activité de l'insuline, réprime l'activation de la transcription des gènes

impliqués dans la lipogenèse par SREBP et de ce fait inhibe la lipogenèse (DeFronzo and Ferrannini 1991) (figure I.7).

Une étude réalisée avec des adipocytes et des myocytes chargés en lipides, a mis en évidence une absence d'effet du récepteur à l'insuline sur la signalisation de ces cellules (Shepherd and Kahn 1999). Plusieurs études se sont donc récemment intéressées à la phosphorylation sur Ser/Thr des protéines IRS, qui découplerait ces protéines du récepteur et arrêterait la transduction du signal insulinique (Le Roith and Zick 2001). De nombreux signaux sont capables d'induire cette phosphorylation, tels les acides gras libres, le diacylglycérol, les acyl-CoA et le glucose, mais également des cytokines inflammatoires comme le $\text{TNF}\alpha$ (tumor necrosis factor α) ou l'IL-1 β (interleukine 1 β) (Shepherd and Kahn 1999; Bennett, Satoh et al. 2003), et même l'insuline. Parmi les enzymes capables de phosphoryler les IRS en Ser/Thr, on trouve la PKC ζ , la kinase IKK β (inhibitor of nuclear factor κ B kinase), la MAP kinase et surtout la Jun kinase (JNK), qui semble particulièrement intéressante (Hirosumi, Tuncman et al. 2002; Bennett, Satoh et al. 2003). Ainsi, en phosphorylant la sérine 307 de l'IRS, la JNK empêche l'interaction de celle-ci avec le récepteur à l'insuline et induit un état de résistance à l'insuline (figure I.7). Cette kinase est activée par l'insuline elle-même, ce qui pourrait expliquer l'insulinorésistance associée aux états d'hyperinsulinémie (Lee, Wang et al. 2001), mais aussi par le $\text{TNF}\alpha$ et les acides gras libres sécrétés par le tissu adipeux, qui sont impliqués dans la résistance à l'insuline en pathologie (Hirosumi, Tuncman et al. 2002 ; White 2002). L'élévation des acides gras libres résultant d'une lipolyse accrue en cas de résistance à l'insuline de ce tissu pourrait conduire à une accumulation de diacylglycérol et d'acyl-CoA dans les muscles et le foie, conduisant à une activation de la PKC θ et à une phosphorylation de l'IRS sur Ser/Thr, inhibant ainsi le signal de l'insuline, notamment pour le transport du glucose dans le muscle. Mais d'autres mécanismes sont également impliqués dans la régulation négative du signal insulinique: la déphosphorylation de phosphoinositides par la PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten), un rétrocontrôle négatif de la PKC ζ sur le récepteur, une diminution de la quantité d'IRS (...).

Mais quel que soit le mécanisme mis en jeu lors de l'insulinorésistance, la translocation insuffisante des GLUT-4 vers la membrane plasmique induit une diminution de la captation de glucose plasmatique par les adipocytes et les myocytes, provoquant une hyperglycémie et une hyperinsulinémie (Shepherd and Kahn 1999), ainsi qu'une augmentation de la libération d'AGL et de $\text{TNF}\alpha$ par le tissu adipeux dans la circulation sanguine.

Figure I.7 : Schéma simplifié des mécanisme d'action lors d'une insulino-résistance sur adipocytes et myocytes.



Lors d'une insulino-résistance, l'autophosphorylation de la sous-unité β et la phosphorylation de la tyrosine de l'IRS sont diminuées. Les vésicules GLUT-4 ne sont plus transloquées du cytoplasme vers la membrane cellulaire. La PDE est inhibée, provoquant ainsi l'augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc, ce qui va activer la PKA, la LPL (ou LHS) et de ce fait stimuler la lipolyse. La transcription des gènes lipogéniques n'est plus stimulée. De plus, la liaison du $\text{TNF}\alpha$ à son récepteur, les acides gras, le glucose et l'insuline induiraient également une inhibition de IRS via l'activation de la protéine JNK.

1.3. Développement de la stéatose hépatique : rôle de l'hyperinsulinémie

La résistance à l'insuline, mais aussi la forte concentration d'insuline plasmatique, jouent un rôle prépondérant dans le développement de la stéatose hépatique chez les patients en surpoids,

ayant ou non un diabète de type 2. L'accumulation excessive de lipides dans le tissu adipeux, et dans le muscle, va provoquer le développement d'une insulino-résistance de ces organes. Cette insulino-résistance va contribuer à l'augmentation de la libération d'acides gras, principalement par le tissu adipeux, et de facteurs inflammatoires ($\text{TNF}\alpha$) dans la circulation. De part sa situation stratégique au niveau de la circulation sanguine portale, le foie reçoit directement les acides gras libres provenant de la lipolyse du tissu adipeux abdominal. Or, comme la quantité d'acides gras arrivant au foie est augmentée, leur captation par celui-ci est également augmentée. Mais les acides gras ne sont pas seulement captés de la circulation par le foie, ils sont également synthétisés par ce dernier. En effet, l'augmentation de la concentration de glucose et d'insuline plasmatique stimule la synthèse d'acides gras et de triglycérides par le foie.

L'insuline augmente la quantité de SREBP-1c et PPAR γ (peroxysome proliferator-activated factor γ), qui sont deux facteurs de transcription qui activent l'expression d'enzymes clés de la lipogénèse comme la citrate lyase, l'ACC et la FAS (Shimomura, Bashmakov et al. 1999 ; Matsusue, Haluzik et al. 2003), mais également l'expression de la glycérol 3-phosphate acyltransférase (GPAT) et de la stéaroyl-CoA désaturase 1 (SCD 1) (Shimomura, Bashmakov et al. 1999). Des études menées avec des souris *ob/ob* ont montré une multiplication par 4 de la quantité de transcrits de SREBP 1c, et une multiplication par 6 de la lipogénèse *de novo* dans le foie de ces animaux (Shimomura, Bashmakov et al. 1999). L'augmentation de la lipogénèse semble donc être un événement clé dans le développement de la stéatose massive observée chez ces souris *ob/ob*. Cela est également appuyé par une étude de Donnelly menée avec des patients atteints de NAFLD, dans laquelle la proportion des acides gras venant de la lipogénèse hépatique était de 26% contre 5% chez des sujets contrôles (Donnelly, Smith et al. 2005). Parallèlement à l'insuline, l'augmentation du glucose circulant va activer un autre facteur de transcription : ChREBP (carbohydrate responsive element-binding protein), qui est également impliqué dans l'activation d'enzymes clé de la lipogénèse, mais aussi de la glycolyse (Dentin, Pegorier et al. 2004; Iizuka, Bruick et al. 2004).

Un autre facteur pourrait également être impliqué dans le développement de la stéatose hépatique. En effet, une diminution de la quantité d'apolipoprotéine B (ApoB) hépatique a été observée chez plusieurs patients atteints de NASH (Charlton, Sreekumar et al. 2002 ; Musso, Gambino et al. 2003). Plusieurs études ont constaté une diminution de la quantité d'ARNm d'ApoB dans le foie de patients avec NASH (Sreekumar, Rosado et al. 2003). Une diminution de la transcription de l'ARNm et/ou de la stabilité de la protéine a été suggérée pour expliquer cela (Taghibiglou, Carpentier et al. 2000 ; Charlton, Sreekumar et al. 2002). En condition normale l'insuline diminue la synthèse et la stabilité d'ApoB, il est donc tout à fait possible qu'une hyperinsulinémie soit impliquée dans la diminution d'ApoB observée lors des cas de NASH. Un autre facteur pouvant être impliqué dans le développement de la stéatose est le MTP (microsomal triglyceride transfer protein). En effet, il a été montré qu'un polymorphisme ou une mutation affectant soit ApoB soit MTP pourrait augmenter les risques de NASH (Fromenty, Robin et al. 2004).

En résumé, le développement d'une insulino-résistance au niveau des adipocytes et des muscles induit une hyperglycémie et une hyperinsulinémie, ainsi qu'une augmentation de la concentration plasmatique d'acides gras. Tous ces facteurs participent ensuite à l'accumulation de lipides hépatiques et au développement d'une stéatose, ce qui va, dans un deuxième temps provoquer une insulino-résistance hépatique.

1.4. Insulino-résistance du foie

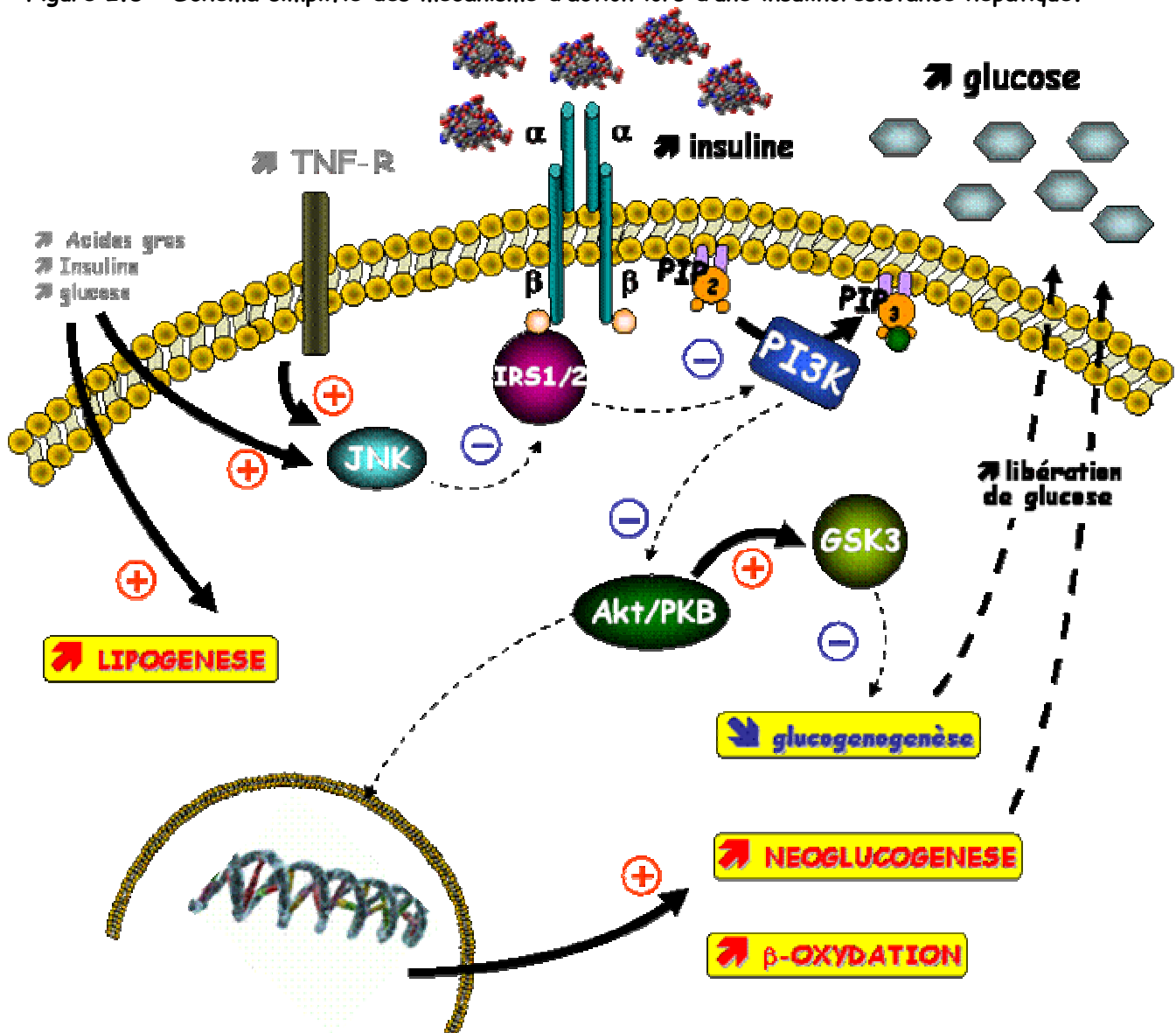
Le rôle de l'accumulation de lipides hépatiques dans le développement d'une résistance à l'insuline du foie est supporté par de nombreuses observations. Dans les processus de développement de la stéatose hépatique, l'insulino-résistance hépatique se développe de manière secondaire. De nombreuses études démontrent une corrélation entre une insulino-résistance et des dépôts lipidiques au niveau du foie (Tiikkainen, Tamminen et al. 2002). Il a été démontré que la lipolyse au niveau du tissu adipeux abdominal était particulièrement importante dans la pathogenèse des NAFLD (Nielsen, Guo et al. 2004). Il apparaît que deux tiers des dépôts lipidiques observés au niveau du foie dans des cas de NAFLD, sont dérivés des AGL circulants (Donnelly, Smith et al. 2005), et que la sévérité de la stéatose hépatique est corrélée avec la quantité de tissu adipeux viscéral plutôt qu'avec le tissu adipeux sous cutané ou périphérique (Kelley, McKolanis et al. 2003). En effet, il a été montré qu'une diminution du tissu adipeux viscéral améliore la sensibilité à l'insuline ainsi que d'autres perturbations métaboliques présentes dans des cas de NAFLD (Uusitupa, Lindi et al. 2003).

L'insulino-résistance périphérique a pour conséquence une hyperinsulinémie. Or, le foie sain est sensible à l'hyperinsulinémie. L'insuline régule certaines voies métaboliques qui favorise le stockage hépatique des nutriments (lipogenèse). L'insuline induit la déphosphorylation de l'ACC et donc son activation et la synthèse de malonyl-CoA, inhibiteur spécifique de CPT-1. Ce haut niveau de malonyl-CoA induit une inhibition de la CPT-1, et donc diminue l'entrée des acides gras dans les mitochondries et les capacités de β -oxydation hépatique. Les AGL néo-synthétisés ne sont pas dégradés et sont orientés vers la formation de triglycérides (lipogenèse et estérification). Les triglycérides sont ensuite stockés sous forme de gouttelettes lipidiques au niveau du foie. On peut supposer que le développement d'une insulino-résistance hépatique pourrait constituer un mécanisme adaptatif face à l'accumulation de lipide et tendrait à limiter le stockage.

Les effets de l'insuline sur le foie diffèrent légèrement de ceux observés sur le muscle ou le tissu adipeux. Tout d'abord le récepteur à l'insuline phosphoryle un substrat différent : IRS-2 (Previs, Withers et al. 2000). Celui-ci via PI3K et Akt-2/PKB phosphoryle et inactive GSK3 (Glycogen Synthase Kinase-3) ce qui lève l'inhibition de la glycogène synthase, augmentant ainsi son activité (Cross, Alessi et al. 1995). Il en résulte donc une augmentation de la synthèse de glycogène au niveau du foie. L'insuline stimule également au niveau du foie, via l'activation de IRS-2 et SREBP, l'expression de gènes lipogéniques déterminant dans la synthèse d'acides gras (Lopez, Bennett et al. 1996). Une insulino-résistance hépatique provoque l'effet inverse, c'est-à-dire une diminution de la

synthèse de glycogène et une augmentation de la néoglucogenèse et de la libération de glucose dans la circulation sanguine (figure I.8).

Figure I.8 : Schéma simplifié des mécanisme d'action lors d'une insulino-résistance hépatique.



Lors d'une insulino-résistance hépatique, la liaison du récepteur à l'insuline et de IRS2 n'a pas lieu. La voie de la PI3K n'est plus stimulée. La liaison du $TNF\alpha$ à son récepteur, les acides gras, l'augmentation du glucose et de l'insuline induisent également une inhibition de IRS via l'activation de la protéine JNK. Ainsi l'insulino-résistance hépatique induit une augmentation de l'oxydation des lipides, de la néoglucogenèse. Le taux élevé d'acides gras, de glucose et d'insuline stimule la lipogenèse.

Les facteurs impliqués dans l'insulino-résistance hépatique sont multiples (Perseghin, Petersen et al. 2003 ; Samuel, Liu et al. 2004; Ueki, Kondo et al. 2004). La stéatose elle-même semble impliquée, aussi bien que le stress oxydant, les acides gras libres, le $TNF\alpha$, ainsi que des médiateurs intracellulaires comme les céramides, $IKK\beta$ (Gao, Hwang et al. 2002), $NF\kappa B$, $PKC-\theta$ (Protéine Kinase C- θ) $JNK1$ (Jun N-Terminal Kinase-1) (Shepherd and Kahn 1999 ; Virkamaki, Ueki et al. 1999 ; Kim, Fillmore et al. 2001 ; Kim, Ellmerer et al. 2003) (Combettes-Souverain and Issad 1998; Bugianesi,

Gentilcore et al. 2005), le cytochrome CYP2E1 (Schattenberg, Wang et al. 2005) et les SOCS (suppressors of cytokine signalling) (Farrell 2005). Ces dernières protéines interfèrent dans la transmission du signal insulinémique en empêchant le contact de IRS2 avec le récepteur à l'insuline (Ueki, Kondo et al. 2004) ou en induisant une dégradation de ces protéines (Rui, Yuan et al. 2002). Cependant, le développement d'une insulino-résistance dans le foie ne touche que certaines des voies métaboliques sensibles à l'insuline (Neuschwander-Tetri and Caldwell 2003). Et paradoxalement, certaines autres voies sont suractivées par le haut niveau d'insuline (voie de synthèse des acides gras) alors que d'autres sont suractivées par la résistance à l'insuline du foie, comme la β -oxydation et la néoglucogénèse (Attie, Krauss et al. 2002)(figure I.8).

L'hyperinsulinémie et l'hyperglycémie plasmatique due, entre autre, à l'insulino-résistance musculaire ont des effets contradictoires sur les voies métaboliques du foie. Paradoxalement certaines voies sont « sur-activées » par la forte concentration d'insuline, comme la synthèse d'acides gras, tandis que d'autres sont « sur-activées » par l'insulino-résistance hépatique, comme l'oxydation lipidique et la néoglucogénèse.

On peut donc résumer en disant que lors d'une obésité, ou lors d'une prise calorique excessive, la première étape de la pathogenèse d'une NASH, le « *first hit* » correspond à l'augmentation des apports en glucide (simple, type fructose) et en acides gras dans l'organisme. Cela va aboutir à une résistance à l'insuline du tissu adipeux et du muscle. Cette insulino-résistance périphérique, caractérisée par une hyperglycémie et une hyperinsulinémie, associée à une augmentation des acides gras plasmatiques, va provoquer dans un premier temps une stéatose hépatique (car le foie sain est sensible à l'insuline). Dans un deuxième temps le foie stéatosique s'adapte en développant une insulino-résistance au niveau du foie, ce qui permet de limiter l'hépatomégalie. Face à cette nouvelle condition « pathologique », le foie va tenter d'adapter son métabolisme, et notamment au niveau mitochondrial.

1.5. Développement de la stéatose hépatique : rôle de la leptine

Outre une insulino-résistance périphérique, l'implication d'une hormone dérivée du tissu adipeux blanc semble impliquée dans l'accumulation lipidique et la progression fibrotique hépatique: la leptine.

La leptine est une hormone peptidique qui régule les réserves de graisses dans l'organisme. C'est une cytokine produite et sécrétée dans la circulation sanguine par les adipocytes. Son action essentielle est de diminuer la prise alimentaire. Sa présence en quantité plus importante augmente aussi la dépense énergétique en majorant la thermogénèse. Sur le plan métabolique, une sécrétion importante (induite par une quantité de masse grasse supérieure), induit une lipolyse, diminue la sécrétion en insuline et réduit la néoglucogénèse interprandiale. A l'inverse, le manque de leptine

induit une augmentation du stockage de masse grasse ainsi qu'une augmentation de l'affinité pour les aliments.

L'absence de réponse à la leptine (résistance à la leptine) pourrait être un facteur important dans la pathogenèse de la stéatose hépatique. La preuve d'une résistance à la leptine dans les NAFLD, quoique indirect, est incontestable. La leptine exerce un certain nombre d'effets anti-stéatotique sur le foie, y compris une inhibition de la synthèse des lipides via une réduction de l'expression de la stéaroyl CoA désaturase-1 (SCD) (Cohen, Miyazaki et al. 2002) et le renforcement de l'oxydation des acides gras, via une « upregulation » du peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR α). Une augmentation du taux de leptine sérique chez des patients présentant une NAFLD laisse suggérer une résistance hépatique à cette hormone (Chitturi, Farrell et al. 2002). Cette hypothèse est également soutenue par des études menées sur souris *ob/ob* présentant un défaut de synthèse de la leptine. Ces souris présentent une augmentation de leur prise alimentaire, le développement d'une obésité, une insulino-résistance, une hyperglycémie, un diabète ainsi qu'une stéatose hépatique (Lin, Yang et al. 2000; Baffy, Zhang et al. 2002 ; Koteish and Mae Diehl 2002; Li, Yang et al. 2003). A noter également que les souris *db/db* et les rats *fa/fa*, qui présentent une mutation sur le récepteur à la leptine, présentent le même phénotype que les souris *ob/ob* malgré une hyperleptinémie (Rosenbaum, Leibel et al. 1997). Il apparaît donc qu'une déficience, ou une résistance, en leptine induit le développement d'une obésité, d'une insulino-résistance, d'une dyslipidémie et d'une stéatose hépatique.

1.6. Adaptations mitochondriale du foie stéatosique

Un foie qui développe une stéatose va augmenter son volume, mais cette hépatomégalie est limitée. Des adaptations vont donc être mises en place face à ce nouvel état. En effet, une « élimination » plus rapide des lipides a été observée chez des patients atteints de NASH, afin de compenser la captation et la synthèse accrue de lipides par le foie. Cela se traduit par une augmentation de la β -oxydation et de la cétogenèse (Sanyal, Campbell-Sargent et al. 2001). Cette augmentation de l'oxydation lipidique mitochondriale a également été observée sur le foie de souris diabétiques *ob/ob*, qui présentent une stéatose massive (Brady, Brady et al. 1985 ; Li, Yang et al. 2003). Cependant, les mécanismes impliqués dans l'augmentation de la β -oxydation mitochondriale lors de NASH ne sont que peu connus, et plusieurs hypothèses ont été proposées.

☞ La première hypothèse serait que l'augmentation du « pool » d'acides gras, due à la captation accrue et à une augmentation de la lipogenèse, provoquerait une augmentation de l'entrée de ces acides gras dans la mitochondrie, et de ce fait une augmentation de la β -oxydation.

☞ La deuxième hypothèse repose sur l'activation du facteur de transcription PPAR α par les acides gras. En effet, une augmentation de PPAR α a été mesurée sur plusieurs modèles animaux (souris *ob/ob* ou *db/db*), présentant une obésité et une stéatose massive (Memon, Hotamisligil et al.

2000). De plus, de récents travaux extrêmement intéressants, ont suggéré que l'activation de PPAR α au niveau hépatique serait effectuée préférentiellement par des acides gras néosynthétisés, à partir de carbohydrates, plutôt que par les acides gras provenant de la lipolyse adipocytaire (Chakravarthy, Pan et al. 2005). De ce fait, dans le cadre d'une stéatose massive, l'activation de PPAR α pourrait être reliée, au niveau du foie, à la lipogenèse *de novo*. L'activation de PPAR α augmenterait donc l'expression et l'activité de la CPT-1, et de ce fait augmenterait l'entrée des acides gras à chaîne longue dans la mitochondrie, même si certaines études suggèrent que les acides gras à longues chaînes seraient capables d'activer la CPT-1 par une voie indépendante de PPAR α (Louet, Chatelain et al. 2001). En effet, une augmentation de l'expression et de l'activité de CPT-1 est observée dans le foie de modèles animaux de stéatose ou de diabète de type 1 ou 2 (Brady, Brady et al. 1985 ; Riu, Bosch et al. 1996 ; Lee, Wang et al. 2001 ; Paterson, Morton et al. 2004). Un autre mécanisme important favorisant l'activité de la CPT, pourrait être une diminution de l'affinité de celle-ci pour son inhibiteur physiologique, le malonyl-CoA (Cook and Gamble 1987). Cette perte d'affinité pourrait ainsi expliquer le fait que des patients diabétiques de type 2 présentent une β -oxydation augmentée, en dépit de la forte concentration d'insuline et de malonyl-CoA. A ce jour, excepté pour la CPT, peu de choses sont établies sur les autres enzymes impliquées dans la β -oxydation et dans la cétogenèse dans les cas de NASH. Une augmentation de la cétogenèse, via la HMG-CoA synthase, pourrait avoir lieu, cependant aucune preuve directe n'a été apportée pour confirmer cela (Serra, Casals et al. 1993). Cependant, cette activation de PPAR α ne semble pas être suffisante pour éliminer l'excès de lipides. En effet, plusieurs facteurs, observés dans les cas de NASH, sont capables d'annuler l'activation de PPAR α par les acides gras. On retrouve le TNF α , NF κ B et les ROS (Beier, Volkl et al. 1997 ; Cabrero, Alegret et al. 2002 ; Glosli, Gudbrandsen et al. 2005).

☞ Un troisième mécanisme pourrait également expliquer l'augmentation de la β -oxydation mitochondriale observée lors de NASH : la leptine (Lee, Yu et al. 2002 ; Savage and O'Rahilly 2002). Une augmentation de la leptine plasmatique est en effet classiquement observée chez des sujets obèses (Friedman and Halaas 1998) et chez des patients atteints de NASH (Uygun, Kadayifci et al. 2000; Chitturi, Farrell et al. 2002). L'augmentation de la sécrétion de leptine par le tissu adipeux pourrait être un mécanisme adaptatif ayant pour conséquence de diminuer le stockage de lipides au niveau d'autres tissus comme le cœur, le foie, les muscles squelettiques (Friedman and Halaas, 1998; Lee et al., 2001; Unger, 2005). Cependant, bien que cette hypothèse soit attrayante, l'augmentation de la leptinémie peut aussi être le reflet d'un état de résistance à la leptine au niveau des tissus périphériques comme le foie et les muscles (Friedman and Halaas 1998 ; Steinberg and Dyck 2000 ; Chitturi, Farrell et al. 2002).

☞ Une augmentation de l'expression hépatique d'UCP2 a été observée chez des modèles animaux de NAFLD, comme les souris génétiquement obèse ob/ob (Chavin, Yang et al. 1999). L'UCP est une protéine mitochondriale située au niveau de la membrane interne. Elle permet un retour des protons vers la matrice sans production d'ATP, découplant ainsi les oxydations des phosphorylations.

Comme pour la CPT, la synthèse d'UCP est activée par PPAR α . L'augmentation de son expression dans le foie dans les cas de NASH pourrait donc perturber la synthèse d'ATP et augmenter la vulnérabilité du foie des patients face aux attaques (Cortez-Pinto, Chatham et al. 1999). D'un autre point de vue, l'augmentation de l'expression d'UCP2 pourrait être une possibilité de stimuler l'oxydation hépatique et donc de limiter la stéatose (Himms-Hagen and Harper 2001). Un autre point positif est qu'UCP2 pourrait augmenter le flux d'électron au travers de la chaîne respiratoire et de ce fait prévenir une réduction excessive des complexes de la chaîne respiratoire et diminuer ainsi la synthèse de ROS (Jezek 2002). L'augmentation de l'expression d'UCP2 est à double tranchant. En effet, il y a un côté bénéfique et un côté néfaste

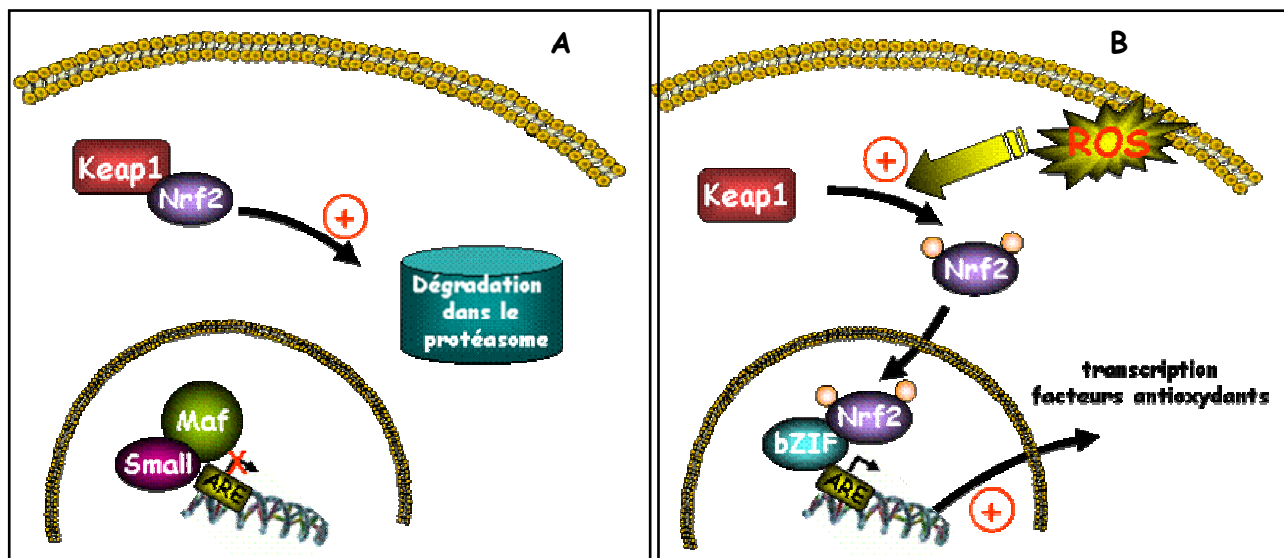
2. Second hit: De la stéatose hépatique à la NASH

Si l'insulinorésistance joue un rôle fondamental dans la pathogenèse de la stéatose hépatique, le stress oxydant est probablement le facteur déclenchant de l'évolution de la stéatose en NASH, mais également de toutes les autres lésions observées dans les NAFLD (James and Day 1999; Chitturi and Farrell 2001). De nombreux facteurs démontrent la présence d'un stress oxydant dans les cas de NAFLD. Des études ont montré tant sur des patients que sur des animaux ayant ce type de lésions, une augmentation du taux hépatique de MDA (malondialdéhyde) de 4-HNE (4-hydroxynonénal) (Laurent, Nicco et al. 2004 ; Seki, Kitada et al. 2005; Garcia-Ruiz, Rodriguez-Juan et al. 2006), de « 3-tyrosine nitrated protein » (Sanyal, Campbell-Sargent et al. 2001; Laurent, Nicco et al. 2004 ; Garcia-Ruiz, Rodriguez-Juan et al. 2006) et de 8-hydroxydéoxyguanosine (Seki, Kitada et al. 2002; Seki, Kitada et al. 2005), qui sont respectivement des marqueurs de lésions oxydatives aux niveaux des lipides, des protéines et de l'ADN. De plus, le taux de thiorédoxines sanguin, un autre marqueur de stress oxydant, est élevé chez les patients atteints de NASH (Sumida, Nakashima et al. 2003), alors que leurs facteurs antioxydants sont réduits (Laurent, Nicco et al. 2004 ; Nobili, Pastore et al. 2005; Yesilova, Yaman et al. 2005).

Les gènes codant pour la plupart des facteurs antioxydants ont en commun un ARE (Antioxidant Response Element), qui répond aux facteurs de transcription Nrf1 et Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor). Ces deux facteurs agissent en hétérodimères et forment un complexe avec Small-Maf et d'autres protéines bZIF (Motohashi, O'Connor et al. 2002). Normalement, les facteurs Nrf sont séquestrés dans le cytoplasme (Itoh, Wakabayashi et al. 1999), mais lorsque les cellules subissent un stress oxydant, les Nrf sont transloqués dans le noyau, se lient aux ARE des gènes des facteurs antioxydants et induisent leur expression (Nguyen, Yang et al. 2004; Gong and Cederbaum 2006) (figure I.9). L'implication, ou plutôt l'absence d'implication, de ces facteurs antioxydants dans la pathogenèse des NAFLD est supportée par des études menées chez des souris Nrf1 $^{-/-}$. Ces souris sont déplétées en Nrf1 et ont une diminution d'expression des gènes possédant une ARE, et présentent en plus d'un stress oxydant une stéatose, de la nécrose, de l'apoptose, une inflammation

hépatique et de la fibrose (Xu, Chen et al. 2005). Ce manque de réponse antioxydante est soutenue par le fait que l'expression du gène de la glutathione S transférase est diminuée chez les patients atteints de NAFLD (Younossi, Gorreta et al. 2005).

Figure I.9 : Schéma simplifié de l'activation des gènes des facteurs antioxydants



En condition basale (A), Nrf2 est associé à une protéine Keap (cullin-3 substrate adaptor protein) et est retenu dans le cytosol avant d'être rapidement dégradé dans le protéasome par un mécanisme d'ubiquitination. L'activation de Nrf2 par des ROS inhibe sa fixation à Keap1 (B). Nrf2 est phosphorylé par la PKC, puis transloqué dans le noyau. Une fois dans le noyau, Nrf2 s'associe à d'autres facteurs de transcriptions (bZIP), se fixe sur l'ARE et active la transcription des gènes des facteurs antioxydants (glutathione transférases, quinone réductase, époxide hydrolase, hème oxygénase, UDP-glucuronosyl transférases, gamma-glutamylcystéine synthétase)

L'activation de ces gènes est inhibée par la fixation des protéines Small-Maf sur la séquence ARE.

2.1 Les sources possibles du stress oxydant

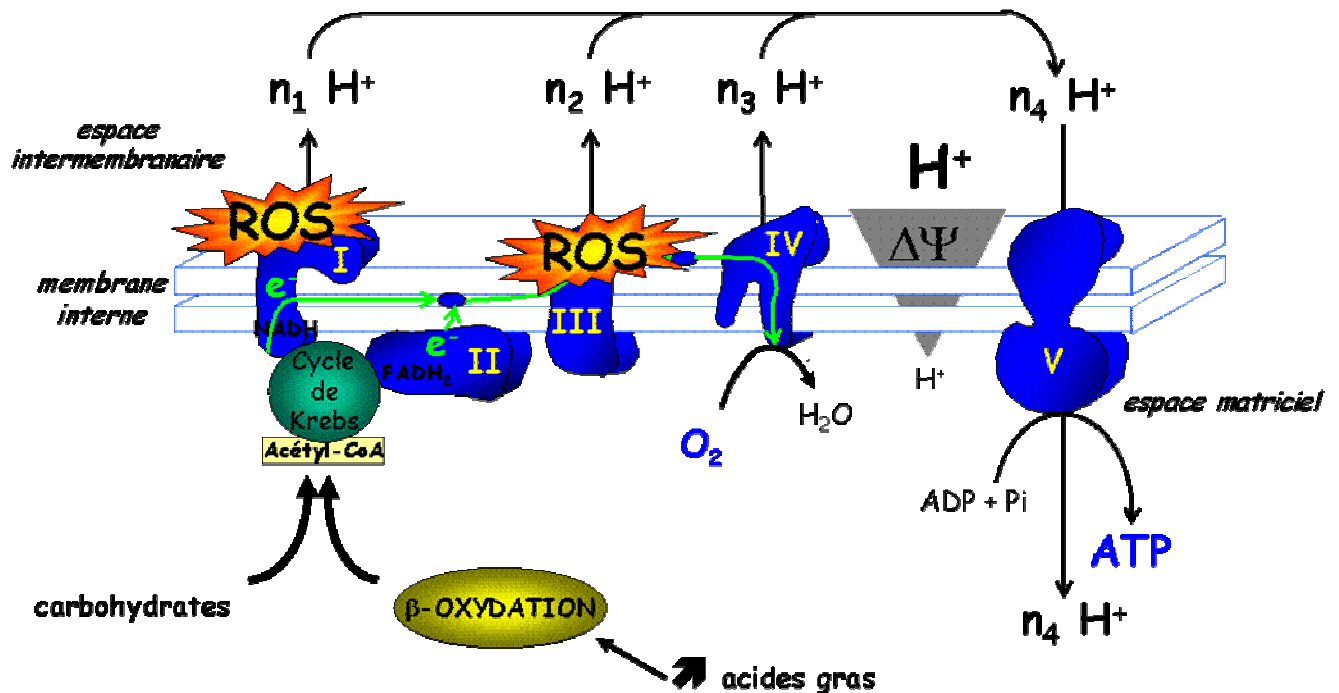
Les conséquences d'un stress oxydant sur une cellule sont multiples. Il induit une peroxydation des lipides de la membrane cellulaire, une dégénérescence cellulaire et une nécrose, ainsi qu'une mort cellulaire par apoptose (Ferret, Hammoud et al. 2001; Malassagne, Ferret et al. 2001). Il induit également l'expression de cytokines pro-inflammatoires, l'activation des cellules étoilées du foie et le développement de fibrose (James and Day 1999; Chitturi and Farrell 2001) (Garcia-Ruiz, de la Torre et al. 2002). Mais si les conséquences d'un stress oxydant sont multiples, les facteurs le déclenchant ne le sont pas moins.

2.1.1 La mitochondrie

Le facteur le plus important impliqué dans les dysfonctions mitochondriale observé lors de NASH est une production accrue de radicaux libres de l'oxygène (ROS) par les mitochondries. Des études antérieures ont en effet montré que la production de ROS pouvait être augmentée lorsque

l'apport d'électrons à la chaîne respiratoire était lui aussi augmenté, pendant l'oxydation de lipides (St-Pierre, Buckingham et al. 2002) ou de glucose (Du, Edelstein et al. 2000), ou lorsque le flux d'électrons était partiellement bloqué au niveau de la chaîne respiratoire (Kushnareva, Murphy et al. 2002).

Figure I.10: chaîne respiratoire mitochondriale et site de production de ROS



L'oxydation des lipides ou des carbohydrates aboutit à la formation d'acétyl-CoA qui va entrer dans le cycle de Krebs et fournir des substrats pour la chaîne respiratoire (NADH et FADH₂). L'oxydation de ces substrats au niveau du complexe I et II provoque un transfert d'électron le long de la chaîne respiratoire jusqu'à l'accepteur final : l'oxygène associé à une expulsion de protons dans l'espace intermembranaire. Lorsque l'apport d'électron à la chaîne est élevé, ou lorsque le flux de ceux-ci est partiellement bloqué, les électrons « s'échappent » de la chaîne respiratoire pour former un anion superoxyde. La production de ROS mitochondriale s'effectue au niveau du complexe I et III de la chaîne respiratoire.

Chez des patients atteints de NASH, l'augmentation de la β-oxydation mitochondriale augmente la formation de NADH et FADH₂ (Sanyal, Campbell-Sargent et al. 2001 ; Miele, Grieco et al. 2003), et donc l'apport d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire. En parallèle, la diminution de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire (Perez-Carreras, Del Hoyo et al. 2003) bloque partiellement le flux d'électrons à travers celle-ci. Le déséquilibre entre « l'entrée » et « la sortie » des électrons au niveau de la chaîne pourrait causer l'accumulation de ceux-ci au niveau du complexe I et du complexe III de la chaîne respiratoire (St-Pierre, Buckingham et al. 2002) qui sont les deux sites de production de ROS au niveau de la mitochondrie (Jezek and Hlavata 2005) (figure I.10). Cela est appuyé par plusieurs études qui ont démontré une augmentation de la formation de ROS par les mitochondries de souris génétiquement obèses *ob/ob* (Yang, Zhu et al. 2000), ou chez des rats

recevant un régime carencé en choline (Hensley, Kotake et al. 2000), qui sont deux modèles de stéatohépatite.

Les ROS peuvent endommager directement les polypeptides de la chaîne respiratoire, ce qui induit un blocage du flux d'électron au niveau de celle-ci. Ils peuvent également oxyder les acides gras insaturés cytoplasmiques, résultant de l'accumulation de ceux-ci au niveau du foie, et les cardiolipines présents au niveau de la membrane mitochondriale, provoquant ainsi la libération de produits réactifs issus de la peroxydation lipidique qui sont connus pour inactiver la cytochrome c oxydase (Chen, Schenker et al. 1998; Chen, Petersen et al. 2000).

Les ROS, mais aussi les produits de la peroxydation lipidique peuvent dégrader l'ADN mitochondrial. Or, les lésions de type oxydation, mutation ou déplétion de l'ADN mitochondrial pourraient perturber la synthèse des polypeptides des différents complexes de la chaîne respiratoire (Haque 2002 ; Gao, Wei et al. 2004). Ceci qui pourrait également bloquer le flux d'électron au niveau de la chaîne respiratoire et donc augmenter la production de ROS. De plus, ces lésions de l'ADN pourraient être maintenues par un manque de système de réparation. En effet, la diminution du potentiel de membrane, résultant de la diminution de l'activité des enzymes de la chaîne respiratoire, empêche l'importation dans la mitochondrie d'enzymes de réparation de l'ADN. Cette diminution des systèmes réparateurs a été observée chez des modèles animaux de stéatohépatite (Gao, Wei et al. 2004). Il a également été observé une déplétion des systèmes antioxydants, comme la vitamine E, lors de NASH, ce qui pourrait potentialiser encore plus les effets délétères des ROS (Strauss 1999).

En augmentant la production de ROS les mitochondries hépatiques contribuent à l'induction de lésions associées à une NASH. En effet, les ROS stimulent l'expression de plusieurs cytokines comme $TGF\beta$, $Il-8$, $TNF\alpha$ et Fas ligand. Les ROS participent également à l'induction de la peroxydation lipidique qui libère des composés aldéhydes biologiquement très réactifs, comme le MDA et le HNE (Pessayre, Berson et al. 2001). L'association des cytokines et des produits de la peroxydation lipidique pourrait donc déclencher les diverses lésions observées dans les cas de NASH (Pessayre, Fromenty et al. 2004).

2.1.2 Acides gras et peroxydation lipidique

Bien que les effets délétères d'une stéatose ne soient pas complètement compris, de nombreuses évidences suggèrent que l'association de lipides oxydables, c'est-à-dire avec des insaturations, et de ROS aboutisse à la peroxydation de ces lipides, générant ainsi des aldéhydes hautement réactifs comme le MDA (malondialdéhyde) de 4-HNE (4-hydroxynonénal). En condition « basale », les hépatocytes produisent des ROS principalement au niveau de la mitochondrie, mais également lors de la β -oxydation peroxysomale, au niveau des cytochrome P450 des microsomes ou dans d'autre types cellulaire au niveau de la NADPH oxydase des cellules de Kupffer (Kono, Rusyn et al. 2000). Lors d'une NASH, cette production de ROS est fortement augmentée au niveau de tous ces sites (discuté plus loin dans le manuscrit). Les ROS vont interagir avec les lipides insaturés accumulés

au niveau du foie et les oxyder, causant ainsi une augmentation de la peroxydation lipidique (Pessayre, Mansouri et al. 2002). Cela est appuyé par une étude menée par Letteron et collaborateurs (Letteron, Fromenty et al. 1996), dans laquelle différents traitements induisant une stéatose ont été donnés à des souris. Dans tous ces traitements, une augmentation des TBARS (thiobarbituric acid reactan) hépatiques, qui sont les produits finaux de la peroxydation lipidique, est observée. Une augmentation de la quantité d'éthane exhalé, qui est un indice *in vivo* de la peroxydation lipidique, est également observée. Une augmentation de la peroxydation lipidique est également mesurée chez des animaux recevant un régime carencé en choline et méthionine (Leclercq, Farrell et al. 2000) et chez des patients ayant une NASH (Sanyal, Campbell-Sargent et al. 2001).

Cette peroxydation lipidique excessive des hépatocytes induit une production accrue de MDA et HNE qui vont causer des lésions notamment au niveau mitochondrial en raison de leur forte réactivité. Tout d'abord, les composés de la peroxydation lipidique peuvent causer des dommages au niveau du génome mitochondrial (Hruszkewycz 1988 ; Hruszkewycz and Bergtold 1990 ; Demeilliers, Maisonneuve et al. 2002). Or, 13 des polypeptides des complexes de la chaîne respiratoire sont codés par le génome mitochondrial. Les dommages causés sur l'ADN mitochondrial par la peroxydation lipidique peuvent donc induire de manière indirecte un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire. Parallèlement à cela, le MDA et le 4-HNE peuvent attaquer directement les complexes de la chaîne respiratoire comme la cytochrome c oxydase (Chen, Schenker et al. 1998 ; Chen, Petersen et al. 2000), ce qui peut également perturber le fonctionnement de la chaîne (Pessayre, Berson et al. 2001). Les ROS et la peroxydation lipidique peuvent également induire des altérations de la structure mitochondriale et provoquer la formation de mégamitochondrie (Matsuhashi, Liu et al. 1996 ; Wakabayashi 2002). Ces altérations structurales sont observées chez les patients atteints de NASH, avec la présence d'inclusions cristallines dans les mégamitochondries (Sanyal, Campbell-Sargent et al. 2001). Enfin, il a été montré un effet activateur de certains produits de la peroxydation lipidique sur le pore de transition de perméabilité (PTP), pouvant aboutir à la mort cellulaire (Kristal, Park et al. 1996).

Il apparaît donc ici que la peroxydation lipidique induit un dysfonctionnement mitochondrial. Cela aboutit à une augmentation de la production de ROS et provoque des dommages au niveau de la chaîne respiratoire. Ces modifications vont à leur tour induire une augmentation de la production de ROS formant ainsi un cercle vicieux entre peroxydation lipidique et production de ROS.

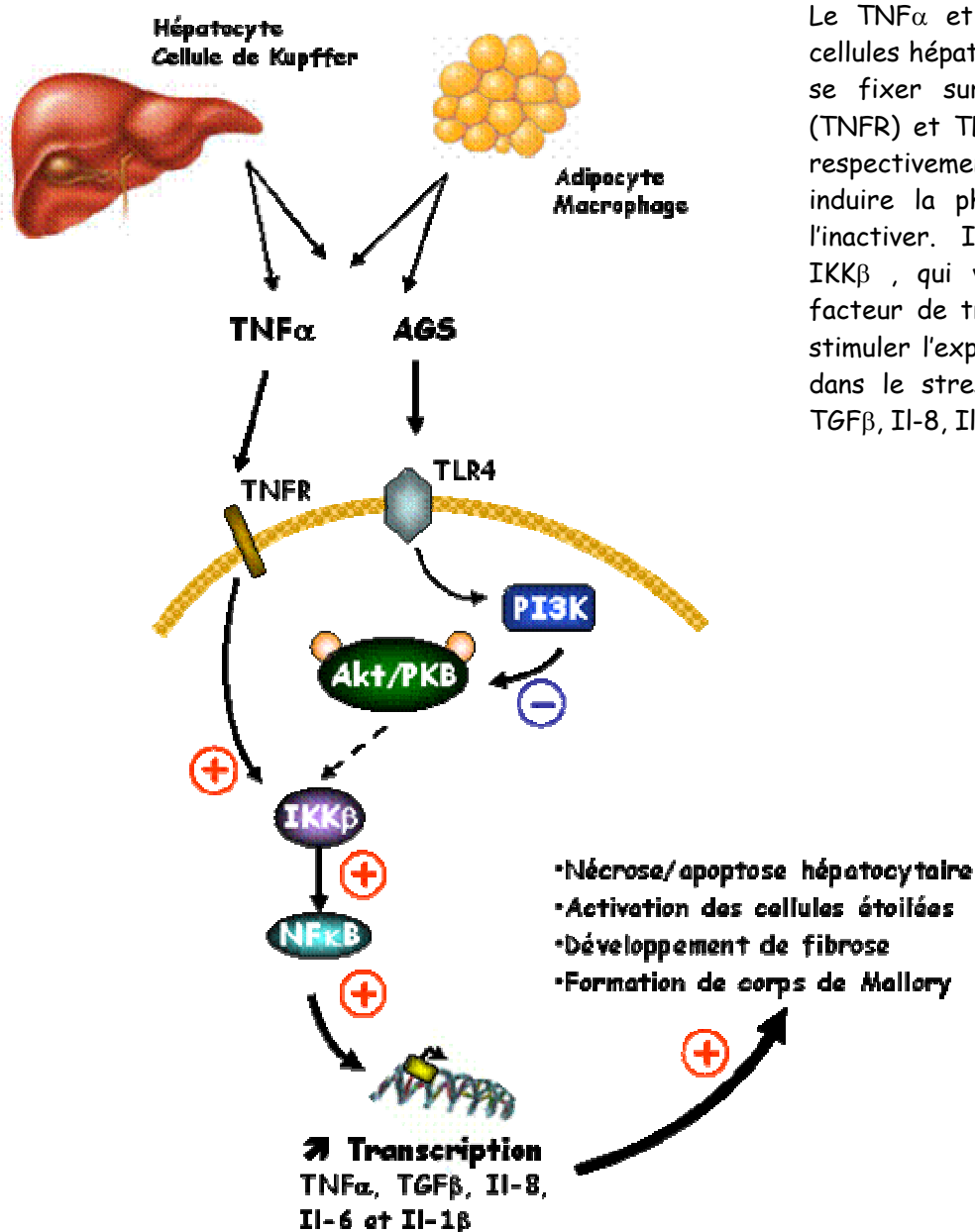
2.1.3 TNF α et autres cytokines

Un autre facteur important pouvant participer au stress oxydant est le TNF α . Il existe de nombreuses évidences supportant l'implication de cette cytokine dans la pathogenèse de la NASH (Tilg and Diehl 2000; Crespo, Cayon et al. 2001). En effet, une concentration élevée en TNF α plasmatique a été observée chez des patients atteints de NASH (Hotamisligil, Arner et al. 1995 ; Miyazaki, Pipek et al. 2003; Perez-Carreras, Del Hoyo et al. 2003 ; Hui, Hodge et al. 2004),

concentration clairement corrélée avec la réduction de l'activité de la chaîne respiratoire (Sanchez-Alcazar, Schneider et al. 2000 ; Perez-Carreras, Del Hoyo et al. 2003). Chez des souris ob/ob, la concentration de $\text{TNF}\alpha$ au niveau du tissu hépatique est 20 fois plus élevée que chez des animaux contrôles (Garcia-Ruiz, Rodriguez-Juan et al. 2006). De plus, des études effectuées sur des cellules traitées avec du $\text{TNF}\alpha$ ont montrées une augmentation de la production de ROS par celle-ci, ainsi qu'une diminution de l'ARNm codant pour certaines sous unités de l'ATPase et de la cytochrome c oxydase (Sanchez-Alcazar, Schneider et al. 2003). Des modifications morphologiques des mitochondries ont également été observées. Après 8h d'incubation en présence de $\text{TNF}\alpha$, les mitochondries gonflent, deviennent arrondies, perdent leur crêtes et rompent leur membrane externe (Sanchez-Alcazar, Schneider et al. 2000).

La provenance du $\text{TNF}\alpha$ mesuré au niveau hépatique n'est pas unique. Le tissu adipeux, aussi bien que les hépatocytes ou les cellules de Kupffer sont en effet capables de produire cette cytokine (Kern, Saghizadeh et al. 1995; Crespo, Cayon et al. 2001 ; Sanyal 2005). Le tissu adipeux abdominal pourrait être un site majeur de production de $\text{TNF}\alpha$. Chez des sujets obèses, leur tissu adipeux est largement infiltré par des macrophages (Weisberg, McCann et al. 2003 ; Bouloumie, Curat et al. 2005), qui, comme les adipocytes, peuvent sécréter du $\text{TNF}\alpha$ (Wellen and Hotamisligil 2003). De plus, les acides gras libérés pendant la lipolyse du tissu adipeux abdominal, peuvent induire eux-mêmes l'expression du $\text{TNF}\alpha$ au niveau adipocytaire (Nguyen, Satoh et al. 2005), mais aussi au niveau hépatocytaire (Feldstein, Werneburg et al. 2004). Il a été suggéré que les acides gras activeraient ces mécanismes inflammatoires en se fixant sur un récepteur TLR4 (Toll-like receptor 4), qui est un récepteur aux endotoxines bactériennes (Lee, Ye et al. 2003; Lee, Zhao et al. 2004). Il a donc été suggéré que la fixation des acides gras saturés sur le récepteur induit une phosphorylation transitoire de Akt. Cette inactivation de PI3K ou de Akt aboutit à l'activation de $\text{IKK}\beta$ et $\text{NF}\kappa\text{B}$ (Cai, Yuan et al. 2005). Ces facteurs de transcription vont alors activer l'expression de gènes du $\text{TNF}\alpha$, $\text{TGF}\beta$, IL-8 , IL-6 et $\text{IL-1}\beta$ entre autres (figure I.11). Tous ces facteurs sont ensuite impliqués dans les modifications histologiques observées lors des NAFLD, comme la nécrose/apoptose hépatocytaire, l'activation des cellules étoilées, le développement de fibrose ou la formation de corps de Mallory.

Figure I.11 : Schéma simplifié de l'activation des gènes par le $TNF\alpha$ et les AGS lors d'un stress oxydant



Il apparaît que beaucoup des perturbations observées dans les cas de NAFLD, comme les dysfonctions mitochondriales pourraient, au moins en partie, être expliquées par les effets biologiques du $TNF\alpha$.

2.1.4 Autres sources de stress oxydant

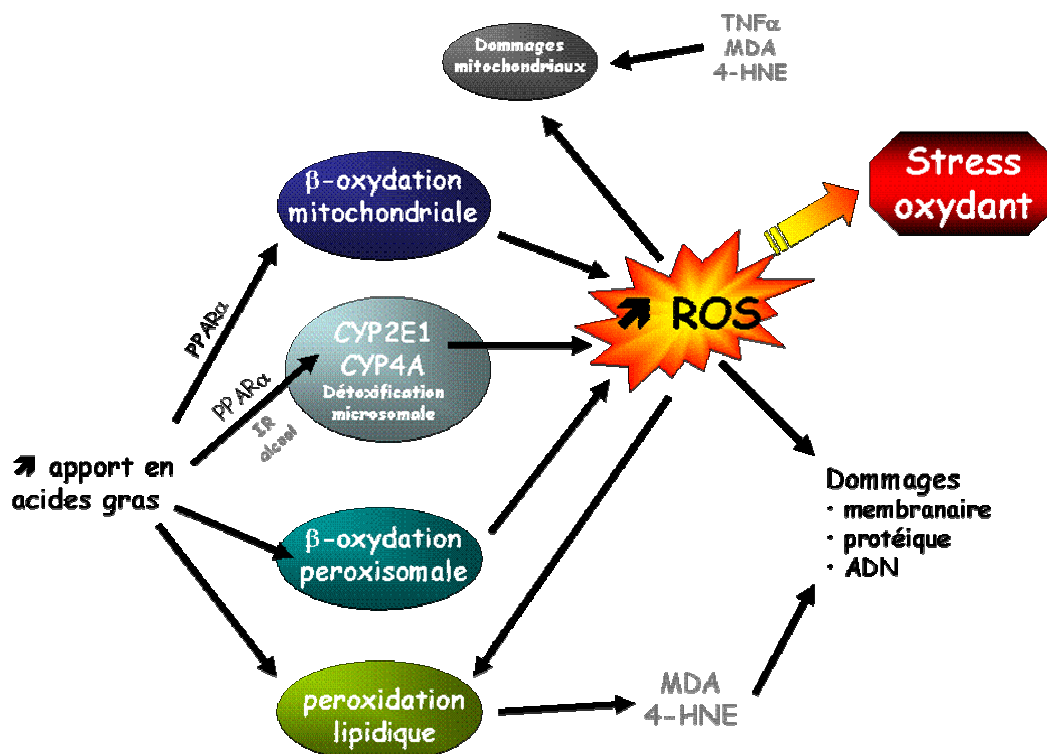
Les cytochromes P450 présents dans les microsomes participent également à l'induction des modifications observées lors de NAFLD, notamment en augmentant la production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Deux enzymes sont impliqués dans le métabolisme des acides gras à chaîne

longue (lipo-oxygénation) : le CYP2E1 et le CYP4A. Le CYP2E1 hépatique augmente avec le jeûne, le diabète, l'obésité et l'insulinorésistance. Il est impliqué dans l'initiation du stress oxydant dans les cas de foies stéatosiques et est associé au phénomène de peroxydation lipidique (Enriquez, Leclercq et al. 1999 ; Leclercq, Farrell et al. 2000; Leclercq, Field et al. 2000). En effet, le CYP2E1 possède une grande affinité pour les électrons et forme de ce fait facilement des ROS. Ces ROS vont interagir avec les insaturations des acides gras à chaînes longues et initier ainsi le processus de peroxydation lipidique (Ekstrom and Ingelman-Sundberg 1989 ; Lieber 1997). Le CYP4A est contrôlé par le facteur de transcription PPAR α (Robertson, Leclercq et al. 2001; Day 2002) et est impliqué dans le métabolisme lipidique intracellulaire, plus particulièrement dans l'oxydation des acides gras à chaînes longues et très longues. Cette oxydation produit des acides dicarboxyliques qui seront ensuite oxydés par la β -oxydation peroxysomale. De ce fait, il a été montré qu'un défaut au niveau de PPAR α ou au niveau de la voie de l'oxydation peroxysomale pouvait jouer un rôle très important dans le développement de la stéatohépatite (Reddy 2001).

Dans le contexte d'une stéatose hépatique, les cytochromes CYP2E1 et CYP4A, impliqués dans ω -oxydation des acides gras, peuvent tous les deux générer le « second hit », plus particulièrement lorsque les réserves antioxydantes sont déplétées (Robertson, Leclercq et al. 2001). Il a été récemment démontré une surexpression du CYP2E1 dans le foie de patients ayant une NASH (Weltman, Farrell et al. 1998 ; Chalasani, Gorski et al. 2003), ainsi que chez la souris recevant un régime enrichi en lipides et carencé en choline et méthionine (Weltman, Farrell et al. 1996; Leclercq, Field et al. 2000). Il est donc probable que le CYP2E1 joue un rôle dans le « turn over » des acides gras hépatiques, même si quantitativement cette voie est moins importante que la β -oxydation mitochondriale et peroxysomale (Fong, Nehra et al. 2000).

L'hyperinsulinémie induit la stimulation de l'oxydation lipidique au niveau de la β -oxydation mitochondriale mais également au niveau peroxisomale et microsomale. Il en résulte une prolifération peroxysomale et une augmentation de la production de peroxyde d'hydrogène, ce qui active la peroxydation lipidique et participe à la transformation de la stéatose en stéatohépatite (Hashimoto, Fujita et al. 1999).

Figure I.12: schéma simplifié des voies d'induction du stress oxydant par les acides gras dans des hépatocytes (d'après (Te Sligte, Bourass et al. 2004)).



Lors d'une augmentation des apports en acides gras, plusieurs voies vont être activées afin de les oxyder. La β -oxydation des acides gras s'effectue principalement au niveau de la mitochondrie, et produit des ROS, qui vont provoquer des dommages au niveau de celle-ci et, dans un second temps inhiber la β -oxydation. Ces acides gras vont également induire l'expression des cytochromes microsomaux (CYP2E1 et CYP4A) provoquant également la production de ROS. Ils vont également subir la β -oxydation peroxysomale, et produire du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Enfin l'augmentation de production des ROS, associée à une forte concentration d'acides gras, va induire une peroxydation lipidique et aboutir à la formation de composés réactifs : le MDA (malondialdéhyde) et 4-HNE (4-hydroxynonénal), qui vont par la suite provoquer des dommages au niveau membranaire, protéique et de l'ADN.

Comme cela vient d'être présenté, les mécanismes impliqués dans l'induction d'un stress oxydant sont multiples. Ils résultent principalement des différentes voies d'oxydation des lipides (mitochondrie, peroxysome, microsome), qui sont stimulées lors de la NASH. La stimulation de ces voies d'oxydation induit une augmentation de la production de radicaux libres de l'oxygène (ROS). Ces ROS vont interagir avec les acides gras présents en grande quantité au niveau du foie et provoquer la formation d'aldéhydes très réactifs (MDA et 4-HNE) par un processus de peroxydation lipidique (figure I.12).

Ainsi, l'augmentation de la production de ROS et de composés peroxydés est responsable de l'induction d'un stress oxydant au niveau hépatique, provoquant les lésions caractéristiques observées chez des patients atteints de NASH. La production accrue de ROS, associée à une insulino-résistance et à un taux de $TNF\alpha$ élevé, sont les composantes majeures du stress oxydant déclenchant le « second hit » entraînant l'évolution de la stéatose en stéatohépatite.

Nous avons vu précédemment que la stéatose hépatique résultent d'une hyperglycémie et une hyperinsulinémie (Shepherd and Kahn 1999), ainsi que d'une augmentation de la libération d'AGL et de $TNF\alpha$ par le tissu adipeux dans la circulation sanguine. L'augmentation de l'oxydation de ces acides gras hépatiques peut provoquer une synthèse de ROS et une peroxydation lipidique accrues, participant ainsi à l'induction d'un stress oxydant. Les acteurs de ce stress oxydant étant des composés très réactifs, ils vont fortement interagir avec les membranes, les protéines ou l'ADN, provoquant ainsi les lésions caractéristiques observées lors d'une NASH (dysfonction mitochondriale, inflammation), pouvant aller jusqu'à un phénomène de mort cellulaire ou d'hépatocarcinome.

2.2 Lésions hépatiques

2.2.1 Au niveau de la mitochondrie

De multiples études ont montré que les mitochondries de patients atteints de NASH présentent des anomalies à la fois morphologiques et fonctionnelles. Les mitochondries de ces patients sont plus grosses, gonflées et ont des inclusions paracristallines (Caldwell, Swerdlow et al. 1999; Sanyal, Campbell-Sargent et al. 2001). Toutes ces observations suggèrent une altération de la fonction, aussi bien que de la morphologie mitochondriale chez les patients atteints de NASH. Les informations disponibles sur la fonction de l'oxydation phosphorylante et de la chaîne respiratoire chez les patients atteints de NASH sont très limitées. Caldwell et al. (Caldwell, Swerdlow et al. 1999) ont trouvé une activité normale des complexes I et III de la chaîne respiratoire de mitochondries de plaquettes de patients atteints de NASH. Une autre étude a mesuré directement l'activité des toutes les enzymes de la chaîne respiratoire sur une biopsie de foie de patients (Perez-Carreras, Del Hoyo et al. 2003), et montre une diminution d'activité de 30 à 50% en comparaison à des patients sains. Ce défaut d'activité touche tous les complexes, qu'ils soient en partie codés par de l'ADN mitochondrial (complexes I, III, IV, V) ou uniquement par de l'ADN nucléaire (complexe II). Cela appuie donc les résultats obtenus par l'équipe de Cortez-Pinto qui avait montré une incapacité de re-synthèse d'ATP de patients ayant une NASH, après une charge de fructose (qui déplete de manière transitoire l'ATP hépatique) (Cortez-Pinto, Chatham et al. 1999).

2.2.2 Mécanismes inflammatoires

Comme décrit précédemment, la production de ROS mitochondriale au niveau hépatique contribue à l'expression de certaines cytokines, ainsi qu'à la peroxydation lipidique. Le $TGF\beta$, l'IL-8 et le HNE sont des molécules chemo-attractives pour les neutrophiles humains, ce qui peut expliquer en partie les infiltrations de neutrophiles observées dans une NASH (Pessayre, Berson et al. 2001). Le $TGF\beta$ induit également les transglutaminase tissulaires qui lient la cytokératine, l'ubiquitine, une protéine se liant à divers éléments insolubles du cytosquelette, et un élément de haut poids moléculaire et pourrait ainsi participer à la formation de corps de Mallory (Fukuda, Xie et al. 1991 ;

Fukuda, Kojiro et al. 1993), qui sont formés par un agrégat de protéines cytosquelettiques (Pessayre, Berson et al. 2001).

2.2.3 Mort cellulaire

En condition normale, les hépatocytes expriment le récepteur Fas à leur surface, mais pas son ligand (Fas-ligand), évitant ainsi la destruction de celui-ci par les cellules environnantes. Cependant, une augmentation de l'expression de Fas-ligand a été mesurée chez des patients présentant une NASH (Feldstein, Canbay et al. 2003) et sur des hépatocytes de souris gorgés de lipides (Feldstein, Canbay et al. 2003). Dans ces conditions, Fas-ligand peut interagir avec le récepteur Fas d'un autre hépatocyte, aboutissant à sa mort par apoptose. Nous avons vu précédemment que la production de $TNF\alpha$ dans les cas de NASH était augmentée. Or l'interaction de Fas et Fas-ligand, ainsi que de $TNF\alpha$ avec son récepteur, vont activer la voie des caspases, qui après une cascade de réaction induit une augmentation de la perméabilité des membranes externe et interne mitochondriale, aboutissant à la mort de la cellule. L'apoptose est un mécanisme important de mort cellulaire observé chez des patients ayant une NASH (Feldstein, Canbay et al. 2003).

2.2.4 Fibrose

La fibrose hépatique résulte de l'activation des cellules de Kupffer et des cellules étoilées. Après avoir phagocyté les corps apoptotiques, les deux types de cellules libèrent du $TGF\beta$, qui active les cellules étoilées qui vont se transformer en cellules de type fibroblastique produisant du collagène (Fadok, Bratton et al. 1998 ; Canbay, Taimr et al. 2003). Les produits de la peroxydation lipidique peuvent également activer la fibrogenèse via deux mécanismes. Ils vont favoriser la production de $TGF\beta$ par les macrophages (Leonarduzzi, Scavazza et al. 1997), et ils vont directement provoquer la production de collagène par les cellules étoilées (Parola, Pinzani et al. 1993). Comme le $TGF\beta$, la leptine produite par les adipocytes « engorgés de lipides », peut activer la fibrogenèse soit en agissant sur les cellules de Kupffer et les cellules étoilées (Ikejima, Takei et al. 2002; Saxena, Ikeda et al. 2002; Tang, Potter et al. 2002), soit en augmentant directement la production de collagène par les cellules étoilées (Saxena, Ikeda et al. 2002).

2.2.5 Hépatocarcinome

Le fort taux d'apoptose observé chez les sujets NASH requière une augmentation de la prolifération cellulaire afin de compenser les pertes et maintenir la masse de leur foie constante. Or, on a vu précédemment que chez les patients ayant une NASH, les ROS et les produits de la peroxydation lipidique induisent des dommages au niveau de l'ADN. La combinaison d'une augmentation de la prolifération cellulaire avec des dégâts de l'ADN va causer de nombreuses mutations. Ces mutations vont s'accumuler au cours du temps, et aboutir à une résistance de la

cellule à l'induction de l'apoptose, échappant ainsi au contrôle du cycle cellulaire pour finalement favoriser le développement d'une lignée cellulaire maligne.

IV. Traitement de la stéatose hépatique

Il n'y a, à ce jour, aucun traitement établi pour les NAFLD ou la NASH, même si une perte de poids et une alimentation pauvre en calories, en lipides et en sucres sont recommandées. La plupart des traitements ont été étudiés sur des patients souffrant de NASH, cette pathologie pouvant potentiellement évoluer vers de la fibrose et une cirrhose. Une amélioration des transaminases et de l'histologie a été démontrée après un régime spécifique et/ou une perte de poids, un traitement avec de l'acide ursodéoxycholique (UDCA), de la vitamine E, de la bétaine, des fibrates, de la metformine et des thiazolidinédiones (TZD) (Neuschwander-Tetri and Caldwell 2003). Les traitements basés sur une perte de poids, la metformine ou les TZD sont issus de l'association des NAFLD à l'obésité et l'insulinorésistance, et sur le postulat que l'insulinorésistance est la cause de la stéatose hépatique.

1. Modification du style de vie

Un changement de style de vie constitue le principal traitement disponible de la NASH. Une diminution de la masse corporelle de 10% est réalisable par les patients, et permet une réduction des transaminases (Park, Kim et al. 1995 ; Ueno, Sugawara et al. 1997 ; Tremblay 1999 ; Youssef and McCullough 2002 ; Suzuki, Lindor et al. 2005), ainsi qu'une diminution du contenu en lipides du foie (Ueno, Sugawara et al. 1997 ; Angulo and Lindor 2002). Une étude de un an menée sur 15 sujets atteints de NASH, qui ont perdu en moyenne 3 kg, a montré une amélioration histologique chez 9 d'entre eux et une stabilité de celle-ci chez 6. Les patients présentant une amélioration de leur histologie, et ayant amélioré leurs transaminases et diminué leur stéatose sont également ceux qui ont perdu le plus de poids (Huang, Greenston et al. 2005). Il a également été mesuré une diminution des lipides hépatiques en réponse à une perte de poids chez des femmes obèses (Tiikkainen, Bergholm et al. 2003) et chez des patients ayant un diabète de type II (Tiikkainen, Hakkinen et al. 2004). Cependant, même si une perte de poids semble bénéfique, si celle-ci est trop rapide (>1kg/semaine), comme après une gastroplastie, elle est associée à une augmentation des lésions inflammatoires d'hépatite, en dépit d'une réduction de la stéatose hépatique (Luyckx, Desai et al. 1998). Les mécanismes permettant une diminution de la stéatose hépatique, suite à une perte de poids, reste encore mal connus. Cependant il semblerait que la diminution de l'ingestion de lipides et la diminution de l'insulinorésistance jouent un rôle primordial.

2. L'exercice

L'exercice peut être bénéfique pour les patients atteints de NASH, même en absence de perte de poids (Kugelman, Hill et al. 2003; Neuschwander-Tetri and Caldwell 2003). En effet, l'activité physique améliore la sensibilité à l'insuline des muscles et du tissu adipeux, en augmentant l'activité de l'AMPK (Musi, Yu et al. 2003 ; Ruderman, Park et al. 2003), ce qui induit une augmentation de l'oxydation lipidique tant au niveau des muscle, que du tissu adipeux et du foie (Park, Kaushik et al. 2002; Ruderman, Park et al. 2003).

3. La metformine

La metformine est un biguanide qui est utilisé largement dans les traitements des patients ayant un diabète de type II (Knowler, Barrett-Connor et al. 2002). Elle a une action anti-hyperglycémique et permet une diminution de la concentration de glucose plasmatique en réduisant la production de glucose hépatique via l'activation de l'AMPK (Zhou, Myers et al. 2001). L'activation de cette enzyme au niveau du foie fait basculer l'homéostasie lipidique vers une diminution de la synthèse de lipides et une augmentation de leur oxydation (Zhou, Myers et al. 2001) ruderman 2004 ; Winder, 1999). La metformine favorise également une perte de poids. Un traitement à la metformine de 4 semaines sur des souris ob/ob, qui ne synthétisent pas de leptine, conduit à une disparition de la stéatose hépatique (Lin, Yang et al. 2000).

Des études menées chez l'homme ont donné des résultats prometteurs. Dans l'une, le traitement à la metformine de sujets atteints de NAFLD, a induit une diminution précoce des enzymes hépatiques, ainsi qu'une amélioration de la sensibilité à l'insuline (Nair, Diehl et al. 2004). Cependant, après 3 mois de traitement les enzymes hépatiques ont graduellement remonté pour retrouver le même niveau qu'avant le traitement. Une autre étude sur patients atteints de NASH a montré une amélioration de la sensibilité à l'insuline, des transaminases et une diminution du volume du foie après 4 mois de traitement (Marchesini, Brizi et al. 2001). Par ailleurs, une autre étude récente a comparé un traitement à la metformine à un traitement à la vitamine E ou à un régime alimentaire contrôlé, chez des patients non diabétiques atteints de NAFLD. Une amélioration des transaminases aussi bien que de l'histologie a été observée chez ces sujets après 12 mois de traitement (Bugianesi, Gentilcore et al. 2005). Cependant, une autre étude n'a observé aucune amélioration significative de l'histologie hépatique après 6 mois de traitement à la metformine (Uygun, Kadayifci et al. 2004), mais il se pourrait que 6 mois soit une période trop courte pour détecter des changements histologiques significatifs. De plus, dans une autre étude avec des patients atteints d'un diabète de type II, un traitement de 16 semaines à la metformine améliore la sensibilité basale hépatique à l'insuline, diminue les acides gras libres et l'hémoglobine glycosylée, mais aucun changement des transaminases, ni de la stéatose, n'est observé (Tiikkainen, Hakkinen et al. 2004). Au vu de la grande

disparité des résultats, un grand nombre d'étude est encore nécessaire avant de préconiser la metformine comme traitement contre les NAFLD.

4. Les thiazolidinédiones (TZDs)

Les thiazolidinédiones sont de nouveaux agents de sensibilisation à l'insuline utilisés dans le traitement du diabète de type II. Cette famille comprend la pioglitazone, la rosiglitazone, la ciglitazone et la troglitazone, cette dernière ayant été retirée du marché en raison de nombreux cas de toxicité hépatique observés lors de son utilisation (Kohlroser, Mathai et al. 2000). Les TZDs agissent comme des ligands spécifiques de PPAR γ (Chao, Marcus-Samuels et al. 2000). De part leur action au niveau du tissu adipeux, l'utilisation des TZDs pourrait être intéressante dans le traitement de la NASH chez des patients en surpoids ou obèses (Neuschwander-Tetri, Brunt et al. 2003 ; Promrat, Lutchman et al. 2004; Tiikkainen, Hakkinen et al. 2004). Leur utilisation permet une amélioration de la sensibilité à l'insuline du foie et de l'organisme en entier (Miyazaki, Glass et al. 2001 ; Miyazaki, Mahankali et al. 2002). Cette amélioration de la sensibilité pourrait s'effectuer de manière directe et indirecte (Kim and Ahn 2004; Tiikkainen, Hakkinen et al. 2004). Les effets indirects passeraient par une diminution de la concentration plasmatique des acides gras et une augmentation de celle de l'adiponectine (Yang, Jeng et al. 2002 ; Yu, Javorschi et al. 2002 ; Phillips, Ciaraldi et al. 2003 ; Pajvani, Hawkins et al. 2004), et les effets directs induiraient l'activation de PPAR γ (Kim and Ahn 2004). Les TZD induisent également une différenciation des adipocytes en augmentant le nombre de petit adipocytes, (de Souza, Eckhardt et al. 2001), et donc la capacité de stockage lipidique des cellules adipeuses, induisant de ce fait une diminution de la concentration en acides gras circulants. Cette diminution des acides gras libres par un traitement aux TZD est relativement consistante (Gomez-Perez, Aguilar-Salinas et al. 2002; Mayerson, Hundal et al. 2002 ; Miyazaki, Mahankali et al. 2002), ce qui diminue la fourniture en AGL au foie. Par ailleurs, des études ont suggéré que l'amélioration de la sensibilité hépatique à l'insuline serait due à une activation de l'AMPK (Saha, Avilucea et al. 2004 ; Bouskila, Pajvani et al. 2005). Le mécanisme par lequel l'AMPK est activée au niveau du foie est encore mal connu, mais il pourrait être, en partie, induit par un changement de repartition du tissu adipeux. En effet, il a été montré chez l'homme que les TZD augmentent la graisse sous-cutanée tandis qu'ils diminuent la graisse abdominale (Miyazaki, Mahankali et al. 2002; Virtanen, Hallsten et al. 2003). Des études sur des patients atteints de NASH et recevant des TZD montrent une amélioration des fonctions hépatiques aussi bien qu'une régression de la stéatose hépatique (Neuschwander-Tetri, Brunt et al. 2003 ; Promrat, Lutchman et al. 2004; Sanyal, Mofrad et al. 2004). Une étude réalisée sur des individus ayant un diabète de type II montre également que la rosiglitazone entraîne jusqu'à 40% de diminution du contenu en triglycérides hépatique (Mayerson, Hundal et al. 2002). Ces observations suggèrent que les TZD pourraient avoir des effets bénéfiques sur le foie des individus ayant une stéatose hépatique.

5. Autres traitements

En plus des agents de sensibilisation à l'insuline, des thérapies cytoprotectrices ou antioxydantes ont été essayées dans des cas de NAFLD et NASH. Certaines études ont montré des résultats encourageants avec des statines (Hatzitolios, Savopoulos et al. 2004 ; Rallidis, Drakoulis et al. 2004), un traitement aux omega-3 (Hatzitolios, Savopoulos et al. 2004) et avec des fibrates (Ogawa, Murata et al. 1998 ; Basaranoglu, Acbay et al. 1999), mais ces résultats n'ont pas été confirmés sur de grandes séries. Le stress oxydant est considéré comme un des facteurs à l'origine des dommages hépatocytaires, de la fibrose et de la cirrhose lors d'une NASH, des thérapies antioxydantes ont donc été testées. La vitamine E est la molécule qui a le plus retenu l'attention des chercheurs. En effet, elle est capable de séquestrer les ROS produits par la mitochondrie (Vrablic, Albright et al. 2001) et de ce fait de prévenir les dommages de l'ADN (Mansouri, Demeilliers et al. 2001 ; Demeilliers, Maisonneuve et al. 2002). Cependant des études complémentaires sont encore nécessaires. L'acide ursodéoxycholique (UDCA) a été utilisé comme agent potentiellement cytoprotecteur chez les sujets ayant une NASH, mais les résultats obtenus restent variables. De récentes études ont montré un effet bénéfique de l'UDCA chez des patients atteints de NASH, cependant, la diminution des enzymes plasmatiques n'est pas toujours associée à une amélioration de l'histologie hépatique (Laurin, Lindor et al. 1996 ; Lindor, Kowdley et al. 2004 ; Fan, Zhong et al. 2005 ; Dufour, Oneta et al. 2006).

A ce jour, il n'existe aucun traitement réellement efficace et validé par les autorités de santé contre les NAFLD ou la NASH. L'obésité et l'insulinorésistance hépatique et périphérique étant souvent observées chez les patients déclarant une NASH, plusieurs molécules utilisées habituellement dans le traitement du surpoids ou du diabète ont été testées sur cette pathologie. Mais à la vu de la grande disparité des résultats obtenus avec ces molécules, un grand nombre d'étude est encore nécessaire avant de préconiser un traitement contre les NAFLD. Un nombre important d'autres molécules a également fait l'objet d'études (acide ursodéoxycholique, vitamine E, bétaine, fibrates ... liste non exhaustive) (tableau I.3). Mais ce ne sont encore que de petites études avec un nombre de patients restreint.

De études cliniques, mais également sur modèles animaux, sont encore nécessaires afin de comprendre les mécanismes d'induction de la NASH et de pouvoir élaborer un traitement efficace.

Tableau I.3: Traitements pouvant être proposés dans un cas de NASH (d'après (Begriche, Igoudjil et al. 2006)).

Traitement	Mécanisme d'action
Metformine	Activation de l'oxydation lipidique via l'activation de l'AMPK Diminution du $TNF\alpha$ perte de poids
TZDs	Activation de l'oxydation lipidique via l'activation de l'AMPK (via une augmentation de l'adiponectine ?) insulinosensibilité
Fibrates	Augmentation de l'expression des enzymes mitochondriales impliquées dans la β -oxydation et la cétogenèse
UDCA	Protection de la mitochondrie contre le stress oxydant et l'ouverture du PTP (effet antiapoptotique) lutte contre la toxicité hépatocytaire de certains acides biliaires (ac chenodésoxycholique)
Vitamine E	Protection de la mitochondrie contre le stress oxydant

TZDs : thiazolidinédiones

UDCA : acide ursodésoxycholique

$TNF\alpha$: tumor necrosis factor α

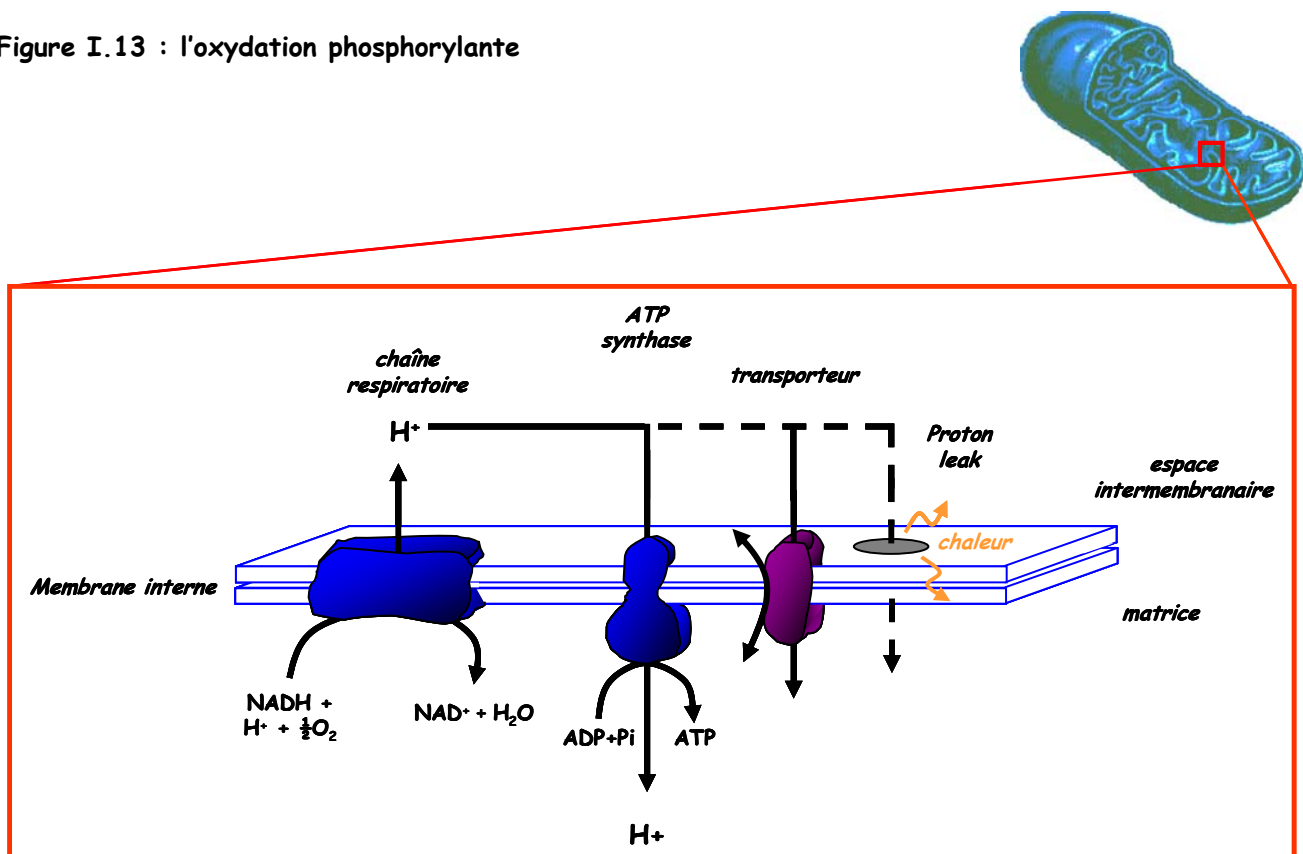
PTP : mitochondrial permeability transition pore

V. Métabolisme énergétique

1. l'oxydation phosphorylante

La mitochondrie est un organite intracellulaire qui possède deux membranes (la membrane interne et la membrane externe) qui délimitent un espace matriciel contenant notamment, les enzymes du cycle de Krebs et de la β -oxydation. La membrane interne est le siège de l'oxydation phosphorylante, en effet, elle contient les quatre complexes de la chaîne de transport des électrons et l'ATP synthase (figure I.13). Le mécanisme de couplage entre la respiration et la synthèse d'ATP a été décrit par Mitchell en 1961 (Mitchell 1961).

Figure I.13 : l'oxydation phosphorylante



La chaîne respiratoire oxyde les équivalents réduits provenant des substrats alimentaires et expulse des protons en dehors de la matrice mitochondriale. Le gradient de protons ainsi formé constitue la force protonmotrice (Δp). Cette force permet aux protons de rentrer dans la matrice mitochondriale via l'ATP synthase, ce qui permet la synthèse d'ATP. L'imperméabilité de la membrane interne n'étant pas absolue, une partie du gradient de protons est dissipée par retour passif des protons, sans passer par l'ATP synthase (leak).

La chaîne respiratoire mitochondriale oxyde les équivalents réduits provenant des nutriments, c'est-à-dire transfère leurs électrons sur l'oxygène. Ce transfert d'électrons s'accompagne d'une expulsion de protons vers l'espace intermembranaire. La membrane interne étant relativement imperméable aux protons, un gradient électrochimique se forme. Ce gradient est composé d'un potentiel de membrane électrique ($\Delta \psi$) et d'un gradient de pH (ΔpH), ce qui constitue la force protonmotrice (Δp). Ce gradient de protons est en fait une force utilisable pour la synthèse d'ATP. En effet, il permet le retour des protons dans la matrice mitochondriale via l'ATP synthase, qui au passage cèdent leur énergie, ce qui permet la synthèse d'ATP. Cet ATP synthétisé va être exporté vers le cytosol en échange d'ADP grâce à la translocase (ANT : adénine nucleotide translocator), en consommant du potentiel de membrane. La force protonmotrice permet également le transport actif d'ions et de métabolites contre leur gradient de concentration (ion phosphate, calcium, pyruvate...). L'imperméabilité de la membrane interne mitochondriale n'est pas absolue, de ce fait une partie de la force protonmotrice est consommée par un retour passif de protons à travers la membrane, sans passer par l'ATP synthase. L'énergie est alors dissipée sous forme de chaleur. Ces fuites passives de protons, appelées leak, sont responsables d'un « découplage » entre l'oxydation et la phosphorylation, puisque les protons expulsés par l'oxydation ne sont pas utilisés pour la

phosphorylation. Ce découplage provoque une diminution de la synthèse d'ATP pour une consommation d'oxygène identique ou augmentée, ce qui provoque une diminution du rendement de l'oxydation phosphorylante. Ce rendement peut être défini par le rapport de flux ATP/O, c'est-à-dire le nombre de molécules d'ATP formées en un temps donné, divisé par le nombre d'atomes d'oxygène consommés dans ce même temps.

2. Régulation de l'oxydation phosphorylante

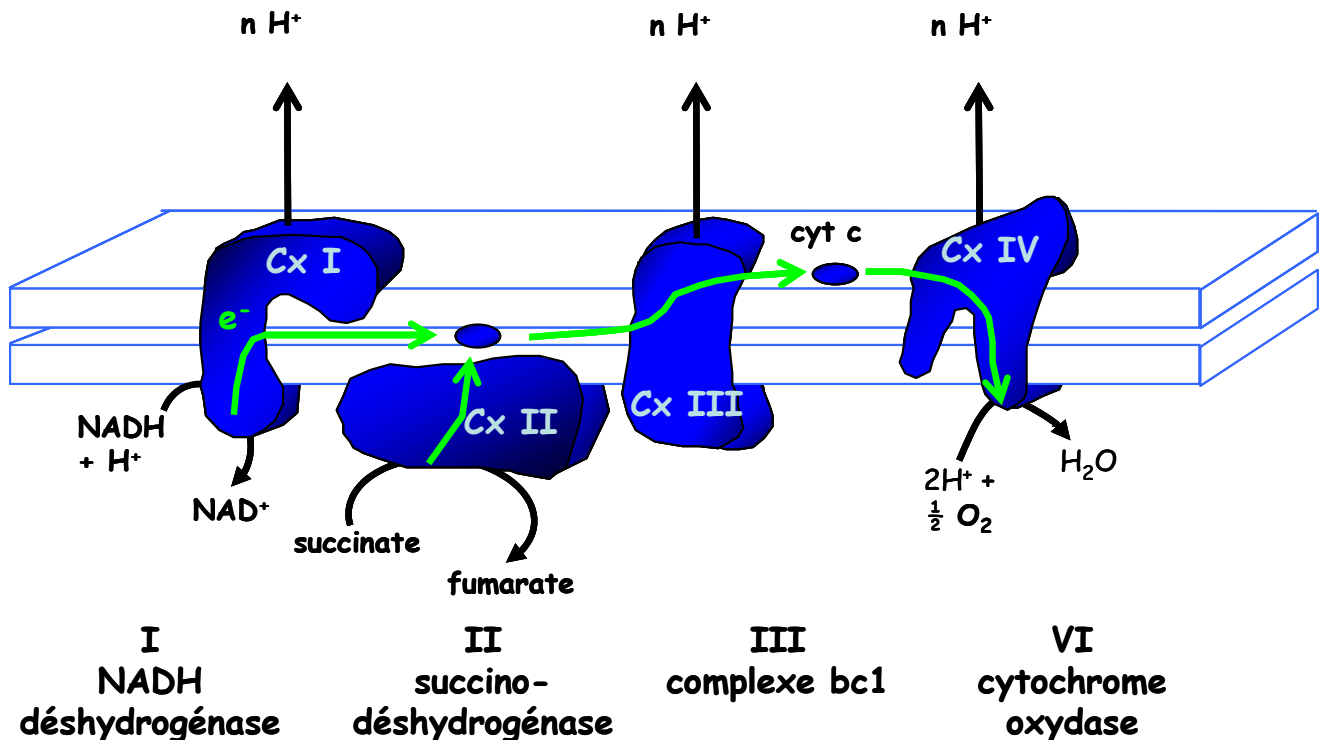
Les premières études sur les mécanismes de régulation des oxydations phosphorylantes datent des années 1950. Il avait été observé que la vitesse de respiration de mitochondries isolées de foie de rats était stimulée par l'ajout d'ADP et de Pi. L'amplitude de cette stimulation étant dépendante de la concentration en ADP et en Pi, Chance et Williams (Chance and Williams 1956) ont émis l'hypothèse selon laquelle, la respiration mitochondriale et la synthèse d'ATP étaient contrôlées cinétiquement par la disponibilité en substrats de l'ATP synthase. En d'autres termes, l'oxydation phosphorylante serait limitée par les concentrations en ADP et en Pi. À l'opposé de cette vision purement cinétique, Klingenberg (Klingenberg 1961) puis Erecinska et Wilson (Erecinska and Wilson 1982), en se basant sur des mesures thermodynamiques ont émis l'hypothèse que l'ensemble des réactions impliquées dans l'oxydation phosphorylante fonctionnait dans des conditions proches de l'équilibre thermodynamique, à l'exception toutefois de la cytochrome oxydase.

2.1 Par la nature des équivalents réduits

La chaîne respiratoire est constituée d'un ensemble de complexes multienzymatiques (figure I.14) enchâssés dans la membrane interne. Il existe trois complexes principaux expulsant les protons (complexes I, III, IV), et deux éléments complémentaires (complexe II et cytochrome c).

Si la disponibilité en ADP et Pi est un facteur important de régulation de l'oxydation phosphorylante, une part importante du contrôle de la respiration est exercée au niveau de l'apport en coenzymes réduits à la chaîne respiratoire. Une augmentation de l'apport en substrats respiratoires stimule la respiration de cellules et mitochondries isolées (Brand and Murphy 1987). Cette augmentation de la capacité de l'oxydation phosphorylante est dépendante du tissu étudié d'une part, de la nature du substrat respiratoire (pyruvate, acides aminés, corps cétoniques, acides gras...) et du potentiel redox (NADH/NAD^+) d'autre part. La majorité des expériences portant sur la régulation de l'oxydation phosphorylante dans les mitochondries isolées a été réalisée en présence de concentrations saturantes de substrats. Néanmoins, dans ces conditions le transport des substrats respiratoires, de même que l'activité des déshydrogénases peuvent exercer un contrôle significatif sur le flux respiratoire de mitochondries isolées (Groen, Sips et al. 1982; Tager, Wanders et al. 1983).

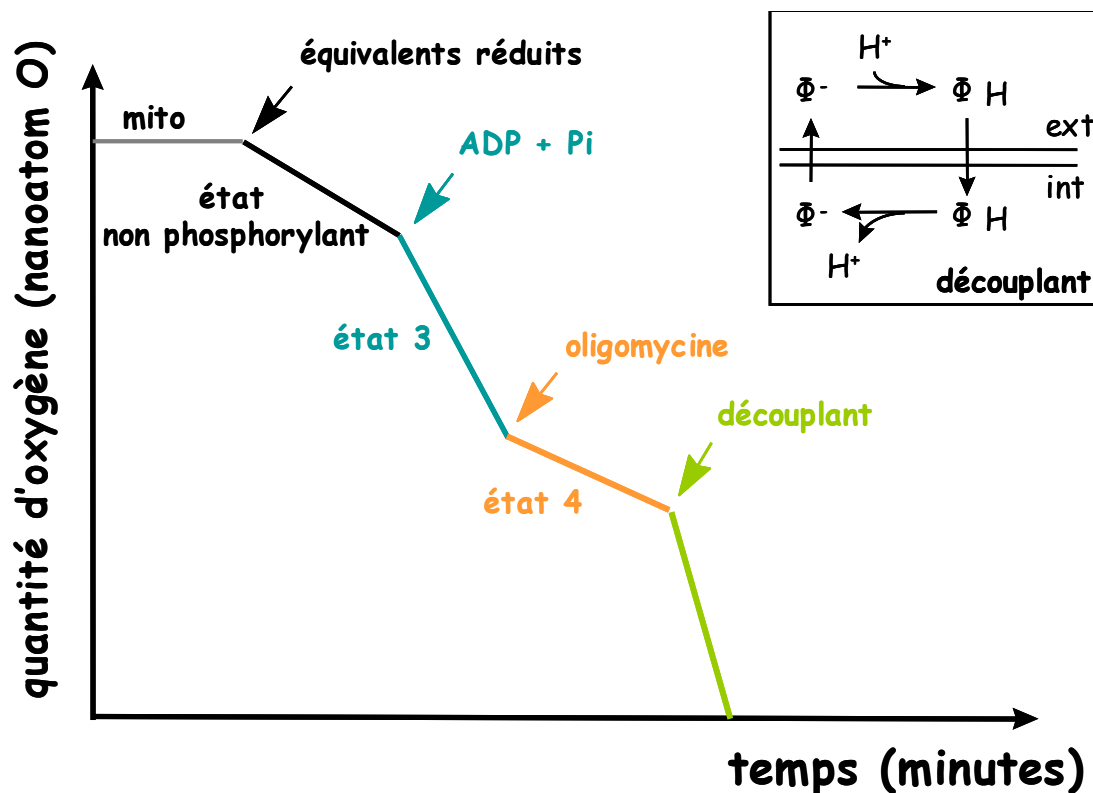
Figure I.14 : la chaîne respiratoire



Le NADH + H^+ est oxydé au niveau du complexe I avec expulsion de protons, tandis que le FADH_2 est oxydé au niveau du complexe II, sans expulser de protons. Les flèches vertes schématisent le flux d'électrons à travers les différents complexes.

Les deux coenzymes réduits qui sont oxydés au niveau de la chaîne respiratoire sont le NADH et le FADH_2 . Le NADH est oxydé au niveau du complexe I, tandis que le FADH_2 n'entre qu'au niveau du complexe II, court-circuitant le complexe I. De ce fait, en comparaison à l'utilisation du NADH, le nombre de protons expulsés lorsque la chaîne respiratoire oxyde du FADH_2 est plus faible pour une même quantité d'oxygène consommé. Le rendement, évalué par le rapport ATP/O, est donc plus faible (ATP/O NADH : 3 et FADH_2 : 2). Prenons le glucose comme exemple de substrat, il est entièrement oxydé dans le cycle de Krebs, et il en résulte la formation de 10 NADH et 2 FADH_2 , soit un ratio NADH/ FADH_2 de 5, tandis que l'oxydation d'un acide gras à 6 carbones procure 11 NADH et 5 FADH_2 soit un ratio NADH/ FADH_2 de 2. Le rendement des acides gras est donc moins bon que celui des glucides.

Figure I.15 : Respiration mitochondriale



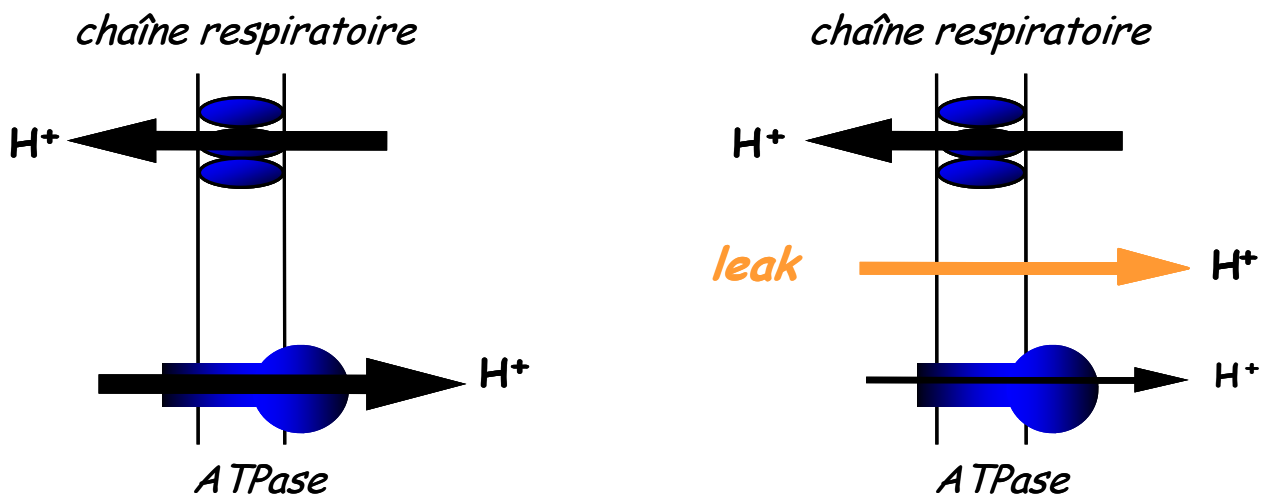
Les mitochondries sont placées dans un milieu contenant de l'oxygène. La vitesse de respiration (déterminée par la pente de la courbe) est calculée par la quantité d'oxygène consommée/minute/mg de protéines. L'état non phosphorylant est la respiration en l'absence de synthèse d'ATP. L'état 3 est la respiration en présence de synthèse d'ATP. L'état 4 est en présence d'oligomycine, un inhibiteur de l'ATP synthase. Un découplant protonophore permet le retour des protons dans la matrice mitochondriale.

Lorsque les mitochondries sont en suspension avec un substrat fournissant des équivalents réduits, par exemple du succinate qui fournit du $FADH_2$, on observe une consommation d'oxygène (figure I.15). Cette respiration en l'absence de synthèse d'ATP (appelée état non phosphorylant), sert à compenser les pertes de protons (leak et autres phénomènes dissipateurs d'énergie). L'adjonction d'ADP et de P_i stimule la respiration car la force protonmotrice diminue du fait du retour des protons dans la matrice via l'ATP synthase, permettant ainsi la synthèse d'ATP. Cette respiration en état phosphorylant est appelée état 3. L'addition d'oligomycine, un inhibiteur de l'ATP synthase, inhibe la respiration et la ramène à un niveau proche de l'état non phosphorylant, et est appelé état 4. Si on rajoute un découplant, qui rend la membrane interne perméable aux protons, la respiration est à nouveau stimulée. Le rapport des flux de respiration état 3 /état 4 est appelé contrôle respiratoire (RCR : respiratory control ratio), et diminue en cas de découplage de l'oxydation et de la phosphorylation.

2.2 Par la perméabilité membranaire (leak)

L'inhibition de l'ATP synthase par l'oligomycine n'abolit pas complètement la consommation mitochondriale d'oxygène. Cette respiration insensible à l'oligomycine est expliquée en partie par un retour passif de protons à travers la membrane mitochondriale interne vers la matrice. En effet si la force protonmotrice permet la synthèse d'ATP en générant un flux de protons au travers de l'ATP synthase, une certaine quantité de protons retourne dans la matrice sans passer par l'ATP synthase. Ce processus de fuites membranaires (leak) constitue un manque à gagner pour la synthèse d'ATP de sorte que, plus les fuites sont importantes, plus l'efficacité de l'oxydation phosphorylante diminue (figure I.16).

Figure I.16 : Perméabilité membranaire (leak)



Si la membrane était totalement imperméable aux protons (figure de gauche), tout proton sortant serait utilisé pour la synthèse d'ATP. En réalité, la membrane n'est pas totalement imperméable (figure de droite) et un certain nombre de protons traverse la membrane et retourne dans la matrice. Plus ce retour passif de protons est important, plus le rendement de l'oxydation phosphorylante diminue. Les découplants augmentent ce retour des protons à travers la membrane interne.

Ces fuites au travers de la membrane interne mitochondriale entraînent une diminution de la force protonmotrice qui est le moteur de l'ATP synthase. Ce phénomène peut être mimé par l'utilisation de découplants. En effet, ceux-ci augmentent la perméabilité aux protons de la membrane interne et diminuent la force protonmotrice, ce qui se traduit par une diminution de la synthèse d'ATP et une augmentation de la vitesse de respiration entraînant une diminution du rapport P/O (Luvisetto, Pietrobon et al. 1987).

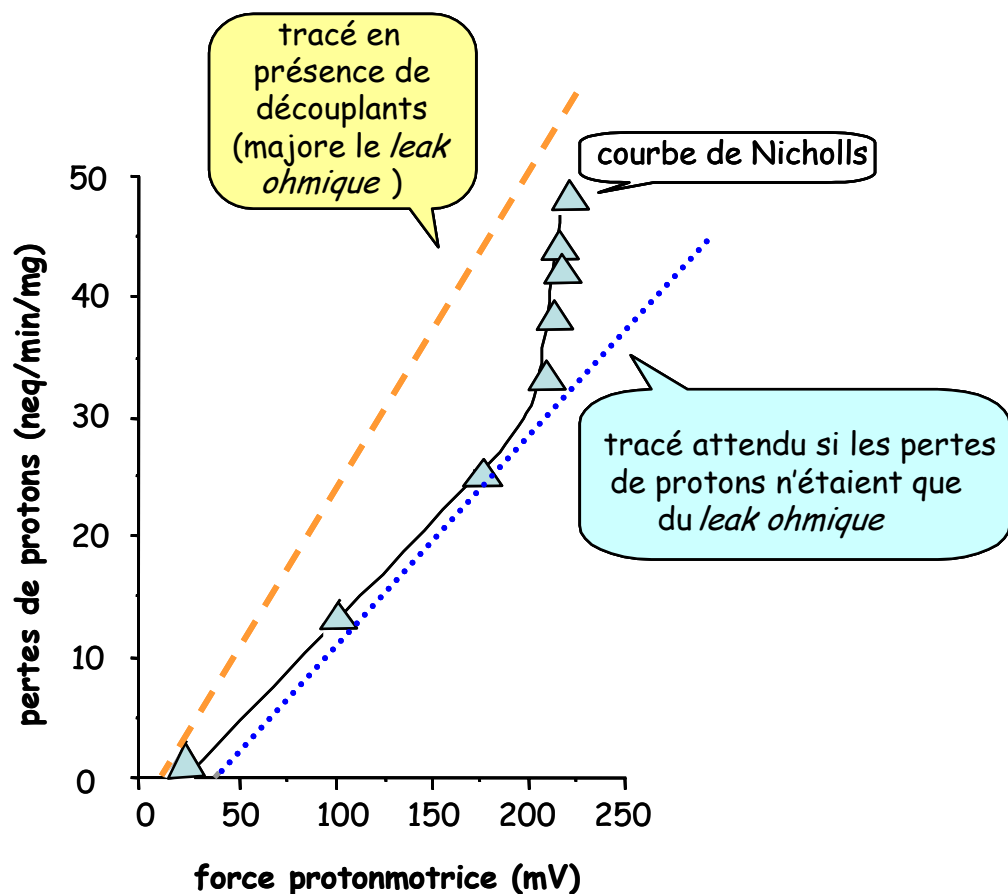
En théorie, le retour des protons à travers la membrane mitochondriale interne peut se faire selon différents modes: (i) par mouvement à travers la membrane elle-même, (ii) par mouvement à l'interface lipides/protéines membranaires, ou (iii) par transfert à travers des transporteurs spécifiques. La dernière possibilité a été démontrée par exemple dans le tissu adipeux brun, où l'UCP1 permet un retour des protons dans la matrice lorsque cette protéine découplante est activée

par le système nerveux sympathique. Néanmoins la présence de protéines découplantes au niveau des hépatocytes reste controversée. UCP2 étant exprimée dans les macrophages, il est difficile de discriminer si la protéine se trouve au niveau de ceux-ci ou au niveau des cellules parenchymateuses du foie (Mattiasson and Sullivan 2006). De manière générale, l'expression d'UCP2 est relativement faible dans des hépatocytes sains, mais il a été montré une augmentation de son expression par différents facteurs comme le stress oxydant, la stéatose (McCarty 2005) ou lors d'infection bactérienne (Cortez-Pinto, Yang et al. 1998). Brookes et coll. (25) ont étudié la perméabilité aux protons de la bicouche lipidique elle-même en utilisant un modèle de liposomes préparés à partir de phospholipides de membrane interne de mitochondries de foie. Ils ont montré qu'en appliquant un potentiel de membrane physiologique, le flux de protons à travers la bicouche lipidique représentait environ 5% du proton leak observé dans des conditions comparables avec des mitochondries isolées. Il en ressort que, lorsque l'on se trouve en conditions « basales », la fuite de protons à travers la membrane participe pour une très faible part au leak, et que la présence des protéines membranaires est nécessaire pour observer ce phénomène.

2.3 Par le patinage des pompes (slip)

Il apparaît donc que la respiration en absence de phosphorylation n'est pas totalement expliquée par le leak ohmique. En 1974, Nicholls dans un article de référence (Nicholls 1974) montre que la relation existant entre la respiration à l'état 4 et la force protonmotrice n'est pas linéaire lorsque la respiration est graduellement diminuée par l'emploi d'un inhibiteur de la chaîne respiratoire (figure I.17). Cette respiration en l'absence de synthèse d'ATP sert à compenser les pertes de protons. Or, si les pertes de protons n'étaient que du leak ohmique, ces pertes devraient être d'autant plus importantes que le gradient de protons, donc la force protonmotrice, est élevé. En traçant la relation entre la force protonmotrice et les pertes de protons (calculées à partir de la respiration oligomycine insensible), on aurait donc dû trouver une relation linéaire (figure I.17). Cela est appuyé par le fait qu'en présence de découplants protonophores, qui rendent la membrane perméable aux protons (augmentant ainsi expérimentalement le leak ohmique), la relation se linéarise (Schmehl, Luvisetto et al. 1995). Or, la courbe mesurée par Nicholls montre que lorsque la force protonmotrice est élevée la relation s'infléchit, les pertes de protons deviennent proportionnellement beaucoup plus importantes que prévu. Ce résultat a été par la suite largement confirmé dans la littérature.

Figure I.17 : Relation entre la force protonmotrice et les pertes de protons

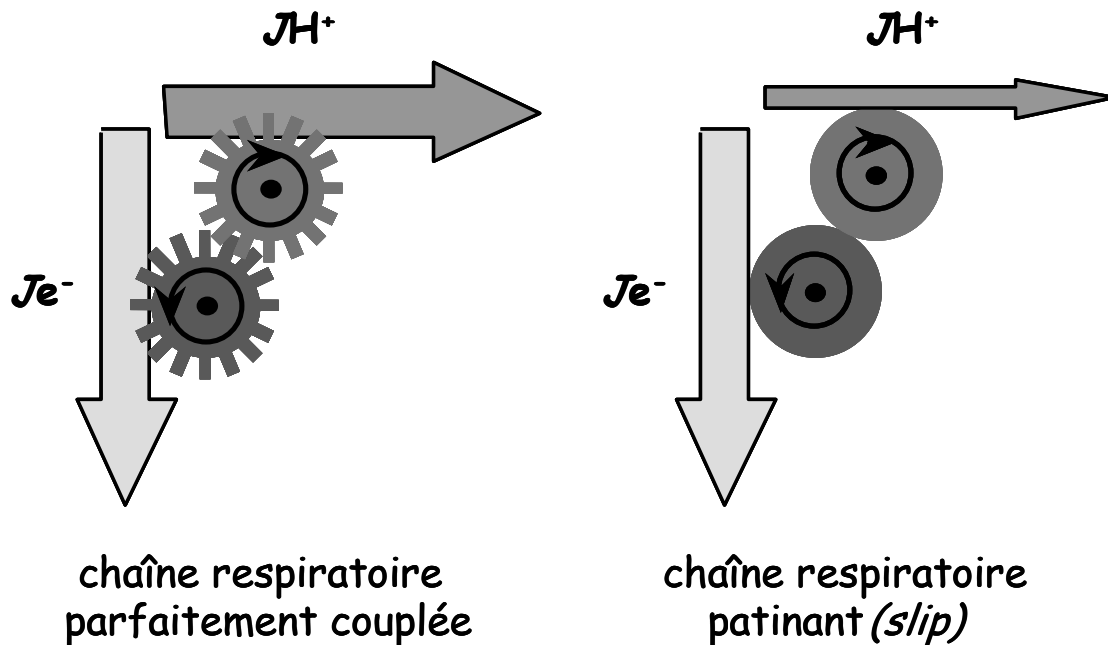


La courbe mesurée par Nicholls est tracée en noir avec les symboles (Δ). Les tracés en pointillés sont des simulations. Adapté de Nicholls DG (Nicholls 1974).

Deux hypothèses principales ont été émises pour expliquer ce phénomène : (i) une perméabilité de la membrane variable en fonction de la force protonmotrice (leak non ohmique) (Brand 1990.Brand, 1994 #170.Brown, 1989 #783), (ii) un changement de stoechiométrie (patinage ou slip) des pompes membranaires (chaîne respiratoire et/ou ATP synthase) en fonction de la force protonmotrice et/ou du flux au travers de ces pompes (Pietrobon, Azzone et al. 1981 ; Pietrobon, Zoratti et al. 1983 ; Murphy and Brand 1987 ; Papa, Capitanio et al. 1991 ; Fontaine, Devin et al. 1997 ; Rigoulet, Leverve et al. 1998). Selon l'hypothèse du leak non ohmique, la membrane mitochondriale interne ne se comporterait pas selon la loi d'Ohm, mais sa conductance serait variable et augmenterait avec la force protonmotrice. A partir d'une certaine force protonmotrice (située au point d'inflexion de la courbe de Nicholls), la membrane deviendrait brusquement plus perméable et les fuites de protons augmenteraient. Cependant, une autre hypothèse a émergé, selon laquelle les pertes de protons ne dépendent pas que de la force protonmotrice, mais aussi du flux à travers les pompes membranaires (Pietrobon, Azzone et al. 1981 ; Pietrobon, Zoratti et al. 1983 ; Fontaine, Devin et al. 1997 ; Rigoulet, Leverve et al. 1998). Des auteurs (Pietrobon, Azzone et al. 1981 ; Pietrobon, Zoratti et al. 1983 ; Fontaine, Devin et al. 1997 ; Rigoulet, Leverve et al. 1998) ont proposé un modèle de fonctionnement des pompes à protons comportant un certain degré de découplage

intrinsèque ou patinage (slip ou slipping) (figure I.18). Le slipping est une perte d'efficacité des pompes membranaires. Quand la chaîne respiratoire patine, moins de protons sortent pour le même flux d'oxydation des équivalents réduits.

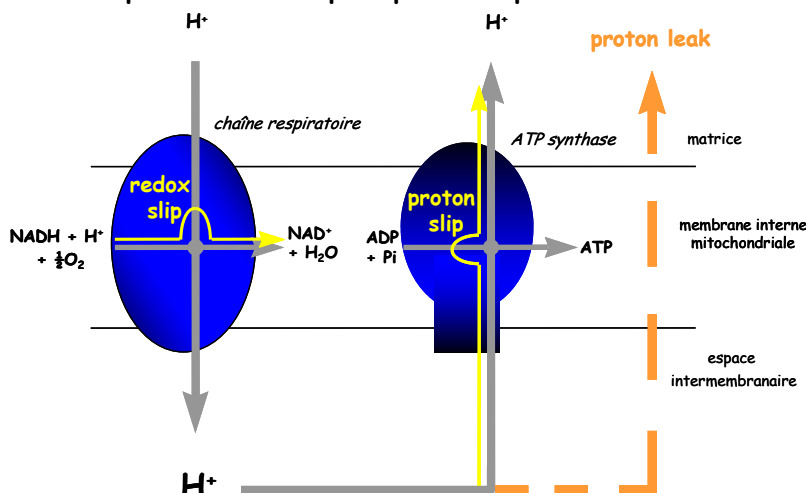
Figure I.18 : Patinage (slip) de la chaîne respiratoire.



Quand la pompe est parfaitement couplée, le rapport entre le flux de protons sortant et le flux de transfert d'électrons provenant de l'oxydation des équivalents réduits est constant. Quand la pompe patine, moins de protons sortent pour le même flux d'oxydation des équivalents réduits.

Deux mécanismes de patinage ont été suggérés : (i) la chaîne respiratoire oxyde des équivalents réduits avec une expulsion de protons moindre (la réaction chimique ne s'accompagne de mouvements moindres de protons), on parle de *redox slip* et (ii) le flux de protons au niveau de l'ATP synthase produit moins d'ATP (les mouvements de protons s'accompagnent d'une réaction chimique moindre) et l'on parle de *proton slip* (figure I.19).

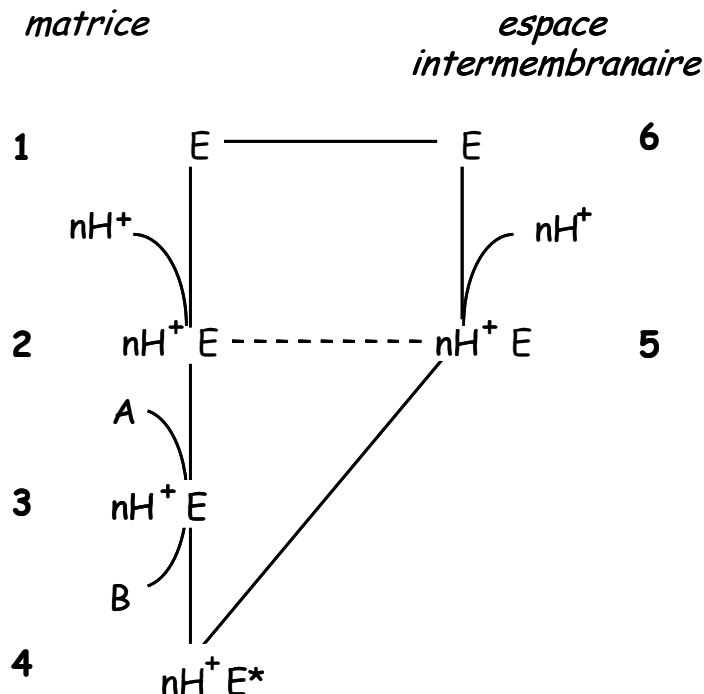
Figure I.19 : Exemple de rédox slip et proton slip



Les flèches grises pleines représentent le circuit couplé. L'oxydation des équivalents réduits est couplée à l'expulsion de protons, et le retour des protons à travers l'ATP synthase est couplé à la synthèse d'ATP. Le slip (flèches jaunes) est l'oxydation des équivalents réduits sans expulsion de protons (redox slip) ou le retour de protons au niveau de l'ATP synthase sans synthèse d'ATP (proton slip). Les 2 mécanismes (slip chimique et proton slip) peuvent intervenir sur les deux sites de couplage (chaîne respiratoire et ATP synthase), selon le sens de fonctionnement des pompes. Adapté de (Brown 1992).

Pietrobon et Caplan (Pietrobon and Caplan 1985) ont modélisé le fonctionnement de ces pompes afin de pouvoir étudier les propriétés thermodynamiques et cinétiques du patinage de celui-ci. Une pompe à protons est un système enzymatique lié à la membrane qui couple une réaction ($A \leftrightarrow B$) à un flux de protons de part et d'autre de la membrane. Le modèle (figure I.20) repose sur un cycle de réactions comportant six étapes successives lorsque le couplage est parfait.

Figure I.20 : Modélisation du fonctionnement des pompes à protons.

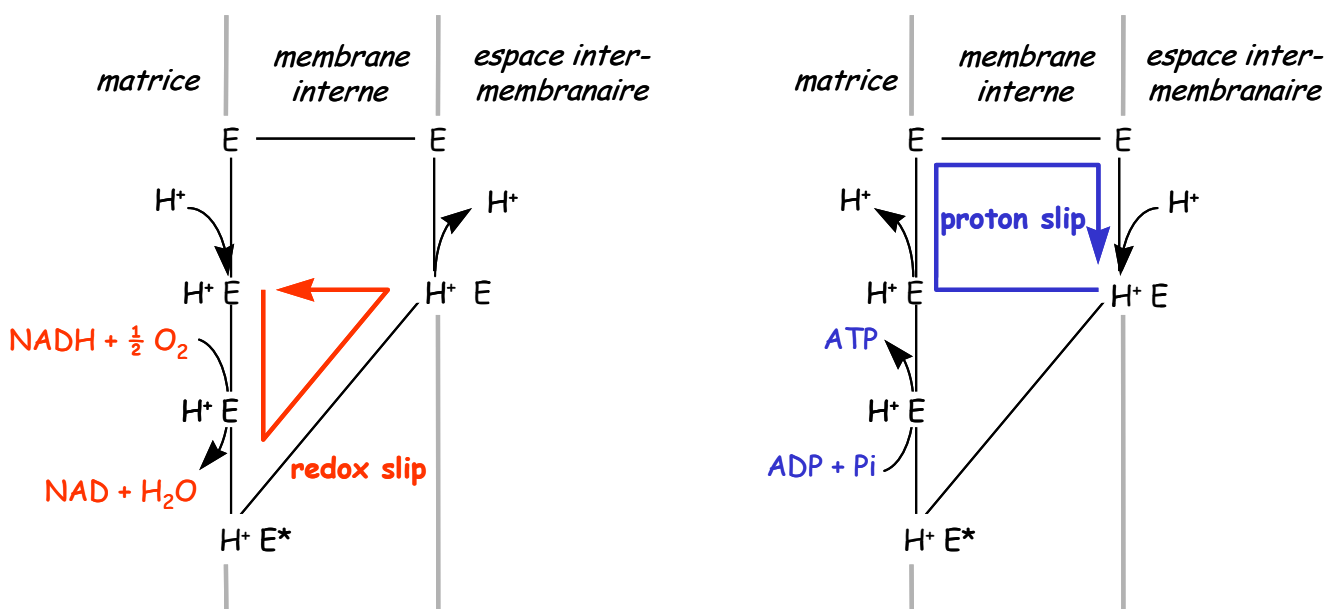


Le cycle peut tourner dans les 2 sens. Les étapes, quand le cycle fonctionne dans le sens de l'expulsion des protons sont: (1-2) fixation de n protons sur la face interne du complexe enzymatique; (2-3-4) couplage de la réaction chimique avec un changement du niveau énergétique de l'enzyme; (4-5) transfert des n protons sur la face externe de la membrane et retour à l'état énergétique de base; (5-6) libération de n protons; (6-1) retour du complexe enzymatique à son état initial. D'après: Pietrobon D et Caplan R. (Pietrobon and Caplan 1985).

Ce cycle peut fonctionner dans les deux sens, l'expulsion de protons étant couplée à l'oxydation des équivalents réduits, et le retour de protons étant couplée à la synthèse d'ATP. Quand le cycle fonctionne dans le sens de l'expulsion de protons vers l'espace intermembranaire, les étapes sont : (1-2) fixation de n protons sur la face interne du complexe enzymatique, (2-3-4) couplage de la réaction chimique (oxydation du NADH) avec un changement du niveau énergétique de l'enzyme, (4-5) transfert des n protons sur la face externe de la membrane et retour à l'état énergétique de base,

(5-6) libération de n protons, (6-1) retour du complexe enzymatique à son état initial. Toutefois, il est possible de passer directement de l'étape 5 à l'étape 2 (figure I.21). La succession de réactions passant par les étapes 2-3-4-5 $\rightarrow$ 2 consomme de l'énergie chimique sans générer de gradient de protons (rédox slip). Quand le cycle tourne dans l'autre sens, la succession de réactions passant par les étapes 5 $\rightarrow$ 2-1-6-5 consomme du gradient de protons sans pour autant recréer de l'énergie chimique (proton slip). Il existe donc deux mécanismes capables d'aboutir à un patinage des pompes et, dans les deux cas, le nombre de protons transférés est inférieur à n (nombre de protons directement liés à la réaction chimique $A \leftrightarrow B$). Il faut noter que ces deux mécanismes (slipping chimique et proton slip) peuvent intervenir sur les deux sites de couplage (chaîne respiratoire et ATP synthase), selon le sens de fonctionnement des pompes.

Figure I.21 : Modélisation du redox slip et du proton slip

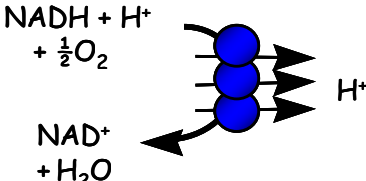
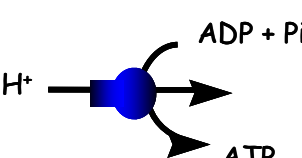


Le cycle peut tourner dans les 2 sens. La succession de réactions passant par les étapes 2 3 4 5 $\rightarrow$ 2 consomme de l'énergie chimique sans générer de gradient de protons (rédox slip). Quand le cycle tourne dans l'autre sens, la succession de réactions passant par les étapes 5 $\rightarrow$ 2 1 6 5 consomme du gradient de protons sans pour autant recréer de l'énergie chimique (proton slip). Les 2 mécanismes (slip chimique et proton slip) peuvent intervenir sur les deux sites de couplage (chaîne respiratoire et ATP synthase), selon le sens de fonctionnement des pompes.

Le leak non ohmique ne dépend que de la force protonmotrice. Au contraire, le slipping subit des contraintes à la fois thermodynamiques (forces en présence) et cinétiques (flux des réactions). Les forces qui influencent le fonctionnement des pompes membranaires sont schématisées dans le tableau I.4. Le slip dépend donc des forces exercées de chaque côté des complexes enzymatiques. Si les deux forces augmentent, les contraintes sur le système sont fortes comme si on appuyait à la fois sur l'accélérateur et le frein et le patinage va augmenter et dissiper l'énergie sous forme de chaleur. Cette capacité de patiner a un intérêt, elle permet d'augmenter très rapidement l'efficacité,

de la même façon qu'un cycle futile. Par exemple, un avion avant le décollage se place en début de piste, monte le régime des moteurs tout en maintenant les freins, ce qui consomme de l'essence pour produire de la chaleur et non un déplacement. Au moment où le pilote lâche les freins, l'efficacité du système augmente instantanément, ce qui permet à l'avion d'atteindre la vitesse de décollage sur une plus courte distance. Il apparaît donc que quand la force protonmotrice diminue, le slip diminue. Etant donné que le retour passif de protons diminue Δp , il existe une compétition entre le leak et le slip. Si le leak augmente, le slip diminuera.

Tableau I.14 : Forces influençant le patinage des pompes membranaires

force «qui pousse»	complexe enzymatique	force «qui freine»
potentiel redox $\frac{NADH}{NAD}$	<i>chaîne respiratoire</i>  $NADH + H^+ + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow NAD^+ + H_2O$	force protonmotrice (Δp)
force protonmotrice (Δp)	<i>ATP synthase</i>  $H^+ \rightarrow ADP + P_i \rightarrow ATP$	potentiel phosphate $\frac{ATP}{ADP \cdot P_i}$

Contrairement au leak non ohmique qui ne dépend que de la force protonmotrice, le slip subit les contraintes des deux forces en présence : la force protonmotrice et la variation d'énergie libre de la réaction chimique (potentiel rédox ou potentiel phosphate).

Bien que le proton slip corresponde à un retour de protons à travers la membrane variable en fonction de Δp , il ne s'agit pas de fuites membranaires assimilables au leak, car le proton slip dépend également du flux à travers la pompe à protons, alors que le leak n'a pas de contrôle cinétique. Selon le modèle de Pietrobon et Caplan (Pietrobon and Caplan 1985), il y a compétition entre le cycle couplé (englobant l'ensemble des 6 étapes), et le cycle découplé (passant par la voie « directe » 5-2 entraînant le slip). La probabilité d'emprunter la voie « directe », donc de patiner, augmente lorsque le flux à travers la pompe augmente (Fontaine, Devin et al. 1997; Rigoulet, Devin et al. 1998). Il y a donc un compromis entre vitesse et efficacité. Plus une pompe tourne vite, moins elle est efficace.

Certaines molécules ont été démontré comme étant des agents provoquant du slip. Ainsi, la bupivacaïne fait patiner la chaîne respiratoire (van Dam, Shinohara et al. 1990) et le chloroforme ou

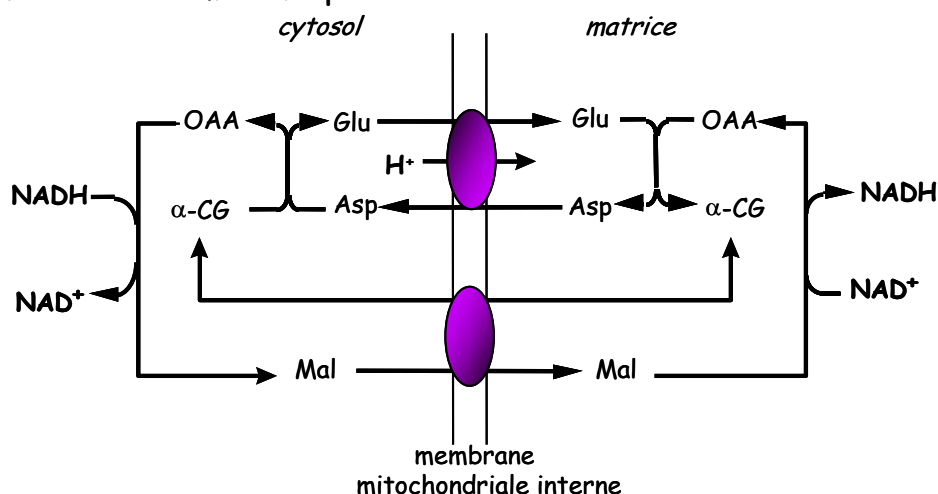
l'almitrine font patiner la chaîne respiratoire et l'ATP synthase (Luvisetto, Pietrobon et al. 1987 ; Rigoulet, Ouhabi et al. 1989; Rigoulet, Fraisse et al. 1990 ; Jumelle-Laclau, Rigoulet et al. 1993; Leverve, Sibille et al. 1998).

2.4 Par les transporteurs

La membrane mitochondriale interne possède des transporteurs de métabolites et d'ions (LaNoue and Schoolwerth 1979). Ces transporteurs utilisent l'une ou l'autre des composantes de la force protonmotrice (ΔpH et $\Delta \Psi$), par exemple en couplant le transport d'un métabolite à la rentrée d'un proton. Les mouvements d'ions ou de métabolites peuvent donc conduire à une consommation de la force protonmotrice et affecter le rendement de l'oxydation phosphorylante. Des mouvements d'ions tels le sodium et le potassium sont impliqués dans l'homéostasie ionique et osmotique de la mitochondrie (Garlid 1994). Le calcium a un rôle particulier dans la régulation de l'oxydation phosphorylante en stimulant les déshydrogénases matricielles et en activant la chaîne respiratoire et l'ATP synthase (McCormack, Halestrap et al. 1990). La translocase (ANT) fait rentrer l'ADP et expulse l'ATP hors de la matrice en consommant du $\Delta \Psi$, car l'ATP porte 4 charges négatives alors que l'ADP n'en a que 3. Le transporteur du phosphate couple l'entrée du phosphate (portant une charge négative) à celle d'un proton, et consomme ainsi du ΔpH .

La membrane mitochondriale interne est imperméable au NADH. Il en résulte que les équivalents réduits portés par le NADH cytoplasmique doivent être transférés dans les mitochondries. Ce transfert se fait indirectement en réduisant certaines molécules acceptrices, qui traversent la membrane mitochondriale interne, pour aller reformer des équivalents réduits intramitochondriaux, puis reviennent dans le cytoplasme à l'état oxydé. C'est ce que l'on appelle le système des navettes. Deux navettes sont reconnues comme fonctionnant *in vivo* selon ce principe: il s'agit de la navette malate/aspartate et de la navette glycérol-3-phosphate/dihydroxyacétone phosphate.

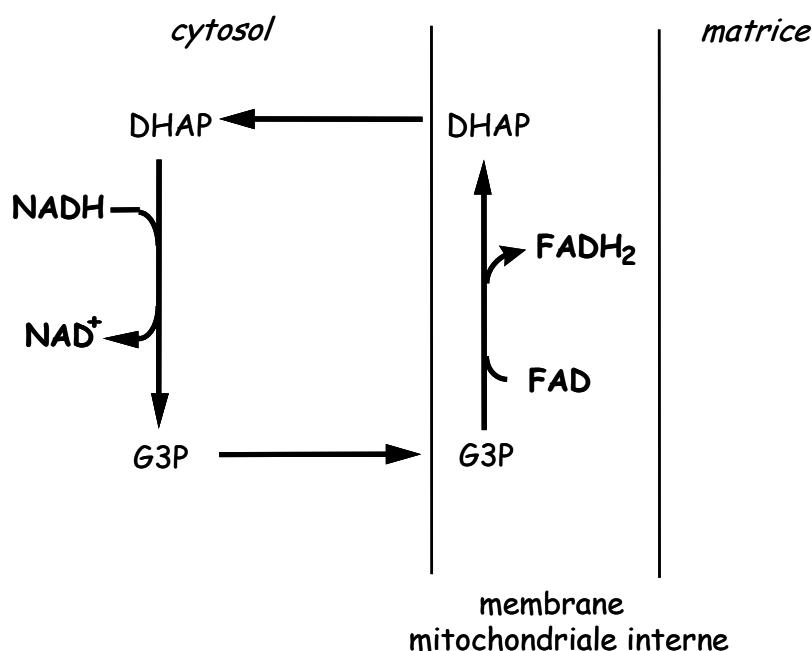
Figure I.22 : Navette malate/aspartate



La navette malate/aspartate transfère les électrons du pool de NADH cytosolique au pool matriciel en consommant de la force protonmotrice. Glu : glutamate, Asp : aspartate, OAA : oxaloacétate, α -CG : α -cétoglutarate, Mal : malate.

La navette malate/aspartate (figure I.22) transfère les électrons du pool de NADH cytosolique vers le pool matriciel. Le potentiel redox de la matrice étant plus électronégatif, ce processus est thermodynamiquement défavorable et est rendu possible grâce à la force protonmotrice. Ainsi, l'échangeur glutamate/aspartate est électrogénique et couple la sortie d'un aspartate à l'entrée d'un glutamate et d'un proton. La force permettant le fonctionnement de cette navette est donc essentiellement le potentiel de membrane électrique $\Delta\Psi$. Cette navette permet de maintenir un gradient redox entre la mitochondrie et le cytosol favorable au fonctionnement de la chaîne respiratoire, c'est à dire un NADH/NAD élevé dans la mitochondrie, pour fournir des substrats à la chaîne respiratoire, et bas dans le cytosol. Si $\Delta\Psi$ diminue, le fonctionnement de cette navette diminuera, et le potentiel redox cytosolique augmentera. Ceci favorisera l'utilisation de la navette du glycérol-3-phosphate.

Figure I.23 : Navette glycérol-3-phosphate (G3P)



Pour chaque molécule de NADH cytosolique consommée correspond une molécule de FADH₂ formée dans la matrice. DHAP : dihydroxyacétone phosphate ; G3P : glycérol-3-phosphate.

Le fonctionnement de la navette du glycérol-3-phosphate (figure I.23) diminue le rendement de l'oxydation phosphorylante. En effet, à chaque molécule de NADH cytosolique consommée, correspond une molécule de FADH₂ formée dans la matrice. Du fait que le FADH₂ court-circuite le complexe I, le fonctionnement de cette navette entraîne une diminution du nombre de protons expulsés par oxygène consommé à partir du NADH cytosolique. Les enzymes assurant le fonctionnement de cette navette sont les glycérol-3-phosphate déshydrogénases cytosolique et

mitochondriale. Il semblerait que plus que la quantité d'enzyme, ce soit la quantité de substrat qui contrôle cette voie (Meijer and Van Dam 1974). Ainsi, l'augmentation du potentiel redox cytosolique stimule le fonctionnement de cette navette. Les deux navettes sont donc complémentaires et ne fonctionnent pas dans les mêmes circonstances. Si le potentiel de membrane est élevé, la navette malate/aspartate tourne vite et la navette du glycérol-3-phosphate n'est pas stimulée, d'une part car le NADH/NAD⁺ cytosolique est bas, et d'autre part car le NADH/NAD⁺ mitochondrial élevé inhibe les déshydrogénases. A l'opposé, si le potentiel de membrane est bas, la navette malate/aspartate ne tourne pas, et l'augmentation du potentiel redox cytosolique stimule la navette du glycérol-3-phosphate.

2.5 Par le volume cellulaire

Le volume mitochondrial est également un paramètre connu pour réguler l'oxydation phosphorylante (McCormack 1985; Halestrap 1989; Espie, Guerin et al. 1995; Devin, Guerin et al. 1996; Devin 1997; Espie, Devin et al. 1997). En effet, il a été montré qu'une stimulation hormonale (glucagon, vasopressine, α -adrénergique) induit une augmentation de la concentration calcique dans la matrice qui, d'une part, stimule l'activité de certaines déshydrogénases, et d'autre part, inhibe l'activité d'une pyrophosphatase matricielle (McCormack 1985). L'augmentation du pyrophosphate dans la matrice induit une augmentation de la perméabilité mitochondriale au potassium. Par conséquent, l'osmolarité de la matrice augmente et la mitochondrie gonfle après une entrée d'eau qui tend à compenser cette osmolarité croissante. A ces mouvements d'eau et d'ions sont associés d'importants changements du métabolisme mitochondrial, tels que l'activation de la β -oxydation et de l'activité glutaminase, ainsi qu'une stimulation de la vitesse de respiration. L'augmentation du de la concentration calcique dans la matrice permettrait donc de stimuler l'oxydation phosphorylante, afin d'adapter la synthèse d'ATP à l'augmentation des besoins énergétiques. Ainsi, une augmentation du volume matriciel stimule de nombreuses activités mitochondriales. Par conséquent, il a été proposé que la variation du volume mitochondrial *per se* soit responsable de modifications de l'oxydation phosphorylante (Halestrap 1989; Devin, Guerin et al. 1996; Devin, Guerin et al. 1997).

3. Caractéristiques des membranes mitochondriales

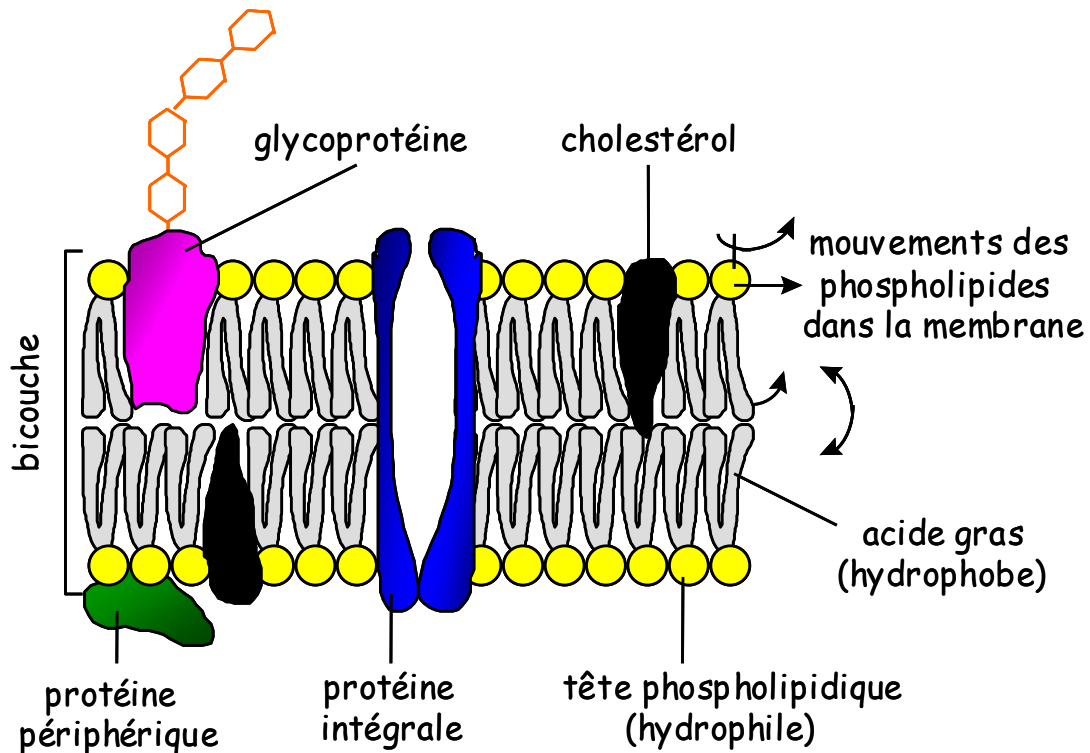
L'efficacité de l'oxydation phosphorylante repose sur deux acteurs principaux : (i) les complexes protéiques (pompes à protons) et (ii) la structure phospholipidique de la membrane mitochondriale interne (permettant de maintenir un gradient de protons de part et d'autre).

3.1 Composition membranaire

Les membranes biologiques sont des structures omniprésentes délimitant les cellules et les organites intracellulaires. Leur rôle premier est de permettre la compartimentation, c'est à dire de

maintenir une composition différente de part et d'autre de la membrane, générant par exemple un gradient électrochimique. Les membranes sont constituées d'une bicouche de phospholipides (figure I.24).

Figure I.24 : Structure membranaire



La membrane est constituée d'une bicouche phospholipidique dans laquelle sont enchâssées des protéines. Les phospholipides sont animés de mouvements divers (rotation, diffusion latérale, mouvement de balancier).

Les phospholipides possèdent un pôle hydrophile (tête polaire constituée d'un alcool ou d'un glucide) et un pôle hydrophobe (acides gras), reliés à un squelette carboné (glycérol ou sphingosine). On peut distinguer différents types de phospholipides en fonction du squelette carboné et de la nature de la tête polaire. C'est cette dernière qui donne généralement son nom au phospholipide (par exemple : phosphatidylcholine, phosphatidylglycérol,...). Les têtes polaires se trouvent sur la partie externe, et les acides gras se font face les uns les autres au cœur de la bicouche. La composition lipidique des membranes est caractéristique pour chaque espèce, chaque tissu et chaque organe à l'intérieur d'un type cellulaire donné. Par exemple, la membrane mitochondriale interne est marquée par une forte proportion de cardiolipines. Le cardiolipine est un type de phospholipide particulier résultant de la condensation de deux molécules de phosphatidylglycérol. La composition protéique des membranes provenant de différentes origines varie beaucoup plus que leur composition lipidique, indiquant ainsi une spécialisation fonctionnelle. La membrane mitochondriale interne est caractérisée par une grande richesse en protéines puisqu'elle contient 4 fois plus de protéines que la membrane plasmique (Daum 1985).

Des études se sont intéressées aux variations de la composition lipidique des tissus, en réponse à des changements de l'alimentation. Chaque organe répond de façon différente à des modifications diététiques. Le foie répond rapidement à des changements dans la quantité ou la nature des acides gras ingérés.

3.2 Fluidité membranaire

La membrane mitochondriale ne ressemble pas à une barrière rigide, mais plutôt à une « rivière qui coule », et a été décrit comme le modèle de « mosaïque fluide » (Singer and Nicolson 1972). La bicouche lipidique est fluide en raison des interactions entre lipides et protéines qui sont non covalentes. Les molécules lipidiques et protéiques disposent donc d'une grande liberté de mouvement latéral au niveau de la membrane. La fluidité membranaire est très régulée et dépend de plusieurs facteurs. Le degré et le type d'insaturation des phospholipides est un facteur important. La présence d'une double liaison en conformation cis entraîne un changement de direction de la chaîne et augmente la fluidité en écartant les phospholipides les uns des autres, tandis que les doubles liaisons en conformation trans n'ont pas cet effet. On pourrait donc s'attendre à ce que, plus il y a de doubles liaisons, plus l'effet sur la fluidité soit grand. Pourtant, il a été montré que l'acide α -linoléique (C18:3 n-3) avait moins d'effet sur la fluidité que l'acide linoléique (C18:2 n-6). Cela pourrait être dû à un effet contractant des doubles liaisons, qui raccourcissent la longueur effective de la chaîne en la repliant sur elle-même (Verma, Wallach et al. 1980). Cependant, ce fait est controversé car il a été suggéré que la double liaison en n-3, située en position terminale, induisait une plus grande fluidité du fait de son emplacement proche du centre de la bicouche membranaire (Rolfe, Hulbert et al. 1994).

La nature de la tête polaire influence également la mobilité des acides gras dans la bicouche lipidique, car c'est la partie polaire qui détermine l'orientation inclinée ou non des chaînes. L'inclinaison des chaînes diminue les interactions hydrophobes entre les chaînes et augmente ainsi la fluidité. Ainsi, une diminution du rapport phosphatidyléthanolamine/ phosphatidylcholine (PE/PC) augmente la fluidité (Gilmore, Cohn et al. 1979; Li, Agellon et al. 2006). La présence de cholestérol dans la membrane a un rôle régulateur. Le cholestérol peut constituer jusqu'à 50% des lipides totaux de certaines membranes, mais il ne joue pratiquement pas de rôle dans la membrane mitochondriale qui est très pauvre en cholestérol.

3.3 Interactions lipides - protéines

Les lipides peuvent influencer d'une part la mobilité, et d'autre part l'activité des protéines. Par exemple les cardiolipines ont une forte affinité pour la cytochrome oxydase, complexe enzymatique de la chaîne respiratoire au niveau de la membrane mitochondriale interne. Ceci pourrait avoir une signification fonctionnelle, puisqu'on sait que les cardiolipines sont activateurs de la cytochrome oxydase (Abramovitch, Marsh et al. 1990 ; Hoch 1992). D'autre part, il a été observé que les sites de contact entre la membrane interne et la membrane externe de la mitochondrie sont enrichis en

cardiolipines (Ardail, Privat et al. 1990). Ces sites de contacts entre les deux membranes mitochondriales existent transitoirement, et sont plus nombreux en état 3 qu'en état non phosphorylant. Ces contacts pourraient contribuer à la diminution du leak observée en état 3.

L'effet de changements de la composition lipidique des membranes sur les activités d'enzymes membranaires a fait l'objet de nombreux travaux (Stubbs and Smith 1984; Daum 1985; Hoch 1992). Il a été établi que l'activité de nombreuses enzymes membranaires dépendait du degré d'insaturation, de la longueur des chaînes d'acides gras et de la nature de la tête polaire des phospholipides. En particulier au niveau de la membrane mitochondriale interne, la plupart des enzymes interagissent fortement avec les lipides. Des expériences avec des protéines isolées de membrane mitochondriale interne montrent que les cardiolipines se fixent à presque tous les complexes protéiques de la membrane interne et les activent.

4. Relation entre la composition membranaire et la perméabilité passive aux protons

Les variations de la composition membranaire affectent donc notablement les caractéristiques physiques des membranes. Or, l'efficacité de l'oxydation phosphorylante dépend au moins en partie de l'imperméabilité de la membrane mitochondriale aux protons.

4.1 Perméabilité des membranes biologiques aux protons

Les membranes biologiques ont une très faible perméabilité aux ions et à la plupart des molécules polaires. Cependant, la perméabilité aux protons paraît discordante par rapport à celle des autres cations. En effet, la perméabilité aux H^+ mesurée dans différentes études est très variable, mais se situe dans tous les cas largement au dessus de celle des autres cations (Verkman and Ives 1986; Deamer 1987 ; Gutknecht 1987 ; Nagle 1987 ; Deamer and Nichols 1989). La cause de cette haute perméabilité n'est pas clairement établie. Selon la théorie « au fil de l'eau », les protons se déplaceraient le long des liaisons hydrogènes des molécules d'eau dissoutes dans le noyau hydrophobe de la bicouche lipidique (Nagle 1987; Deamer and Nichols 1989). L'autre possibilité serait que les protons traversent la membrane grâce à des acides faibles ou des acides gras libres contaminants le noyau hydrophobe de la bicouche, qui agiraient comme des transporteurs de protons (Gutknecht 1987; Deamer and Nichols 1989). Des anions superoxydes produits par la chaîne respiratoire pourraient également agir comme des protonophores en oxydant les lipides insaturés et en créant ainsi un canal à eau (Carbonera and Azzone 1988). D'après le modèle de diffusion des molécules à travers les membranes, une diminution de la fluidité membranaire devrait s'accompagner d'une diminution de la vitesse de diffusion de ces substances à travers la bicouche lipidique. Cela a été confirmé par Lande et coll (Lande, Donovan et al. 1995). En effet, une étude menée sur des vésicules unilamellaires artificielles montre qu'une diminution de la fluidité membranaire induite par des variations de sa composition lipidique entraîne une diminution de la perméabilité à différentes

molécules (Lande, Donovan et al. 1995). Par contre, la perméabilité aux protons n'était que faiblement corrélée à la fluidité. Ceci suggère que la diffusion des protons à travers les membranes est peu influencée par la composition lipidique de celles-ci. On ne peut cependant pas extrapoler ces résultats à la membrane mitochondriale interne qui a une structure très différente d'une membrane artificielle.

4.2 Composition lipidique mitochondriale et leak

La relation entre la perméabilité passive de la membrane mitochondriale interne aux protons (leak) et la composition lipidique de celle-ci a été largement étudiée (Brand, Couture et al. 1991 ; Brand, Chien et al. 1994 ; Rolfe, Hulbert et al. 1994; Porter, Hulbert et al. 1996; Brookes, Hulbert et al. 1997; Brookes, Rolfe et al. 1997; Brookes, Buckingham et al. 1998). Il faut noter que la littérature dans ce domaine ne concerne que la relation de la composition membranaire avec le leak, et non avec l'autre cause possible de découplage c'est à dire le slip ((Pietrobon, Azzone et al. 1981; Pietrobon, Zoratti et al. 1983; Pietrobon and Caplan 1985; Murphy and Brand 1987; Papa, Capitanio et al. 1991; Schmehl, Luvisetto et al. 1995; Fontaine, Moussa et al. 1996; Rigoulet, Leverve et al. 1998). Parmi ces travaux, ceux de l'équipe de Brand sont effectués sur des mitochondries isolées et la perméabilité aux protons n'est pas mesurée directement. Le paramètre mesuré est la respiration insensible à oligomycine, qui est assimilée par ce groupe au leak. Une étude menée sur des reptiles, qui ont une dépense énergétique différente de celle des mammifères, a apporté des arguments en faveur de l'existence d'une relation entre la perméabilité aux protons de la membrane mitochondriale interne et la composition lipidique de cette membrane. En effet, la dépense énergétique de repos d'un rat est 7 fois supérieure à celle d'un dragon barbu, lézard de même masse et de même température corporelle. Ces différences de dépense énergétique ont été assimilées à une augmentation du leak au niveau de la membrane interne des mitochondries de foie de rat par rapport à celles du lézard (Brand, Couture et al. 1991). Parallèlement, des différences dans la composition lipidique des membranes ont été observées. L'étude de liposomes préparés à partir de phospholipides extraits de mitochondries de ces rats ou lézards a confirmé que les membranes provenant des rats étaient plus perméables aux protons. De plus, le flux de protons à travers ces membranes était d'autant plus élevé que la proportion d'acides gras polyinsaturés (AGPI) était grande, suggérant que le contenu en AGPI était responsable, ou tout du moins impliqués, dans le phénomène du leak (Brand, Couture et al. 1994). Le mécanisme possible serait que les électrons délocalisés des doubles liaisons des acides gras stabiliseraient les liaisons hydrogènes des molécules d'eau dissoutes dans le noyau hydrophobe de la bicouche lipidique, favorisant ainsi le transport des protons « au fil de l'eau ».

Par la suite, l'analyse de mitochondries isolées d'une quinzaine de vertébrés, de dépenses énergétiques variées, a permis de confirmer cette corrélation entre le flux de protons à travers la membrane interne et la composition en acides gras des membranes (Porter, Hulbert et al. 1996; Brookes, Buckingham et al. 1998). Cependant la situation apparaît plus complexe que ce qui avait été initialement pressenti. En effet, le rôle des acides gras insaturés, notamment en n-3, précédemment

suggéré (Rolfe, Hulbert et al. 1994; Porter, Hulbert et al. 1996) n'est pas confirmé. Il apparaît que l'acide docosaénoïque (C22:6 n-3) est corrélé positivement au flux de protons, alors que l'acide α -linoléique (C18:3 n-3) y est corrélé négativement. De même dans la série n-6, il a été observé que le rapport C20:4 n-6/C18:2 n-6 est d'autant plus élevé que le leak augmente (Brookes, Buckingham et al. 1998). Malgré cela, la longueur moyenne des chaînes hydrocarbonées n'est pas significativement corrélée à la perméabilité aux protons.

Cette relation entre composition lipidique et leak est donc observée sur un modèle de mitochondries isolées. Cependant près de 50 % de la surface interne de la membrane mitochondriale est constituée de protéines (Schwermann, Cruz-Orive et al. 1986), et afin de confirmer le rôle de la phase lipidique de la membrane dans la perméabilité aux protons, des expériences ont été effectuées sur des liposomes. Le flux de protons à travers des liposomes issus de huit animaux, représentant un panel de leak et de composition lipidique très divers, a été mesuré (Brookes, Hulbert et al. 1997). Étonnamment, tous ces liposomes avaient la même perméabilité aux protons, et celle-ci n'était pas corrélée à la composition lipidique des membranes. Brookes et coll. (Brookes, Rolfe et al. 1997) ont alors comparé la perméabilité aux protons de mitochondries isolées avec celle de la bicouche lipidique elle-même, en utilisant des liposomes issus de ces mêmes mitochondries. Ils ont montré qu'en appliquant un potentiel de membrane physiologique, le flux de protons à travers la bicouche lipidique ne représentait que 5% du leak observé dans des conditions comparables sur mitochondries isolées. Ces expériences indiquent que la fuite de protons à travers la membrane elle-même participe pour une très faible part au leak, et que la présence des protéines membranaires est nécessaire pour observer ce phénomène. Plusieurs explications peuvent être suggérées pour expliquer la différence de leak entre les mitochondries isolées et les liposomes issus de ces mêmes mitochondries.

☞ Les mitochondries et les liposomes présentent des propriétés de leur bicouche phospholipidique différentes, comme la distribution asymétrique des cardiolipines. Celles-ci prédominent sur la feuille interne de la mitochondrie (Hoch 1992), et cette répartition n'est pas conservée dans les liposomes. D'autre part la courbure de la membrane, différente d'un modèle à l'autre, peut influencer les interactions des têtes polaires entre elles ou avec le milieu. Enfin, la présence de protéines peut modifier l'épaisseur de la membrane.

☞ Les protéines membranaires pourraient avoir des effets non spécifiques sur la perméabilité aux protons. En effet, la présence de nombreuses protéines dans la membrane peut altérer la mobilité des phospholipides ainsi que la charge électrique présente à la surface membranaire. De plus, il a été rapporté que l'incorporation dans une bicouche lipidique de polypeptides, de conformation en hélice α , permettaient la translocation de protons en formant un agrégat constituant un canal à protons (Oliver and Deamer 1994).

Des protéines spécifiques à effet découplant pourraient être responsables de la majeure partie du leak. Cependant, la présence des protéines découplantes connues (UCP1, UCP2, UCP3...) dans les hépatocytes sains reste encore controversée, notamment pour UCP2. En effet, UCP2 étant

exprimée dans les macrophages, il est difficile de discriminer si la protéine se trouve au niveau de ceux-ci ou au niveau des cellules parenchymateuses du foie (Mattiasson and Sullivan 2006). D'autre part, la spécificité des anti-corps UCP2 commerciaux, utilisés pour la détection d'UCP2 au niveau hépatique, est largement discutée (Pecqueur, Alves-Guerra et al. 2001). Par ailleurs, en 2004, Tan et coll. (Tan, Ooi et al. 2004) ont proposé une nouvelle protéine comme protéine découplante spécifique du foie : HDMCP (Hepatocellular Carcinoma Down-regulated Mitochondrial Carrier Protein). Cette protéine est exprimée spécifiquement dans le foie, au niveau mitochondrial. Elle présente une forte homologie de séquence avec les protéines de la famille des transporteurs mitochondriaux, et, comme les UCP, permet la dissipation du gradient de protons mitochondrial lorsqu'elle est surexprimée. Il a été montré que la translocase (exportant l'ATP et important l'ADP) était impliquée dans le découplage induit par les acides gras (Brustovetsky and Klingenberg 1994). Cependant, la surexpression de cette enzyme sur des levures n'entraîne pas d'augmentation de la respiration à l'état 4 (Sheldon, Williams et al. 1996), suggérant que le rôle de la translocase dans le leak est limité.

☞ Les pertes de protons, en l'absence de phosphorylation, sont dues à la fois aux fuites passives de protons à travers la membrane mitochondriale interne (leak), mais aussi à une perte d'efficacité au niveau des pompes membranaires (slip). Le slip étant lié au fonctionnement des pompes membranaires, il n'est par définition pas visible sur un modèle de liposomes. Il n'est donc pas surprenant que le flux de pertes de protons de liposomes soit plus faible que celui de mitochondries isolées. La différence observée entre ces deux modèles constitue un argument supplémentaire en faveur de l'existence du slip. Il est clair que la composition lipidique membranaire régule les activités des protéines membranaires. Au vu de ces résultats, il semble donc raisonnable de suggérer qu'une ou plusieurs protéines responsables du slip soient sensibles à la composition lipidique de la membrane.

Résumé (définition des termes)

Découplage de l'oxydation phosphorylante : phénomène qui conduit à ce qu'une consommation d'oxygène par la chaîne respiratoire ne soit pas associée à une synthèse d'ATP. Ceci se traduit par une baisse du rapport ATP/O (nombre de molécules d'ATP synthétisées divisées par le nombre d'atomes d'oxygène consommés). Les mécanismes causals possibles sont multiples.

Leak ohmique : retour passif de protons à travers la membrane interne mitochondriale sans passer par l'ATP synthase. La nature ohmique signifie que le processus suit la loi d'Ohm, c'est à dire qu'il y a une relation linéaire entre les fuites de protons et la force protonmotrice.

Découplants protonophores : agents augmentant la perméabilité aux protons de la membrane interne et générant un leak ohmique.

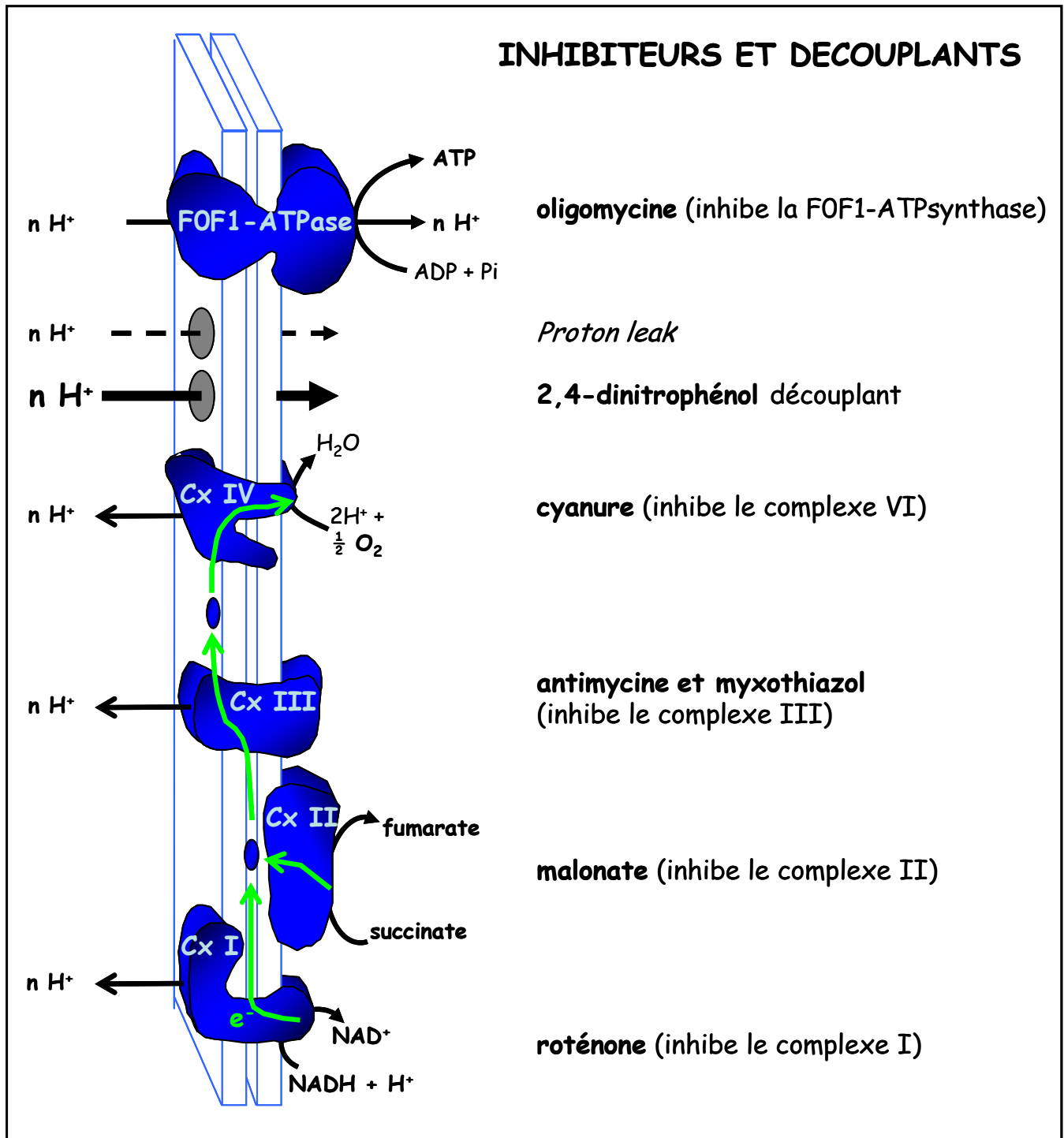
Leak non ohmique : perméabilité de la membrane aux protons variable en fonction de la force protonmotrice. La membrane mitochondriale interne ne se comporterait pas selon la loi d'Ohm, mais sa conductance serait variable et augmenterait avec la force protonmotrice. A partir d'une certaine force protonmotrice (située au point d'inflexion de la courbe de Nicholls), la membrane deviendrait plus perméable, comme si une soupape de sécurité s'ouvrait, et les fuites de protons augmenteraient. Ce processus entraîne un découplage dépendant de la force protonmotrice.

Slip (ou patinage) : Changement de stoechiométrie apparente (diminution de l'efficacité) des pompes de la membrane mitochondriale interne (chaîne respiratoire et/ou ATP synthase). Ce processus, intimement lié au fonctionnement des protéines membranaires, entraîne un découplage dépendant à la fois des forces en présence (force protonmotrice, potentiel rédox, potentiel phosphate) et du flux des réactions. Cette capacité de patiner permet d'augmenter très rapidement l'efficacité du système en diminuant le slip.

Outils utilisés (inhibiteurs et découplants)

Dans ce travail, nous avons utilisé différents inhibiteurs ou découplants protonophores. Les sites d'action sont schématisés dans la figure I.25.

Figure I.25 : Sites d'action des inhibiteurs et découplants



VI. Métabolisme hépatique

Les organismes vivants doivent adapter continuellement leur métabolisme à l'environnement nutritionnel car la quantité et la qualité des nutriments disponibles varient au cours du temps et ne permettent pas toujours de répondre correctement aux besoins énergétiques. Ceci est particulièrement vrai pour le glucose qui est utilisé en permanence chez les mammifères par certains organes ou tissus.

Le foie est l'organe principal intervenant dans le maintien de l'homéostasie glucidique et il peut alternativement libérer du glucose dans la circulation sanguine ou en prélever et le stocker. Cette balance entre utilisation et synthèse du glucose est finement contrôlée par une multitude de facteurs, principalement les concentrations en substrats et produits des différentes voies métaboliques ainsi que par l'environnement hormonal et nutritionnel de l'organisme (Hue 2001). Ainsi, en période post-prandiale, lorsque la nourriture est en excès, le foie stocke le glucose sous forme de glycogène, principalement par une voie indirecte nécessitant sa conversion préalable en composés à 3 carbones (lactate, pyruvate,...) (Katz and McGarry 1984 ; Newgard, Moore et al. 1984 ; Radziuk and Pye 2001), et peut aussi éventuellement le convertir en acides gras par la voie de la lipogenèse *de novo* (Hellerstein, Schwarz et al. 1996). Inversement, en période de jeûne, le foie peut produire du glucose pour maintenir la glycémie et l'approvisionnement des tissus extra-hépatiques, notamment ceux qui utilisent le glucose comme substrat exclusif (rétine, globules rouges...).

Le glucose libéré par le foie peut provenir de deux sources différentes : du glycogène, à la suite de sa dégradation par la glycogénolyse, et de certains précurseurs non glucidiques, qui participent à la synthèse *de novo* de glucose par la voie de la néoglucogenèse.

Contrairement à la glycolyse, qui se déroule dans toutes les cellules vivantes, il est généralement admis que la néoglucogenèse a lieu exclusivement au niveau du foie et du cortex rénal, les deux seuls tissus possédant l'équipement enzymatique nécessaire à ce processus. Cependant, la démonstration récente de la présence de glucose 6-phosphatase au niveau de l'intestin grêle fait de ce tissu un troisième site néoglucogénique hautement probable (Croset, Rajas et al. 2001).

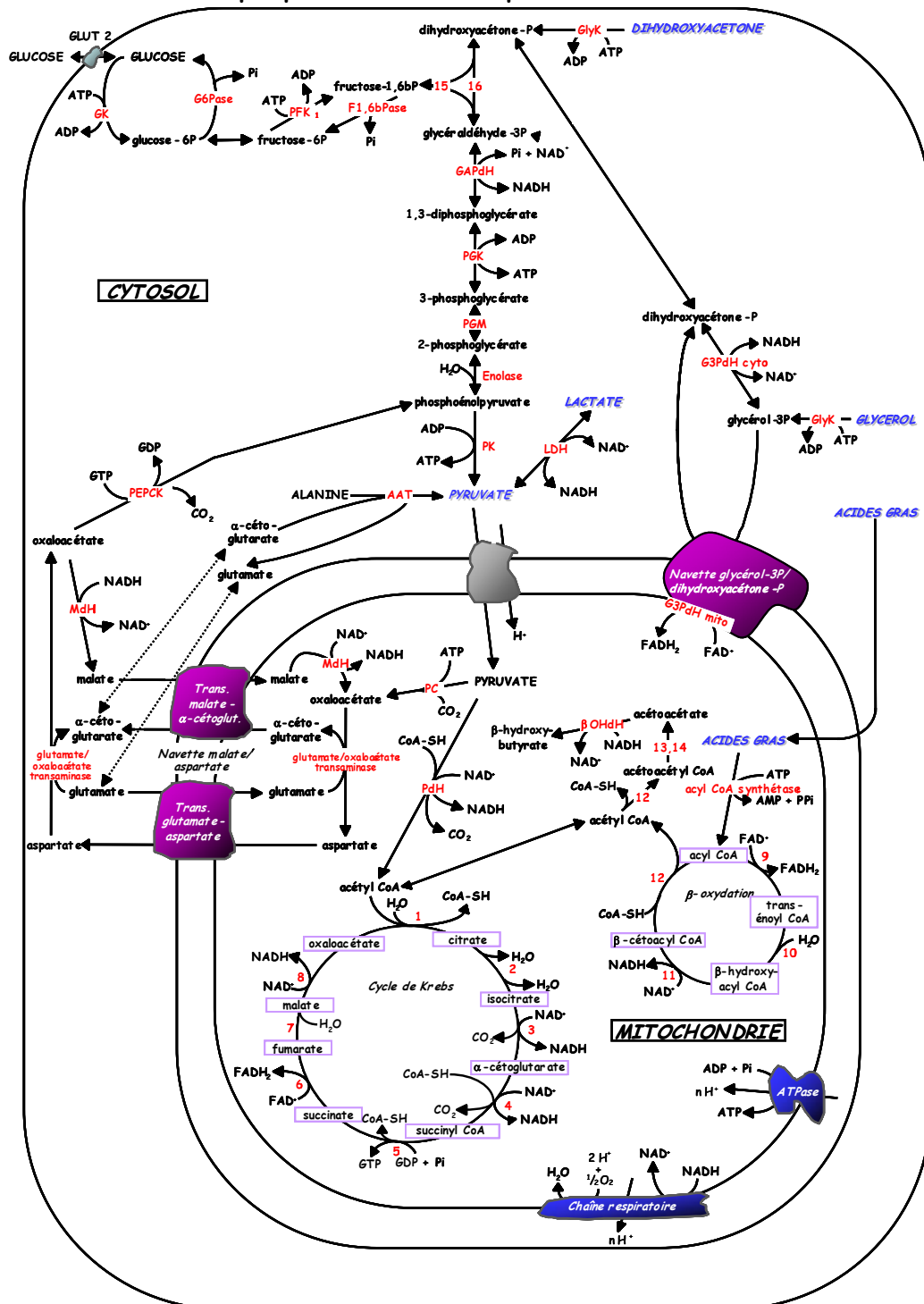
Les réserves en glycogène hépatique étant limitée (environ 75 g chez l'homme sain) (Cahill 1970), la contribution relative de la néoglucogenèse à la production hépatique de glucose augmente au cours du jeûne (Hellerstein, Neese et al. 1997). De même, la participation relative du cortex rénal et du foie au flux néoglucogénique total est également sujet à variation, avec cependant une prévalence de ce dernier (70-75% vs 25-30%) dans les situations physiologiques normales (hors jeûne à long terme) (Gerich, Meyer et al. 2001). En ce qui concerne la participation relative de l'intestin à la production de glucose par la néoglucogenèse, les données disponibles chez le rat à jeun 72 heures montrent qu'elle peut apparemment représenter plus de 40% de la totalité du glucose synthétisé par la voie métabolique (Mithieux 2001).

A l'inverse de la glycolyse, qui permet de générer 2 à 3 molécules d'ATP par hexose oxydé selon la provenance des carbones (glucose ou glycogène respectivement), la néoglucogenèse est un processus consommateur d'énergie. En effet, 6 molécules d'ATP sont par exemple requises pour synthétiser une seule molécule de glucose à partir d'hydrate de carbone comme le pyruvate ou le lactate. En situation de jeûne, la majeure partie de l'énergie nécessaire à cette voie endergonique provient généralement de l'oxydation hépatique des acides gras par l'intermédiaire de la β -oxydation mitochondriale.

1. Régulation des voies métaboliques

Les voies métaboliques de la glycolyse et de la néoglucogenèse constituent des réseaux enzymatiques complexes (Figure I.26) qui ne peuvent être dissociés car ils possèdent plusieurs étapes communes catalysant des réactions réversibles proches de l'équilibre. L'orientation du flux métabolique entre la glycolyse et la néoglucogenèse est assurée par un nombre restreint d'enzymes qui constituent les étapes clés du contrôle de la voie en catalysant généralement des réactions opposées et loin de l'équilibre thermodynamique.

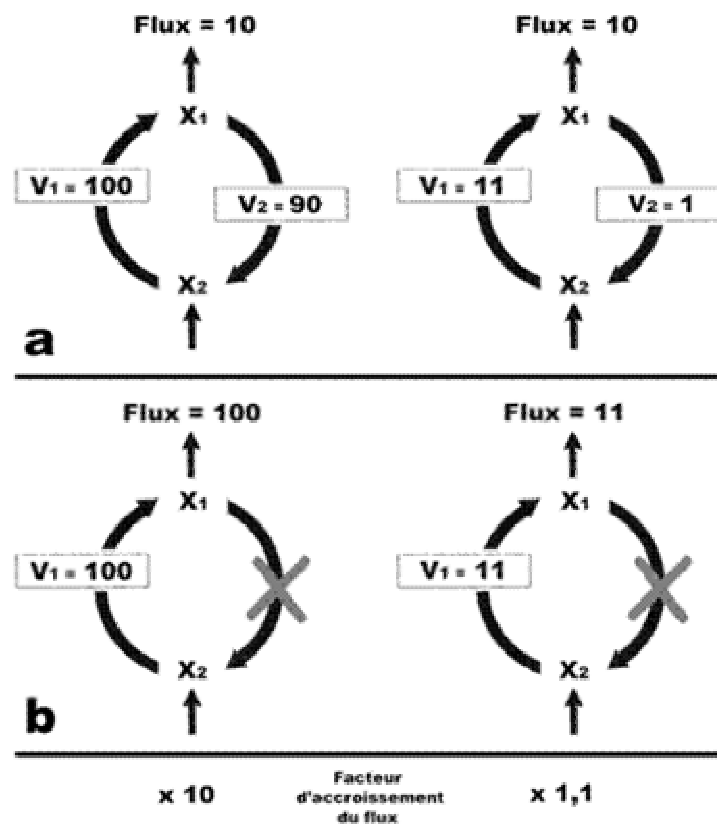
Figure I.26 : Relations entre quelques voies métaboliques.



AAT : alanine aminotransférase ; β OHdH : β -hydroxybutyrate déshydrogénase ; F1,6bPase : fructose 1,6-biphosphatase ; FK : fructokinase ; GAPdH : glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase ; GK : glucokinase ; G6Pase : glucose 6-phosphatase ; G3PdH : glycérol 3-phosphate déshydrogénase ; GlyK : glycérol kinase ; LDH : lactate déshydrogénase ; MdH : malate déshydrogénase ; PC : pyruvate carboxylase ; PFK₁ : phosphofructokinase 1 ; PGK : phosphoglycérate kinase ; PGM : phosphoglycérate mutase ; PEPCK : phosphoenolpyruvate carboxykinase ; PK : pyruvate kinase ; PdH : pyruvate déshydrogénase ; 1 : citrate synthase ; 2 : aconitate ; 3 : isocitrate déshydrogénase ; 4 : céto-glutarate déshydrogénase ; 5 : succinate thiokinase ; 6 : succinate déshydrogénase ; 7 : fumarase ; 8 : malate déshydrogénase ; 9 : acyl CoA déshydrogénase ; 10 : énoyl CoA hydratase ; 11 : β -hydroxyacyl CoA déshydrogénase ; 12 : cétothiolase ; 13 : β -hydroxyméthylglutaryl CoA ; 14 : β -HMG CoA lyase ; 15 : aldolase ; 16 : triose phosphate isomérase.

Ainsi, un flux net dans un sens ou dans l'autre n'a lieu que lorsque la résultante des flux à travers les étapes clefs des voies glycolytique ou néoglucogénique n'est pas nulle. L'existence de cycles métaboliques constitue un système grâce auquel la vitesse et la direction des flux peuvent être finement modulées par de subtiles variations au niveau de la concentration des différents effecteurs d'une ou plusieurs des enzymes du cycle et/ou par une modification covalente de celles-ci (Figure I.27). Ce système de régulation particulier a cependant un coût, le maintien d'une vitesse de recyclage élevée à travers ces boucles métaboliques consommant de l'énergie (cycle futile).

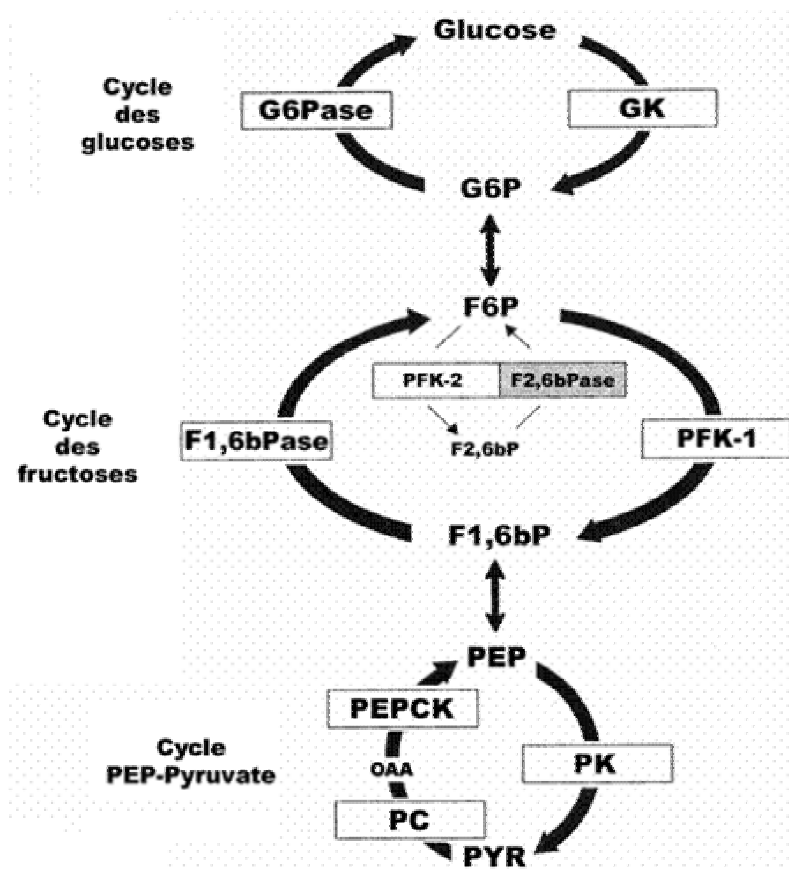
Figure I.27 : Représentation schématique d'un cycle métabolique.



A un état stable donné correspondant à un flux résultant identique (partie a), l'amplitude de l'effet d'une modification covalente d'une des enzymes du cycle (partie b) aura d'autant plus de répercussion sur le flux que la vitesse de recyclage initiale sera élevée. V_1 et V_2 : vitesse à travers chaque étape du cycle ; X_1 et X_2 : concentrations des deux intermédiaires du cycle.

Trois boucles métaboliques peuvent être localisées à différents niveaux de la voie de la glycolyse/néoglucogénèse : le cycle glucose 6-phosphate (G6P) - glucose, nommé « cycle des glucoses », le cycle fructose 6-phosphate (F6P) - fructose 1,6-biphosphate (F1,6bP), appelé « cycle des fructoses » et le cycle phosphoénolpyruvate (PEP) - pyruvate (Figure I.28). Chacun de ces cycles constitue une étape sujette à de multiples régulations et joue un rôle potentiel déterminant dans le contrôle de ces deux voies métaboliques indissociables.

Figure I.28 : Cycles métaboliques des voies glycolytique et néoglucogénique.



F6P : fructose 6-phosphate ; F2,6bP : fructose 2,6-biphosphate ; F1,6bPase : fructose 1,6-biphosphatase ; F2,6bPase : fructose 2,6-biphosphatase ; GK : glucokinase ; G6Pase : glucose 6-phosphatase ; G6P : glucose 6-phosphate ; OAA : oxaloacétate ; PC : pyruvate carboxylase ; PEP : phosphoénolpyruvate ; PEPCK : phosphoénolpyruvate carboxykinase ; PFK-1 : phosphofructokinase-1 ; PFK-2 : phosphofructokinase-2 ; PK : pyruvate kinase ; PYR : pyruvate. Adapté de (Pilkis and Granner 1992).

Pour ajouter à la complexité structurelle de cette voie métabolique, plusieurs des intermédiaires de la glycolyse/néoglucogénèse sont communs à d'autres voies métaboliques distinctes et certaines de ces enzymes clés sont également localisées dans des compartiments intracellulaires autres que le cytosol (réticulum endoplasmique, noyau, mitochondrie), ce qui leur confère des propriétés et/ou une régulation particulières.

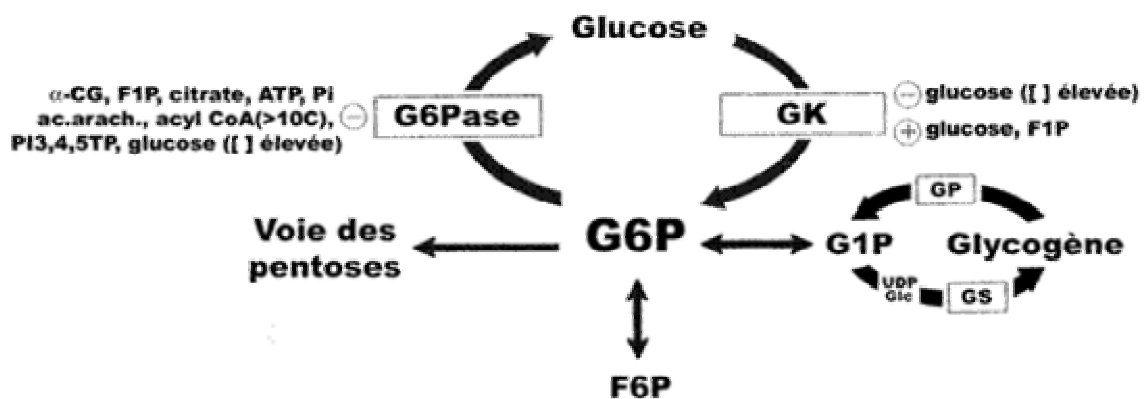
Enfin, une zonation métabolique existe au niveau du foie où la distribution quantitative des enzymes des deux voies varie selon la localisation proximale (hépatocytes périportaux) ou distale (hépatocytes périverneux) des cellules le long de l'axe vasculaire hépatique.

1.1 Le carrefour du glucose 6-phosphate et le cycle G6P-Glucose

Le cycle des « glucoses » ne constitue pas une boucle métabolique exclusive de la voie de la glycolyse/néoglucogénèse car le G6P est situé au carrefour de plusieurs autres voies métaboliques de grande importance, principalement la voie de la glycogénolyse/glycogénogénèse et celle des

pentoses phosphates (Figure I.29). Ainsi, la concentration de ce métabolite n'est pas uniquement contrôlée par l'activité des deux enzymes « miroirs » du cycle mais également par la vitesse des autres réactions qui l'utilisent ou le produisent.

Figure I.29 : Organisation du carrefour du glucose 6-phosphate et principaux effecteurs du cycle des « glucoses ».



ac. arach. : acide arachidonique ; ATP : adénosine triphosphate ; α-CG : α-cétoglutarate ; F1P : fructose 1-phosphate ; F6P : fructose 6-phosphate ; GK : glucokinase ; G6Pase : glucose 6-phosphatase ; G1P : glucose 1-phosphate ; G6P : glucose 6-phosphate ; GP : glycogène phosphorylase ; GS : glycogène synthase ; Pi : phosphate inorganique ; PI3,4,5TP : phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate ; UDP-Glc : uridine diphosphate glucose. Adapté de (Pilkis and Granner 1992).

Nous limiterons notre approche au cadre strict de la glycolyse/néoglucogénèse et à la régulation des deux enzymes constitutives du cycle G6P-glucose que sont la glucokinase (GK) et la glucose 6-phosphatase (G6Pase).

1.1.1 Glucokinase

La GK hépatique est une protéine monomérique de 55 kDa et constitue la première enzyme de la glycolyse. De la famille des hexokinases (hexokinase IV), cette enzyme catalyse la phosphorylation du glucose en G6P et possède des caractéristiques cinétiques particulières. En effet, à l'inverse des autres types d'hexokinases connus, la GK possède un K_m élevé pour le glucose (~10-12 mM) et n'est pas directement inhibée, à concentration physiologique, par son produit le G6P (K_i = 60 mM) (Printz, Magnuson et al. 1993). L'activité de la GK semble donc directement dépendante de la disponibilité en substrat à l'intérieur de l'hépatocyte. Cependant, avec des concentrations de glucose relativement élevées, une inhibition indirecte de l'enzyme peut être observée, consécutive à une augmentation du F6P intracellulaire qui se lie avec la protéine de régulation et entraîne une élévation de son affinité pour la GK.

1.1.2 Glucose 6-phosphatase

La glucose 6-phosphatase (G6Pase), du fait de sa position stratégique au niveau de l'étape terminale des voies glycogénolytique et néoglucogénique, est une enzyme clé potentielle pour le contrôle du métabolisme glucidique. La G6Pase semble posséder de multiples activités mais catalyse principalement la réaction d'hydrolyse du G6P en glucose et Pi (Foster and Nordlie 2002). Il est aujourd'hui reconnu par tous que la G6Pase est localisée dans le réticulum endoplasmique lisse et rugueux. Du fait de son K_m supérieur à la concentration intracellulaire de G6P, l'activité de la G6Pase est uniquement contrôlée par la disponibilité en substrat.

Plusieurs travaux réalisés *in vitro* sur microsomes isolés ont démontré que la G6Pase peut être inhibée par différents métabolites comme l' α -cétooglutarate (α -CG), le F1P, le citrate, l'acide arachidonique ou certains esters d'acyl CoA à chaînes moyennes ou longues supérieures à 10 atomes de carbone (Mithieux, Vega et al. 1990 ; Robbins, Foster et al. 1991 ; Mithieux, Bordeto et al. 1993; Mithieux and Zitoun 1996). Les hormones pancréatiques pourraient également modifier l'activité de l'enzyme à la fois *in vivo* et *in vitro* : l'insuline exercerait un effet inhibiteur (Gardner, Liu et al. 1993), probablement par l'intermédiaire du phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PI3,4,5TP) (Mithieux, Daniele et al. 1998), alors que le glucagon pourrait éventuellement l'activer (Speth and Schulze 1981 ; Striffler, Garfield et al. 1984). Enfin, la G6Pase est inhibée par l'ATP et le Pi ainsi que par son produit, le glucose, avec toutefois un K_i pour ce dernier compris entre 50 et 200 mM (Arion, Wallin et al. 1972), ce qui est très supérieur aux concentrations physiologiques rencontrées *in vivo*.

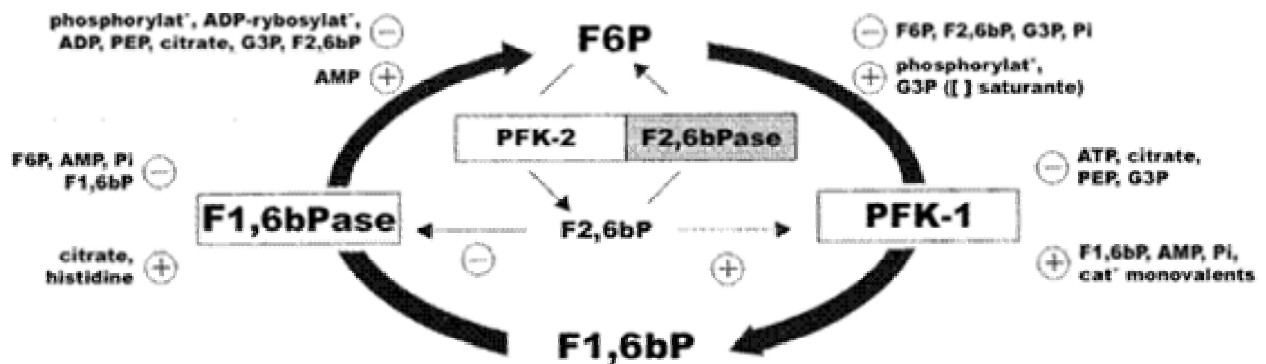
1.2 Le cycle F1,6bP-F6P et l'enzyme bi-fonctionnelle

La fructose 1,6-biphosphatase (F1,6bPase) et la phosphofructokinase-1 (PFK-1) composent le cycles des « fructoses » et sont la cible d'un grand nombre d'effecteurs. Cependant, il est aujourd'hui bien reconnu que la régulation de ce cycle est plutôt assurée par une troisième enzyme, nommée enzyme bi-fonctionnelle, et dont la particularité repose sur le fait qu'elle catalyse deux réactions opposées permettant de contrôler la concentration du fructose 2,6-biphosphate (F2,6bP), un effecteur allostérique majeur des deux enzymes précédentes (Figure I.30).

1.2.1 Phosphofructokinase-1

La phosphofructokinase de type 1 (PFK-1) est une protéine tétramérique de 340 kDa qui constitue une des principales enzymes clefs de la glycolyse en catalysant la phosphorylation du F6P en F1,6bP. Elle peut être régulée de manière allostérique par plusieurs effecteurs. En effet, l'enzyme est principalement inhibée par l'ATP, mais également par le citrate, le PEP et le G3P, et ses effecteurs positifs sont le F2,6bP, l'AMP ainsi que le Pi, ces derniers agissant en synergie avec le substrat de la réaction, le F6P (Hue 1981). Initialement considéré comme un effecteur positif potentiel, il semble que le produit de la réaction, le F1,6bP, n'exerce finalement qu'un faible effet activateur sur la PFK-1 à concentration physiologique.

Figure I.30 : Organisation du cycle des « fructoses » et principaux effecteurs.



ATP : adénosine triphosphate ; ADP : adénosine diphosphate ; AMP : adénosine monophosphate ; F1,6bPase : fructose 1,6-biphosphatase ; F2,6bPase : fructose 2,6-biphosphatase ; F6P : fructose 6-phosphate ; F1,6bP : fructose 1,6-biphosphate ; F2,6bP : fructose 2,6-biphosphate ; G3P : glycérol 3-phosphate ; PFK-1 : phosphofructokinase-1 ; PFK-2 : phosphofructokinase-2 ; PEP : phosphoénolpyruvate ; Pi : phosphate inorganique. Adapté de (Pilkis and Granner 1992).

1.2.2 Fructose 1,6-biphosphatase

La fructose 1,6-biphosphatase hépatique (F1,6bPase) est une enzyme tétramérique d'environ 140 kDa avec une localisation intracellulaire périnucléaire (Saez, Figueroa et al. 1996). Cette enzyme clé de la néoglucogenèse catalyse la conversion irréversible du F1,6bP en F6P et en Pi et présente une cinétique Mickaëlienne avec un Km d'environ 5 μ M pour son substrat. Les principaux facteurs qui interviennent dans le contrôle de son activité sont les concentrations de ses principaux inhibiteurs, l'AMP et le F2,6bP, qui agissent en synergie pour potentialiser leur action respective au niveau de l'enzyme. Ses produits, le Pi et le F6P ainsi que son substrat, le F1,6bP, inhibe également l'enzyme, mais ce dernier uniquement à des concentrations supra-physiologiques (Hue 1981). Les rares activateurs identifiés de la F1,6bPase sont le citrate et l'histidine.

1.2.3 Enzyme bi-fonctionnelle (PFK-2/F2,6bPase)

Il semble en fait que la régulation du cycle des « fructoses » repose essentiellement sur le F2,6bP, un effecteur allostérique dont la concentration intracellulaire est finement contrôlée par l'enzyme bi-fonctionnelle PFK-2/F2,6bPase. Cette enzyme dimérique de 110 kDa peut être phosphorylée sur un résidu sérine par la PKA ce qui affecte l'activité de ses deux domaines catalytiques, kinase et biphosphatase (Pilkis, Claus et al. 1995). En effet, la phosphorylation induit une inhibition de la PFK-2, qui se traduit par une augmentation de son Km pour le F6P et d'une diminution de sa Vmax, couplée à une activation de la F2,6bPase entraînant une augmentation exclusive de sa Vmax. Cette double action a pour conséquence une diminution de la concentration de F2,6bP, cet effecteur allostérique agissant ensuite de manière concomitante comme un puissant activateur de la PFK-1 et un inhibiteur de la F1,6bPase (Pilkis, Claus et al. 1995). L'enzyme bi-fonctionnelle peut également être régulée par ADP-ribosylation sur résidu arginine, ce qui empêche

sa phosphorylation et se traduit par une diminution de l'activité de PFK-2 (Kurland and Pilkis 1995). La signification physiologique de ce mécanisme reste cependant floue.

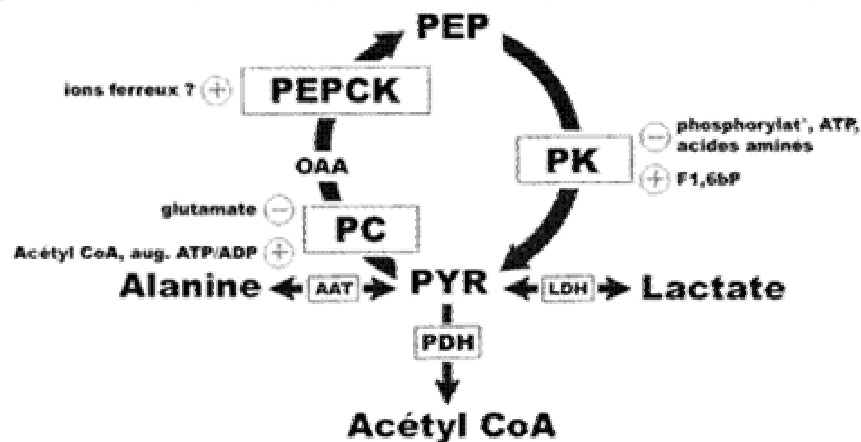
De manière individuelle, l'activité de la PFK-2, comme celle de PFK-1, est inhibée par ses deux produits, l'ADP et le F2,6bP, ainsi que par le citrate, le PEP et le glycérol 3-phosphate (G3P). A l'inverse, PFK-2 peut être activée par l'AMP (van Schaftingen, Davies et al. 1982). De son côté, la F2,6bPase est à la fois inhibée par le produit (F6P) et le substrat (F2,6bP) de la réaction qu'elle catalyse (van Schaftingen, Davies et al. 1982) et la modulation de son activité par le phosphate inorganique (Pi) et le G3P varie en fonction de la concentration des deux effecteurs (inhibition à concentration physiologique puis activation à concentration saturante) (Stewart, el-Maghrabi et al. 1985).

1.3 Le carrefour du pyruvate et le cycle PEP-Pyruvate

Le cycle PEP-Pyruvate, comme celui des « glucoses », n'est pas restreint à la voie de la glycolyse/néoglucogenèse car, outre sa carboxylation en oxaloacétate par la pyruvate carboxylase (PC), le pyruvate peut également subir une décarboxylation oxydative en acétyl CoA par la pyruvate déshydrogénase (PDH), être transaminé en alanine par l'alanine aminotransférase (AAT) ou encore réduit en lactate par la lactate déshydrogénase (LDH) en fonction du potentiel redox cellulaire.

On peut réduire grossièrement le cycle PEP-pyruvate (Figure I.31) à trois réactions distinctes, la première étant catalysée par la pyruvate kinase (PK) et les deux autres par la pyruvate carboxylase (PC) et la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK). Cependant, ce cycle métabolique, dont une des particularités réside dans sa compartimentation (chez le rat, la PK et la PEPCK sont cytosoliques alors que la PC est exclusivement mitochondriale), est également dépendant des transporteurs de pyruvate et de glutamate.

Figure I.31 : Organisation du cycle PEP-pyruvate et principaux effecteurs enzymatiques.



ALAT : alanine aminotransférase ; ATP : adénosine triphosphate ; ADP : adénosine diphosphate ; F1,6bP : fructose 1,6-biphosphate ; LDH : lactate déshydrogénase ; OAA : oxaloacétate ; PC : pyruvate carboxylase ; PDH : pyruvate déshydrogénase ; PEP : phosphoénolpyruvate PEPCK : phosphoénolpyruvate carboxykinase ; PK : pyruvate kinase ; PYR : pyruvate. Adapté de (Pilkis, Claus et al. 1995).

1.3.1 Pyruvate kinase

La L-pyruvate kinase est l'isoforme hépatique de la dernière enzyme de la glycolyse et peut jouer de ce fait un rôle potentiellement important dans le contrôle de la voie métabolique. Cette protéine tétramérique d'environ 250 kDa catalyse la réaction unidirectionnelle aboutissant à la formation de pyruvate et d'ATP à partir de PEP et d'ADP. La PK, est finement régulée par un certain nombre d'effecteurs allostériques qui modulent son activité en modifiant son affinité pour son substrat. L'enzyme, dont l'activité requiert la présence de cations monovalents, est principalement activée par le F1,6bP et inhibée par un de ses produits, l'ATP, ainsi que certains acides aminés comme l'alanine, la sérine, ou la phénylalanine (Hue 1981).

Elle est la seule enzyme du cycle PEP-pyruvate pouvant être phosphorylée et s'avère donc une cible privilégiée de l'action des hormones. Elle est inhibée par phosphorylation sur résidu sérine par la PKA, ce qui entraîne une diminution de l'affinité de l'enzyme pour ses principaux effecteurs positifs, le PEP et le F1,6bP (Engstrom 1978). Il a également été proposé que la modification de la conformation de la PK par ses principaux effecteurs allostériques puissent influencer la vitesse de phosphorylation de l'enzyme et donc son inactivation (Berglund, Ljungstrom et al. 1977 ; Feliu, Hue et al. 1977). En effet, l'inhibition de la PK par phosphorylation est empêchée par ses deux principaux effecteurs positifs, le PEP et le F1,6bP, mais également par son produit, le pyruvate, à des concentrations élevées (Feliu, Hue et al. 1977). Ainsi, les effecteurs allostériques qui augmentent l'activité de la PK sont également ceux qui préviennent son inactivation par phosphorylation.

1.3.2 Pyruvate carboxylase

La pyruvate carboxylase (PC) est une protéine tétramérique de 500 kDa et constitue, avec la PEPCK, une des deux enzymes de la première étape de la néoglucogenèse à partir du pyruvate s'opposant à la PK. Chez l'homme comme chez le rat, la localisation de la PC est exclusivement mitochondriale et l'enzyme, après transport intra-mitochondrial du pyruvate, catalyse la réaction endergonique de conversion de ce dernier en oxaloacétate (OAA) (Jitrapakdee and Wallace 1999). Le pyruvate est transporté du cytosol vers la mitochondrie par l'intermédiaire d'un transporteur non spécifique sensible au pH avec un Km apparent de 0.15 mM (Halestrap 1975). La synthèse d'OAA par la PC nécessite de la biotine ainsi que du Mg^{2+} comme co-facteurs. L'enzyme possède un Km pour le pyruvate proche des concentrations physiologiques (0.14 mM) et son activité dépend donc étroitement de la concentration de son substrat (Hue 1981). Elle est également régulée par des effecteurs dont la majorité possèdent des effets opposés sur la PdH. En effet, la PC est activée par l'acétyl-CoA et par un rapport ATP/ADP élevé. A l'inverse, il semble que le glutamate soit son effecteur négatif le plus puissant. Enfin, l'enzyme n'est pas régulée par un mécanisme de phosphorylation/déphosphorylation (Hers and Hue 1983).

1.3.3 Phosphoénolpyruvate carboxykinase

La phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) est une protéine monomérique de 74 kDa qui catalyse la réaction endergonique aboutissant à la synthèse du PEP à partir d'OAA et de GTP. Elle est généralement considérée comme la seconde enzyme de la néoglucogenèse contribuant à contourner la barrière thermodynamique de la réaction catalysée par la PK.

Distribuée de manière relativement équitable entre les compartiments cytosolique et mitochondrial chez l'homme, il semble que la localisation de la PEPCK chez le rat soit majoritairement cytosolique (Lardy and Hughes 1984). Son K_m étant proche des concentrations intracellulaires d'OAA (de l'ordre du micromolaire), l'activité de l'enzyme est principalement contrôlée par la disponibilité en substrat (Hue 1981). Bien que son activité catalytique puisse être influencée par l'état redox des groupements thiols de la protéine et par la présence de certains ions ferreux activateurs (Lardy and Hughes 1984), la PEPCK, contrairement aux deux autres enzymes du cycle, n'est régulée ni par phosphorylation, ni par des effecteurs allostériques.

2. Contrôle de la néoglucogenèse

La néoglucogenèse hépatique est contrôlée par la fourniture et la disponibilité en substrats glucoformateurs (la répartition du contrôle entre les différentes étapes pouvant varier en fonction de la concentration de substrat et du flux à travers la voie), par le glucose qui est son produit final, par l'environnement hormonal de l'organisme ainsi que par l'état énergétique cellulaire.

2.1 A partir de différents substrats

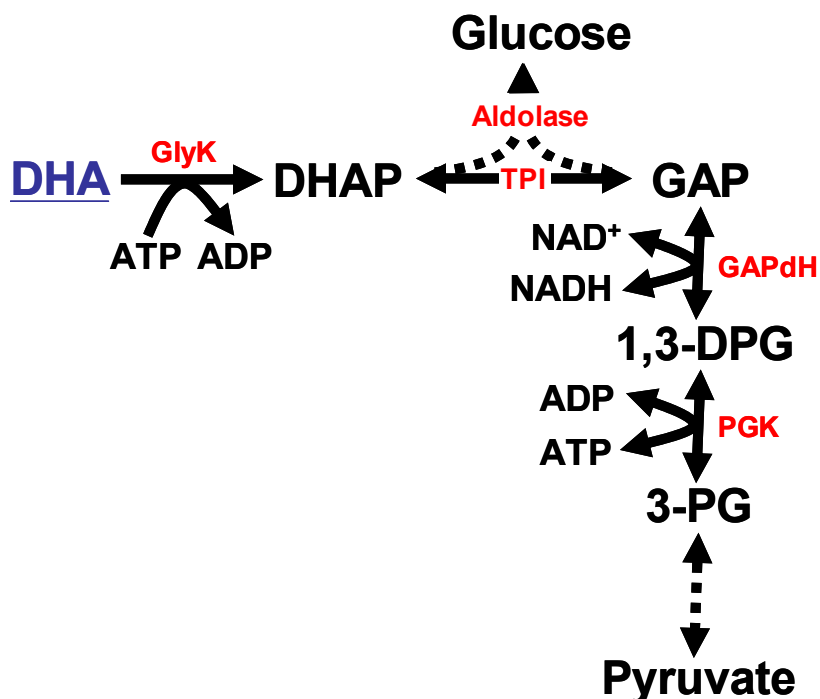
Au cours du jeûne, le foie synthétise du glucose à partir des différents précurseurs néoglucogéniques en provenance des tissus extra-hépatiques : le lactate et le pyruvate, le glycérol. De plus, certains autres substrats glucoformateurs peuvent être apportés par l'alimentation, comme le fructose et, dans un degré moindre, la dihydroxyacétone.

Tous ne rentrent pas au même niveau dans la voie métabolique ce qui entraîne donc des différences en terme de contrôle.

2.1.1 Dihydroxyacétone

La dihydroxyacétone (DHA) est un substrat non physiologique que l'on peut toutefois retrouver en faible quantité dans l'alimentation. Il constitue un outil de premier choix dans l'étude du métabolisme hépatique car ses carbones empruntent simultanément les voies de la néoglucogenèse et de la glycolyse en fonction de l'état énergétique cellulaire (Figure I.32).

Figure I.32 : Schéma récapitulatif du métabolisme du DHA.



ATP : adénosine triphosphate ; ADP : adénosine diphosphate ; DHA : dihydroxyacétone ; DHAP : dihydroxyacétone phosphate ; 1,3-DPG : 1,3 diphosphoglycérate ; 3-PG : 3 phosphoglycérate ; GlyK : glycérol kinase ; GAP : glycéraldéhyde 3-phosphate ; GAPdH : glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase ; NAD⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide oxydé ; NADH : nicotinamide adénine dinucléotide réduit ; PGK : phosphoglycérate kinase ; TPI : triose phosphate isomérase.

Le transport du DHA à l'intérieur de la cellule est mal caractérisé mais s'effectue probablement par simple diffusion en fonction du gradient de concentration de part et d'autre de la membrane plasmique. De même, la première étape de phosphorylation du DHA en dihydroxyacétone phosphate (DHAP) est également mal établie car la kinase catalysant la réaction pourrait ne pas être unique. En effet, la glycérol kinase (GlyK) et la trikinase (TK) sont deux enzymes qui ont été respectivement identifiées comme des candidates potentielles (Lin 1977; Miwa, Kito et al. 1994). Toutefois, il est généralement admis que la phosphorylation du DHA est plutôt catalysée par la GlyK. La particularité de cette enzyme est qu'elle possède une faible élasticité pour son produit, c'est-à-dire que l'accumulation de DHAP n'exerce pas de rétrocontrôle négatif sur l'enzyme.

Le contrôle du métabolisme du DHA est principalement exercé au niveau de plusieurs étapes dépendantes de l'état énergétique cellulaire (assimilé au rapport ATP/ADP cytosolique) que sont la phosphorylation du substrat par la GlyK, l'étape catalysée par la 3-phosphoglycérate kinase (PGK) et celle de la PK.

2.1.2 Glycérol

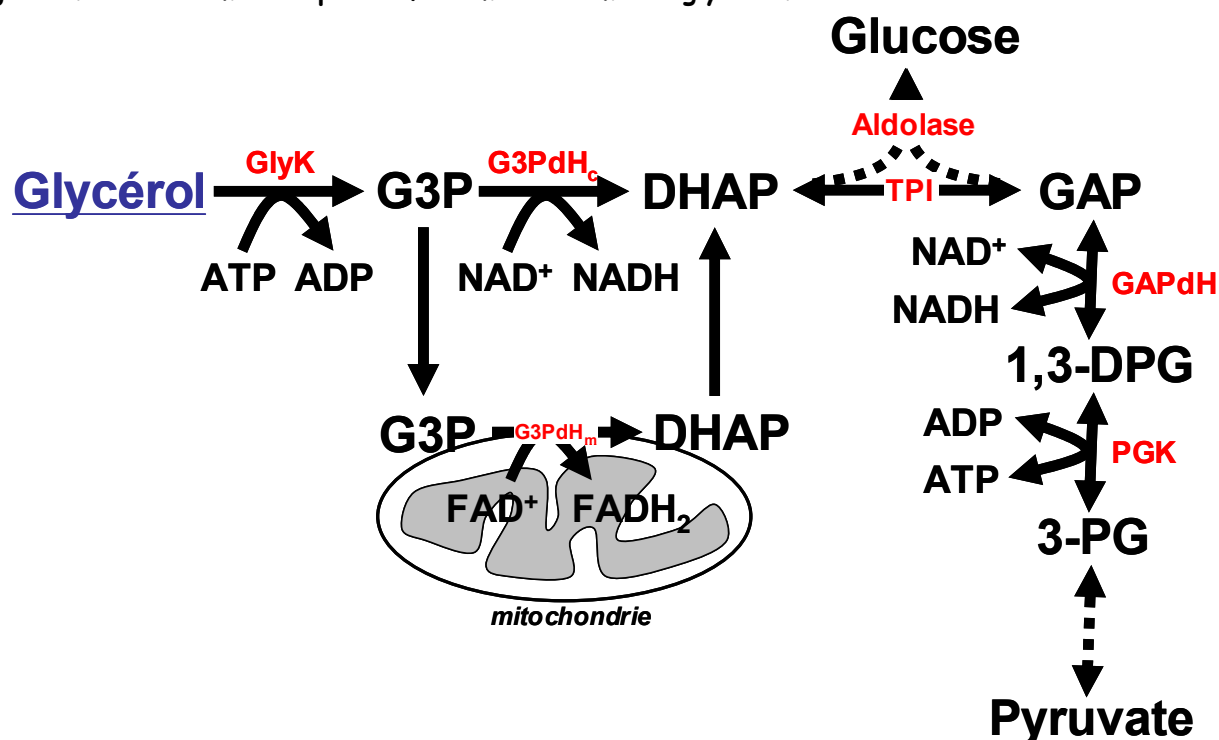
Bien que le transport du glycérol intracellulaire soit encore mal caractérisé (Lin 1977), ce dernier ne semble pas être contrôlant pour son métabolisme.

Le glycérol entre dans la voie de la glycolyse/néoglucogenèse au même niveau que le DHA et son métabolisme diffère de ce dernier par la seule présence d'une étape supplémentaire entre sa phosphorylation par la GlyK et le DHAP (Figure I.33). Celle-ci catalyse l'oxydation du G3P en DHAP par l'isoforme cytosolique de la glycérol 3-phosphate déshydrogénase (G3PdH_c) et nécessite la présence de NAD⁺ comme co-facteur.

Le flux à travers la GlyK n'étant limité que par des diminutions importantes du rapport ATP/ADP cytosolique, le contrôle de la néoglucogenèse à partir du glycérol est majoritairement exercé par l'étape de la G3PdH dépendante du potentiel redox cytosolique (rapport NADH/NAD⁺) (Berry, Kun et al. 1973).

En présence de glycérol, la ré-oxydation des équivalents réduits s'effectue majoritairement par l'intermédiaire de la navette G3P/DHAP, étroitement liée à la chaîne respiratoire par l'isoforme mitochondriale de la G3PdH.

Figure I.33 : Schéma récapitulatif du métabolisme du glycérol.

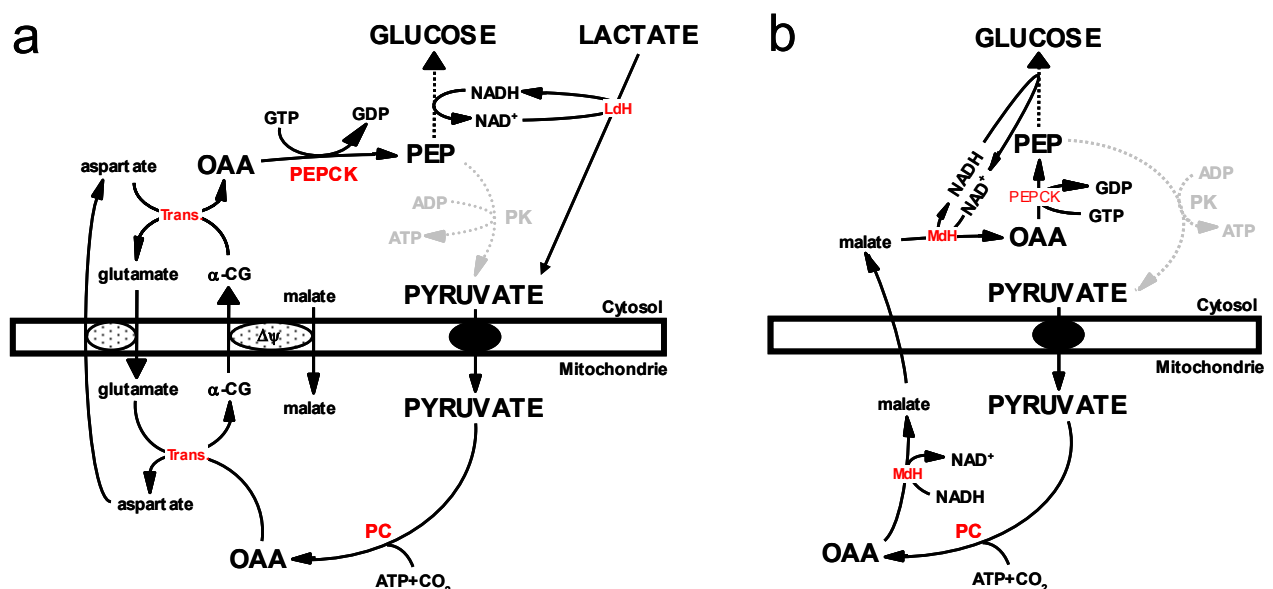


ATP : adénosine triphosphate ; ADP : adénosine diphosphate ; DHA : dihydroxyacétone ; DHAP : dihydroxyacétone phosphate ; 1,3-DPG : 1,3 diphosphoglycérate ; 3-PG : 3 phosphoglycérate ; GlyK : glycérol kinase ; GAP : glyceraldéhyde 3-phosphate ; GAPdH : glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase ; G3PdH_c : glycérol 3-phosphate déshydrogénase cytosolique ; G3PdH_m : glycérol 3-phosphate déshydrogénase mitochondriale ; G3P : glycérol 3-phosphate ; NAD⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide oxydé ; NADH : nicotinamide adénine dinucléotide réduit ; PGK : phosphoglycérate kinase ; TPI : triose phosphate isomérase.

2.1.3 Lactate et pyruvate

Avec du lactate et du pyruvate comme substrat, le contrôle de la néoglucogénèse est réparti entre un grand nombre d'étapes, notamment au niveau de la PC, de la PK, de la F1,6bPase ainsi que d'autres étapes en dehors de celles classiquement identifiées, comme par exemple le transporteur mitochondrial des nucléotides adényliques (Groen, van Roermund et al. 1986). Outre l'ATP, la néoglucogénèse à partir du cycle PEP/pyruvate nécessite la fourniture d'équivalents réduits. Or, si l'entrée de lactate dans la voie permet de générer du NADH, le métabolisme à partir du pyruvate, en revanche, est très dépendant de la fourniture en équivalents réduits dans le cytoplasme qui, dans ces conditions particulières, s'effectue alors par un mécanisme de navette (Figure I.34).

Figure I.34 : Voie de la néoglucogénèse à partir du lactate (a) et du pyruvate (b).



ATP : adénosine triphosphate ; ADP : adénosine diphosphate ; α -CG : α -cétoglutarate ; GTP : guanidine triphosphate ; GDP : guanidine diphosphate ; MdH : malate déshydrogénase ; NAD⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide oxydé ; NADH : nicotinamide adénine dinucléotide réduit ; OAA : oxaloacétate ; PC : pyruvate carboxylase ; PEPCK : phosphoenolpyruvate carboxykinase ; PEP : phosphoenolpyruvate ; PK : pyruvate kinase ; Trans. : transaminase. Adapté de (Hue 1981).

2.2 Les acides gras

Les effets des acides gras sur le métabolisme hépatique sont connus depuis longtemps (Randle, Garland et al. 1965). Il est généralement admis que l'oxydation des acides gras modifie le métabolisme du glucose en réduisant l'utilisation de celui-ci, principalement par une inhibition de la glycolyse (Hue, Maisin et al. 1988), et en activant la gluconéogénèse. Initialement décrite sur un modèle de foie isolé perfusé (Struck, Ashmore et al. 1965), la stimulation de la gluconéogénèse par les acides gras a ensuite été confirmée par la majorité des travaux réalisés avec ce modèle (Soling, Willms et al. 1968 ; Williamson, Scholz et al. 1969 ; Patel, Barron et al. 1984 ; Gonzalez-Manchon,

Ayuso et al. 1989) ainsi que sur hépatocytes isolés (Blumenthal 1983 ; Ochs and Harris 1986 ; Berry, Gregory et al. 1988 ; Morand, Remesy et al. 1993). L'effet des acides gras sur la gluconéogenèse est classiquement attribué à des modifications de la concentration intracellulaire d'acétyl-CoA, produit terminal commun de la β -oxydation mitochondriale et de l'oxydation du pyruvate par la PdH. En effet, cet intermédiaire métabolique constitue un puissant activateur de la PC (Williamson, Scholz et al. 1969 ; Brocks, Siess et al. 1980) et sa concentration ainsi que le rapport acétyl-CoA/CoA joue un rôle important au niveau de la régulation de la PdH. L'oxydation des acides gras pourrait également influencer sur la gluconéogenèse par ses conséquences sur (i) l'état redox cellulaire, (ii) les concentrations d'ATP et d'ADP et/ou le rapport ATP/ADP et (iii) la concentration intracellulaire de citrate, un effecteur de la PFK-2 et de la F1,6bPase (Siess and Wieland 1976 ; Soboll, Seitz et al. 1984 ; Agius and Alberti 1985).

2.3 Par les hormones pancréatiques

La néoglucogenèse est régulée par les hormones pancréatiques qui agissent par l'intermédiaire d'une modulation de la concentration intracellulaire en AMPc.

En situation de jeûne, le glucagon, comme d'autres agonistes β -adrénergiques, stimule la néoglucogenèse par une cascade de phosphorylation dépendante de l'AMPc, ce qui entraîne une inactivation de la PK et de la PFK-2 et une activation de la F2,6bPase (Pilkis, el-Maghrabi et al. 1988). Cependant il semble que le contrôle de la néoglucogenèse en présence de glucagon diffère en fonction des substrats. Avec du lactate+pyruvate comme précurseur, Groen et al. ont calculé que la majeure partie du contrôle est exercé par la PC (Groen, Vervoorn et al. 1983). A l'inverse, une étude récente semble montrer qu'en présence de DHA comme substrat, les enzymes du cycle PEP-pyruvate sont peu contrôlantes et la répartition du contrôle s'effectue alors probablement entre le cycle des « fructoses » et des « glucoses », (Ichai, Guignot et al. 2001). Dans cette dernière étude, un effet du glucagon sur l'hydrolyse du G6P au niveau de l'étape de la G6Pase a été mis en évidence, sans modification de l'activité intrinsèque de l'enzyme.

En ce qui concerne l'insuline, elle inhibe classiquement la néoglucogenèse par un effet antagoniste au glucagon au niveau de l'AMPc empêchant ainsi l'inactivation de la PK et de la PFK-2 et l'activation de la F2,6bPase (Pilkis, el-Maghrabi et al. 1988).

2.4 Par le métabolisme énergétique

La cellule en aérobie produit de l'ATP principalement à partir de la phosphorylation oxydative mitochondriale, mais elle peut également synthétiser cette molécule par l'intermédiaire de la glycolyse en condition anaérobie ou lorsque la voie de phosphorylation mitochondriale est inhibée. Les métabolismes énergétique et glucidique sont étroitement liés par les modifications des rapports ATP/ADP et NADH/NAD⁺ cytosolique.

En condition physiologique, plusieurs des enzymes clés de la néoglucogenèse peuvent être régulées par une modification du rapport ATP/ADP ou des concentrations des différents nucléotides ce qui peut donc se répercuter sur le contrôle du flux à travers la voie. Généralement, l'ATP et l'AMP agissent en sens opposé : le premier stimule la néoglucogenèse, par une augmentation du rapport ATP/ADP au niveau de la PC et/ou une inhibition de la PK, tandis que le second l'inhibe, étant un effecteur positif des deux phosphofructokinase (PFK-1 et PFK-2). De plus, la 3-phosphoglycérate kinase (PGK) fonctionnant près de l'équilibre, le sens de la réaction qu'elle catalyse entre le 1,3 DPG et le 3-PG dépend étroitement du rapport ATP/ADP.

Des variations du potentiel redox cellulaire, se traduisant par une modification du rapport NADH/NAD⁺ cytosolique, peuvent également réguler la néoglucogenèse au niveau de deux enzymes : la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (G3PDH) et la pyruvate carboxylase (PC). La G3PDH étant une enzyme proche de l'équilibre avec le NADH et le NAD⁺ comme co-facteurs, le rapport de leurs concentrations détermine l'orientation du flux à travers l'enzyme. De plus, une augmentation du potentiel redox peut également activer le flux à travers la PC, car le pyruvate et l'oxaloacétate sont impliqués dans le transport des équivalents réduits entre le cytosol et la mitochondrie.

Enfin, le citrate et l'acétyl CoA établissent un lien entre le cycle de Krebs et la néoglucogenèse en activant la néoglucogenèse. Leurs actions sont complémentaires car leurs concentrations varient le plus souvent en parallèle : le citrate agit sur le cycle des « fructoses » et inhibe les deux phosphofructokinases (PFK-1 et PFK-2), diminuant ainsi la concentration en F2,6bP, et l'acétyl CoA a une action sur le cycle PEP/pyruvate, en stimulant la PC et en inhibant la PdH (Hue 1981).

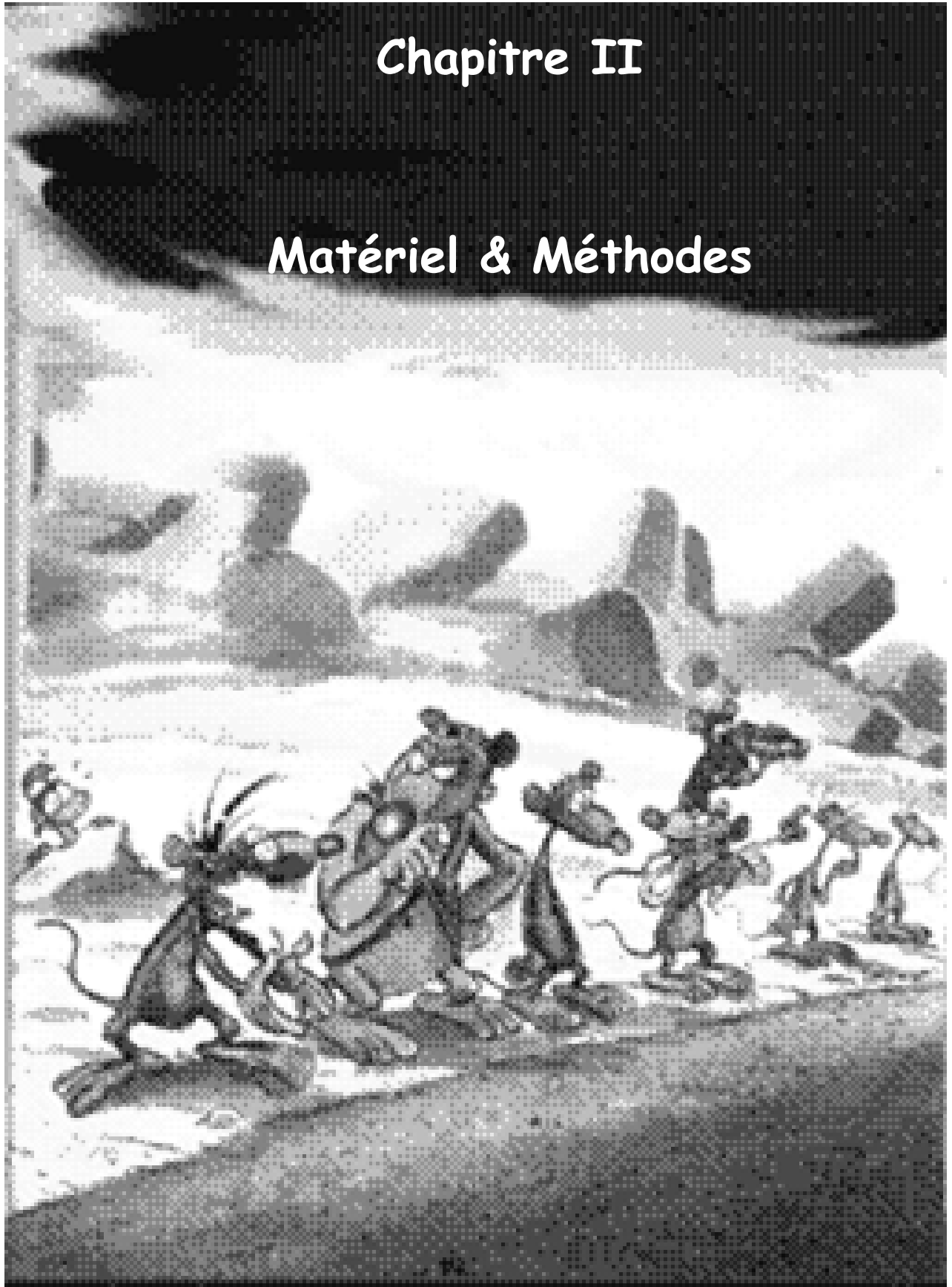
2.5 Contrôle transcriptionnel de la néoglucogenèse

En terme de physiologie intégrée, la régulation transcriptionnelle constitue également une partie cruciale du contrôle hormonal et nutritionnel de la glycolyse et de la néoglucogenèse. L'environnement nutritionnel de l'organisme ainsi que certaines hormones comme l'insuline, le glucagon ou les glucocorticoïdes entraînent une modification significative du contenu hépatique en enzymes des voies glycolytique et néoglucogénique. Cette régulation à long terme est basée sur des modifications transcriptionnelles. Il est aujourd'hui généralement reconnu qu'une période de jeûne induit l'expression des principales enzymes clés de la néoglucogenèse (PEPCK, PC et G6Pase) et diminue celle des enzymes glycolytiques (GK, PFK-2 et PK) (Pilkis and Granner 1992). De toutes ces enzymes, il apparaît que la PEPCK est celle dont la demi-vie est la plus courte (6 heures) et de ce fait elle a longtemps été décrite comme la principale étape limitante de la néoglucogenèse. Les études portant sur l'analyse du contrôle métabolique ont depuis permis de relativiser ce concept puisqu'il a été montré que le contrôle du flux à travers la voie de la néoglucogenèse est en fait partagé entre la PEPCK et d'autres enzymes toutes aussi importantes. De même, le glucose induit également l'expression d'un certain nombre de gènes, notamment ceux codant pour la PK et pour la G6Pase, ce qui est plutôt paradoxal pour cette dernière et reste encore aujourd'hui mal compris (Girard, Ferre

et al. 1997; Nordlie, Foster et al. 1999). Enfin, les hormones jouent également un rôle important au niveau de la régulation transcriptionnelle des voies métaboliques, l'insuline et le glucagon exerçant des effets antagonistes sur le niveau de l'expression de certains gènes. En effet, l'insuline induit l'expression de la PK et de la GK et réprime celle de la PEPCK et de la G6Pase (Barthel and Schmoll 2003) alors que le glucagon et l'AMPc fonctionnent à l'opposé en diminuant l'expression de la PK et de la GK et en surexprimant la G6Pase (Nordlie, Foster et al. 1999). Toutefois, malgré un nombre croissant d'études sur ce domaine, les mécanismes intracellulaires exacts liant l'environnement nutritionnel et hormonal à la régulation transcriptionnelle du métabolisme hépatique sont encore largement méconnus et nécessitent de plus vastes investigations. Des travaux ont cependant mis en évidence le rôle joué par une protéine nommée CREB (cyclic AMP response element binding protein) dans le contrôle à long terme de la néoglucogénèse (Herzig, Long et al. 2001) par l'intermédiaire de PGC-1 (peroxisome proliferator-activated receptor-1), un co-activateur de certains récepteurs nucléaires et de plusieurs facteurs de transcription intervenant dans l'activation de l'expression des gènes codant pour les principales enzymes clés de la néoglucogénèse (PEPCK, PC et G6Pase) en situation de jeûne (Yoon, Puigserver et al. 2001). SREBP-1c (sterol regulatory element-binding proteins 1c), un autre facteur de transcription impliqué dans la régulation de l'expression des gènes (Becard, Hainault et al. 2001 ; Chakravarty, Leahy et al. 2001; Fofelle and Ferre 2002) en fonction de l'environnement nutritionnel et hormonal semble également impliqué.

Chapitre II

Matériel & Méthodes



II. MATERIEL & METHODES

Ces travaux reposent sur deux protocoles expérimentaux. La première étude (**Etude I**) évalue les modifications métaboliques et la répartition tissulaire de rats après un régime hyperlipidique, enrichi principalement en acides gras saturés.

La deuxième étude (**Etude II**) est subdivisée en deux « sous études ». La première consiste en une étude du statut bioénergétique et métabolique de rats atteints de stéatohépatite non-alcoolique (NASH) induite par un régime carencé en choline et en méthionine. La deuxième consiste à étudier les effets de deux médicaments sur la NASH : la metformine et l'almitrine.

1. Traitement des animaux

Ces travaux ont été réalisés sur la souche de rats Wistar. Des rats de sexe mâle ont été élevés dans des conditions standards d'alimentation. Ces expérimentations sont menées selon les recommandations de la Convention Européenne de Protection des Animaux Vertébrés utilisés dans un but Expérimental et Scientifique (Conseil Européen n°123, Strasbourg 1985). Les rats ont été fournis par Charles Rivers (L'Arbresle, France).

1.1 Etude I : Régime enrichi en acides gras saturés

Pour cette étude les rats ont été élevés dans l'animalerie du laboratoire, à partir de géniteurs provenant de la société Charles Rivers France. Après sevrage, à l'âge de 27 jours, les rats sont répartis de façon aléatoire en trois groupes expérimentaux, recevant chacun un régime alimentaire spécial. Les animaux sont hébergés à 4 par cage, nourris ad libitum et ont un libre accès à la boisson. Le groupe « Contrôle » reçoit l'alimentation standard (8% de l'énergie dérivée des lipides) utilisée en animalerie (A04 - Scientific Animal Food & Engineering, France), les deux autres groupes reçoivent une alimentation enrichie en lipides à 45% (m/m) ou 67% des calories totales (tableau II.1).

Tableau II.1 : valeur énergétique des différents régimes alimentaires.

	contrôle	coco	beurre
(kcal/kg)	2900	5500	5500
Protéines (% d'énergie)	20	13	13
Lipides (% d'énergie)	8	67	67
Carbohydrates (% d'énergie)	72	20	20

Deux sources de lipides différentes sont utilisées, de l'huile de coco (C1758 SIGMA) pour le régime « coco » et du beurre alimentaire (Carrefour) pour le régime « beurre ». Ces deux sources

lipidiques ont été choisies pour leur forte teneur en acides gras saturés (AGS). L'huile de coco est composée à 86,5% d'AGS, dont majoritairement de l'acide laurique (C12) et de l'acide miristique (C14). Le beurre est composé à 51,4% d'AGS, dont principalement de l'acide palmitique (C16) et de l'acide stéarique (C18), et contient 0,2% de cholestérol. La composition de ces deux sources lipidiques est détaillée dans le tableau II.2.

Tableau II.2 : composition des différentes sources lipidiques.

%	Beurre	Huile de coco
Acides gras saturés	51,4	86,5
10:0	12	6
12:0	2,5	44,6
14:0	7,4	16,8
16:0	21,7	8,2
18:0	10	2,8
Acides gras monoinsaturés	21	5,8
18:1	20	5,8
Acides gras polyinsaturés	3	1,8
18:2	2,8	1,8
18:3	0,3	0
Cholestérol	0,2	0

Les valeurs sont issues de l'United State Department of Agriculture, National Nutrient Database for Standard Reference. (www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/)

La confection des régimes hyperlipidiques consiste en un mélange d'une base alimentaire à 55% (m/m) et d'un corps gras à 45%. Ce que l'on appelle la base alimentaire correspond au régime standard (A04) sous forme de poudre auquel des protéines, des vitamines et des sels minéraux ont été rajoutés afin de maintenir des niveaux identiques au régime contrôle. Chaque semaine, 550g de base est mélangé à 450g de beurre ou d'huile de coco. Les deux sources lipidiques sont laissées 2h à température ambiante avant le mélange, afin de les rendre plus malléables. Le mélange est remué manuellement jusqu'à obtention d'une pâte homogène (30 min). Les deux régimes sont préparés chaque début de semaine, conditionnés sous forme de petites croquettes de la taille des croquettes standard, et stockées à -20°C. L'alimentation de nos trois groupes de rats est changée tous les jours

à 18 H, juste avant l'extinction de la lumière. La prise de poids de chaque rat, ainsi que la prise alimentaire par cage (c'est-à-dire la prise alimentaire globale pour 4 rats) sont mesurées chaque jour. Après 14 semaines de régime les rats sont sacrifiés pour les différentes études.

1.2. Etude II : Induction d'une NASH par un régime carencé en choline et méthionine

1.2.1 Régime « MCDD »

Pour cette étude les rats sont commandés à l'âge de 7 semaines à la société Charles Rivers France puis hébergés dans l'animalerie du laboratoire. Après deux semaines d'acclimatation les rats sont répartis de façon aléatoire en deux groupes expérimentaux. Ils sont hébergés à 4 par cage, nourris ad libitum et avec un libre accès à la boisson. Un premier groupe reçoit une alimentation carencée en méthionine et choline (MCDD : Methionine and Choline Deficient Diet) (ICN Pharmaceuticals France SA, ref n° 960439) pendant six semaines, le second groupe « Contrôle » reçoit l'alimentation standard utilisée en animalerie (A04 - Scientific Animal Food & Engineering, France) (tableau II.3). Au terme du régime, les rats sont utilisés, soit pour une étude sur mitochondries isolées de foie, soit pour une étude sur hépatocytes isolés.

Tableau II.3 : composition des différents régimes alimentaires.

<i>(g/kg)</i>	contrôle	MCDD
kcal/kg	2900	3660
protéines	160	175*
lipides	27	100
carbohydrates	596	655
cellulose	44	30
sels minéraux	50	40
humidité	123	

*: (exprimé en acides aminés)

1.2.2 Effet de l'Almitrine et de la Metformine

La deuxième partie de l'étude réalisée sur les rats MCDD consiste à étudier les effets de deux médicaments sur la NASH : la metformine et l'almitrine.

☞ **la Metformine** (Glucophage), qui est la molécule la plus largement utilisée dans le traitement du diabète de type II. Elle possède un effet hypoglycémiant, qui est médié par l'augmentation de l'utilisation du glucose par les muscles et la diminution de la production hépatique. En activant la voie de l'AMPK, la Metformine module le métabolisme glucidique mais aussi le métabolisme lipidique. Il a été démontré une diminution de l'activité de l'acetyl-CoA carboxylase

(ACC) sur des hépatocytes isolés de rats, ainsi qu'une augmentation de l'oxydation des lipides (Zhou, Myers et al. 2001). Le choix de la concentration de la drogue a été déterminé d'après des études réalisées sur ce même modèle animal (Minassian, Tarpin et al. 1998; Owen, Doran et al. 2000; Mithieux, Guignot et al. 2002; Guigas 2003). Il a ainsi été montré que l'administration de 50mg/Kg de metformine permettait l'obtention d'une concentration plasmatique relativement proche de celle mesurée classiquement chez l'homme après ingestion orale du médicament (Wilcock, Wyre et al. 1991; Wilcock and Bailey 1994) et qu'une durée de traitement relativement courte était apparemment suffisante pour induire des modifications significatives du métabolisme hépatique (Owen, Doran et al. 2000).

La Metformine a été utilisée pour son action stimulatrice sur l'oxydation lipidique. Son utilisation sur les animaux atteints de NASH a pour but d'augmenter la β -oxydation et donc de diminuer le stockage de lipides hépatiques.

☞ **L'almitrine** (vectarion), qui est utilisée dans le traitement d'insuffisances respiratoires associées aux bronchites chroniques. L'Almitrine a pour effet d'augmenter la pression partielle en oxygène au niveau artériel (Castaing, Manier et al. 1986). Il a également été décrit un effet sur le couplage entre oxydation et phosphorylation de mitochondries isolées de levures et de rats. Un changement de stoechiométrie de l'ATPase/ATPsynthase a été montré, un transfert de protons plus important est nécessaire pour obtenir un même nombre de moles d'ATP formé, augmentant de ce fait la respiration (Rigoulet, Ouhabi et al. 1989; Rigoulet, Fraisse et al. 1990; Jumelle-Laclau, Rigoulet et al. 1993; Leverve, Sibille et al. 1998; Rigoulet, Leverve et al. 1998). Ce changement du ration H^+/ATP correspond à un slipping au niveau de l'ATPase.

L'almitrine, par son action au niveau de l'ATPase, a été utilisée dans le but d'augmenter la respiration mitochondriale, afin de stimuler l'utilisation de substrats et donc l'oxydation des lipides hépatiques.

Pour cette étude les rats sont divisés en trois groupes, et reçoivent le même régime que pour l'étude I.2.1. Après 10 jours de régime MCDD, le premier (MET) et le deuxième (ALM) groupe reçoivent soit de la Metformine, soit de l'Almitrine dans leur eau de boisson, et cela jusqu'à la fin du régime. Les concentrations des deux solutions sont calculées de manière à délivrer 50mg/Kg/j de Metformine (Guigas 2003) ou 15mg/Kg/j d'Almitrine aux rats (Kreher, Keriél et al. 1996). Les biberons contenant les deux solutions sont changés tous les deux jours. Le troisième groupe, qui ne reçoit que le régime MCDD et de l'eau seule, sert de groupe contrôle. Un suivi de la prise alimentaire et de la prise de poids est effectué chaque semaine. Au terme des 6 semaines de régime les rats sont sacrifiés pour une étude sur mitochondries isolées de foie.

2. Mesure de la dépense énergétique

La dépense énergétique a été mesurée par calorimétrie indirecte à partir de la consommation d'O₂ et du rejet de CO₂ de l'animal.

Les rats sont placés dans une cage en verre fermée hermétiquement, dont le volume est adapté à la morphologie de l'animal, afin de minimiser le volume mort (figure II.1). La cage possède un orifice assurant l'entrée d'air et un autre, assurant la sortie. Cette sortie est reliée à un système de pompe qui aspire l'air à débit constant et l'envoie dans un circuit d'analyse de gaz. Le débit de la pompe est fixé et mesuré par un débitmètre, et est de 4 L/min. Le pourcentage d'O₂ dans l'air est mesuré par un analyseur paramagnétique d'O₂ (amplitude de mesure 20-21% ; délai de mesure 50s) et le pourcentage de CO₂ est mesuré par un analyseur à infrarouge (amplitude de mesure 0-1% ; délai de mesure 50s). Les analyseurs d'O₂ et de CO₂ sont étalonnés avant chaque mesure avec de l'azote pur afin de régler les zéros, et avec l'air atmosphérique (20,93% d'O₂) et un mélange contenant 0,6% de CO₂. La cage est placée dans une enceinte fermée, isolée phoniquement et thermiquement. La température ambiante (ta) est mesurée et maintenue à 22°C. Le rythme jour/nuit de l'enceinte est identique à celui de la pièce d'élevage. Dans la cage, le rat a libre accès à la nourriture et à l'eau. Les mesures sont effectuées sur 24 heures.

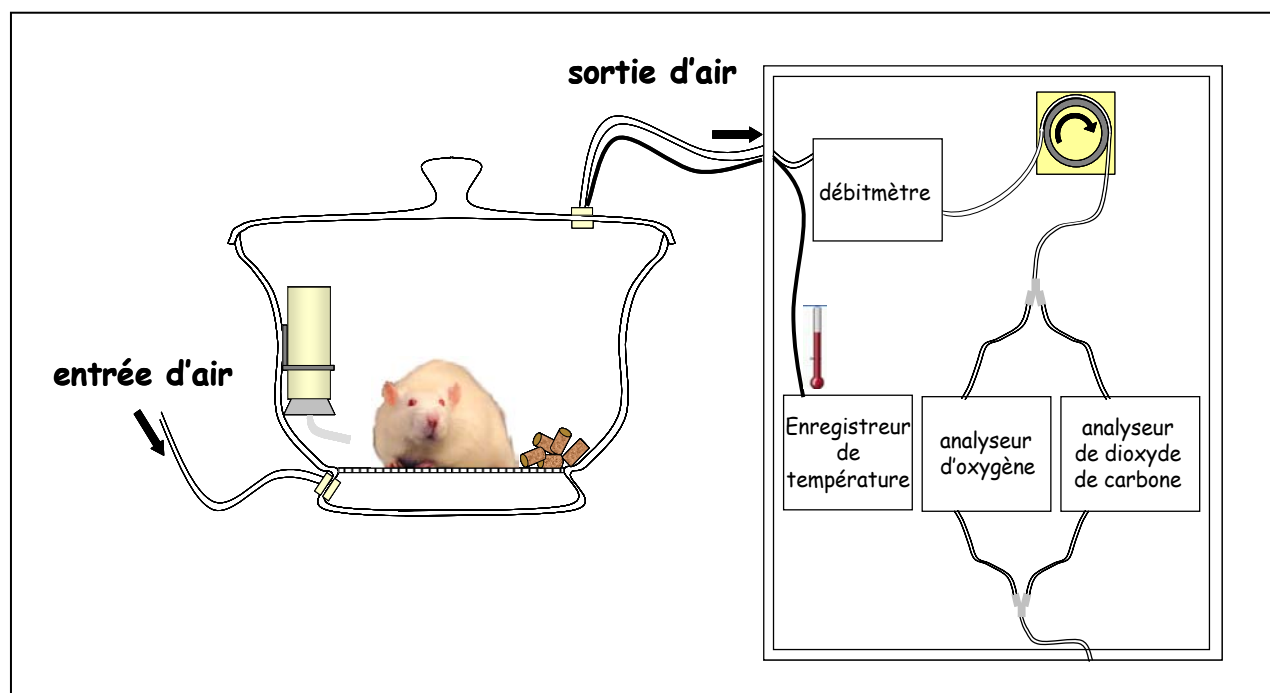
Le système d'acquisition enregistre une mesure du débit d'air, de la ta, du pourcentage de CO₂ (FICO₂) et d'O₂ (FIO₂) entrant et du pourcentage de CO₂ (FECO₂) et d'O₂ (FEO₂) dans l'air de sortie toutes les 50 sec. Le calcul de la dépense énergétique exprimée en Watt/Kg pour chaque rat, est effectué en utilisant la formule de Depocas et Hart (Depocas and Hart 1957).

$$\dot{V}_{O_2} = \dot{V}_{STPD} \left\{ \frac{F_{IO_2} - F_{EO_2}}{1 - [1 - (F_{ECO_2} - F_{ICO_2}) / (F_{IO_2} - F_{EO_2})] F_{IO_2}} \right\},$$

Les mesures sont effectuées en condition standard de température et de pression, sur air sec (STPD).

Lors de chaque expérimentation des prélèvements tissulaires et sanguins sont effectués. Après rupture cervicale, dans le cas de l'extraction de mitochondries, ou avant la perfusion du foie pour l'isolement d'hépatocytes, un prélèvement de sang (environ 2 mL) est effectué au niveau de la veine porte à l'aide d'une seringue rincée à l'héparine. Le sang est conservé dans la glace, puis centrifugé 5 min à 5000g à 4°C afin de récupérer le plasma qui est ensuite congelé et conservé à -80°C pour des dosages ultérieurs de glucose, insuline, transaminases (AST et ALT), triglycérides (TG) et acides gras libres (AGL).

Figure II.1: Schéma du circuit ouvert utilisé pour la mesure de la consommation d'oxygène et de la production de dioxyde de carbone.



3. Prélèvements tissulaires et sanguins

Des prélèvements tissulaires (muscles soléaire, EDL ou extenseur du doigt long, plantaire ; tissu adipeux blanc : épидидymal et rétro-péritonéal ; et le tissu adipeux brun interscapulaire: BAT), sont effectués et congelés à -80°C pour la détection d'éventuelles modifications d'expression de gènes ou de protéines par des techniques de biologie moléculaire. Un prélèvement hépatique est également réalisé, une partie sera immergée dans du formol à 4% pour une analyse histochimique et l'autre partie congelée à -80°C .

4. Préparation du matériel expérimental

4.1 Technique d'isolement des mitochondries hépatiques

Les mitochondries sont isolées à partir de foies des différents groupes de rats. La procédure d'isolement des mitochondries repose sur une technique de fractionnement des composés cellulaires par centrifugation différentielle (Klingenberg and Slenczka 1959). Les rats sont assommés puis sacrifiés par rupture cervicale (l'anesthésie modifiant les propriétés membranaires des mitochondries).

Après laparotomie médiane, le foie est immédiatement excisé et refroidi par immersion dans du tampon d'homogénéisation à 4°C (saccharose 250 mM, KH_2PO_4 2 mM, Tris-HCl 20 mM, EGTA

1 mM; pH = 7,25). Il est alors découpé en petits morceaux qui sont rincés abondamment avec le même tampon froid pour éliminer le maximum d'hématies et de dépôts lipidiques. Ces morceaux sont homogénéisés à vitesse lente (600 rpm) à l'aide d'un Potter en verre type Elvehjem par 5-6 passages de piston en teflon. Il s'ensuit alors une série de trois centrifugations à 4°C de cet homogénat. Une première centrifugation de 10 min à 700 g permet d'éliminer par sédimentation les gros débris cellulaires, les noyaux, le cytosquelette et les cellules intactes. Le surnageant, contenant les mitochondries, est réparti dans deux tubes, et est centrifugé 10 minutes à 7000 g. Cela permet d'obtenir deux culots mitochondriaux, les surnageants contenant les composants solubles et les organites plus petits comme les microsomes. Ces culots sont alors remis délicatement en suspension dans le tampon d'homogénéisation et réunis. La suspension est à nouveau centrifugée 10 minutes à 7000 g afin de rincer les mitochondries. Enfin le culot mitochondrial est suspendu dans un minimum de tampon d'homogénéisation (500 µL à 1 mL) et conservé à 4°C.

4.2 Détermination de la quantité de protéines

L'ensemble des résultats obtenus avec les mitochondries isolées est exprimé par mg de protéines. La méthode du Biuret (Gornall 1949), qui repose sur la formation d'un complexe entre du sulfate de cuivre et les protéines, permet de doser quantitativement la concentration en protéines de la suspension mitochondriale. Pour cela, 10 µL de la suspension mitochondriale sont solubilisés par 500 µL de désoxycholate de sodium à 3%. Après avoir été vortexé, l'échantillon, additionné de réactif de Biuret, est incubé pendant 1 minute à 100°C. Après retour à la température ambiante du mélange, la densité optique est lue à 540 nm contre un blanc ne contenant pas de suspension mitochondriale. La quantité de protéines contenues dans l'échantillon est déterminée à l'aide d'une courbe d'étalonnage réalisée avec des quantités connues d'albumine de sérum de veau (BSA pour Bovine Serum Albumin) en solution dans du tampon d'homogénéisation (milieu de l'échantillon). La détermination de la concentration de la suspension de mitochondries est effectuée avant chaque manipulation afin d'utiliser une concentration connue de mitochondries.

4.3 Les hépatocytes isolés intacts

4.3.1 Préparation

Les animaux sont mis à jeun 24 heures avant l'expérimentation afin de dépler les réserves de glycogène hépatique et d'étudier uniquement l'effet des substrats exogènes utilisés sur le métabolisme. Les hépatocytes sont isolés à partir de foies de rats mâles selon la méthode de Berry et Friend (Berry 1969) modifiée par Groen (Groen, Sips et al. 1982). Cette technique d'isolement repose sur la digestion enzymatique sélective du collagène de la matrice extra-cellulaire par la collagénase. Cette technique consiste en une perfusion du foie en deux temps, d'abord avec du Krebs sans calcium (*solution I*) puis ensuite avec du Krebs additionné de calcium et de collagénase (*solution III*). Dans un premier temps, l'absence de calcium dans le liquide de perfusion altère les jonctions

intercellulaires de type desmosomes dont le fonctionnement est dépendant du calcium, ce qui permet à terme une meilleure action de la collagénase. Dans un deuxième temps la présence de calcium est indispensable à l'action de la collagénase.

Quatre milieux sont utilisés :

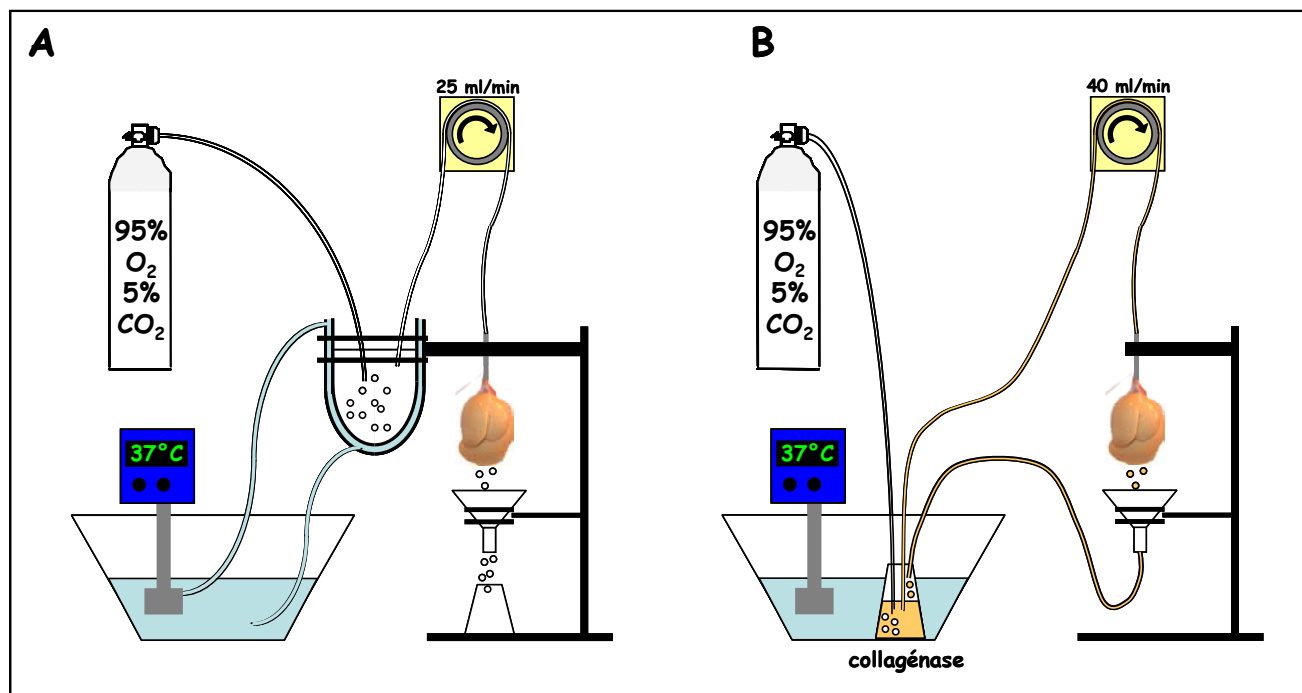
- *solution I* - Krebs-Ringer-bicarbonate: NaCl 119,8 mM, KCl 4,8 mM, MgSO₄ 1,2 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, NaHCO₃ 24 mM.
- *solution II* - Krebs-Ringer-bicarbonate-calcium: Solution I additionnée de CaCl₂ 1,3 mM
- *solution III* - Krebs-Ringer-bicarbonate-calcium-collagénase: 25 mg de collagénase type IV (sigma C5138) pour 100 mL de solution II.
- *solution IV* - Krebs-Ringer-bicarbonate-calcium-BSA 1%: 5 mL de BSA délipidée à 20% (p/v) pour 100 mL de solution II.

Les solutions utilisées sont saturées en carbogène (95% O₂ / 5% CO₂) et maintenues à 37°C, pH 7,4. Les perfusions sont réalisées à des débits suffisants pour éviter toute anoxie des hépatocytes.

Les rats sont anesthésiés par une injection intra-péritonéale de thiopental sodique (12,5 mg / 100 mg de masse corporelle). Après une laparotomie médiane, une ligature non serrée est placée sur la veine cave inférieure au-dessus de la veine rénale. En amont de la ligature, il est effectué une injection d'héparine (500 U.I diluées dans 0,3 mL de solution I) dans la veine cave inférieure afin d'éviter la formation de thromboses intra-hépatiques qui nuiraient à l'oxygénation de l'organe. Une ligature est posée et serrée au niveau du lobe caudal afin de réaliser une biopsie du foie. L'extrémité du lobe est alors coupée à l'aide d'un ciseau et mis immédiatement dans du formol à 4%. La veine porte est ensuite cathétérisée pour perfuser le foie dans le sens antérograde ce qui permet de rincer l'organe (le foie se décolore) et de prévenir la formation de micro-caillots. La section immédiate des vaisseaux pelviens empêche toute hyper-pression hépatique. Cette première perfusion, avec la solution I, est réalisée à un débit de 25 mL/min durant 2 min environ. Durant ces deux minutes, une rapide thoracotomie permet la mise en place d'une ligature non-serrée sur la veine cave inférieure sus-hépatique. Le sens de perfusion est ensuite inversé, c'est-à-dire qu'il est réalisé dans le sens rétrograde à partir de la veine cave inférieure sus-hépatique rendue accessible grâce à une incision dans l'oreillette droite. Les deux ligatures préalablement mises en place sont alors serrées induisant un gonflement du foie et maintenant une pression de perfusion intra-hépatique suffisante. Cette perfusion en circuit ouvert avec la solution I dépourvue de calcium, maintenue durant 20 min à 37°C à un débit de 25 mL/min, permet de rincer le foie de ses hématies, d'éviter l'anoxie cellulaire et d'altérer les jonctions intercellulaires dépendantes du calcium. Pendant ce temps, le foie est extrait de l'animal par dissection, en prenant soin de ne pas léser la capsule de Glisson, et est placé sur une potence (figure II.2). Il s'ensuit une perfusion en circuit fermé avec la solution III, comprenant de la collagénase et du calcium nécessaire à l'activité de l'enzyme et limitant la déplétion des hépatocytes

en calcium (figure II.2). Cette perfusion est effectuée pendant les 10 premières minutes jusqu'à un débit de 25 mL/min. Celui-ci est ensuite augmenté progressivement à 40 mL/min, et est maintenu 15 à 20 min en fonction de l'efficacité de la collagénase. L'observation de la texture et de la morphologie du foie permet de juger de l'état de digestion.

Figure II.2 : Système de perfusion rétrograde du foie.



Une fois disséqué, le foie est placé sur une potence et perfusé en circuit ouvert avec la solution I thermostatée à 37°C et saturée en carbogène (95% O₂ - 5% CO₂) à un débit de 25 mL/min pendant 20 minutes (A). Dans un deuxième temps, le foie est perfusé en circuit fermé avec de la solution II dans un bêcher ou la solution est thermostatée à 37°C et saturée en carbogène (95% O₂ - 5% CO₂) (B). Au bout de 10 minutes le débit est augmenté jusqu'à 40 mL/min.

Au terme de la perfusion, le foie est séparé des structures vasculaires et du diaphragme, placé dans un bêcher puis fragmenté en petits morceaux à l'aide de ciseaux afin de détruire la capsule de Glisson et libérer les hépatocytes. La suspension cellulaire obtenue est ensuite transférée dans un erlen et agitée en présence d'un mélange 95% O₂ / 5% CO₂ durant deux minutes, ceci permettant d'oxygéner les cellules et de poursuivre l'action de la collagénase. Les fragments non-digérés sont ensuite éliminés par filtration. Le filtrat obtenu est divisé en deux fractions égales qui sont centrifugées à 50 g et 4°C pendant 2 minutes. Après cette première centrifugation, les surnageants sont éliminés et les culots sont délicatement remis en suspension dans la solution II (préalablement saturée en carbogène et conservée à 4°C dans de la glace). Au terme d'une deuxième centrifugation les surnageants sont à nouveau éliminés et les culots sont resuspendus

dans la solution IV et poolés pour une dernière centrifugation. Les cellules sont enfin suspendues dans un faible volume de solution IV (10-13 mL). Cette suite de centrifugations à basse vitesse permet l'élimination de la collagénase résiduelle ainsi que des débris cellulaires et des cellules mortes ou non parenchymateuses (comme les cellules de Kupffer ou les cellules endothéliales). La suspension est filtrée puis saturée par le mélange 95% O₂ / 5% CO₂ pendant 2 min puis mise au repos durant 1 heure à 4°C avant son utilisation.

4.3.2 Appréciation de la qualité de la suspension cellulaire

De nombreux paramètres sont susceptibles d'influer sur l'intégrité des hépatocytes et sur le rendement de la préparation. Les principaux sont : la qualité de la technique opératoire et la rapidité de son exécution, l'oxygénation, la température, le pH, le débit de perfusion, le temps de contact entre le foie et la collagénase. Un foie mal perfusé présente des taches brunâtres témoignant de la formation de micro-thrombus suite à une injection d'héparine mal effectuée ou à une mauvaise cathétérisation de la veine porte, ou encore des taches blanchâtres reflétant une anoxie. De tels signes se traduiront par un faible rendement de la préparation. La viabilité des cellules est appréciée par examen microscopique de l'exclusion du bleu de Trypan 0,1% (m/v) où un taux de plus de 85% des cellules excluant le colorant atteste de la bonne qualité de la préparation.

La concentration cellulaire est évaluée par la pesée du culot d'hépatocytes obtenu après centrifugation (7600 g, 2 minutes) de 250 µL de suspension cellulaire et est exprimée en mg d'hépatocytes de poids sec estimé par mL. Pour cela, on admet que les cellules sont composées à 75 % d'eau. Cette approximation a l'avantage de donner une valeur immédiate, à 10 % près, du poids sec de la suspension cellulaire. Le poids sec final est obtenu par la différence, après dessiccation à l'étuve (24 heures à 100°C), entre le poids d'un volume de 500 µL de suspension cellulaire et celui d'un même volume de solution IV ayant servi à reprendre le culot cellulaire final après centrifugation. De façon habituelle, il est obtenu entre 600 et 1000 mg de poids sec d'hépatocytes par foie isolé. Sachant que 1 mg de poids sec correspond à 465 000 cellules (valeur obtenue par comptage sur grille de Malassez), la perfusion d'un foie permet donc d'obtenir entre 280 et 465 millions d'hépatocytes. Les résultats obtenus sur hépatocytes isolées sont exprimés en mg de poids sec d'hépatocytes (mgps) dans la partie III Tome 1 et par 10⁵ cellules dans la partie III Tome 3.

4.4. Les adipocytes isolés

En parallèle de la préparation de mitochondries, des adipocytes sont isolés. Après laparotomie et excision du foie, les tissus adipeux blancs épидидymal et rétropéritonéal sont rapidement prélevés et pesés. Entre 1 et 2 grammes de tissu sont placés dans un milieu de culture type « Eagles » contenant 2% de BSA et de la collagénase type I (1mg/7,5 mL), le reste étant congelé à -80°C. Les tissus adipeux sont finement émincés à l'aide de ciseaux puis transférés dans un tube de 50 mL. Les tubes sont placés de manière inclinée dans un bain-marie thermostaté à 37°C sous agitation lente (80

cycles/min) pendant 30 minutes. Au terme de l'incubation, les cellules sont dissociées par « va et viens » avec une pipette, 10-15 mL de milieu « Eagles » sont ajoutés à la suspension cellulaire (c.à.d. deux fois le volume initial), cela afin de diluer la collagénase et ainsi stopper son action. La suspension est homogénéisée puis passée sur un filtre en nylon de 250µm. Après 5 minutes de décantation, les adipocytes sont remontés à la surface, et le milieu d'incubation, en dessous, est éliminé par aspiration. 5 mL de milieu « Eagles » sont ajoutés aux cellules afin de rincer celles-ci de la collagénase pouvant encore restée dans le tube. Après 5 minutes de décantation, le milieu est aspiré, et 15 mL de milieu d'incubation sont ajoutés pour diluer la suspension.

5. Techniques d'étude utilisées sur mitochondries isolés

5.1 Analyse de la composition en acides gras des phospholipides membranaires

5.1.1 Extraction et purification des lipides

Les lipides mitochondriaux sont extraits dans du chloroforme-méthanol (2:1, v/v) pendant 12 h à température ambiante suivant la méthode de Folch (Folch, Lees et al. 1957). Après plusieurs lavages et évaporations, les lipides sont récupérés et leur masse est déterminée. Les lipides sont recueillis dans des tubes à bouchons téflonés et stockés à -30°C dans du benzène-méthanol (2 :1, v/v) jusqu'à leur analyse ultérieure. Les quantités de phospholipides totaux sont déterminées après minéralisation et dosage du phosphore libéré selon la méthode décrite par Fisk et Subbarow (Fisk and Subbarow 1925) et modifiée par Abdul-Malak? (Abdul-Malak 1978).

5.1.2 Chromatographies sur Couche Mince (CCM) et en Phase Gazeuse (CPG)

Séparation bidimensionnelle des phospholipides : Les phospholipides sont séparés par chromatographie sur couche mince bidimensionnelle. Cette séparation des phospholipides est réalisée selon la technique décrite par Portoukalian et al. (Portoukalian, Meister et al. 1978) sur des plaques de gel de silice G60 (Merck, Darmstad - Allemagne) de 10×10 cm. Une première migration est réalisée dans l'éther diisopropylique afin de séparer les lipides neutres (cholesterol, triglycérides, acides gras libres) des phospholipides. Une seconde migration est réalisée dans le système de solvant chloroforme – acétone – méthanol – acide acétique – eau (50 :20 :10 :15 :5, v/v/v/v/v). Les phospholipides (LPC, SM, PC, PI, PS, PE, DPG) sont ainsi révélés par le réactif de Dittmer et Lester (Dittmer and Lester 1964), puis sont grattés dans des tubes à essai et minéralisés.

Méthylation des acides gras : Après la CCM, le dépôt, contenant les phospholipides qui ne migrent pas dans l'éther, est gratté dans un tube en verre à bouchon téfloné. La méthylation des acides gras est réalisée dans du méthanol contenant du chlorure d'acétyle (0.5M), additionné de benzène – chlorure d'acétyle (2 :1, v/v). La réaction de trans-esterification est réalisée à 90 °C pendant 2 heures. Les acides gras méthylés sont ensuite extraits et dissous dans de l'hexane.

Séparation des acides gras méthylés par CPG : La séparation est réalisée sur un chromatographe Chrompack CP 9001 (Les Ulis, France) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne capillaire (0.25mm × 30 m) Omegawax 250 (Supelco, Saint Quentin Fallavier - France). Le gaz vecteur utilisé est l'azote, avec un programme de température variant de 180°C à 250°C. L'intégration des résultats se fait à l'aide du logiciel d'acquisition Maestro de Chrompack.

5.1.3 Fractionnement des différentes classes de lipides par extraction en phase solide

Les lipides totaux sont fractionnés par extraction en phase solide sur des colonnes aminopropyle. La colonne est éluée successivement par différents systèmes de solvants. Après évaporation des solvants sous azote, les différentes fractions ainsi obtenues sont déposés sur plaque de chromatographie sur couche mince afin de séparer les différentes classes de lipides. Les lipides sont déposés sur CCM dans du chloroforme-méthanol (2 :1, v/v) et séparés. Après développement et séchage des plaques, les différents « spots » de lipides sont révélés par carbonisation à 180°C en présence de 3% d'acétate de cuivre dissous dans de l'acide orthophosphorique à 8%.

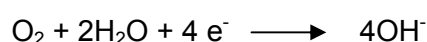
5.1.4 Dosage des protéines

Les protéines sont dosées sur des aliquotes prélevés à partir de l'homogénat tissulaire obtenu après extraction des lipides. Le dosage est réalisé suivant la méthode de Bradford (Bradford 1976), une solution d'albumine sérique bovine étant utilisée pour la gamme étalon.

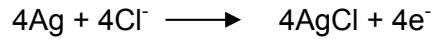
5.2 Mesure de la Consommation d'Oxygène

La consommation d'oxygène par les mitochondries isolées est mesurée dans une chambre d'oxygraphie thermostatée (37°C), fermée et agitée, munie d'une électrode de Clark mesurant en continu la concentration d'oxygène dans le milieu. L'électrode de Clark est composée d'une cathode en platine polarisée à - 0,6 Volts et d'une anode en argent, immergées dans une solution à demi-saturée de KCl, et isolées de la cuve de mesure par une membrane de téflon laissant diffuser l'oxygène. Dans ces conditions, les variations de courant induites par la réduction de l'oxygène au niveau de la cathode sont directement proportionnelles aux variations de la quantité d'oxygène dissoute dans le milieu d'incubation.

Au contact de la cathode (platine), l'oxygène provenant du milieu à tester est réduit selon la réaction suivante:

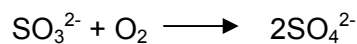


La réaction d'oxydation correspondante au niveau de l'anode (argent) est :



Il y a donc un faible courant électrique entre les 2 électrodes (4 électrons transférés par O₂ réduit) proportionnel à la pression partielle d'O₂ dans le milieu électrolytique. Il est donc possible de mesurer directement la vitesse de respiration des mitochondries en fonction des différents produits ajoutés.

La consommation d'oxygène est donc mesurée en continu dans un oxygraphe préalablement calibré en effectuant un « zéro » sur de l'eau et un « 100% » d'oxygène sur le milieu respiratoire. Le « 100% » est obtenu après équilibration du milieu de respiration avec l'air atmosphérique par bullage et correspond à la saturation du milieu en oxygène dissout à cette pression atmosphérique (440 nanoatomes d'oxygène/mL, à 37°C dans un milieu KCl). Le « zéro » est le point correspondant à une pression partielle en oxygène nulle. Cette condition est obtenue par ajout de bisulfite de sodium (NaSO₃) dans de l'eau, lequel « consomme » l'oxygène du milieu selon la réaction :



Les mitochondries isolées de foie sont incubées à une concentration de 1 mg/mL dans un tampon à pH 7,25 contenant 125 mM de KCl, 1 mM EGTA, 20 mM de Tris-HCl, 2 mM KH₂PO₄ avec, ou sans, BSA délipidée (concentration finale de 0,3%). A ce tampon de respiration sont ajoutés différents substrats respiratoires en concentrations saturantes, permettant d'isoler fonctionnellement les différents sites de couplage de la chaîne respiratoire.

☞ Pour le complexe I : 5 mM de glutamate / 1,25 mM de malate. Le malate génère du NADH au sein de la matrice mitochondriale par l'intermédiaire de la malate déshydrogénase. Il est associé au glutamate en raison du mode de transport de ces substrats (navette malate-aspartate).

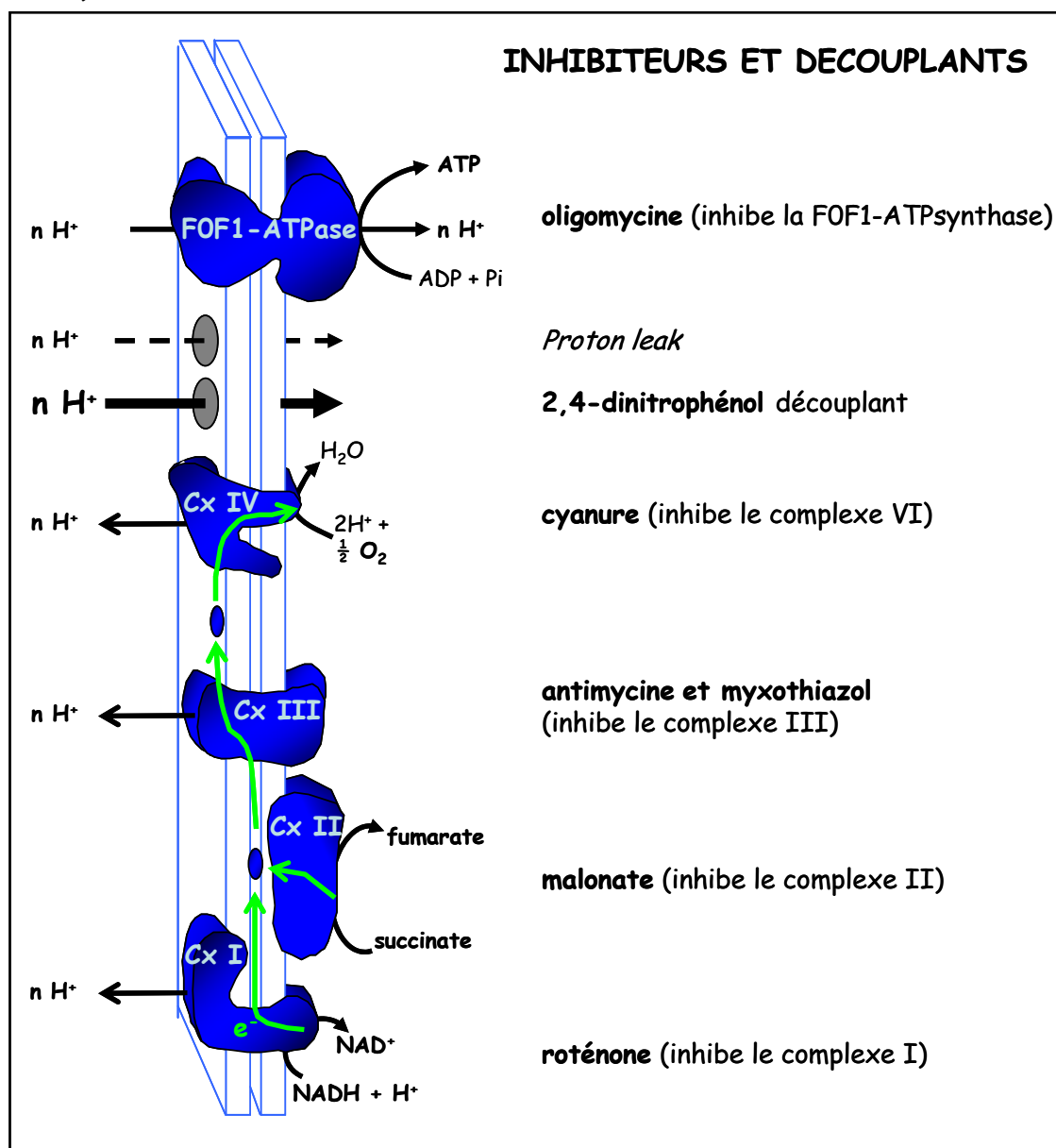
☞ Pour le complexe II : 5 mM de succinate / 0,5 mM de malate (maintient le niveau d'oxaloacétate, inhibiteur de la succinate déshydrogénase) plus 1,25 µM de roténone (permet d'éviter un flux inverse des électrons vers le complexe I). Le succinate est réduit en fumarate par la succinate déshydrogénase, formant par cette réaction du FADH₂.

☞ Pour le complexe IV : TMPD (N,N,N',N' tétraméthyl-1,4-phénylènediamine) 1-2 mM, ascorbate 5 mM, myxothiazol 3,8 µM et DNP (2,4-dinitrophénol) 75 µM. L'ascorbate cède ses électrons au TMPD qui va réduire le cytochrome c, substrat de la cytochrome c oxydase. Le myxothiazol permet d'éviter un flux inverse des électrons en inhibant le transfert d'électrons vers le complexe III, et le DNP permet d'apprécier la vitesse maximale de la cytochrome c oxydase en découplant l'oxydation des phosphorylations.

☞ 100 μM d'octanoyl-carnitine: dérivé d'acides gras, sous leur forme active. Ils vont être oxydés au niveau de la matrice et fournir des équivalents réduits (NADH et FADH_2) aux complexes I et II.

En présence de substrats les mitochondries respirent sous un état non-phosphorylant. L'état 3 ou phosphorylant est obtenu par ajout de 1mM d'ADP. L'état découplé est obtenu par l'ajout de 75 μM de DNP, ce découplant protonophore provoque une diffusion facilitée des protons dans le sens de leur gradient de concentration, c'est-à-dire dans le sens de la dissipation du gradient électrochimique de protons. L'ajout du DNP stimule ainsi la vitesse de respiration de façon maximale (figure II.3). L'état 4 est obtenu après addition d'oligomycine (1,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), un inhibiteur de l'ATPsynthase, et permet d'apprécier la respiration « résiduelle » due aux pertes énergétiques.

Figure II.3: Sites d'action des inhibiteurs et découplants de l'oxydation phosphorylante. Tiré de (Nogueira 2001).



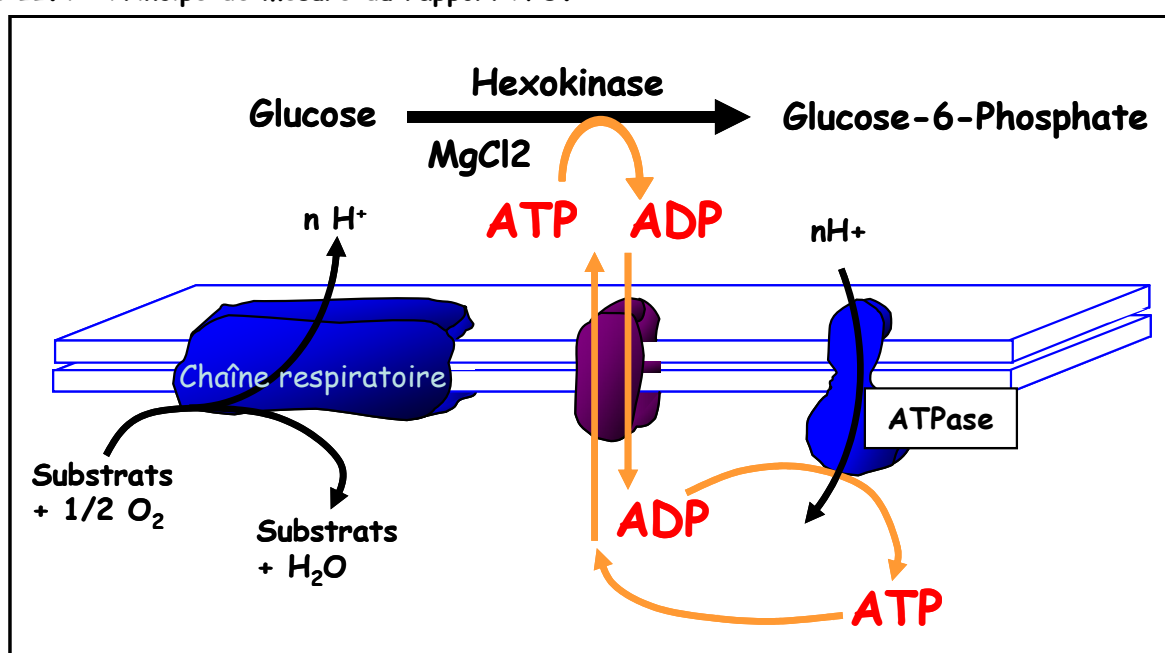
5.3 Détermination du rapport ATP/O

Le rapport ATP/O correspond au rapport entre le flux de synthèse d'ATP et celui de consommation d'oxygène. Il permet d'apprécier le rendement de l'oxydation phosphorylante, c'est-à-dire l'efficacité avec laquelle l'énergie redox provenant de l'oxydation des substrats est convertie en énergie permettant la synthèse d'ATP.

Nous avons étudié ce rendement en concentrations sous-saturantes d'ADP (Fontaine, Moussa et al. 1996), avec le système hexokinase, en présence de succinate/malate. En pratique, le milieu de respiration KCl est supplémenté par 20 mM de glucose, 1 mM de $MgCl_2$ et 125 μM d'ATP. La respiration est alors stimulée par l'addition de concentrations croissantes d'hexokinase (0,2-2 U/mL). L'ATP est utilisé par l'hexokinase, générant ainsi de l'ADP qui secondairement stimule la respiration. La quantité d'ATP utilisé est fonction de la concentration d'hexokinase, la synthèse de glucose-6-phosphate qui en résulte correspond à la synthèse d'ATP par l'ATPase mitochondriale (figure II.4).

La mesure des flux de synthèse d'ATP et de consommation d'oxygène est réalisée simultanément dans un milieu KCl classique thermostaté à 37°C, avec une concentration finale de BSA délipidée de 0,3%, et de mitochondries isolées de 1 mg/mL. Une mesure continue de la respiration permet de vérifier que celle-ci reste constante durant la période étudiée. La production d'ATP a été mesurée indirectement par la mesure de la production dans le temps de glucose-6-phosphate.

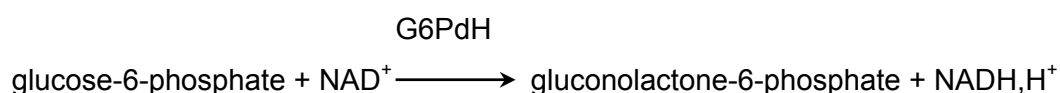
Figure II.4 : Principe de mesure du rapport P/O.



On enregistre la consommation d'oxygène pendant 1-2 minutes, puis on effectue des prélèvements de la suspension mitochondriale, directement dans la chambre d'oxygraphie, à intervalles réguliers (toutes les 30 sec.), afin de quantifier la production d'ATP. Ces prélèvements sont immédiatement déposés dans un mélange d'acide perchlorique (10%) et d'EDTA (25 mM) et maintenus à 4°C afin d'arrêter les réactions enzymatiques. Après neutralisation par un mélange de potasse (KOH 2 M) et de MOPS (0,3 M), les échantillons sont centrifugés 5 minutes à 13000g et à 4°C. Les surnageants sont conservés à -20°C pour des dosages ultérieurs.

5.4 Dosage du glucose-6-phosphate

Le dosage du glucose-6-phosphate est réalisé de manière enzymatique selon la méthode décrite par Bergmeyer (Bergmeyer 1974). Le principe de ce dosage repose sur la transformation du NAD⁺ en NADH lors d'une réaction catalysée par la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PdH).



La détermination de la concentration de NADH, qui présente un pic d'absorption maximal à la longueur d'onde de 340 nm, est réalisée par un spectrophotomètre avant et après l'action d'enzymes dans un milieu de dosage de composition standardisée contenant les échantillons à analyser.

Selon la loi de Lambert-Beer :

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot C$$

où l'absorbance (A) est fonction de la concentration molaire (C) en NADH dans la cuve, l est la longueur du trajet optique (largeur de la cuve = 1 cm) et ε est le coefficient d'extinction molaire du NADH ($6.22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

350 μL des prélèvements neutralisés sont placés dans 2 mL d'un milieu de dosage comprenant de la triéthanolamine chlorhydrate (50 mM), du chlorure de magnésium (7,5 mM), de l'EDTA (3,75 mM) tamponné à pH 7,4 (pH optimum des réactions enzymatiques ci-dessus) par du NaOH, et supplémenté avec 0,5 mM de NAD⁺. Une première lecture de densité optique à 340 nm est effectuée afin d'obtenir la valeur du blanc, puis il est ajouté 0,5 U.I de G6PdH. La cuve est homogénéisée puis une deuxième lecture de densité optique est réalisée 60 minutes plus tard.

5.5 Mesure de la conductance membranaire protonique : proton leak

L'énergie libérée par l'oxydation des équivalents réduits au niveau de la chaîne respiratoire, sert à déplacer les protons de la matrice vers l'extérieur de la mitochondrie. Ce mouvement de protons a deux conséquences : i) il crée un gradient de pH à travers la membrane interne mitochondriale, avec une concentration de protons plus faible dans la matrice, donc un pH plus

alcalin que dans le reste de la cellule. Il crée également ii) un gradient de potentiel électrique à travers la membrane interne. La résultante de ces deux gradients constitue un gradient électrochimique de protons ($\Delta\mu\text{H}^+$) et correspond à une force appelée protonmotrice (Δp).

5.5.1 Principe de la mesure de Δp

Les lois de la thermodynamique imposent que lorsqu'un soluté S portant une charge z est soumis à un potentiel de membrane $\Delta\Psi$, la variation d'énergie libre accompagnant le transport d'une mole de S est :

$$\Delta G = -RT \ln \frac{[S]_1}{[S]_2} + z F \Delta\Psi$$

Avec R = constante des gaz parfaits ; T = température en degrés Kelvin ; F = constante de Faraday ; z = la valence du soluté S.

Quand le soluté S est un proton, z est égale à 1. On a donc :

$$\Delta G = -RT \ln \frac{[\text{H}^+]_{\text{départ}}}{[\text{H}^+]_{\text{arrivée}}} + F \Delta\Psi$$

En remplaçant le logarithme népérien par le logarithme décimal (facteur de correction = 2,3) et en résolvant l'équation ($\log a/b = \log a - \log b$) on obtient :

$$\Delta G = F \Delta\Psi - 2,3 RT (\log [\text{H}^+]_{\text{départ}} - \log [\text{H}^+]_{\text{arrivée}})$$

En remplaçant $-\log [\text{H}^+]$ par pH on a :

$$\Delta G = F \Delta\Psi - 2,3 RT (\text{pH}_{\text{arrivée}} - \text{pH}_{\text{départ}})$$

En d'autres termes, l'énergie stockée dans le gradient de protons est :

$$\Delta G = F \Delta\Psi - 2,3 RT \Delta\text{pH}$$

Dans ce cas, le gradient de protons est exprimé en Kcal/mol et est noté $\Delta\mu\text{H}^+$. Pour exprimer la force protonmotrice en mV, il faut diviser par F. L'équation finale qui caractérise Δp est :

$$\Delta\mu\text{H}^+/F = \Delta p = \Delta\Psi - z \Delta\text{pH}.$$

Mesurer Δp reviendrait donc à mesurer simultanément $\Delta \Psi$ et ΔpH .

5.5.2 Mesure de $\Delta \Psi$ avec une électrode à TPMP⁺

Dans la pratique, on s'affranchit de la mesure de $-\Delta pH$ en convertissant le gradient de pH en gradient électrique à l'aide d'un échangeur antiport K⁺/H⁺. Ainsi, en ramenant le gradient de pH à 0, Δp se trouve inchangé mais s'exprime entièrement sous la forme de $\Delta \Psi$.

Cette condition est obtenue en ajoutant un ionophore : la nigericine (65 ng/mL) à la suspension de mitochondries.

La méthode quantitative utilisée repose sur la mesure de la concentration d'une sonde moléculaire chargée positivement, le cation triphénylméthyl phosphonium (TPMP⁺), dont la distribution de part et d'autre de la membrane interne dépend du potentiel électrique. $\Delta \Psi$ est calculé à l'aide de l'équation de Nernst à partir de la mesure de la quantité de TPMP⁺ présent dans le milieu d'incubation ou milieu extra-matricielle (TPMP_{extra}). Connaissant la quantité initiale de TPMP⁺ ajoutée (TPMP_{ajouté}) dans le milieu et en appliquant un facteur de correction Bf (Binding factor) qui tient compte de la fraction de TPMP⁺ liée aux membranes et aux protéines ainsi que du volume des mitochondries, on peut alors déterminer la concentration de TPMP⁺ intra matricielle (TPMP_{intra}) et appliquer la relation :

$$\Delta \Psi = \frac{RT}{F} \ln \frac{[TPMP]_{intra}}{[TPMP]_{extra}}$$

$$\text{Avec : } [TPMP]_{intra} = (TPMP_{ajouté} - TPMP_{extra}) \times Bf / [\text{mitochondries}]$$

On a donc la relation :

$$\Delta \Psi \text{ (mV)} = \frac{RT}{F} \ln \frac{([TPMP]_{ajouté} - [TPMP]_{mesuré}) \times Bf}{0,001 \times [TPMP]_{mesuré} \times [\text{mitochondrie}]}$$

Avec $\ln RT/F = 61,7$ à 37°C ($R = 8,314 \text{ J/K/mol}$, $T = 273 + t(^{\circ}\text{C}) \text{ K}$ et $F = 96500 \text{ C/mol}$).

La valeur de Bf est de 0,38 $\mu\text{L/mg}$ de protéines pour le foie (Espie, Guerin et al. 1995).

5.5.3 Obtention d'une droite de calibration

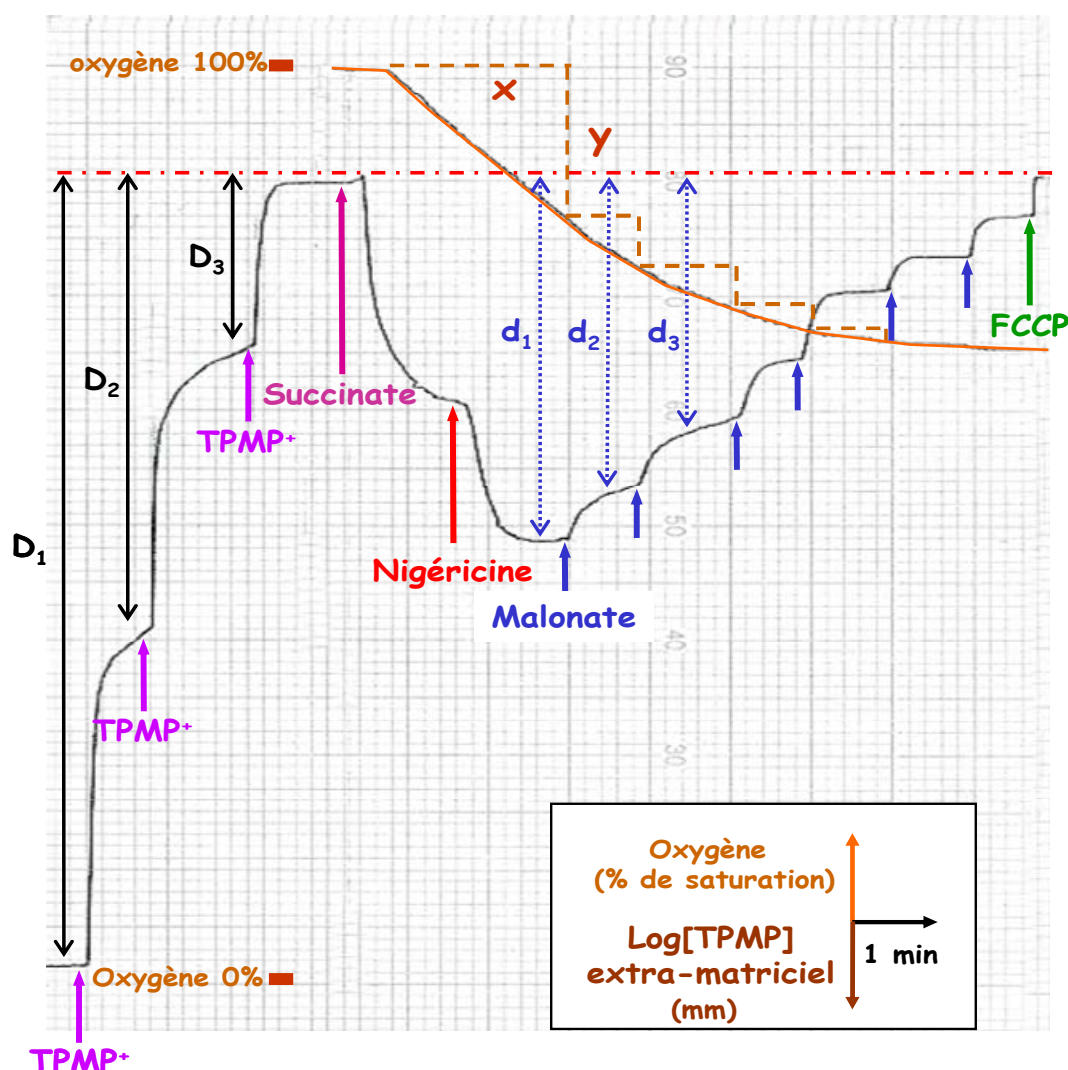
Avant chaque mesure, un étalonnage est réalisé afin de prendre en compte les variations de sensibilité de la membrane de l'électrode à TPMP⁺ au cours du temps.

1 mg/mL de protéines mitochondriales hépatiques sont incubés à 37°C dans le même milieu respiratoire que précédemment en présence de 0,3% de BSA. En absence de substrat, l'activité de la chaîne respiratoire est nulle, il n'y a pas de potentiel de membrane proton dépendant.

L'ajout de 4 fois $0,5\mu\text{M}$ de TPMP^+ permet d'obtenir la réponse logarithmique observable sur le tracé légendé de la figure II.5. On construit alors la droite de calibration en mesurant les déflexions D_1 , D_2 et D_3 observées après chaque addition et en appliquant la relation :

$$\text{déflexion (mm)} = f(\log[\text{TPMP}^+]) \text{ (figure II.5)}$$

Figure II.5: Mesure simultanée de l'intensité de la respiration et du potentiel électrique



La consommation d'oxygène par les mitochondries (orange) conduit à une déflexion vers le bas. Pour le tracé en noir (TPMP^+) une dérivation vers le haut traduit une augmentation de TPMP^+ dans le milieu. Lorsque les mitochondries disposent de substrat (succinate) le fonctionnement de la chaîne respiratoire conduit à générer un potentiel de membrane provoquant une entrée de TPMP^+ dans la matrice chargée négativement (dérivation vers le bas). Chaque ajout de malonate inhibe le complexe II ce qui conduit à réduire la respiration et le potentiel de membrane; le TPMP^+ est progressivement libéré, le tracé remonte jusqu'au niveau basal initial. Les variations de potentiel sont mesurées en mm ($d_1, d_2, \dots, d_n$) et traduites en mV à l'aide de la droite de calibration. En parallèle, la valeur de respiration est obtenue en mesurant X et Y (consommation d'oxygène par unité de temps) comme précédemment décrit dans les mesures de respiration conventionnelles.

5.5.4 Variation de la force protonmotrice par titration au malonate : obtention des courbes de Nicholls.

L'ajout de succinate 5 mM (substrat du complexe II) entraîne l'activation de la chaîne respiratoire et de ce fait la création d'un potentiel électrique transmembranaire $\Delta\Psi$. Les cations TPMP⁺ vont donc se répartir de part et d'autre de la membrane interne, motivés par le gradient de charge, ce qui se traduit au niveau de l'électrode par une diminution de la concentration de TPMP⁺ dans le milieu.

L'addition séquentielle de malonate jusqu'à 3 mM (inhibiteur du complexe II) ralentit peu à peu l'activité de la chaîne respiratoire induisant une diminution du potentiel trans-membranaire et donc le re-largage de TPMP⁺ dans le milieu.

En fin de titration, une addition d'un ionophore (FCCP 0,4 μ M) permet d'effondrer totalement le potentiel de membrane donc de relarguer la totalité du TPMP⁺ matriciel à l'exception de la fraction liée aux mitochondries.

On mesure alors les déflexions d1, d2, ...dn traduites en variations de concentration de TPMP⁺ extramatriciel à l'aide de la courbe de calibration. $\Delta\Psi$ est enfin calculé en appliquant l'équation de Nernst (voir ci dessus). Le résultat (pertes énergétiques en fonction de $\Delta\Psi$) apparaît sous la forme d'une relation non linéaire caractéristique décrite pour la première fois par Nicholls en 1974 (Nicholls 1974).

5.5.5 Détermination du volume matriciel

La suspension mitochondriale (3 mg/ml) est incubée dans le même tampon que pour la respiration, supplémenté en ³H₂O (2,25 μ Ci/mL) marqueur de l'espace total et en [¹⁴C]-mannitol (0,45 μ Ci/mL) marqueur de l'espace extra matriciel (le mannitol traverse la membrane mitochondriale externe et évite une surestimation du volume mitochondrial). Après équilibration (4 minutes), un aliquot de 450 μ L est prélevé et centrifugé (15000g, 1 minute), 100 μ L de surnageant sont placés dans 4 ml de liquide de scintillation. Le reste du surnageant est aspiré et le culot est remis en suspension dans 300 μ L d'acide perchlorique à 7%. Après centrifugation (15000g, 2 minutes), 250 μ L sont prélevés et placés dans 4 ml de liquide de scintillation. Le double comptage ¹⁴C/ ³H permet de déterminer (s = surnageant; c = culot):

$$\text{le volume d'eau dans le culot} = \frac{{}^3\text{Hc} \cdot \text{Vs}}{{}^3\text{Hs}}$$

$$\text{l'espace extra matriciel} = \frac{{}^{14}\text{Cc} \cdot \text{Vs}}{{}^{14}\text{Cs}}$$

$$\text{et le volume matriciel} = \text{Vs} [({}^3\text{Hc}/{}^3\text{Hs}) - ({}^{14}\text{Cc}/{}^{14}\text{Cs})]$$

avec ^3Hc = dpm tritium contenus dans le culot; ^3Hs = dpm tritium contenus dans le surnageant; ^{14}Cc = dpm ^{14}C contenus dans le culot; ^{14}Cs = dpm ^{14}C contenus dans le surnageant; et V_s = volume de surnageant prélevé. Le volume matriciel peut être exprimé en $\mu\text{L}/\text{mg}$ de protéine en divisant le volume par la quantité de mitochondries présente dans le culot.

5.5.6 Détermination de ΔpH avec des radioéléments

La suspension mitochondriale était incubée dans le même tampon que pour la respiration, supplémenté en $[^3\text{H}]$ -acétate (2,25 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$) et en $[^{14}\text{C}]$ -mannitol (0,45 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$). Après équilibration on détermine le rapport d'accumulation des formes ionisées de l'acide de part et d'autre de la membrane selon le même principe que pour le volume matriciel, rapport qui est ramené à un rapport de concentration en utilisant le volume matriciel. A l'équilibre, on a:

$$\Delta\text{pH} = \log \left\{ V_s \frac{(^3\text{Hc}/^3\text{Hs}) - (^{14}\text{Cc}/^{14}\text{Cs})}{V_m} \right\}$$

5.5.7 Détermination de $\Delta\Psi$ avec des radioéléments

La suspension mitochondriale (3 mg/ml) est incubée dans un tampon supplémenté par $[^3\text{H}]$ -TPMP⁺ (2,25 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mL}$) et $[^{14}\text{C}]$ -mannitol (0,45 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$). Après équilibration (4 minutes), et ajout de 1 mM d'ADP, 2 aliquots de 450 μL sont prélevés et centrifugés (15000g, 1 minute), 100 μL de surnageant sont placés dans 4 ml de liquide de scintillation. Les culots sont remis en suspension dans 300 μL d'acide perchlorique à 7%. Après centrifugation (15000g, 2 minutes), 250 μL sont prélevés et placés dans 4 ml de liquide de scintillation. Le double comptage $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ permet de déterminer (s = surnageant; c = culot):

$$\Delta\Psi = -60 \log \left\{ V_s \frac{(^3\text{Hc}/^3\text{Hs}) \times 0,38 - (^{14}\text{Cc}/^{14}\text{Cs})}{V_m} \right\}$$

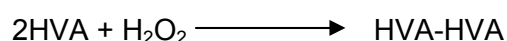
avec ^3Hc = dpm tritium contenus dans le culot; ^3Hs = dpm tritium contenus dans le surnageant; ^{14}Cc = dpm ^{14}C contenus dans le culot; ^{14}Cs = dpm ^{14}C contenus dans le surnageant; V_s = volume de surnageant prélevé, 60 = rapport $2,3RT/F$ (mV), et 0,38 = coefficient d'activité du TPMP⁺ (Espie, Guerin et al. 1995).

5.6 Mesure de la production mitochondriale de ROS par fluorimétrie

5.6.1 Principe

La mesure de la production endogène d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) s'effectue indirectement en mesurant l'apparition de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) issu de la dismutation (par la SOD mitochondriale) de l'anion superoxyde produit par la chaîne respiratoire.

Cette méthode a déjà été utilisée au laboratoire dans le cadre d'autres expérimentations (Servais, Couturier et al. 2003). En présence de la peroxydase de raifort (« horse raddish peroxydase », HRP), l'acide homovanillique (acide 4-hydroxy-3-methoxy-penylacétique, HVA) réagit avec le H₂O₂ pour former un dimère fluorescent : l'acide 2,2dihydroxy-3,3'dimethoxydiphenyl-5,5'-diacétique (λ excitation : 312 nm, λ émission : 420 nm) selon la réaction suivante :



La fluorescence est détectée à l'aide d'un fluorimètre puis traduite en pmoles d'H₂O₂ à l'aide d'une gamme étalon réalisée à partir d'une solution mère de H₂O₂ à 30% (v/m)

5.6.2 Mode opératoire

L'équivalent de 0,35 mg de protéines mitochondriales est placé dans une cuve en quartz avec 2 mL du même milieu respiratoire que lors de la mesure de consommation d'oxygène, à 30°C, en présence de HVA (0,1 mM) et HRP (6 U/mL) sous agitation magnétique permanente. La chaîne respiratoire est alimentée par du succinate 5 mM (substrat du complexe II) ce qui permet une production de ROS par le complexe III et, en absence de roténone, par le complexe I grâce au flux inverse d'électrons.

Les mesures étaient réalisées en l'état non phosphorylant (en absence d'ADP) à une température de 30°C (imposée pour des raisons techniques de stabilité du signal généré en présence de HVA/HRP et également pour limiter les fuites de protons au travers de la membrane interne, qui augmentent avec la température), avec et sans roténone (5 μ M).

Les mesures de respiration sont réalisées par polarographie dans les mêmes conditions, à 30°C, à l'aide d'un oxygraphe comme décrit précédemment, permettant de rapporter la production d'H₂O₂ à la consommation d'O₂ et donc d'exprimer les résultats en pmoles d'H₂O₂ par natomO d'oxygène consommé et par mg de protéine.

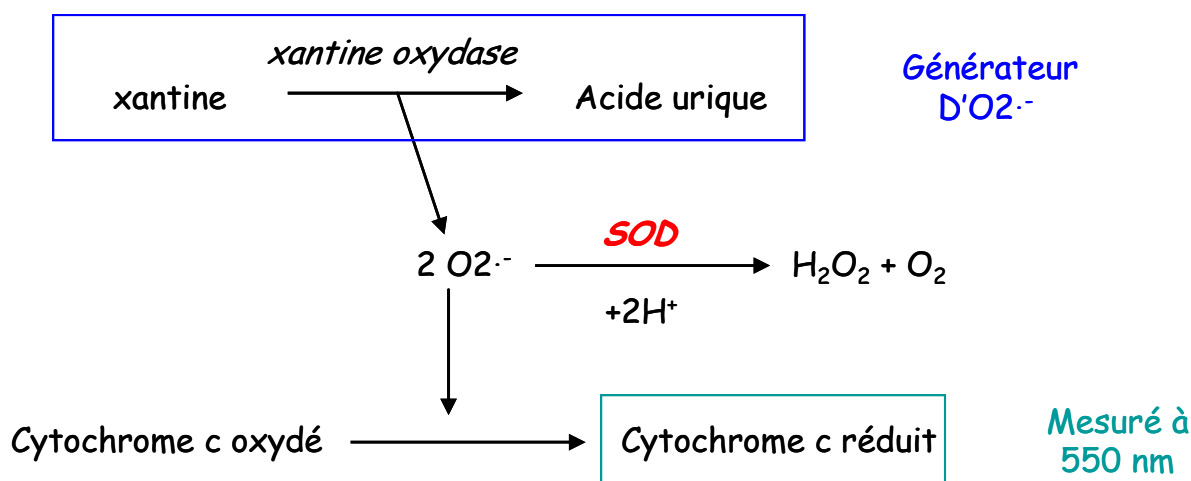
5.7 Dosages spectrophotométriques d'activités enzymatiques

Les échantillons de tissus (foie ou tissu adipeux brun) sont broyés dans un potter en verre à 4°C, dans un tampon de broyage (KH₂PO₄ 100 mM, DTT 1 mM, EDTA 2 mM, pH 7,4) pour les dosages de l'activité de la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx) et la superoxyde dismutase (SOD), ou dans un tampon phosphate (0,3mM, pH 7,7) + 10% de BSA pour la citrate synthase (CS) et la 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (HAD). Trois cycles de congélation décongélation, à -80°C, sont effectués afin de rompre les membranes et ainsi libérer les enzymes dans le milieu. Les tubes sont centrifugés à 3000 g pendant 5 minutes. Le surnageant est récupéré

pour le dosage des activités enzymatiques. La concentration de protéine est déterminée sur le surnageant par la méthode de Lowry (Lowry, Rosebrough et al. 1951).

5.7.1 Dosage de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD ; EC.1.15.1.1)

La méthode spectrophotométrique utilisée permet une mesure de l'activité de la SOD de manière indirecte, en utilisant le système xanthine / xanthine oxydase comme producteur d' $O_2^{\cdot-}$, et le cytochrome c oxydé (Flohe and Otting 1984). La réduction du cytochrome c par l' $O_2^{\cdot-}$ est mesurée à 550 nm. La SOD issue des extraits entre en compétition pour l'utilisation du $O_2^{\cdot-}$ et donc limite la réduction du cytochrome c.



La mesure est effectuée dans un tampon de réaction (xanthine [0,5mM], cytochrome c 0,2mM, KH_2PO_4 50mM, EDTA 0,1mM, pH 7,8) à 25°C. Le volume de xanthine oxydase à ajouter (0,01 U), pour avoir une réduction du cytochrome c suffisante, est ajusté préalablement pour que la réduction du cytochrome c, sans extrait, provoque une diminution de la DO de 0,025/minute.

La SOD cytosolique (CuSOD) a la particularité d'être inhibée par le cyanure (1mM). Ainsi nous distinguons les deux isoformes par une mesure en présence et en absence de cyanure, sans séparer les mitochondries du cytosol. L'activité de la forme cytosolique est calculée en retranchant l'activité de la SOD mitochondriale (MnSOD) à l'activité de la SOD totale. Une gamme étalon de SOD est effectuée dans les mêmes conditions. Une unité d'activité de SOD est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour inhiber de 50% la réduction du cytochrome c. Les activités sont exprimées en U/100 mg de protéines totales.

5.7.2 Dosage de l'activité de la glutathion peroxydase (GPx ; EC.1.11.1.9)

L'activité de la GPx est déterminée via la formation du glutathion oxydé (GSSG) à partir de glutathion réduit (GSH) (Tappel 1978). Le système nécessite la présence d'un oxydant (cumène- H_2O_2) et de la glutathion réductase (GR) qui réduit le GSSG, en oxydant le NADPH en NADP.



La mesure consiste donc à suivre, par spectrophotométrie, la disparition du NADPH à 340 nm, à 37°C, dans un tampon réactionnel contenant : GSH 0,25mM, NADPH 0,12mM, GR 1U/mL et NaCN 10mM. Une mesure en présence du tampon réactionnel et de cumène-H₂O₂ (1mg/mL) est préalablement effectuée. L'extrait est ensuite ajouté et la DO enregistrée. Le calcul de l'activité est fait à partir du coefficient d'extinction molaire (ϵ) du NADPH = $6,22 \cdot 10^3 \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. L'activité est exprimée en U/100 mg de protéines totales.

5.7.3 Dosage de l'activité de la catalase (CAT ; EC.1.11.1.6)

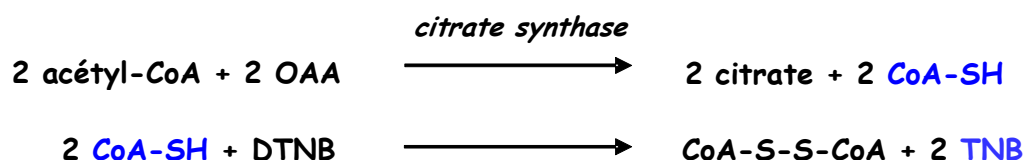
La méthode utilisée est basée sur la propriété de la catalase à dégrader le peroxyde d'hydrogène (Aebi 1984). Nous mesurons la disparition du H₂O₂ par spectrophotométrie à 240 nm. Les extraits (200µL) sont incubés 30 minutes à 0°C avec 2 µL d'éthanol 95%. 2 µL de Triton à 1% sont ensuite ajoutés et les homogénats sont centrifugés à 5000 g pendant 5 minutes. Le surnageant ainsi récupéré sera utilisé tout d'abord seul. Cette mesure correspond au blanc. Puis 50 µL de H₂O₂ (180 mM) sont ajoutés pour déclencher la réaction.

La constante de vitesse est définie telle que : $K = 2,3/\Delta t \cdot \log_{10}(\text{DO}_{\text{zéro}}/\text{DO}_t)$ (Aebi 1984). Les résultats sont exprimés en unité (U ou K)/mg de protéines totales.

5.7.4 Dosage de l'activité de la citrate synthase (CS ; EC.9.1.3.7)

La citrate synthase est une enzyme présente dans la matrice mitochondriale. Elle initie la synthèse de citrate à partir d'oxaloacétate (OAA) et d'acétyl-CoA. Elle est spécifique des mitochondries. La mesure de l'activité de la citrate synthase (CS) est effectuée selon la méthode de Srere (Srere 1969).

La CS a été mesurée sur les suspensions d'hépatocytes isolés. 50µL de surnageant est prélevé et dilué dans 50µL de tampon Tris (100mM ; pH 8) et 10µL de Triton X100. 10µL de cette solution diluée sont mélangés au milieu réactionnel (tampon Tris 100mM, acide 5,5' dithio bis-2 nitrobenzoïque (DTNB) 1mM, acétyl-CoA 3mM) pour le dosage de la CS. Une première lecture DO à 420nm et à 25°C, correspondant à l'activité basale, est réalisée. La réaction est initiée par ajout d'OAA (1mM). Une deuxième lecture de DO, correspondant à l'apparition du TNB est effectuée toutes les 30 sec. pendant 3 min.



Le calcul de formation de TNB est réalisé suivant la loi de Beer-Lambert, en utilisant le coefficient d'extinction molaire (ϵ) du TNB ($13,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Les résultats sont exprimés en nmol/min.

5.7.4 Dosage de l'activité de la 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (HAD; EC.1.1.1.35)

Les échantillons de tissu adipeux brun (40-50 mg) sont broyés dans un tampon phosphate (0,3mM, pH 7,7) + 10% de BSA. La 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase est la troisième enzyme d'un cycle de β -oxydation des acides gras saturés. Le principe du dosage de l'activité repose sur la mesure de la décroissance du NADH au cours de la réaction enzymatique. Les variations de DO sont mesurées par spectrophotométrie à 340 nm et à 25°C (Lowry and Passonneau 1973).



10 μ L de l'échantillon sont mélangé au milieu réactionnel (EDTA 200mM, imidazole 40 mM, NADH 10 mM, pH 7) à 25°C. Une lecture de DO est effectuée toutes les 5 sec. pendant 1 min. La réaction est initiée par l'ajout de S acétoacétyl-CoA (5 mM). La lecture de DO de la réaction, correspondant à la disparition de NADH, est réalisée à 340 nm et à 25°C. Le calcul de la disparition du NADH est réalisé suivant la loi de Beer-Lambert, en utilisant le coefficient d'extinction molaire (ϵ) du NADH ($6,22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Les résultats sont exprimés en $\mu\text{mol/min/g prot.}$

5.8 Détermination de la concentration des cytochromes (aa3, b, cc1)

La détermination de la concentration en cytochromes de la chaîne respiratoire a été faite par spectrophotométrie (Williams 1964). Le spectre d'absorption des cytochromes varie selon leur degré d'oxydoréduction. La suspension mitochondriale (5 mg/mL de protéines mitochondriales) est diluée dans 2 mL de tampon sodium phosphate 0,1 M, 1% Triton 100X, pH 7,4, puis est répartie dans deux cuves (1 mL par cuve) qui sont placées dans un spectrophotomètre (double faisceau, thermostaté à 30°C). Dans la cuve échantillon, 10 μ L d'ascorbate de sodium à 0,05 M sont ajoutés. Les cuves sont homogénéisées par renversement, et après 1 minute les premiers spectres dits « basal » sont lus. Les cytochromes sont ensuite réduits dans la cuve échantillon par addition de quelques cristaux de dithionite de sodium et dans la cuve référence, les mitochondries sont oxydées par 10 μ L de ferricyanure de potassium à 0,5 μ M. Les cuvettes sont à nouveau homogénéisées et après 1 minute

une deuxième lecture de spectres est effectuée. Les spectres de base sont soustraits à leur spectre oxydé ou réduit respectif.

La différence de densité entre les spectres réduits et oxydés à des longueurs d'onde précises permet de calculer la concentration en cytochromes des mitochondries. La concentration en cytochrome $a+a_3$ est déterminée par la différence entre A_{605} nm et A_{630} nm ($\epsilon = 24 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), les concentrations en cytochromes b entre A_{563} nm et A_{575} nm ($\epsilon = 18 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), et $c+c_1$ des différences respectives entre A_{550} nm et A_{535} nm ou A_{554} nm et A_{540} nm ($\epsilon = 18 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

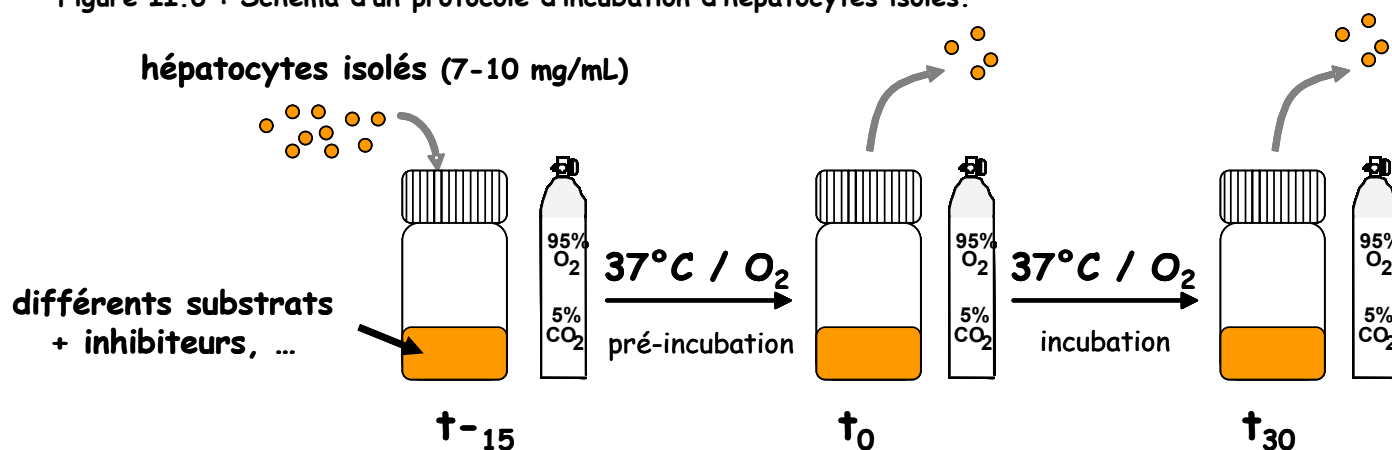
6 Techniques d'étude utilisées avec les hépatocytes isolés

6.1 Incubation en flacons fermés

Les hépatocytes isolés (entre 7 et 10 mg/mL dans 1,3 à 1,7 mL de milieu) sont incubés dans des flacons en polypropylène fermés contenant la solution IV (voir page 88), saturée en carbogène (95% O_2 -5% CO_2). Le milieu contenant les différents substrats est thermostaté à 37°C à l'aide d'un bain-marie, et maintenu en agitation permanente. Un prélèvement de la suspension cellulaire (700 μL) est effectué à t_0 et t_{30} . Cela permettra de doser l'accumulation extracellulaire des principaux métabolites dans les différentes conditions étudiées (figure II.6).

Les prélèvements cellulaires sont immédiatement acidifiés dans des tubes eppendorf contenant de l'acide perchlorique (4% final, m/v), afin de précipiter les protéines et stopper ainsi les activités enzymatiques, puis conservés à 4°C. Une centrifugation à 13500 g pendant 5 min permet ensuite d'éliminer les protéines précipitées par l'acide perchlorique. Le surnageant est alors prélevé (550 μL) puis neutralisé avec un mélange de potasse (2 M KOH) et d'acide morpholino-propanesulfonique (0,3 M MOPS). Les tubes sont conservés à 4°C pour les dosages enzymatiques des métabolites qui sont effectués le jour même, le pyruvate étant instable à la congélation.

Figure II.6 : Schéma d'un protocole d'incubation d'hépatocytes isolés.



Les avantages immédiats de cette technique d'incubation résident dans la possibilité de réaliser un grand nombre d'expérimentations en testant plusieurs conditions différentes de manière simultanée et assez simple. A l'inverse, les inconvénients majeurs de ce système sont principalement liés à la nécessité d'utiliser des concentrations saturantes de substrats pour ne pas être limitant au cours du temps du fait de leur disparition progressive. Dans ces conditions particulières, les hépatocytes n'approchent jamais de l'état stationnaire en raison, notamment, de l'accumulation des produits du métabolisme qui peuvent exercer un rétrocontrôle sur certaines voies métaboliques ou être réutilisés par la cellule.

Le foie étant le siège d'un métabolisme important (néoglucogenèse, lipogenèse, ...), plusieurs paramètres permettant de le quantifier sont mesurés :

1. le flux de glucose ou néoglucogenèse [Glc]
2. le flux lactate + pyruvate ou glycolyse [L+P]
3. le rapport lactate/pyruvate (L/P) (état d'oxydo-réduction cytosolique à une constante près) (Williamson, Lund et al. 1967). $\text{NADH/NAD}^+_{\text{cyto}} = 1,1 \cdot 10^{-4} \times \text{lactate/pyruvate}$
4. quantité de substrat métabolisé (2G+L+P)
5. les corps cétoniques, c'est à dire 3-hydroxybutyrate + acétoacétate ou cétoгенèse [CC] (oxydation partielle des lipides)
6. le rapport 3-OHBut/AcAc ($\beta\text{OH/AcAc}$) (état d'oxydo-réduction matriciel) $\text{NADH/NAD}^+_{\text{mito}} = 4,93 \cdot 10^{-2} \times \frac{3\text{-OHBut}}{\text{AcAc}}$

Nous avons choisi deux types de substrats différents (hydrate de carbone et acide gras) pour nos expériences.

☞ **Le dihydroxyacétone** (DHA=condition contrôle). Ce substrat, bien que non physiologique, entre au niveau des trioses phosphates et est phosphorylé par la glycérokinase (GK) en DHAP. Les carbones de ce composé vont s'orienter soit vers la glycolyse soit vers la néoglucogenèse en fonction de l'état énergétique de la cellule, c'est-à-dire du rapport ATP/ADP cellulaire.

☞ **Le glycérol** qui est catalysé dans un premier temps en glycérol-3-phosphate par la glycérokinase (GK), puis en DHAP par la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (G3PDH). L'orientation de ce composé vers l'une ou l'autre des voies métaboliques va dépendre du rapport NADH/NAD^+ .

☞ **Le lactate + pyruvate associé à un acide gras.** La formation de glucose à partir de lactate et pyruvate représente la voie « classique » de néoglucogenèse, c'est *in vivo* la voie métabolique physiologique essentielle des hépatocytes qui reçoivent de grandes quantités de lactate provenant de

l'intestin, des globules rouges ou des muscles. Elle est régulée au niveau du cycle PEP/pyruvate et le cycle des fructoses (Groen, Vervoorn et al. 1983; Groen, van Roermund et al. 1986). De plus la lactate déshydrogénase étant proche de l'équilibre, le rapport des concentrations de lactate et pyruvate est proportionnel au rapport des concentrations de NADH/NAD⁺ cytosolique.

☞ **L'octanoate** est un acide gras à chaîne moyenne (C8). Il est activé en acyl-coA dans la mitochondrie où il subit la β -oxydation qui conduit à la production d'acétyl-coA et d'équivalents réduits (NADH et FADH₂).

☞ **L'oléate** est un acide gras à chaîne longue (C18) qui entre dans la matrice mitochondriale via le système de la carnitine transférase, pour être β -oxydé et ainsi produire du NADH et FADH₂.

Tableau II.3: liste des différents substrats et inhibiteurs utilisés sur hépatocytes isolés.

Inhibiteurs / Substrats	Concentration utilisée
DHA	20 mM
octanoate	4 mM
DHA + octanoate	20/4 mM
oléate	2 mM
DHA + oléate	20/2 mM
Lactate + pyruvate + octanoate	10/1/4 mM
glycérol	20 mM
Roténone	5-10 μ M
DNP	75 μ M
Oligomycine	6,25 μ g/ml
Myxothiazol	3,8 μ M
TMPD	1-2 mM
Ascorbate	5 mM

6.2 Oxygraphie

Les mesures de consommation d'oxygène sur hépatocytes intacts sont réalisées après incubation des cellules (7 -10 mg/mL) en pots fermés dans de la solution IV selon un protocole identique à celui décrit précédemment.

Après 15 minutes d'incubation dans les conditions à étudier et en présence des différents substrats, 1,3 mL de suspension cellulaire, préalablement saturée avec du carbogène pendant 30 secondes, est prélevée et immédiatement transférée dans la chambre d'oxygraphie thermostatée à 37°C et agitée en continu. Après stabilisation de la respiration des hépatocytes, différents inhibiteurs sont introduits dans la cuve à l'aide d'une seringue Hamilton évitant ainsi toute ré-oxygénation du milieu par ouverture de la cuve. Les substrats et inhibiteurs utilisés sur hépatocytes sont indiqués dans le tableau ci-dessus.

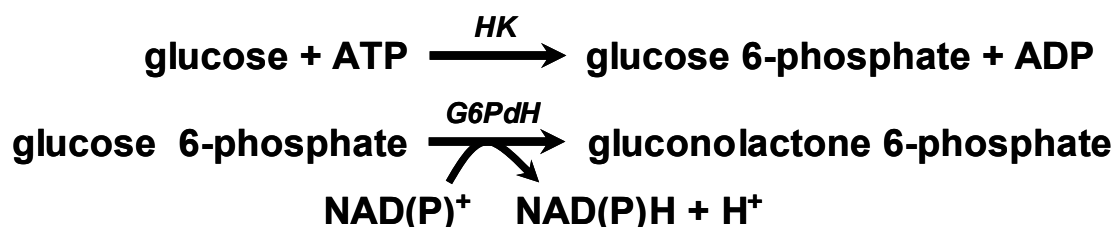
6.3 Dosage enzymatique des métabolites extracellulaires

Les dosages des principaux métabolites extracellulaires sont réalisés par les méthodes enzymatiques décrites par Bergmeyer reposant sur la transformation de NAD^+ en NADH ou inversement (Bergmeyer 1974).

La détermination de la concentration de NADH, qui présente un pic d'absorption maximal à la longueur d'onde de 340 nm, est réalisée par un spectrophotomètre avant et après l'action d'enzymes dans des milieux de dosage de composition standardisée contenant les échantillons à analyser. Après soustraction de l'absorbance du blanc, réalisé sur du milieu de dosage sans enzyme, à celle de l'échantillon, la quantité de NADH calculée correspond stoechiométriquement à celle de produit transformé par l'enzyme utilisée. Les concentrations des métabolites dans la cuve sont rapportées au poids sec d'hépatocytes, en tenant compte de toutes les dilutions effectuées.

6.3.1 Dosage du glucose

Le dosage du glucose repose sur la transformation du NAD^+ en NADH lors d'une réaction catalysée par la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PdH).

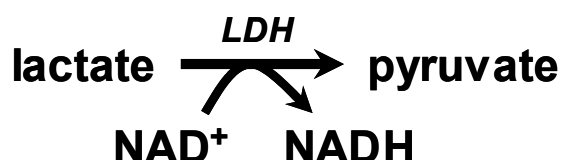


L'échantillon (60 μL) à doser est placé dans une cuve plastique contenant 2mL de milieu de dosage standardisé (0,5 mM NAD^+ , 0,625 mM ATP, 0,5 U.I. G6PdH NAD^+ -dépendante, 50 mM TRA-HCl, 7,5 mM MgCl_2 et 3,75 mM EDTA ; pH 7,4 avec NaOH). Une première lecture de densité optique

à 340 nm est effectuée afin d'obtenir la valeur du blanc puis, 0,3 U.I d'hexokinase est ajouté. La cuve est homogénéisée puis une deuxième lecture de densité optique est réalisée 60 minutes plus tard.

6.3.2 Dosage du lactate

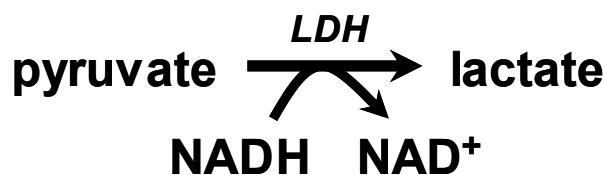
Le dosage du lactate repose sur la transformation du NAD^+ en NADH lors d'une réaction catalysée par la LDH.



L'échantillon à doser (150 μL) est placé dans une cuve plastique contenant 1,5 mL de milieu de dosage standardisé (0,75 mM NAD^+ , 0,4 M d'hydrate d'hydrazine et 0,4 mM glycine). La présence de glycine rend le milieu de dosage basique (pH 9) et permet ainsi d'orienter la réaction dans le sens du pyruvate. Une première lecture à 340 nm est réalisée puis la réaction est initiée par ajout de 5 U.I de LdH. La cuve est agitée pour homogénéisation puis une seconde lecture est réalisée 90 minutes plus tard.

6.3.3 Dosage du pyruvate

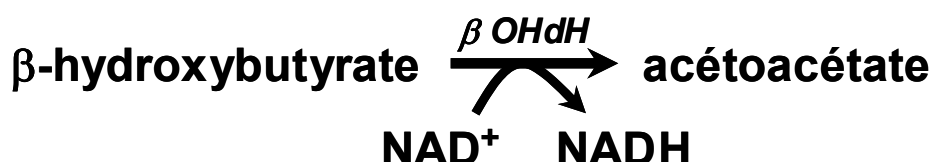
Le dosage du pyruvate repose sur la transformation du NADH en NAD^+ . On mesure donc une diminution du NADH lors de la réaction inverse de celle du dosage du lactate, également catalysée par la LDH.



L'échantillon à doser (150 μL) est placé dans une cuve plastique contenant 1,5 mL de milieu de dosage standardisé (0,2 mM NADH ; pH 7,4 avec un tampon phosphate 50 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$). Une première lecture à 340 nm est réalisée puis la réaction est initiée par adjonction de 1,25 U.I de LdH. La cuve est agitée pour homogénéisation puis une seconde lecture est réalisée 15 minutes plus tard.

6.3.4 Dosage du β -hydroxybutyrate

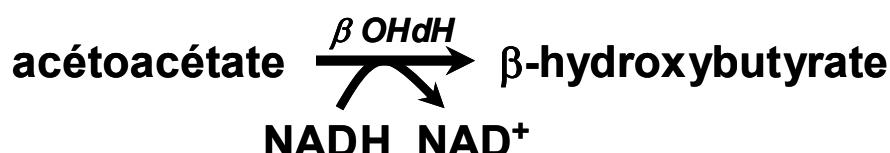
Le dosage du β -hydroxybutyrate (β -OH) repose sur la transformation du NAD^+ en NADH lors d'une réaction catalysée par la β -hydroxybutyrate déshydrogénase (β -OHDH).



L'échantillon à doser (150 μL) est placé dans une cuve plastique contenant 1,5 mL du même milieu de dosage que celui utilisé pour le lactate. Le dosage du $\beta\text{-OH}$ peut ainsi être réalisé sur le même échantillon à la suite de celui du lactate. Une première lecture à 340 nm est réalisée puis la réaction est initiée par adjonction de 80 mU.I. de $\beta\text{-OHdH}$. La cuve est agitée pour homogénéisation puis une seconde lecture est réalisée 90 minutes plus tard.

6.3.5 Dosage de l'acétoacétate

Le dosage de l'acétoacétate (AA) repose sur la transformation du NADH en NAD^+ lors de la réaction inverse de celle du dosage du $\beta\text{-OH}$, également catalysée par la $\beta\text{-OHdH}$.



L'échantillon à doser (150 μL) est placé dans une cuve plastique contenant 1,5 mL du même milieu de dosage que celui utilisé pour le pyruvate. Le dosage de l'AA peut ainsi être réalisé sur le même échantillon à la suite de celui du pyruvate. Une première lecture à 340 nm est réalisée puis la réaction est initiée par ajout 24 mU.I. de $\beta\text{-OHdH}$. La cuve est agitée pour homogénéisation puis une seconde lecture est réalisée 45-60 minutes plus tard.

7 Techniques d'étude utilisées avec les adipocytes isolés

7.1 Cellularité

Une fois l'isolement des adipocytes effectué, la cellularité de la suspension est estimée. Un comptage cellulaire est effectué sur une lame de Mallassez afin de déterminer la concentration de la solution d'adipocytes. La mesure de la taille et du diamètre des cellules est également réalisée grâce à un micromètre monté sur le microscope (théoriquement, le diamètre d'un adipocyte est en moyenne de 60 μm chez un Wistar).

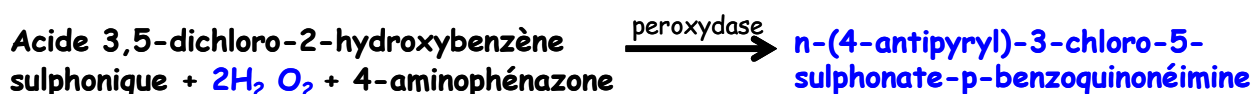
7.2 Lipolyse

Les adipocytes de chaque tissu (1 mL de suspension) sont incubés 30 min. à 37°C avec différentes hormones dans des tubes eppendorf. 4 conditions d'incubations sont réalisées :

- ☞ **un temps zéro**, qui correspond à des tubes non incubés (quantité de glycérol présent dans la solution à t_0).
- ☞ **une lipolyse basale**, qui correspond à une incubation de 30 min. sans hormones.
- ☞ **Une lipolyse en présence d'isoprotérénol** (10^{-7} M), un agoniste β -adrénergique, connu pour stimuler la lipolyse.
- ☞ **Une lipolyse en présence d'isoprotérénol et d'insuline** à deux concentrations différentes (20 μ U/mL ou 100 μ U/mL). L'insuline est un inhibiteur de la lipolyse.

A la fin de l'incubation, les tubes sont centrifugés 10 sec. à 1000g afin de faire remonter les adipocytes à la surface. La lipolyse est stoppée par aspiration des cellules. Un prélèvement (50 μ L) est effectué à t_0 , et un deuxième au terme des 30 min. d'incubation (t_{30}). Le glycérol est ensuite dosé dans le milieu d'incubation. La différence de concentration entre les échantillons à t_0 et t_{30} nous donnant ainsi un reflet de la lipolyse. Le dosage consiste en une méthode colorimétrique directe, utilisant un système chromogénique quinonéimine (ACSB) en présence de glycérol kinase, peroxydase et glycérol phosphate oxydase. La quantité de glycérol produit est calculée à partir d'une gamme étalon réalisée à partir d'une solution mère de glycérol à 1 mM.

Le dosage est réalisé avec un kit Randox. 50 μ L de milieu d'incubation sont mélangés à 1 mL de réactif de dosage. Après 30 min. à température ambiante, la DO de la solution est lue à 520 nm.



Pour les expériences préliminaires, nous admettrons que le rendement d'isolement des adipocytes est d'environ 60% et donc que la digestion de 1g de tissu adipeux donne finalement 600 μ L de cellules. La lipolyse est donc exprimée en nmoles de glycérol libéré par 100 μ L d'adipocytes et par heure.

8 Techniques de biologie moléculaire

8.1 Extraction et dosage des ARN totaux

Environ 80 mg de tissu ont été broyés 15 secondes à l'aide d'un ultraturax dans 1 mL d'une solution Trizol (Invitrogen, France). L'extraction des ARNs totaux est obtenue par séparation de phase (organique et aqueuse), les ARNs étant solubilisés dans la phase aqueuse. La concentration en ARN a été dosée par spectrophotométrie en mesurant la densité optique à 260 nm et leur pureté vérifiée par la mesure du rapport des densités optiques à 260 et 280 nm (supérieur à 1,8). L'absence de dégradation des ARN a été vérifiée par électrophorèse sur minigel d'agarose à 1 %.

8.2 Rétro transcription des ARN messagers et réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR)

Cette étape permet de synthétiser des ADNc à partir d'ARNm. Pour cela, nous avons utilisé la M-MLV RT (Moloney-Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) (Promega, France) en présence d'oligo(dT) servant d'amorce et permettant la complémentarité avec la queue poly (A) de l'ARNm. En effet, 1 µg d'ARN en présence d'1 µg d'oligo(dT) sont chauffés à 70°C pendant 5 minutes dans un volume final de 17,5 µL. Cette étape permet la déstabilisation des structures secondaires, favorisant ainsi la linéarisation des ARNm. Ensuite, 7,5 µL d'un mélange de RT sont ajoutés à chaque échantillon. Ce mélange est constitué de 5 µL de Tampon M-MLV RT (5X), 20 U de Rnasin Inhibitor, 15 nanomoles de dNTP, 100 U de M-MLV RT. L'ensemble est incubé pendant 1h30 à 42°C, permettant ainsi la transcription inverse, puis pendant 10 min à 70°C, favorisant la dénaturation de l'enzyme.

8.3 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Les différents jeux d'amorces ainsi que les nombres (n) de cycles utilisés sont répertoriés dans le tableau II.4.

L'amplification par PCR des ADNc est réalisée à partir 2,5 µL de produits de RT obtenus précédemment mélangés à 5 µL de tampon 10X, 2 µL de MgCl₂ (25 mM), 2,5 U de EurobioTaq Pol (Eurobio, les Ulis, France), 1,5 µL de dNTP (10 mM) et 1,5 µL d'amorces sens et antisens (15 µM) (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), pour un volume final de 47 µL. Après une dénaturation initiale à 94°C pendant 2 min, chaque échantillon subit un nombre de cycles de PCR (n) variable en fonction des cibles. Chaque cycle comprend 1 min à 94°C (dénaturation), 1 min à 60°C (hybridation) et 1 min à 72°C (élongation). Une étape finale de 10 min à 72°C est réalisée pour terminer l'amplification. L'appareil utilisé est un thermocycleur Thermo Hybaid (Ashford, UK). Un mélange de 1,5 µL d'amorce sens et 1,5 µL d'amorce antisens de cyclophiline (15 µM) est ajouté dans chaque tube contenant les amorces cibles de façon à ce que cette dernière subisse toujours 23 cycles de PCR. La cyclophiline sert dans ce cas de standard interne à l'échantillon et est utilisée pour quantifier les ARNm cibles de manière semi-quantitative.

Tableau II.4: sequences des primer utilises pour la RT-PCR

	Sense (5' → 3')	Antisense (5' → 3')	taille (bp)	n (cycles)
cyclophiline (gi62666570)	<i>GTG GCA AGT CCA TCT ACG GAG</i>	<i>CCA CAG TCG GAG ATG GTG ATC</i>	265	23
IL-6 (gi7549768)	<i>GAC TGA TGT TGT TGA CAG CCA</i>	<i>CCA TTA GGA GAG CAT TGG AAG</i>	482	36
TNF-α (gi82524821)	<i>ATG AGC ACG GAA AGC ATG AT</i>	<i>CCT TGT CCC TTG AAG AGA AC</i>	442	32
TNF-R (gi207361)	<i>GGT CCG ATC GTC TTA CTT CA</i>	<i>GGA GAA ATC TCC ACC TGG AA</i>	443	27
UCP1 (NM_012682)	<i>GTG AAG GTC AGA ATG CAA GC</i>	<i>AGG GCC CCC TTC ATG AGG TC</i>	197	21
HDMCP (NM_001001509)	<i>AAT CAA GAC TGA GGC CAA GTA</i>	<i>TGT GTC TGC AGG CGG AGT TT</i>	302	24
FAS (X62888)	<i>GGC CTG GAC TCG CTC ATG GG</i>	<i>TGG GCC TGC AGC TGG GAG CA</i>	514	26
ACC1 (J03808)	<i>GTT GCA CAA AAG GAT TTC AG</i>	<i>CGC ATT ACC ATG CTC CGC AC</i>	504	28
ANT 1 (D12770)	<i>AGG GCT TTC TCT CCT TCT GG</i>	<i>CCC TGC ACA GAG ACA CTG AA</i>	355	30
ANT 2 (D12771)	<i>TTC GTA TCC CCA AGG AAC AG</i>	<i>GAA GTT AGG CCA GCA ACA GC</i>	508	30

8.4 analyse des produits PCR

L'analyse des produits de RT-PCR est faite par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,5% contenant du bromure d'éthidium. Après migration à 70 V pendant 30 min, les produits séparés sont visualisés sous UV et le gel est photographié à l'aide d'un système d'analyse d'images Kodak Digital Science™ camera (DC120) qui permet de mesurer l'intensité lumineuse des bandes. L'analyse semi-quantitative de l'expression du gène cible est déterminée par le calcul du rapport entre l'intensité de la bande du gène cible et celle de la cyclophiline.

8.5 Western blot

Les protéines mitochondriales sont séparées par électrophorèse au travers d'un gel de polyacrylamide en présence de Sodium DodécylSulfate (SDS-PAGE: SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis), détergent anionique qui confère une charge négatives les protéines.

Pour une bonne séparation de la protéine étudiée par rapport aux autres protéines, nous utilisons un gel à 13% d'acrylamide. Les protéines mitochondriales (20 µg pour le BAT) ont été placées dans un tampon de charge (Tris 100 mM, glycérol 12,5%, β-mercaptoéthanol 2%, SDS 2% et bleu de bromophénol 0,05%). Les échantillons sont ensuite chauffés à 95°C pendant 5 min, afin d'assurer la dénaturation des protéines. Les protéines sont séparées par SDS-PAGE pendant environ 90 minutes à 110V, à température ambiante, dans un tampon Tris 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0,1%. Sous l'action du champ électrique, les protéines chargées négativement se dirigent vers l'électrode positive, l'anode.

Une fois l'électrophorèse terminée, les protéines sont transférées du gel sur la membrane de polyvinylidène fluorure (PVDF, Immobilon-P, Millipore), sous l'action d'un champ électrique. Le transfert est réalisé pendant 1 heure à 300 mA et à 4°C dans un tampon contenant 50 mM de Tris, 386 mM de glycine, 20% de méthanol et 0,1% de SDS. Avant immunodétection, les sites de fixation potentiels non utilisés de la membrane sont bloqués 12 heures à 4°C sous agitation douce avec une solution à pH 7,4 de PBS (Phosphate Buffered Saline) 0,1% Tween 20 (polyéthylène sorbitan monolaurate, détergent non ionique) et 5% de lait écrémé en poudre.

La protéine d'intérêt est détectée par immuno-marquage. L'anticorps primaire, anti-UCP1 (alpha-diagnostic, 1/15000) est dilué dans une solution de PBS-0,1% Tween 20 (pH 7,4) contenant 1% de lait, et mis en contact avec la membrane 1 heure à température ambiante sous agitation douce. La membrane est ensuite lavée 2 fois 10 min et 1 fois 15 min avec une solution de PBS-0,1% Tween 20 (pH 7,4) sous agitation vigoureuse. L'anticorps secondaire lié de manière covalente à l'enzyme HorseRadish Peroxidase (HRP) est préparé et utilisé comme l'anticorps primaire (dilution 1/5000). La membrane est ensuite lavée 4 fois 5 min et 1 fois 15 min avec une solution de PBS-0,1% Tween 20 (pH 7,4) sous agitation vigoureuse. Puis la membrane est lavée 10 min dans une solution de PBS sans Tween 20.

La détection de l'activité enzymatique de la HRP est réalisée grâce à une méthode de chemiluminescence améliorée (Enhanced ChemiLuminescence, ECL plus, Amersham) permettant de révéler la position des complexes antigène-anticorps. La membrane est placée 1 min en présence d'ECL puis une autoradiographie de la luminescence émise est réalisée. Les autoradiographies des membranes sont analysées à l'aide d'un logiciel d'analyse d'images (Image J, NIH). Les bandes sont quantifiées en unités arbitraires (UA).

La membrane est ensuite colorée avec un colorant spécifique des protéines (amido-black 0,1% dilué dans 25% d'isopropanol et 10% d'acide acétique). Cette opération permet de vérifier l'homogénéité de la charge des protéines dans les différents puits et de vérifier si l'électrophorèse et le transfert se sont bien déroulés.

9. Dosages plasmatiques et tissulaires

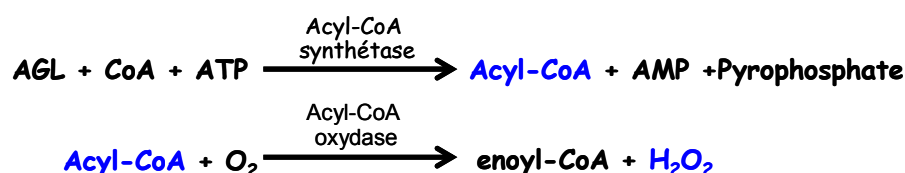
9.1 Le glucose plasmatique

La concentration plasmatique de glucose a été déterminée de manière enzymatique selon la méthode décrite par Bergmeyer (Bergmeyer 1974). Le principe est le même que celui décrit précédemment (6.3.1).

La glycémie est mesurée sur 50 µL de plasma. Les résultats sont exprimés en mM, et calculés à partir d'une gamme étalon de glucose (0-1-5 mM).

9.2 Les acides gras libres (AGL) plasmatiques

Les AGL ont été dosés par une technique enzymatique grâce à un test Nefa-C (Wako). Le principe de dosage est le suivant :

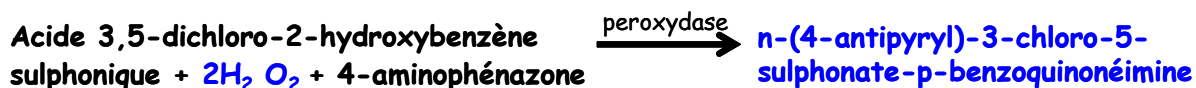


Les AGL sont convertis en Acyl-CoA par l'enzyme Acyl-CoA synthétase en présence des co-facteurs CoA et ATP. La deuxième étape consiste en la formation de peroxyde d'hydrogène par l'Acyl-CoA synthétase après interaction entre l'Acyl-CoA et l'oxygène. Dans la dernière étape, le peroxyde d'hydrogène transforme le MEHA et la 4-amino-4-antipyrine en un chromogène, en présence de peroxydase. Une coloration pourpre, proportionnelle à la quantité d'AGL, se développe. L'intensité de la coloration est mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 550 nm.

Pour chaque dosage, 50 µL de plasma ont été nécessaires. Les résultats sont exprimés en mM à partir d'un standard d'acide oléique (1mM).

9.3 Le glycérol (Gly) plasmatique

Le glycérol a été dosé par une technique enzymatique grâce à un test Randox. Le principe de dosage est le suivant :



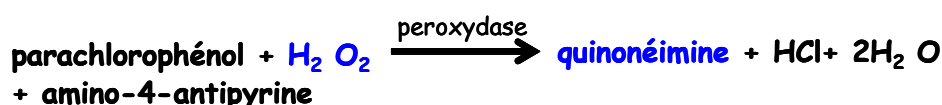
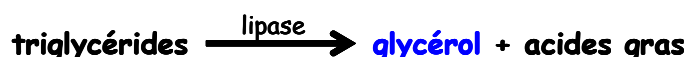
Le glycérol est converti en glycérol-3-phosphate par la glycérol kinase, en présence d'ATP. La deuxième étape consiste en la formation de peroxyde d'hydrogène par la glycérol phosphate oxydase après interaction entre le glycérol-3-phosphate et l'oxygène. Dans la dernière étape, le peroxyde d'hydrogène transforme le DCHBS et la 4-aminophénazone en un chromogène (ACSB), en présence de peroxydase. Une coloration rose, proportionnelle à la quantité de glycérol, se développe. L'intensité de la coloration est mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 520 nm.

Pour chaque dosage, 30 µL de plasma ont été nécessaires. Les résultats sont exprimés en mM à partir d'un standard de glycérol (100 µM).

9.4 Les triglycérides (TG)

La concentration en TG hépatique est estimée après extraction préalable des lipides du tissu. 50-100mg de foie sont broyés dans 1mL de potasse alcoolique (KOH 0,5 M, éthanol 95%) dans un potter en verre. Le broyat obtenu est chauffé au bain-marie à 70°C sous agitation pendant 20 minutes. Les tubes sont ensuite laissés 10 minutes à température ambiante, puis 2 mL de MgSO₄, 7H₂O (0,15 M) sont ajoutés. Les tubes sont vortexés puis centrifugés 5 minutes à 10000g. Le dosage est ensuite effectué sur le surnageant.

Pour le dosage, 10 µL de plasma ou 5 µL du surnageant de l'extraction hépatique sont utilisés. Les TG sont dosés par une technique enzymatique à l'aide d'un kit Biomérieux. Le principe de dosage est le suivant :



Les TG sont convertis en glycérol et acides gras par une lipase. La mesure de la concentration de TG repose en fait sur le dosage du glycérol. La deuxième étape consiste donc en la

conversion du glycérol en glycérol-3-phosphate par la glycérol kinase, en présence d'ATP. Le peroxyde d'hydrogène issu de l'interaction entre le glycérol-3-phosphate et l'oxygène par la glycérol phosphate oxydase, va transformer le parachlorophénol et l' amino-4-antipyrine en quinonéine, en présence de peroxydase. Une coloration fuschia, proportionnelle à la quantité de glycérol, se développe. L'intensité de la coloration est mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 505 nm.

Les résultats sont exprimés en μM pour le sérum et en mg/g pour le tissu, à partir d'un standard de glycérol (2,29 mM ou 2 g/L).

10. Analyse des Résultats et Statistiques

Tous les résultats sont exprimés sous forme de moyenne +/- un écart standard à la moyenne (sem). Les comparaisons statistiques ont été effectuées par un test d'analyse des variances (ANOVA) pour comparer les groupes entre eux lorsque leur nombre était supérieur à 2, suivi d'un test post hoc de PLSD Fisher. Les variations au sein d'un même groupe ont été comparées par un test t de Student. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel Statviews.

Chapitre III

Résultats et discussion - Tome 1

Effets d'un régime alimentaire enrichi
en lipides saturés sur le métabolisme



III-1. Effets d'un régime alimentaire enrichi en lipides saturés

1. Introduction

Certaines études laissent supposer que si l'incidence de la stéatohépatite non alcoolique (NASH : non alcoholic steatohepatitis) a augmentée au cours des dernières années, parallèlement à l'obésité et au diabète de type II, cela est dû à un changement de mœurs. En effet, avec la « modernisation » et la sédentarisation, l'homme a changé son mode de vie et d'alimentation. Il est devenu moins actif et a changé son alimentation riche en fruits et en légumes par une alimentation riche (trop) en lipides. Cela est appuyé par une étude menée sur l'alimentation de patients atteints de NASH (Musso, Gambino et al. 2003). Dans cette étude, effectuée sur 25 patients et sur une durée d'une semaine, une augmentation de la quantité de lipides ingérés a été observée, notamment en acide gras saturés (AGS), ainsi qu'une diminution des apports en fibre et vitamines C et E.

A ce jour, l'étude de la NASH, que se soit au niveau des mécanismes de mise en place ou une fois la pathologie bien établie, reste relativement limitée de part la difficulté de détection de la maladie, même si d'énormes progrès ont été réalisés au cours des dernières années, et par un manque de modèles d'étude. Il est très difficile de se procurer du tissu hépatique frais humain en quantité suffisante pour réaliser des études approfondies. Les modèles animaux, et notamment murins, nous permettent donc d'avancer dans l'étude de la NASH. Cependant, beaucoup sont des modèles de la pathologie une fois celle-ci établie, mais peu, permet une étude de la pathogenèse de la NASH et donc des modifications impliquées dans le développement de celle-ci. Plusieurs équipes ont travaillé sur des régimes alimentaires enrichis en lipides de durées plus ou moins longues. Certains régimes induisent une stéatose sans autres complications, d'autre une NASH mais peu développent simultanément les autres caractéristiques du syndrome métabolique qui sont une obésité abdominale, une hyperlipidémie, une insulino-résistance etc.

Le premier objectif de cette étude a été de mettre au point un régime alimentaire enrichi en lipides, notamment en acides gras saturés, dans le but d'induire une NASH « physiologique » chez le rat Wistar. Pour cela, deux corps gras différents ont été utilisés, contenant chacun un pourcentage de lipides saturés différent. L'huile de coco (86% AGS) et du beurre alimentaire (51% AGS et 0,2% cholestérol).

Le deuxième objectif était d'étudier les modifications hépatiques induites par la NASH, au niveau cellulaire et mitochondrial.

2. Composition des régimes

Afin de se rapprocher des habitudes alimentaires des patients atteints de NASH décrite par l'équipe de Musso (Musso, Gambino et al. 2003), nous avons élaboré deux régimes alimentaires enrichis à 45% (m/m) ou 67% (kcal total) en lipides saturés à partir de deux types de graisse différentes (tableau III.1). Le premier régime est à base d'huile de coco, composé à environ 86% de lipides saturés dont principalement d'acide laurique (C12 :0) et le deuxième à base de beurre, comprenant 51% d'acide gras saturés dont principalement de d'acide palmitique (C16 :0) et une petite quantité de cholestérol.

Des rats au sevrage (3-4 semaines) ont reçus l'un ou l'autre de nos régimes et cela pendant 14 semaines. A l'âge de 17-18 semaines les rats ont été sacrifiés pour permettre une étude du métabolisme hépatocytaire et de la bioénergétique mitochondriale.

Tableau III.1 : composition des différents régimes alimentaires.

(g/kg)	contrôle	coco	beurre
kcal/kg	2900	5600	5600
protéines	160	170	170
lipides	27	460	460
AGS		86.5% (ac. Laurique)	51.3% (ac. Palmitique)
AGMI		5.8% (ac. Oléique)	21% (ac. Oléique)
AGPI		1.8% (ac. Linoléique)	3% (ac. Linoléique)
carbohydrates	596	250	250
cellulose	44	20	20
sels minéraux	50	50	50
humidité	123	50	50

AGS : acides gras saturés ; **AGMI** : acides gras mono-insaturés ; **AGPI** : acides gras poly-insaturés
Les acides gras présents majoritairement sont notés entre parenthèse. Les valeurs sont issues de l'United State Department of Agriculture, National Nutrient Database for Standard Reference. (www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/)

3. Problèmes rencontrés

Plusieurs problèmes ont été rencontrés au cours de cette étude, notamment au niveau de la préparation et de la stabilité des régimes, mais également vis-à-vis de l'appétence de ces aliments pour les rats. Le premier problème auquel nous nous sommes heurté a été la température de liquéfaction de notre huile de coco (25°C). Au dessus de cette température l'huile devenait liquide et nos croquettes se répandaient dans la cage. Nous avons donc du réaliser toute notre étude à une température de 22-23°C.

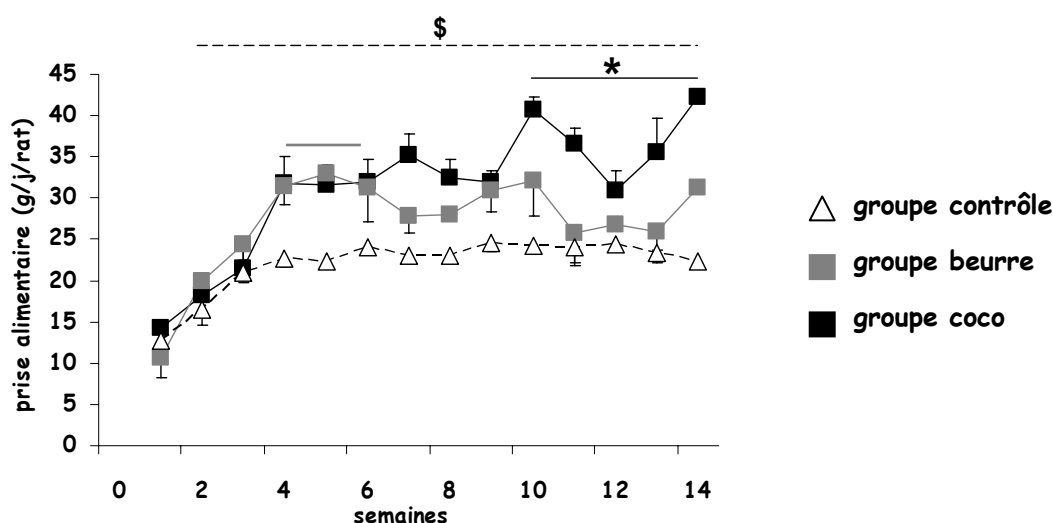
Le deuxième problème rencontré se situait au niveau de l'état de conservation de la nourriture une fois déposée dans la cage, en particulier pour le régime enrichi en beurre. Nous avons remarqué une oxydation du beurre après deux jours passé dans les cages avec dégagement d'une odeur âpre ayant pour conséquence une diminution de la prise alimentaire de nos rats. Pour pallier à tout cela, nos deux régimes étaient préparés chaque début de semaine, conditionnés sous forme de petites croquettes, et congelés afin d'avoir une forme, une taille et une texture dure identique aux croquettes contrôle. Les aliments étaient changés tous les jours à 18h juste avant l'extinction des lumières.

Enfin, le dernier problème auquel nous avons du faire face a été un refus de s'alimenter de la part des rats lorsqu'on ne leur présentait que le régime enrichi en lipides. En effet, nous avons constaté la nécessité de maintenir une certaine quantité de croquettes standards dans nos cages, en plus de nos croquettes enrichies en lipides, sans quoi les rats ne se nourrissaient pas. Cependant nous avons observé une préférence croissante de nos animaux envers les régimes enrichis durant les 14 semaines de l'étude. En effet au début du régime les rats mangeaient environ 80% de régime standard et donc 20% de régime enrichi en lipides, alors qu'à la fin des 14 semaines leur alimentation ne comprenait plus que 60% de régime standard et 40% de régime coco ou beurre (données non montrées). Pour chaque groupe, la quantité de chaque régime ingéré est calculée par une pesée quotidienne de la nourriture.

4. Prise alimentaire

La prise alimentaire est mesurée tous les jours durant les 14 semaines de régime. Elle correspond à la quantité de régime standard additionné ou non au régime hyperlipidique pour chaque cage et par jour (contrôle vs contrôle+coco vs contrôle+beurre), nous permettant ainsi de mesurer l'ingestion de chaque constituant du régime respectivement (lipides, glucides, protéines). Les rats étant hébergés à quatre par cage, les résultats présentés ici sont en fait une estimation de la prise alimentaire individuelle (prise alimentaire totale/4). Les résultats sont détaillés dans la figure III.1 et sont exprimés en grammes par jour et par rat (g/j/rat).

Figure III.1 : prise alimentaire des trois groupes de rats étudiés.



La prise alimentaire est mesurée quotidiennement pour les rats contrôles, coco et beurre. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM (g/jour/rat), $n=10$ pour le groupe contrôle et le groupe coco, $n=4$ pour le groupe beurre. Les comparaisons ($p<0,05$) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher. \$: coco vs. contrôle ; £: beurre vs. contrôle ; *: coco vs. beurre.

Les trois groupes de rats présentent une augmentation de leur prise alimentaire identique au cours des trois premières semaines de régime. A partir de la quatrième semaine on observe que les rats contrôles stabilisent leur prise alimentaire à environ 22 g/j/rat alors que les groupes beurre et coco présentent une augmentation significative de la quantité de nourriture ingérée qui va se stabiliser à environ 32 g/j/rat et rester stable jusqu'à la semaine 10. Au cours des 4 dernières semaines on constate une diminution de la prise alimentaire de ces deux groupes. Les valeurs du groupe beurre tendent à rejoindre les valeurs contrôles alors que les valeurs du groupe coco restent significativement supérieures (35-40 g/j/rat). Cette baisse s'explique par un problème de stabulation au niveau de l'animalerie. En effet, les rats ont été en contact avec des rats d'une autre expérimentation ou ceux-ci déclaraient des crises récurrentes d'épilepsie, perturbant ainsi cette étude. Nous pouvons supposer qu'en conditions « normales », la prise alimentaire du groupe beurre serait restée stable aux environs de 32 g/j/rat. Il faut tout de même remarquer que la prise alimentaire des rats coco est significativement supérieure à celle des rats du groupe beurre au cours des 4 dernières semaines ($p<0,05$).

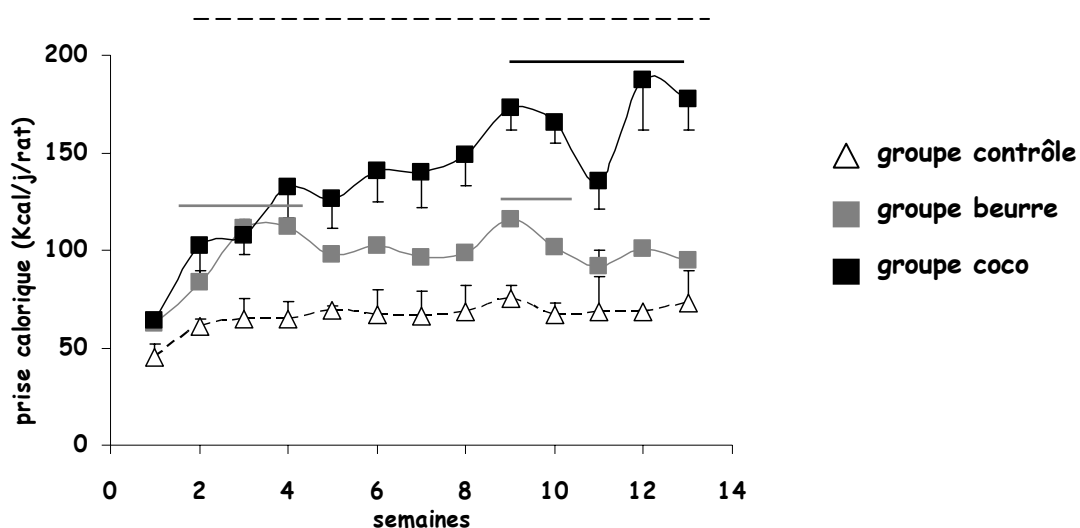
De manière générale, lorsque l'on compare les évolutions des prises alimentaires de chaque groupe, il apparaît que les groupes ayant un régime enrichi en lipides ont une prise alimentaire supérieure aux rats recevant un régime contrôle (coco : $p<0,005$ et beurre : $p<0,05$).

5. Prise calorique

Les rats coco et beurre ayant un libre accès à l'alimentation standard ET enrichie en lipides, nous avons voulu savoir si l'augmentation de la prise alimentaire était dû à une ingestion accrue de l'un ou de l'autre des régimes ou des deux. Nous avons également voulu savoir l'influence propre de l'huile de coco et du beurre sur les préférences alimentaires des rats et leurs répercussions en terme de calories ingérées.

La prise calorique est alors calculée sachant la valeur énergétique de chaque régime : contrôle = 2900 kcal/kg et régimes coco et beurre = 5500 kcal/kg. Comme pour les prises alimentaires, les valeurs sont une estimation de la prise calorique individuelle (prise calorique totale/4). Les résultats sont détaillés sur la figure III.2 et sont exprimés en kilocalories par jour et par rat (kcal/j/rat).

Figure III.2 : prise calorique des trois groupes de rats étudiés.



La prise calorique est calculée quotidiennement pour les rats contrôles, coco et beurre. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM (kcalories/jour/rat), $n=10$ pour le groupe contrôle et le groupe coco, $n=4$ pour le groupe beurre. Les comparaisons ($p<0,05$) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher. \$: coco vs. contrôle ; £: beurre vs. contrôle ; *: coco vs. beurre.

Tout d'abord on observe que les rats contrôles stabilisent leur prise calorique à environ 69 ± 1 kcal/j/rat après deux semaines de régime (figure III.2). Dès la première semaine on observe une prise calorique supérieure chez les deux groupes de rats recevant un régime enrichi en lipides. Les deux courbes se superposent jusqu'à la 3-4^{ème} semaine pour ensuite se stabiliser en moyenne à 101 ± 2 kcal/j/rat pour le groupe recevant le régime enrichi en beurre, alors que la courbe des rats coco continue à augmenter pour atteindre une prise calorique moyenne de l'ordre de 166 ± 7 kcal/j/rat au cours des quatre dernières semaines. On observe donc ici une augmentation de la prise calorique journalière de nos deux groupes de rats recevant une

alimentation enrichie en lipides. Cette augmentation est de + 143% (178 VS 73 kcal/j/rat ; $p < 0,001$) pour le groupe coco et de +30% (95 VS 73 kcal/j/rat; $p < 0,05$) pour le groupe beurre au cours de la dernière semaine de régime.

Tableau III.2: pourcentage calorique des lipides, protéines et carbohydrates dans chacun des trois régimes étudiés.

semaine	3			16		
	contrôle	coco	beurre	contrôle	coco	beurre
kcal/rat/jour	45	64	62	73	178	95
% lipides	7	29	47		45	42
% AGS	0,8	26,6	32,0		41,3	28,0
% AGMI	2,2	1,8	13,0		2,8	12,0
% AGPI	4,0	0,6	2,0		0,9	2,0
% dérivé du régime contrôle		4	2		3	3
% dérivé du régime « high fat »		25	45		42	39
% protéines	16	14	13		13	13
% dérivé du régime contrôle		10	6		6	6
% dérivé du régime « high fat »		4	7		7	7
% carbohydrates	77	57	40		42	45
% dérivé du régime contrôle		48	25		27	31
% dérivé du régime « high fat »		9	15		15	14

Les résultats sont exprimés en % de calories totales.

L'augmentation de la prise calorique de nos deux groupes de rats coco et beurre est la conséquence d'une ingestion accrue de nourriture, mais surtout d'une augmentation de la proportion de lipides absorbés. En effet, lorsque l'on calcule le pourcentage énergétique dû à l'ingestion de matière grasse, on observe une nette augmentation de celui-ci chez les groupes coco (45%) et beurre (42%) au terme des 14 semaines de régime, en comparaison au groupe contrôle (7%) (tableau III.2). On constate également que le groupe beurre, bien qu'en ayant augmenté son ingestion calorique, maintient le pourcentage d'énergie provenant des lipides entre

le début (47% kcal totale) et la fin du régime (42% kcal totale). Ce qui n'est pas le cas du groupe coco qui a multiplié son pourcentage de calorie provenant des lipides par 1,5 (29% vs 45%).

Il apparaît ici, que des rats soumis à un régime enrichi en lipides saturés ont une prise énergétique augmentée. Cette augmentation semble être fonction de la quantité et/ou du type d'acides gras ingérés. Dans cette étude, ce sont les rats nourris avec un régime enrichi en huile de coco (86% d'acides gras saturés dont une majorité d'acide laurique : C12 :0) qui présentent la prise alimentaire et calorique la plus importante. Au terme du régime les 2 groupes de rats recevant un régime enrichi en lipide ingèrent en moyenne 45% (kcal totale) de graisse.

6. Poids des animaux et répartition tissulaire

Nous avons ensuite étudié les conséquences de cette augmentation de la prise alimentaire sur l'organisme des rats. Un suivi de la masse corporelle des trois groupes de rats a donc été effectué au cours des 14 semaines de régime. Au début de l'étude, les rats (même âge et même masse corporelle) sont répartis aléatoirement en trois groupes, recevant chacun un régime alimentaire différent (contrôle, coco, beurre).

Tableau III.3: Evolution des masses corporelles et tissulaires des rats soumis à un régime enrichi en lipides (coco ou beurre) pendant 14 semaines.

masse	contrôle	coco	p	beurre	p
initiale (g)	101 ± 5	96 ± 4		100 ± 1	
finale (g)	480 ± 9	492 ± 5		544 ± 22	
foie (g/100g)	3,4 ± 0,1	3,3 ± 0,1		3,2 ± 0,1	
tissu adipeux blanc (g/100g) (épididymal + rétropéritonéal)	2,4 ± 0,2	3,8 ± 0,2	★	4,0 ± 0,6	★
muscle (mg/100g) (Soléaire + plantaris + EDL)	172 ± 2	148 ± 6	★	157 ± 4	

La masse des tissus est exprimée par 100g de masse corporelle. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM, n=10 pour le groupe contrôle et le groupe coco, n=4 pour le groupe beurre. Les comparaisons (p<0,05) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher. ★ vs. contrôle.

Au terme des 14 semaines de régime, les rats ont pris entre 400 et 450g. Malgré un régime alimentaire différent, la masse moyenne des trois groupes de rats n'est pas significativement différentes (tableau III.3). A noter tout de même une tendance, bien que non significative, à

l'augmentation chez les rats ayant reçu le régime enrichi en beurre. On peut supposer que la non significativité de ce résultat soit due au faible nombre de rats dans ce groupe (n=4). Lors de chaque expérimentation, différents organes ont été prélevés et pesés. Les masses du foie, du tissu adipeux blanc (épididymal plus rétropéritonéal), ainsi que la masse musculaire (soléaire, plantaris et EDL) sont évaluées et exprimées par 100g de masse corporelle (tableau III.3).

Une augmentation significative de la masse du tissu adipeux blanc est observée chez les groupes de rats coco et beurre (+58% et +67%, $p < 0,005$) en comparaison aux rats contrôles. Les régimes enrichis en lipides entraînent donc une augmentation de la masse des tissus de stockage des lipides chez les rats coco et beurre. Parallèlement à cela les deux groupes de rats, coco et beurre, présentent une diminution de leur masse musculaire, qui est représentée dans notre étude par la somme du muscle soléaire, du plantaire et de l'EDL de chaque patte postérieure. Cette masse musculaire est significativement diminuée chez les rats coco ($p < 0,001$), et cette diminution est due principalement à la diminution des masses du soléaire et de l'EDL. Une tendance à la diminution de la masse musculaire est également observée chez les rats beurre mais de manière non significative, certainement du fait du faible effectif de ce groupe. Enfin on n'observe aucune variation de la masse du foie dans les trois groupes de rats.

Ces modifications de répartition tissulaire en réponse à une alimentation enrichie en lipides ne sont pas surprenantes et sont en accord avec des études antérieures. En effet, il a été démontré une réaction immédiate des rongeurs en réponse à une alimentation enrichie en lipides, qui se traduit par une augmentation de l'ingestion calorique, de la dépense énergétique et de la répartition tissulaire (Rothwell, Stock et al. 1982 ; Rothwell, Stock et al. 1985 ; Iossa, Lionetti et al. 2003). De nombreuses autres études ont également décrit une augmentation du tissu adipeux blanc de leurs animaux en réponse à un régime supplémenté avec diverses huiles (huile de coco, huile d'olive, huile de Menhaden etc.) (Yaqoob, Sherrington et al. 1995; Bizeau and Hazel 1999; Iossa, Lionetti et al. 1999). Cette augmentation du stockage des lipides a été associée à une augmentation des capacités d'exportation des lipides hépatiques vers le tissu adipeux. En effet, une étude (Srivastava 1996) menée avec des rongeurs nourris avec un régime contenant 20% d'huile de coco montre une augmentation des VLDL et des LDL de 15–17% chez le rat et de 44% chez la souris, cela est accompagné par une augmentation des apo E et B au niveau plasmatique. Les capacités d'exportation des rats de cette étude seront mesurées et discutées plus loin dans le manuscrit.

L'augmentation de la dépense énergétique en réponse à un régime enrichi en lipides, ou de type « cafétéria », a été largement étudiée par l'équipe de Rothwell (Rothwell and Stock 1979; Rothwell and Stock 1979; Rothwell and Stock 1982; Rothwell and Stock 1983; Rothwell and Stock 1985; Rothwell, Stock et al. 1985). Les auteurs ont ainsi démontré que des animaux recevant ce type de nourriture montrent une réponse thermogène accrue, une augmentation de la masse du tissu adipeux brun (TAB) et de son contenu en protéines, notamment en UCP1 (Rothwell, Stock et

al. 1985) en comparaison à des animaux contrôles (Yaqoob, Sherrington et al. 1995; Bizeau and Hazel 1999; Iossa, Lionetti et al. 1999). Les mammifères possèdent un tissu thermogène spécifique, le TAB, qui est caractérisé par une grande quantité de mitochondries et de protéine découplante (UCP1) et qui par un mécanisme de découplage va permettre de dissiper l'excès d'énergie sous forme de chaleur (Cannon and Nedergaard 2004). Le TAB est sous le contrôle du système nerveux sympathique via des neurones adrénergiques ((Himms-Hagen 1990). La consommation d'un simple repas stimule l'activité sympathique du TAB, provoquant ainsi une réponse thermogénique (Glick, Teague et al. 1981). C'est ce qui est appelé la « diet-induced thermogenesis » ou thermogénèse induite par l'alimentation. De plus, il a été montré qu'une activation chronique du système nerveux sympathique, par un régime de type cafétéria de longue durée, provoque une hypertrophie du TAB et une augmentation de la réponse thermogène, cela dans un but de protection contre l'obésité (Rothwell and Stock 1979 ; Brooks, Rothwell et al. 1980 ; Glick, Teague et al. 1981 ; Richard, Boily et al. 1988). Les variations d'expression de la protéine UCP1 dans les rats coco et beurre seront discutées plus loin dans ce manuscrit.

Malgré une masse corporelle identique, les rats soumis à un régime alimentaire enrichi en lipides présentent une modification de la répartition des masses de leurs tissus. En effet, on observe une augmentation de la masse des tissus de stockage, comme le tissu adipeux blanc, et des tissus de « dissipation d'énergie », comme le tissu adipeux brun, ainsi qu'une diminution des masses musculaires. La masse du foie reste inchangée.

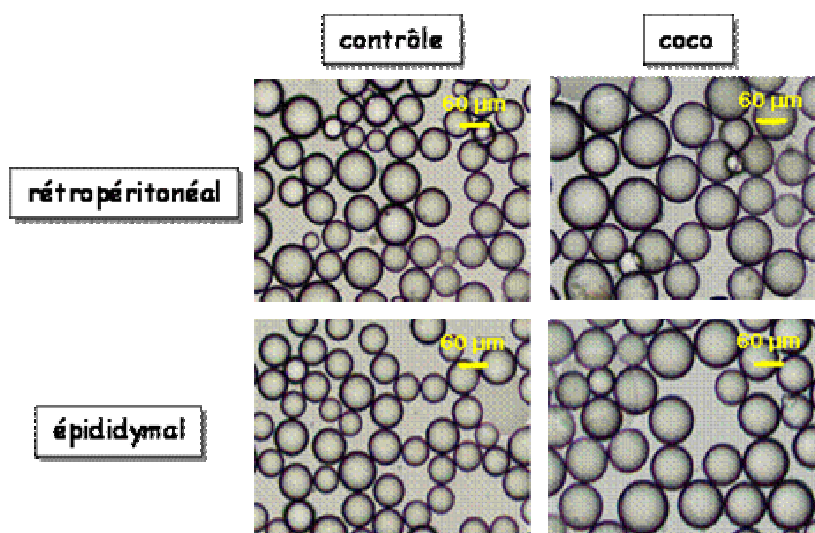
7. Etude sur adipocyte isolés

7.1. Morphologie

En général, lorsqu'une masse adipeuse est augmentée en raison d'une accumulation de lipides, cela est dû soit à une augmentation du nombre de cellule (hyperplasie) soit à une augmentation de la taille des cellules (hypertrophie), soit les deux. Nous avons voulu savoir si l'augmentation de tissu adipeux observée suite au régime coco était due, au moins, à l'un de ces phénomènes. Des adipocytes ont été isolés à partir des tissus adipeux rétropéritonéal et épидидymal des rats contrôles et coco. Ces cellules ont ensuite été observées au microscope optique afin de pouvoir mesurer leur diamètre et calculer leur volume (tableau III.4). Les adipocytes des tissus épидидymal et rétropéritonéal des rats contrôles présentent un diamètre quasi identique. Par contre, il apparaît, suite au régime coco, que ce diamètre est largement augmenté, +28% pour le tissu épидидymal et +30% pour le rétropéritonéal. De ce fait les adipocytes des rats coco ont un volume supérieur aux rats contrôles (tableau III.4), +112% dans le tissu adipeux

épididymal et +113% dans le rétropéritonéal, indiquant une augmentation du stockage de lipides sous forme de triglycérides au sein de ces tissus. Le régime supplémenté en beurre n'ayant pas été réitéré lors de cette expérimentation, les mesures de diamètre et de volume n'ont pas été réalisées sur les rats du groupe beurre.

Figure III.3: Détermination de la taille des adipocytes de tissu adipeux épididymal et rétropéritonéal de rats soumis à un régime enrichi en lipides (coco) pendant 14 semaines.



	Diamètre (µm)			Volume (mm ³)		
	contrôle	coco		contrôle	coco	
rétropéritonéal	78 ± 4	102 ± 2	*	252 ± 39	538 ± 31	*
épididymal	71 ± 3	91 ± 6	*	190 ± 22	403 ± 73	*

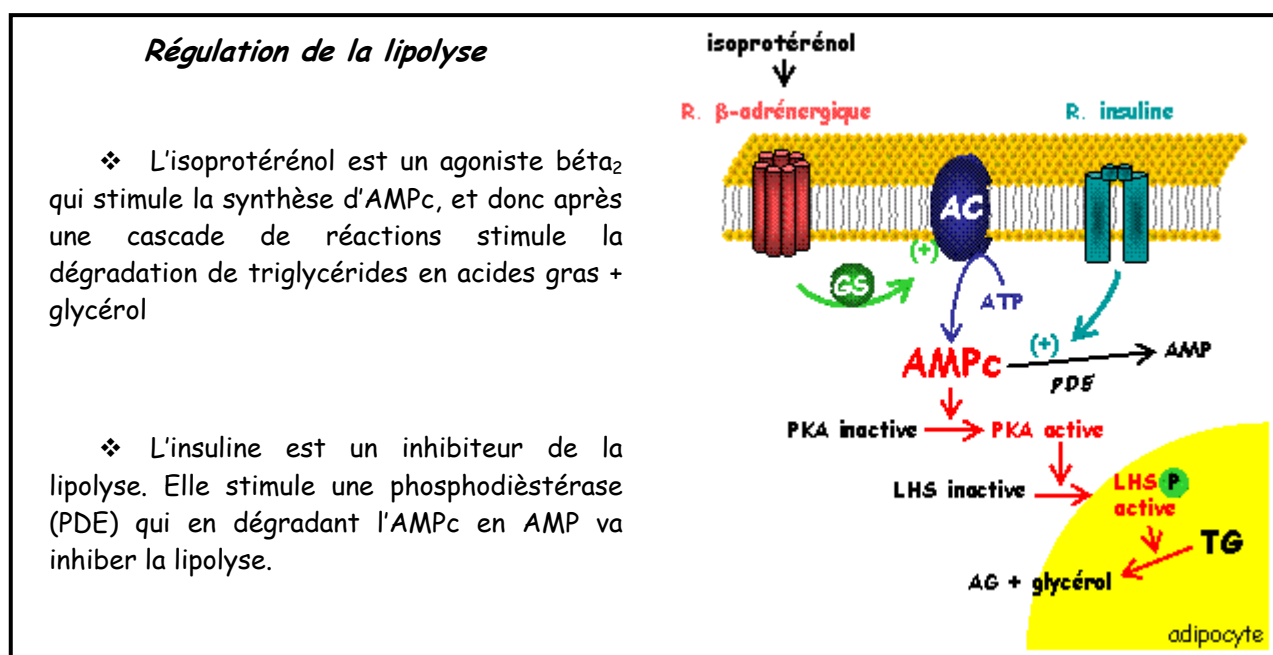
Le diamètre des cellules des groupes contrôles et coco est mesuré sous microscope à l'aide d'un micromètre intégré, permettant ainsi le calcul du volume de chaque adipocyte. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM, n=3. Les comparaisons (p<0,05) sont réalisées par un test t de Student. * vs. contrôle.

Il ressort de cette étude que l'augmentation du tissu adipeux blanc des rats recevant un régime enrichi en huile de coco est due, au moins en partie, à une hypertrophie des adipocytes. Cela est en accord avec une étude menée sur trois espèces différentes, et qui a montré qu'une augmentation du tissu adipeux épididymal est due à une hypertrophie chez le rat et le hamster, contrairement au cochon d'Inde (Di Girolamo and Mendlinger 1971). Plus récemment, ces mêmes auteurs ont réalisé une étude dans laquelle elle a déterminé la proportion d'hyperplasie et d'hypertrophie impliquées dans le développement de quatre tissus adipeux différents au cours du temps (Di Girolamo, Fine et al. 1998). Il apparaît que chez un rat contrôle de masse moyenne de

489g, le tissu adipeux blanc représente 5,6% de cette masse, répartie entre les tissus mésentérique (15,3%), épididymal (30,3%), rétropéritonéal (23,3%) et inguinal sous-cutané (31,1%). Or si l'on considère les deux tissus qui nous intéressent dans notre étude, il ressort de cette étude que la « croissance » du tissu adipeux épididymal est la conséquence à 65% d'une hypertrophie et à 35% d'une hyperplasie, alors que la répartition est de 42% vs 58% respectivement pour le tissu adipeux rétropéritonéal. Ces deux études confirment bien la capacité de stockage de lipides, en augmentant la taille de leur adipocytes, des tissus adipeux épididymal et rétropéritonéal.

7.2. Lipolyse

Si le tissu adipeux « viscéral » a la capacité d'augmenter le volume de ses cellules et donc de stocker les lipides sous forme de TG, on peut se poser la question de sa capacité à mobiliser et hydrolyser ces même TG. Une expérience préliminaire, sur quelques rats des groupes coco et contrôle, a été réalisée afin d'évaluer la lipolyse des deux types de tissus adipeux blancs : le rétropéritonéal et l'épididymal, ainsi que leur sensibilité à l'insuline. Les adipocytes des rats des groupes contrôle et coco sont isolés et incubés avec de l'isoprotérénol (10^{-7} M), un agoniste β , en présence ou non d'insuline (20 μ U/mL ou 100 μ U/mL). Un premier prélèvement est effectué (t=0) puis un deuxième après 30 min d'incubation (t=30). La production de glycérol pendant les 30 minutes, reflétant la lipolyse, est mesurée dans chaque condition. Les résultats sont présentés figure III.3.

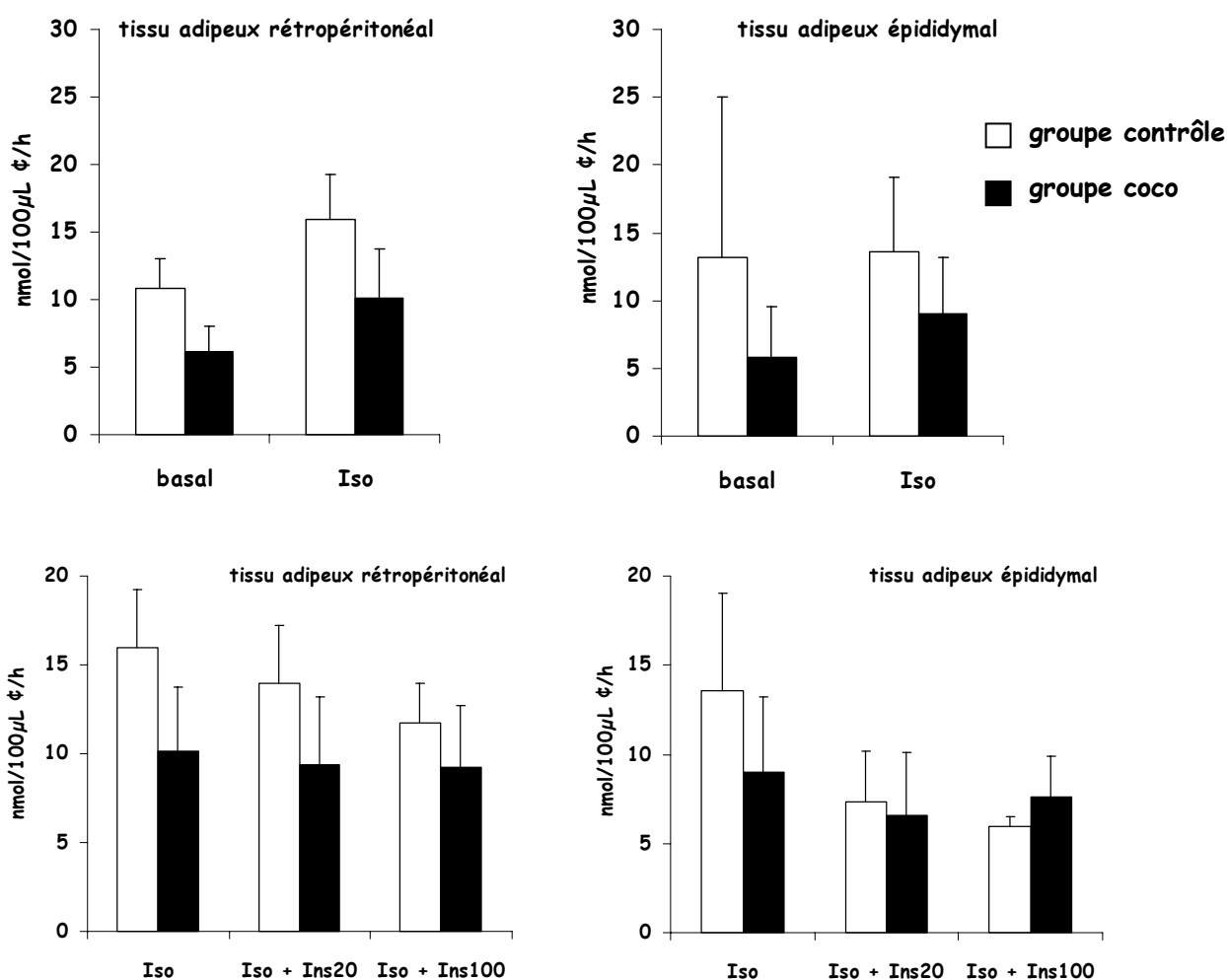


On observe, chez les rats contrôles, une stimulation de la lipolyse par l'ajout d'isoprotérénol (10^{-7} M) au niveau du tissu adipeux rétropéritonéal (+45%) par rapport à la lipolyse basale (figure

III.3). Au niveau du tissu adipeux épидидymal, la stimulation observée en présence de l'agoniste bêta est beaucoup plus faible (7%). Cependant, il faut noter que la lipolyse basale présente un niveau haut, ainsi qu'une très forte dispersion des valeurs. L'absence de stimulation observée est donc peut être due à une lipolyse basale trop élevée. Une autre possibilité serait que le tissu adipeux épидидymal requière une dose d'isoprotérénol supérieure pour observer les mêmes effets que sur le tissu rétro-péritonéal.

Sur les adipocytes de rats coco, bien que les résultats soient non significatifs en raison du faible nombre d'animaux, on observe une lipolyse basale inférieure à celle des rats contrôles, quel que soit le tissu (rétro : 11 ± 2 vs 6 ± 2 et épi 13 ± 12 vs 6 ± 4 nmol/100 μ L ϕ /h). L'incubation des adipocytes en présence d'isoprotérénol induit également une stimulation de la lipolyse, tant au niveau du tissu adipeux rétro-péritonéal (+66%) que du tissu adipeux épидидymal (+50%).

Figure III.4: Effet d'un régime enrichi en lipides (huile de coco) sur la lipolyse d'adipocytes en présence d'isoprotérénol plus ou moins insuline.



Les adipocytes de rats contrôle ou coco sont incubés en présence de 10^{-7} M d'isoprotérénol (iso) $\pm$ 20 μ U/ml ou 100 μ U/ml d'insuline (Ins20, Ins100). La production de glycérol est déterminée au terme des 30 min d'incubation. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM. n=3-4.

L'effet de l'insuline sur la lipolyse est ensuite mesuré sur des adipocytes contrôles. Deux doses d'insuline ont été testées (20µU/ml ou 100µU/ml) sur les adipocytes incubés en présence d'isoprotérénol (figure III.3). L'incubation des adipocytes contrôles avec la première dose d'insuline (Ins20) induit une inhibition de 13% sur le tissu adipeux rétro-péritonéal et de 50% sur le tissu épидидymal par rapport à la lipolyse en présence d'isoprotérénol. Cette inhibition de la lipolyse est d'autant plus importante que l'on augmente la dose d'insuline (Ins100) avec 25% et 57% d'inhibition respectivement.

L'incubation d'adipocytes de rats coco avec de l'insuline (Ins20) induit une inhibition de la lipolyse de 10% sur tissu adipeux rétro-péritonéal et de 22% sur épидидymal (figure III.3). L'action de l'insuline sur le tissu rétro-péritonéal est identique entre les adipocytes coco et contrôles, par contre celle-ci est 2 fois plus faible sur le tissu épидидymal par rapport au tissu contrôle (-22% vs -50%). De plus, on observe dans les adipocytes coco que, même en augmentant la dose d'insuline (Ins100), l'inhibition de la lipolyse n'augmente quasiment pas et reste de 10% sur le tissu rétro-péritonéal et de 11% sur l'épididymal. Il semble que, dès la première dose d'insuline, nous ayons atteint une inhibition maximale de la lipolyse chez les rats coco.

Il ressort de cette expérience préliminaire plusieurs constats. Tout d'abord, il semblerait que la sensibilité à l'insuline soit différente entre le tissu adipeux épидидymal et rétro-péritonéal. Cela s'observe dans les deux groupes de rats. Deuxièmement, les adipocytes de rat coco semblent présenter une sensibilité moindre à l'isoprotérénol et à l'insuline en comparaison aux adipocytes contrôles. Cela pourrait s'expliquer par une diminution de la quantité, ou de l'affinité des récepteurs β -adrénergiques et des récepteurs à l'insuline. En effet, de récentes études ont démontré une modulation de l'expression et de la fonction des récepteurs adrénergiques du tissu adipeux blanc chez des souris obèses *ob/ob* ou chez des souris ou des rats, recevant un régime « high fat » (Collins, Daniel et al. 1994 ; Llado, Rodriguez-Cuenca et al. 2002). De même, il a été montré, chez l'homme et sur l'animal obèses, que la diminution de la sensibilité à l'insuline observée sur tissu adipeux, était associée à une diminution du nombre de récepteurs (Kahn, Neville et al. 1973 ; Olefsky 1976 ; Alemzadeh, Jacobs et al. 1996). Il semble donc que les rats coco, tout en conservant une masse totale identique aux contrôles, présentent un tissu adipeux blanc « viscéral » avec des caractéristiques d'obèses, dont la mise en place d'une insulino-résistance. Il faut tout de même rappeler que ces résultats ne sont que des expériences préliminaires réalisées sur très peu de rats. Cela explique aussi les forts SEM et la non significativité des résultats. D'autres expériences de ce type avec plus d'effectif, doivent donc être réalisées pour confirmer ou infirmer ces résultats.

Les résultats préliminaires de la mesure de la lipolyse du tissu adipeux « viscéral » des rats coco semblent montrer une diminution de celle-ci en comparaison à des rats contrôles. De plus,

cela semble être accompagné par une insulino-résistance des adipocytes de ce groupe. Le tissu adipeux « viscéral » des rats coco semble donc présenter les caractéristiques typiques du tissu adipeux d'obèses.

8. Profil plasmatique

Au vu de la modification de répartition des masses grasses induite par le régime enrichi en lipides, nous avons voulu établir le profil plasmatique des rats. Les mesures ont été effectuées à l'état nourri ou après 24h de jeûne. Or, il apparaît que les rats contrôles maintiennent leur glycémie et leurs concentrations plasmatiques d'acides gras non estérifiés (AGNE) et de triglycérides (TG) au même niveau quel que soit le statut nutritionnel. Ce résultat est étonnant, on s'attendait à une diminution de la glycémie après 24h de jeûne. Le manque de différence de glycémie entre les statuts nutritionnels pourrait être dû au moyen de sacrifice des animaux. En effet, pour des raisons expérimentales, les animaux à jeun sont anesthésiés avec du thiopental sodique au moment du sacrifice, alors que ceux nourris ne le sont pas. Or il a été démontré un effet hyperglycémiant de certains anesthésiques de la famille des barbituriques, comme le pentobarbital (Penicaud, Ferre et al. 1987), famille à laquelle appartient le thiopental. Ce facteur pourrait expliquer le fait que les rats contrôles aient une glycémie identique dans les deux conditions nutritionnelles. Les rats coco ont une glycémie similaire aux rats contrôles (nourri et à jeun).

Tableau III.4: Variables plasmatiques des rats soumis à un régime enrichi en huile de coco pendant 14 semaines

	contrôle		coco	
	à jeun	nourri	à jeun	nourri
glycémie (mmol/L)	7,4 ± 0,9	8,1 ± 1	9,0 ± 0,3	8,3 ± 0,5
AGNE (mmol/L)	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,9 ± 0,1 *	0,8 ± 0,1 *
TG plasm (mmol/L)	1,0 ± 0,1	1,6 ± 0,2	1,4 ± 0,1	2,4 ± 0,1 *£

AGNE : acide gras non estérifié, TG : triglycéride nd : non déterminé.

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM, n=4-5. * Significativement différent des contrôles; £: à jeun vs nourri (p<0,05).

Le profil lipidique plasmatique des rats contrôles est également surprenant entre l'état nourri et à jeun. En effet, les concentrations en AGNE et en TG sont identiques dans ces deux conditions (tableau III.4). Pourtant, il est classiquement observé une augmentation des AGNE et

une diminution des TG lors du jeûne (Letexier 2004). Cela est dû à une stimulation de la lipolyse adipocytaire et à une diminution de la lipogenèse hépatique, afin de fournir des substrats aux différents tissus. A la vue de ces résultats on peut donc se poser la question de la validité des ceux-ci. La raison pourrait être la non intégrité du plasma. En effet, on peut supposer que les congélations/décongélations successives des échantillons pourraient provoquer la dégradation des TG, faussant ainsi les résultats. Les mesures obtenues sur plasma de rats coco ayant été réalisées en même temps que celles des rats contrôles, la validité de celles-ci est donc également discutable.

Cependant, si on se base sur les résultats préliminaires de la lipolyse, on aurait pu s'attendre à observer à un taux d'AGNE supérieur et de TG inférieur aux contrôles en raison de l'insulinorésistance du tissu adipeux, ce qui correspond au profil plasmatique classiquement observé chez des animaux obèses. Des dosages à partir de plasma frais seraient tout de même nécessaires afin de vérifier cela.

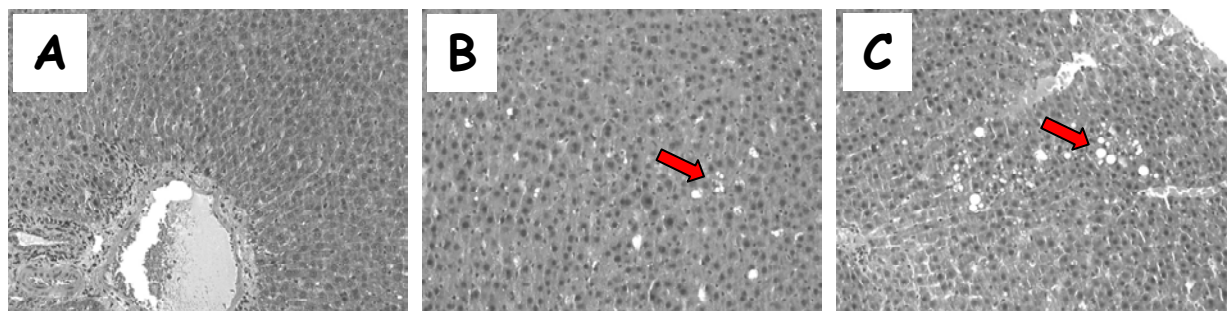
9. Etude hépatique

9.1 Analyse histologique et triglycérides hépatiques

Lors de chaque expérience des petits morceaux de foie sont prélevés pour être congelés à -80°C ou fixés dans du formol à 4%. Une analyse histologique est réalisée afin de mettre en évidence la présence de stéatose et de fibrose sur les foies des différents groupes de rats (figure III.5) afin de vérifier si les régimes hyperlipidiques induisent ou non une NASH.

Le seuil inférieur de présence de stéatose a été fixé à 5% des hépatocytes touchés. Quelques gouttelettes lipidiques sont observables chez les groupes coco et beurre (indiquées par les flèches rouges sur la figure III.5), mais dans des proportions largement inférieure à 5%. Après analyse histologique, il apparaît qu'aucun des trois groupes ne présentent de stéatose hépatique. De plus, aucune inflammation ni fibrose ne sont observées dans les groupes étudiés.

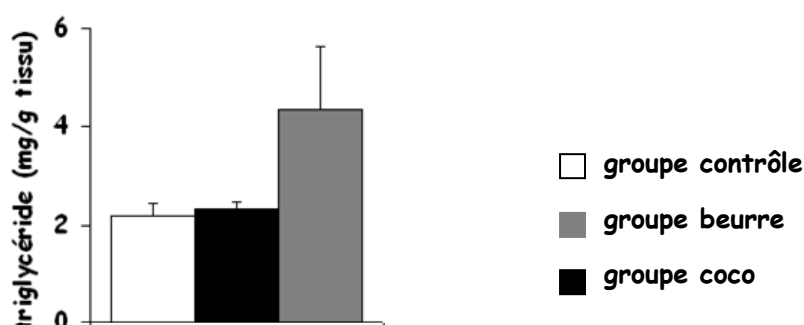
Figure III.5: Analyse histologique de coupe de foie des rats soumis à un régime enrichi en lipides (coco ou beurre) pendant 14 semaines



Après fixation dans du formol, les coupes de foie de rats contrôles (A), coco (B) et beurre (C) sont colorées avec de l'hématoxyline & éosine ainsi que la réticuline et observées à un grossissement de 10X. Les flèches rouges indiquent la présence de microvésicules lipidiques. n=10 pour les groupes contrôle et coco, et n=4 pour le groupe beurre.

Les observations histologiques sont confirmées par un dosage hépatique de triglycérides (figure III.6). Les rats nourris avec un régime enrichi en lipides ne présentent aucune modification significative du contenu en TG hépatiques par comparaison aux rats contrôles. On peut noter tout de même une tendance à une augmentation du contenu en TG chez le groupe beurre, mais de manière non significative.

Figure III.6: Evolution du contenu en triglycérides hépatique des rats soumis à un régime enrichi en lipides (coco ou beurre) pendant 14 semaines.



Le contenu en TG hépatique est mesuré chez les groupes contrôle, coco et beurre. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM, n=10 pour le groupe contrôle et le groupe coco, n=4 pour le groupe beurre. Les comparaisons ($p < 0,05$) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher. * vs. contrôle.

Malgré une ingestion de lipides (kcal tot) très augmentée au terme des 14 semaines de régime enrichi en huile de coco ou en beurre (+143% et +30% respectivement), les rats de ces deux groupes ne développent pas de stéatose hépatique ni de NASH. La question se pose donc

du devenir des lipides ingérés, puisque ceux-ci ne sont pas stockés au niveau du foie. Plusieurs hypothèses peuvent être proposées afin d'expliquer cela. Tout d'abord, si les lipides ne sont pas stockés au niveau du foie, ils sont peut être exportés et stockés au sein d'un autre tissu. Cette hypothèse est renforcée par l'observation d'une augmentation du tissu adipeux blanc chez les rats coco (+58%) et beurre (+67%). Une deuxième hypothèse peut également être proposée pour expliquer l'absence de stéatose. Si les lipides ne sont pas stockés, ils pourraient être utilisés et oxydés de manière accrue au niveau du foie.

9.2 Respiration mitochondriale

Les rats recevant un régime enrichi en lipides ne développent pas de stéatose hépatique malgré une ingestion lipidique largement augmentée par rapport aux rats contrôles. L'hypothèse d'une oxydation lipidique accrue au niveau hépatique est donc proposée. Nous avons dans un premier temps étudié les conséquences des régimes beurre et coco sur l'oxydation phosphorylante des mitochondries hépatiques de nos trois groupes de rats.

Les paramètres de l'oxydation phosphorylante des mitochondries isolées de foie des trois groupes de rats sont présentés dans le tableau III.5. L'osmolarité du milieu dans lequel se trouvent les mitochondries *in situ* étant maintenu par du potassium, les mesures ont été réalisées dans un milieu KCl. De même, pour se rapprocher des conditions physiologiques, nos mesures ont été réalisées à 37°C. Les substrats respiratoires utilisés sont le succinate/malate, producteur de FADH₂, et le glutamate/malate qui produit majoritairement du NADH.

Tout d'abord, on observe chez le groupe de mitochondries contrôles que la respiration est supérieure en absence de BSA pour un même substrat. Les acides gras sont considérés comme un découplant naturel de l'oxydation phosphorylante. En effet, il a été démontré que l'ajout d'acides gras sur des mitochondries provoque un léger découplage (Polcic, Sabova et al. 1997; Korshunov, Korkina et al. 1998 ; Samartsev, Simonyan et al. 2000; Popova, Bodrova et al. 2004; Di Paola and Lorusso 2006). De plus, les acides gras présents dans le milieu peuvent également être utilisés comme substrats par les mitochondries, augmentant d'autant leur fourniture en équivalents réduits, induisant ainsi une stimulation de la respiration à l'état 3. Afin de pallier à cela, de la BSA-FFA (0,3% final) est ajoutée afin de chélater les lipides.

Dans nos expérimentations le succinate et le glutamate sont additionnés de malate. Celui-ci fixe la concentration d'oxaloacétate, évitant ainsi l'accumulation d' α -cétoglutarate, métabolite qui inhibe la respiration cellulaire en inhibant la succinate déshydrogénase. On plus, on observe dans le groupe contrôle que la respiration est supérieure en présence de succinate/malate, qu'en présence de glutamate/malate. Cela s'explique par le fait que le glutamate fournit du NADH qui est oxydé au niveau du complexe I, tandis que le succinate fournit du FADH₂ qui entre au niveau du complexe II, court-circuitant ainsi le complexe I. De ce fait, en comparaison à l'utilisation du NADH,

le nombre de protons expulsés lorsque la chaîne respiratoire oxyde du FADH₂ est plus faible pour une même quantité d'oxygène consommé. De manière simplifiée, la mitochondrie doit respirer plus vite avec du succinate, pour maintenir un même gradient de protons qu'avec du glutamate.

Tableau III.5: Effet d'un régime enrichi en lipides (huile de coco ou beurre) sur la respiration mitochondrial en présence de succinate/malate ou glutamate/malate $\pm$ BSA.

JO_2 (natomO/min/mg prot) avec succ/mal						
	- BSA			+ BSA		
	état non	état 4	état 3	état non	état 4	état 3
	phosphorylant	oligo		phosphorylant	oligo	
contrôle	43 $\pm$ 2	37 $\pm$ 1	168 $\pm$ 9	32 $\pm$ 2	24 $\pm$ 1	155 $\pm$ 10
coco	42 $\pm$ 2	36 $\pm$ 1	157 $\pm$ 9	33 $\pm$ 2	26 $\pm$ 2 £	170 $\pm$ 6
beurre	nd	nd	nd	27 $\pm$ 1	19 $\pm$ 1	157 $\pm$ 14

JO_2 (natomO/min/mg prot) avec glut/mal						
	- BSA			+ BSA		
	état non	état 4	état 3	état non	état 4	état 3
	phosphorylant	oligo		phosphorylant	oligo	
contrôle	23 $\pm$ 1	18 $\pm$ 1	129 $\pm$ 6	16 $\pm$ 1	13 $\pm$ 1	113 $\pm$ 12
coco	24 $\pm$ 1	19 $\pm$ 1	129 $\pm$ 5	20 $\pm$ 2 £	19 $\pm$ 3 £	112 $\pm$ 8
beurre	nd	nd	nd	12 $\pm$ 1	7 $\pm$ 1	124 $\pm$ 12

Les mitochondries de foie de rats (1 à 2 mg/ml) contrôle, beurre ou coco ont été incubées dans un milieu KCl avec 5/0,5 mM de succ/mal plus 1,25 μ M roténone $\pm$ BSA (0,3%) ou 5/1,25 mM de glut/mal $\pm$ BSA (0,3%). La consommation d'oxygène est mesurée grâce à une électrode de Clarck. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM. Les comparaisons ($p < 0,05$) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher : ★: différent du contrôle ; £ : coco *vs* beurre.

Comme attendu, en présence de BSA, les respirations des mitochondries des trois groupes de rats sont nettement plus faibles, nous confirmant ainsi la présence d'acides gras dans le milieu d'incubation. Les valeurs de respiration obtenues pour les mitochondries de foie de rats contrôles correspondent aux valeurs classiquement retrouvées dans la littérature (Piquet 1999; Nogueira 2001), avec stimulation de la consommation d'oxygène par l'ajout d'ADP et retour à un niveau proche de l'état non phosphorylant en présence d'oligomycine (état 4) (tableau III.5).

Lorsque l'on compare les respirations, en état non phosphorylant et quelque soit le substrat, des mitochondries de rats coco OU beurre aux mitochondries de rats contrôles, aucune

différence de consommation d'oxygène n'apparaît entre ces trois groupes. L'addition d'ADP (état 3, respiration couplée à la synthèse d'ATP), provoque également une stimulation de la respiration chez ces deux groupes. Cependant, aucune différence de respiration n'apparaît entre les trois groupes de mitochondries. L'ajout d'oligomycine (état 4), qui est un inhibiteur de l'ATP synthase, bloque le retour des protons dans la matrice via l'ATPase. La consommation d'oxygène mesurée dans cette condition reflète donc les pertes énergétiques dues, entre autre, à des fuites de protons à travers la membrane interne mitochondriale. Or, dans cette condition non plus, aucune différence n'apparaît entre les groupes coco OU beurre et le groupe contrôle. On remarque tout de même quelques différences entre les mitochondries de rats coco ET beurre, notamment dans les « conditions non couplées », c'est-à-dire en état non phosphorylant ou en état 4. En effet on remarque que les mitochondries de rats coco ont une consommation d'oxygène significativement supérieure, ou presque, à celle des mitochondries de rats du groupe beurre dans ces deux conditions (tableau III.5) et avec les deux substrats. Il apparaît donc, que lorsque l'on compare ces deux groupes de mitochondries, celles provenant des rats coco semblent être plus « découplées » que celles provenant des rats beurre, puisque que leur consommation d'oxygène est supérieure. Cependant ces différences ne semblent pas majeures, puisqu'elle n'apparaissent pas en comparaison des mitochondries contrôles.

Les régimes alimentaires enrichis en lipides (beurre ou huile de coco) n'induisent aucune modification des paramètres de l'oxydation phosphorylante des mitochondries de foie. Il n'apparaît donc ici aucune modification d'oxydation des substrats au niveau du foie des deux groupes de rats ayant reçus un régime hyperlipidique. Ces résultats infirment donc notre première hypothèse (augmentation de l'oxydation des lipides au niveau du foie permettant d'éviter tout stockage) et n'expliquent en aucun cas l'absence de stéatose hépatique malgré une forte augmentation de l'ingestion lipidiques des rats coco et beurre.

9.3 Respiration cellulaire

,L'utilisation de mitochondries isolées nous situe dans un contexte qui n'est pas physiologique. De plus, nous ne pouvons pas exclure la survenue d'un problème lors de l'isolation, qui toucherait l'intégrité des mitochondries et donc la fiabilité des résultats obtenus, même si cela paraît peu probable. Pour palier ce problème, nous avons mesuré la consommation d'oxygène au niveau de la cellule entière : l'hépatocyte. Nous avons étudié la respiration des hépatocytes des trois groupes de rats, en absence et en présence d'oligomycine. L'étude a été réalisée en condition endogène (sans ajout de substrat) ou après addition d'acides gras. Les résultats sont présentés dans le tableau III.6. Nous avons utilisé deux types d'acides gras, l'un à chaîne longue (l'oléate ; 18 carbones) et l'autre à chaîne moyenne (l'octanoate ; 8 carbones). L'oléate est activé

en acyl-CoA dans le cytosol et pénètre dans la mitochondrie par le système de la carnitine transférase (CPT), où il sera métabolisé via la β -oxydation. Au contraire, l'octanoate entre directement dans la mitochondrie sans nécessiter de transporteur.

En condition endogène, c'est-à-dire sans ajout de substrat, la consommation d'oxygène est identique entre les trois groupes de rats (tableau III.6). L'addition d'oligomycine inhibe la respiration de 30 à 45% suivant le groupe, nous indiquant ainsi la part de la respiration couplée à la synthèse d'ATP. On observe que la respiration oligomycine insensible reste identique entre les trois groupes de rats.

Tableau III.6: Effet d'un régime enrichi en lipides (huile de coco ou beurre) sur la respiration hépatocytaire

	$\mathcal{JO}_2$ ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gps}$)		
	contrôle	beurre	coco
endogène	11 $\pm$ 1	11 $\pm$ 6	10 $\pm$ 1
+ oligomycine	7 $\pm$ 1	6 $\pm$ 1	7 $\pm$ 1
oléate	15 $\pm$ 1	14 $\pm$ 6	15 $\pm$ 1
+ oligomycine	8 $\pm$ 1	7 $\pm$ 1	8 $\pm$ 1
octanoate	21 $\pm$ 1	18 $\pm$ 6	20 $\pm$ 1
+ oligomycine	9 $\pm$ 1	8 $\pm$ 1	9 $\pm$ 1

Les hépatocytes ont été isolés de rats contrôles, beurre et coco, à jeun depuis 24 heures. Les cellules sont incubées en pots fermés à 37°C sous atmosphère oxygénée O_2/CO_2 (19/1). Le milieu contient 2% d'albumine et la respiration a été mesurée avec une électrode de Clark, avec ou sans substrats et oligomycine (6,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Les résultats sont exprimés en μmol d' O_2/g poids sec/min et en moyenne $\pm$ SEM. $n=10$ sauf pour le groupe beurre $n=4$. Les comparaisons ($p<0,05$) sont réalisées avec une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher

L'addition d'acides gras (octanoate ou oléate) stimule la respiration hépatocytaire, quelque soit le groupe de rats étudié, mais sans différence significative. Cette stimulation est due à une augmentation de la disponibilité en NADH et FADH_2 pour la chaîne respiratoire (Nobes, Hay et al. 1990). Cet effet des acides gras sur la respiration cellulaire est classiquement décrit dans la littérature (Brown, Lakin-Thomas et al. 1990). L'addition d'acides gras induit non seulement une stimulation de la respiration, mais aussi une augmentation du potentiel de membrane mitochondrial mesuré *in situ* sur hépatocytes isolés. Ceci indique que l'augmentation de la fourniture en substrats a plus d'effet que la stimulation de processus consommateur de la force protonmotrice. Brown et al. ont démontré le rôle prépondérant du rapport NADH/NAD^+ dans le

contrôle exercé sur la respiration cellulaire (Brown, Lakin-Thomas et al. 1990). En effet, l'augmentation de ce rapport, comme lors de l'oxydation d'acide gras, stimule la respiration et inversement.

On constate également que la stimulation de la respiration des hépatocytes est plus importante avec octanoate (X2) qu'avec oléate (X1,4), ce qui est également classiquement décrit en raison de leur mécanisme d'entrée différent dans la mitochondrie. L'ajout d'oligomycine sur les hépatocytes incubés en présence d'acides gras induit également une inhibition de la consommation d'oxygène ($\approx 55\%$ avec octanoate et $\approx 48\%$ avec oléate).

Afin de comprendre pourquoi l'ingestion des régimes enrichis en lipides (beurre ou coco) ne provoque aucune stéatose ou NASH, nous avons étudié les capacités d'oxydation lipidique des cellules hépatocytaires des trois groupes de rats. En effet, une augmentation de l'oxydation des lipides au niveau cellulaire aurait pu expliquer, en partie, l'absence de stockage de lipides au niveau hépatique. Cependant, la mesure de la consommation d'oxygène des hépatocytes de rats coco ou beurre, en présence d'octanoate ou d'oléate, ne présente aucune différence en comparaison aux hépatocytes contrôles.

On sait que l'oxydation des lipides, qui a lieu au niveau mitochondrial, peut être complète, fournissant ainsi une grande quantité d'équivalents réduits et stimuler la respiration, et/ou partielle, induisant la synthèse de corps cétoniques (3-hydroxybutyrate et acétoacétate). Ainsi une re-orientation du métabolisme lipidique vers une oxydation partielle des lipides, amenant à la formation de corps cétoniques dans les hépatocytes de rats soumis à un régime enrichi en lipides est envisagée..

9.4 Métabolisme d'hépatocytes isolés

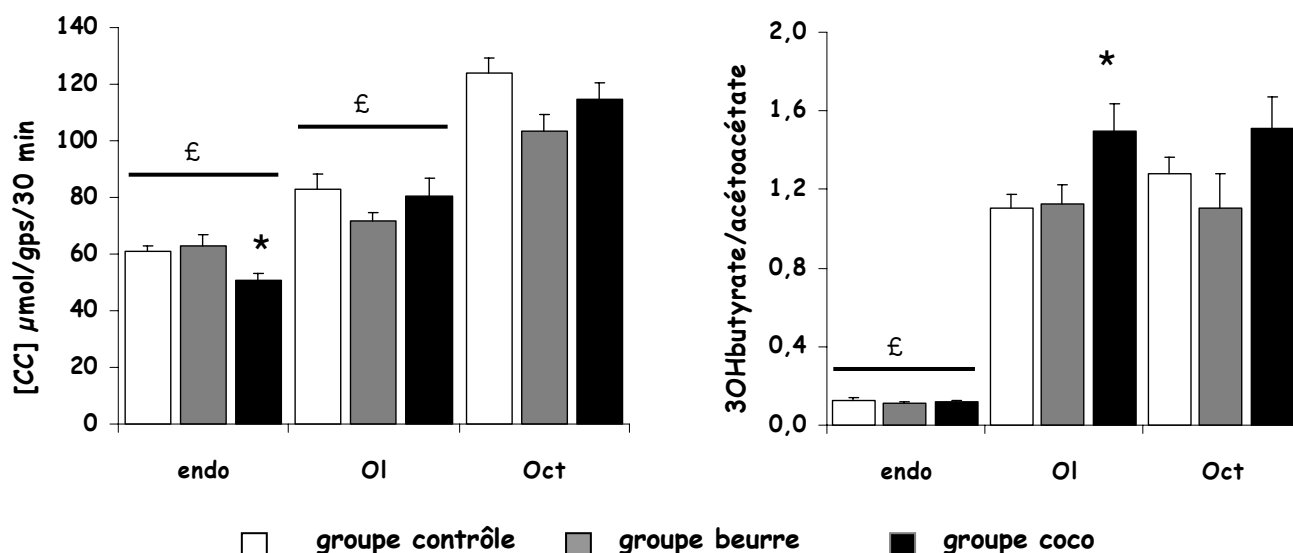
N'ayant pas mis en évidence de modification de la respiration cellulaire entre les rats coco et beurre et les rats contrôles, nous avons vérifié si le métabolisme lipidique hépatique était inchangé, ou si cela était dû à une réorientation des acétyl-CoA vers la synthèse de corps cétoniques plutôt que vers le cycle de Krebs. Dans un premier temps, nous avons étudié la cétogenèse hépatique dans les trois groupes de rats.

⇒ Production de corps cétoniques

La première voie métabolique étudiée a été la cétogenèse. Les animaux recevant un régime hyperlipidique ne présentant aucune accumulation de graisse au niveau du foie (stéatose), nous avons supposé que l'oxydation de ces lipides soit augmentée au niveau hépatocytaire. Le métabolisme hépatocytaire des acides gras comporte deux branches : (i) l'estérification qui a lieu dans le cytosol et (ii) la β -oxydation mitochondriale. La β -oxydation aboutit à la formation d'acétyl-CoA qui peut être dirigé soit vers le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire et être complètement

oxydé en CO_2 , soit vers la formation de corps cétoniques (3OHbutyrate + acétoacétate). Comme pour la respiration cellulaire, la cétogenèse a été étudiée en présence d'acides gras à chaîne moyenne (octanoate) ou longue (oléate). Les résultats sont présentés en figure III.7.

Figure III.7: Effet d'un régime enrichi en lipides (huile de coco ou beurre) sur la production de corps cétoniques (3OHbutyrate + acétoacétate) et sur le rapport 3OHbutyrate/acétoacétate.



Les hépatocytes de rats contrôles, beurre ou coco sont incubés en présence de 4 mM d'octanoate ou 2 mM d'oléate. La production de corps cétoniques (CC), est calculée à partir de la production de β -hydroxybutyrate et acétoacétate au terme des 30 min d'incubation. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM. $n=10$ sauf pour le groupe beurre ou $n=4$. Les comparaisons ($p<0,05$) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher : * significativement différent du groupe contrôle. £ significativement différent de l'octanoate.

Comme attendu en condition contrôle, la production de corps cétoniques augmente significativement en présence d'acides gras. En condition basale (sans substrats) la cétogenèse est très faible et ne provient que de la lipolyse des acides gras et de la protéolyse cellulaire des acides aminés cétogènes. La cétogenèse mesurée avec les cellules contrôles, comme la consommation d'oxygène, sont supérieures avec de l'octanoate qu'avec de l'oléate. Cela est le reflet d'une oxydation supérieure de l'octanoate par rapport à l'oléate, due à son entrée directe dans la cellule sans nécessité de transporteur. La β -oxydation produisant des équivalents réduits, l'apport d'acides gras entraîne une augmentation du rapport 3-hydroxybutyrate/acétoacétate, qui est égale à une constante près au rapport NADH/NAD^+ mitochondrial (Williamson, Lund et al. 1967). De ce fait on s'attendait à obtenir un rapport 3-hydroxybutyrate/acétoacétate supérieur en présence d'octanoate par rapport à l'oléate, or ce n'est pas le cas. Des travaux antérieurs ont mesuré un rapport nettement inférieur en présence d'octanoate que d'oléate (Piquet 1999). Ces résultats ont été expliqués par un effet inhibiteur de l'oléate sur la chaîne respiratoire (Wojtczak 1976). Or, dans notre étude, les rapports 3-hydroxybutyrate/acétoacétate sont identiques, que les

cellules soient incubées en présence d'octanoate ou d'oléate. Si on se base sur les travaux de Piquet et al (Piquet 1999), nous obtenons des valeurs quasi identiques pour les conditions endogènes et oléate, par contre, en présence d'octanoate, nous obtenons un rapport 3-hydroxybutyrate/acétoacétate presque 4 fois supérieur. Nos valeurs de respiration sont également similaires, quelque soit le substrat. Nous sommes donc dans une situation où pour une respiration donnée conforme à la littérature, nous avons un rapport 3-hydroxybutyrate/acétoacétate « trop » élevé. Enfin, ce rapport 3-hydroxybutyrate/acétoacétate étant le reflet du rapport NADH/NAD⁺ mitochondrial, on peut émettre l'hypothèse dans ces deux situations, d'un problème au niveau des navettes de transfert des équivalents réduits du cytosol vers la mitochondrie permettant le maintien du potentiel redox de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale.

Il faut quant même préciser que la mesure des rapports 3-hydroxybutyrate/acétoacétate et lactate/pyruvate, qui reflète les rapports NADH/NAD⁺ mitochondrial et cytosolique, sont relativement difficiles à réaliser. De plus, nous avons utilisé un spectrophotomètre, qui présente des limites de détection, pour réaliser ces dosages. L'utilisation d'un fluorimètre, beaucoup plus fiable et précis, serait à envisager pour de prochaines mesures. Les résultats de rapports 3-hydroxybutyrate/acétoacétate et lactate/pyruvate présentés dans cette étude sont donc à prendre avec précaution.

Les résultats obtenus chez les groupes beurre et coco suivent globalement le même profil que pour les rats contrôles, avec un effet stimulateur des acides gras sur la cétogenèse et la respiration, mais aucune différence n'apparaît entre les groupes. À noter cependant, que l'on n'observe pas l'effet stimulateur de l'oléate sur la cétogenèse dans le groupe beurre, et même si cela reste non significatif, on note également une tendance à une consommation d'oxygène plus faible dans ce groupe. On observe également un rapport hydroxybutyrate/acétoacétate significativement plus élevé dans le groupe coco en présence d'oléate.

L'absence de stéatose hépatique chez les rats coco et beurre n'est pas due à une oxydation accrue des lipides, puisque ni la cétogenèse, ni la respiration ne sont modifiées en présence d'octanoate ou d'oléate.

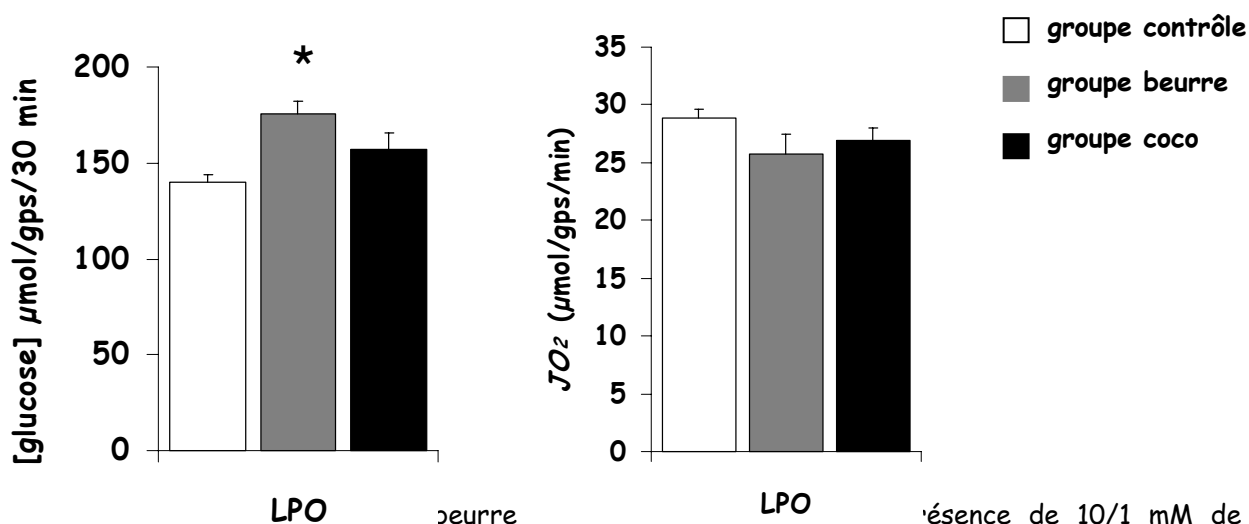
L'ingestion à long terme d'un régime enrichi en lipides peut avoir une influence sur la composition des membranes cellulaires. Or, l'intégrité de ces membranes est un facteur très important dans le maintien du métabolisme cellulaire. On peut donc supposer que l'ingestion, pendant 14 semaines, d'un régime enrichi en lipides ait induit une modification de la composition membranaire chez les rats coco et beurre en comparaison des rats contrôles. Cette modification membranaire pouvant entraîner une perturbation du métabolisme cellulaire, cela pourrait également être impliqué dans l'absence de différence de respiration observée entre les trois

groupes. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons étudié la néoglucogenèse hépatique dans chacun des groupes de rats, celle-ci étant le reflet de l'état énergétique de la cellule et donc de son intégrité et viabilité. Cette voie consomme beaucoup d'énergie (4 ATP et 2 GTP par glucose formé), et est donc très sensible à un déficit énergétique.

⇒ Néoglucogenèse à partir de lactate+pyruvate

Nous avons tout d'abord étudié la néoglucogenèse à partir de lactate+pyruvate. En effet, c'est une voie métabolique physiologique essentielle *in vivo*. Les hépatocytes reçoivent de grandes quantités de lactate provenant à la fois de l'intestin mais également du métabolisme glycolytique d'autres tissus comme les globules rouges et les muscles. Ce lactate sera utilisé comme substrat par le foie ou transformé en glucose pour ensuite être, en fonction des besoins de l'organisme, soit stocké sous forme de glycogène, soit relargué dans la circulation sanguine afin de réalimenter ces tissus en substrats énergétiques. La néoglucogenèse à partir lactate et pyruvate est régulée notamment au niveau du cycle PEP/pyruvate et du cycle des fructoses (Groen, Vervoorn et al. 1983; Groen, van Roermund et al. 1986).

Figure III.8: Effet d'un régime enrichi en lipides (huile de coco ou beurre) sur la production de glucose et sur la respiration cellulaire en présence de lactate+pyruvate+octanoate.



Le LPO beurre LPO présence de 10/1 mM de lactate/pyruvate et 4 mM d'octanoate. La production de glucose est calculée après 30 min d'incubation. La respiration a été mesurée avec une électrode de Clark. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM. n=10 sauf pour le groupe beurre ou n=4. Les comparaisons ($p < 0,05$) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher : * significativement différent du groupe contrôle.

Si le pyruvate peut être un substrat pour la néoglucogenèse hépatique, il peut également pénétrer dans la mitochondrie et être transformé en acétyl-CoA pour alimenter le cycle de Krebs. L'ajout d'acide gras (octanoate) au lactate+pyruvate, permet d'orienter les carbones de ces derniers vers la production de glucose, plutôt que vers l'entrée dans le cycle de Krebs. En effet, les acides gras vont être β -oxydés et fournir de l'acétyl-CoA, de l'ATP et du NADH et ainsi augmenter

le rapport NADH/NAD⁺ et ATP/ADP. Or l'acétyl-CoA, le rapport NADH/NAD⁺ et ATP/ADP sont des régulateurs allostériques de plusieurs enzymes clés du métabolisme, notamment de la pyruvate déshydrogénase (PdH) et de la pyruvate carboxylase (PC). Ainsi en inhibant la première et en activant la seconde, les acides gras favorisent l'orientation du pyruvate vers la néoglucogenèse plutôt que vers le cycle de Krebs.

L'utilisation de lactate/pyruvate + octanoate va nous permettre d'étudier principalement la voie néoglucogénique de ces substrats, ainsi que sa régulation par le cycle PEP/pyruvate et le cycle des fructoses.

En présence de lactate/pyruvate + octanoate, les hépatocytes de rats contrôles ont un flux néoglucogénique de $140 \pm 4 \mu\text{mol/gps}/30\text{min}$ et une respiration de $29 \pm 1 \mu\text{mol O}_2/\text{gps}/\text{min}$ (figure III.8), ce qui correspond aux valeurs classiquement observées dans ces conditions. Deux cycles sont impliqués dans la régulation de cette voie : le cycle fructose 6-phosphate (F6P) - fructose 1,6-biphosphate (F1,6bP), appelé « cycle des fructoses » et le cycle phosphoénolpyruvate (PEP) - pyruvate. Chacun de ces cycles constitue une étape sujette à de multiples régulations et joue un rôle déterminant dans le contrôle de la balance glycolyse/néoglucogenèse. Ainsi, avec du lactate/pyruvate comme substrat, le contrôle de la néoglucogenèse est réparti entre un grand nombre d'étapes, notamment au niveau de la pyruvate carboxylase (PC), de la pyruvate kinase (PK), de la fructose 1,6-biphosphatase (F1,6bPase).

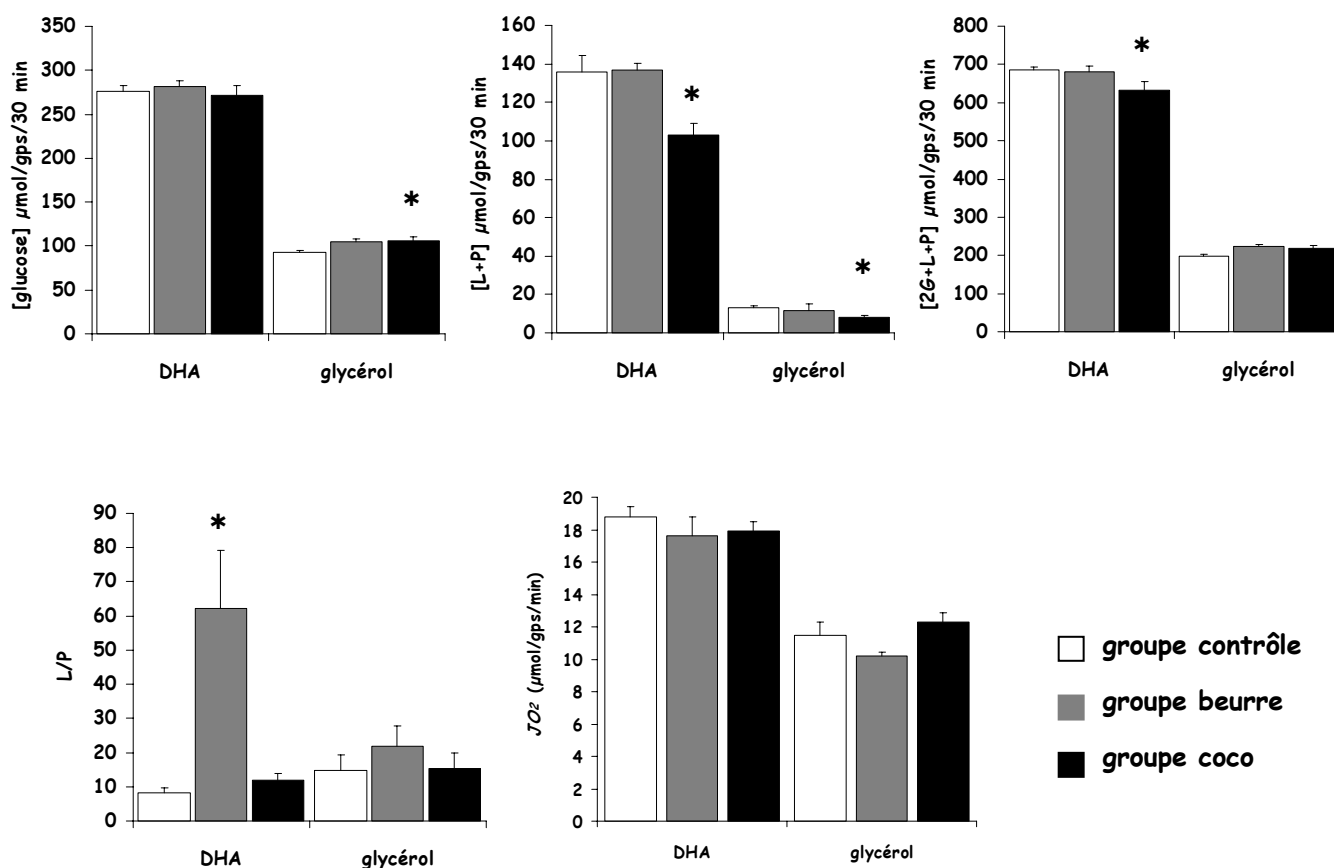
La production cellulaire de glucose du groupe beurre est, quant à elle, significativement plus importante que celle du groupe contrôle, pour une respiration identique. Cette augmentation laisse supposer une régulation différente des enzymes clés de la néoglucogenèse, en comparaison des contrôles. Cela pourrait être due à une inhibition de la PdH, une stimulation de la PEPCK ou de la PC au niveau du premier cycle, ou à une activation de la F1,6bPase au niveau du deuxième cycle. Une inhibition de la PK est à exclure. En effet, cette enzyme permet le passage du PEP au pyruvate, et une inhibition de celle-ci diminuerait la fourniture en substrat pour la néoglucogenèse, diminuant de ce fait celle-ci. Une augmentation de la quantité d'une ou de plusieurs enzymes est également envisageable. Le groupe coco, quant à lui, présente une néoglucogenèse et une respiration identiques au groupe contrôle.

⇒ ***Néoglucogenèse à partir de DHA ou glycérol***

Conjointement à l'étude de la néoglucogenèse à partir lactate+pyruvate, nous avons étudié celle-ci à partir de DHA ou de glycérol. Ces deux substrats entrent au même niveau de la voie métabolique (DHAP), et sont contrôlés l'un par le potentiel phosphate (DHA) et l'autre par le potentiel redox (glycérol). Nous avons donc comparé le métabolisme hépatique de ces deux substrats ainsi que leur orientation vers la glycolyse ou la néoglucogenèse (figure III.9). De plus, comme la DHA et le glycérol entre au niveau du DHAP, la néoglucogenèse à partir de ces substrats ne sera plus régulée par le cycle PEP/pyruvate. La comparaison des résultats obtenus

avec DHA ou avec lactate/pyruvate nous permettra de discriminer au niveau de quels cycles se situent les modifications enzymatiques, si il y en a.

Figure III.9: Effet d'un régime enrichi en lipides (huile de coco ou beurre) sur le métabolisme d'hépatocytes incubés en présence de DHA ou de glycérol.



Les hépatocytes de rats contrôle, beurre ou coco sont incubés en présence de DHA ou glycérol. Les productions de glucose et de lactate + pyruvate (L+P) sont déterminées à partir des accumulations de glucose, lactate et pyruvate au terme des 30 min d'incubation. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM. $n=10$ sauf pour le groupe beurre ou $n=4$. Les comparaisons ($p<0,05$) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher : * significativement différent du groupe contrôle.

En présence de DHA, la production de glucose par les hépatocytes contrôles pendant les 30 minutes d'incubation est de $276 \pm 6 \mu\text{mol/gps}$, alors que la glycolyse (lactate + pyruvate) est de $136 \pm 8 \mu\text{mol/gps}$. Comme classiquement décrit, le métabolisme de la DHA se répartit à 80% vers la néoglucogénèse (2G/2G+L+P) et à 20% vers la glycolyse (L+P/2G+L+P) chez les rats contrôles. La consommation d'oxygène de ces hépatocytes est de $19 \pm 1 \mu\text{mol O}_2/\text{gps}/\text{min}$.

Les hépatocytes des rats du groupe beurre présentent une néoglucogénèse, une glycolyse et un métabolisme global de la DHA identiques aux hépatocytes contrôles. Par contre, le rapport L/P, reflétant l'état de réduction cytosolique, apparaît nettement augmenté, ce qui est extrêmement surprenant. En effet, le rapport L/P équivaut, à une constante près, au rapport NADH/NAD^+ cytosolique. Or, celui-ci est en équilibre avec le rapport NADH/NAD^+ mitochondrial. Et il a été

démontré qu'une augmentation du rapport NADH/NAD^+ mitochondrial induisait une stimulation de la respiration cellulaire (Nobes, Hay et al. 1990), ce qui n'est pas le cas chez les hépatocytes beurre, celle-ci étant identique à la respiration contrôle. De plus, comme cela a été expliqué précédemment, la mesure des rapports NADH/NAD^+ mitochondrial et cytosolique, est relativement difficile à effectuer, et en ce qui concerne le groupe beurre, le nombre d'animaux n'est que de 4. Cette valeur de L/P peut donc être due à un problème de mesure.

Les hépatocytes de rats coco présentent une diminution significative de la quantité totale de DHA métabolisé en équivalents 3 carbones (2G+L+P), avec une répartition des flux métaboliques différente des contrôles (figure III.9). En effet, la néoglucogenèse est identique aux contrôles ($272 \pm 11 \mu\text{mol/gps}$ vs. $276 \pm 6 \mu\text{mol/gps}$) par contre une diminution de la glycolyse est observée ($103 \pm 6 \mu\text{mol/gps}$ vs. $136 \pm 8 \mu\text{mol/gps}$) (cf ANNEXE I). La DHA se répartie donc à 84% vers la néoglucogenèse et à 16% vers la glycolyse. Le rapport L/P ne bouge pas, et la consommation d'oxygène est identique aux contrôles. L'orientation des carbones de la DHA entre néoglucogenèse et glycolyse est régulée, notamment, au niveau de la PK. Cette enzyme est inhibée par une augmentation du potentiel phosphate. On peut donc suggérer que les hépatocytes de rats coco présentent une augmentation de leur rapport ATP/ADP cytosolique, ce qui va induire une inhibition de la PK, et par conséquent inhiber la glycolyse. Cependant, une augmentation du rapport ATP/ADP devrait être accompagnée d'une augmentation de la respiration dans ce groupe, et ce n'est pas le cas.

Plusieurs hypothèses peuvent être évoquées pour expliquer la diminution du flux total de DHA chez le groupe coco : i) un défaut de transport de DHA dans la cellule, ii) une diminution de la synthèse d'ATP et iii) une modification de l'activité ou de la quantité de(s) l'enzyme(s) impliquée(s) dans cette voie. Tout d'abord, on pourrait imaginer que l'ingestion accrue de lipides induise des remaniements au niveau de la composition membranaire, et que cela puisse modifier le transport de DHA, mais l'utilisation de concentrations saturantes de substrat rend cette hypothèse improbable. En effet, le transport du DHA à l'intérieur de la cellule est mal caractérisé mais s'effectue probablement par simple diffusion en fonction du gradient de concentration de part et d'autre de la membrane plasmique. Deuxièmement, bien que nécessitant un ATP, la première étape de phosphorylation de la DHA n'est pas contrôlée par le potentiel phosphate, à moins d'une diminution majeure de celui-ci (Leverve, Fontaine et al. 1994). Par conséquent, le flux de la DHA étant entièrement régulé par cette première étape, l'hypothèse d'une inhibition de l'enzyme catalysant cette réaction peut être émise. La première étape de phosphorylation du DHA en dihydroxyacétone phosphate (DHAP) est mal établie car la kinase catalysant la réaction pourrait ne pas être unique. En effet, la glycérol kinase (GlyK) et la triokinase (TK) sont deux enzymes qui ont été respectivement identifiées comme des candidates potentielles (Lin 1977; Miwa, Kito et al. 1994). Toutefois, il est généralement admis que la phosphorylation du DHA est plutôt catalysée

par la GLyK. Une inhibition de celle-ci pourrait donc expliquer la diminution de la quantité de DHA métabolisée par les hépatocytes coco.

Le régime enrichi en beurre n'induit pas de modification du métabolisme hépatocytaire à partir de DHA. Par contre, l'huile de coco induit une diminution du flux total de DHA métabolisé, ainsi qu'un changement dans la répartition néoglucogenèse/glycolyse avec diminution de la glycolyse. Une augmentation du potentiel phosphate pourrait expliquer ces modifications.

Le glycérol entre dans la voie de la glycolyse/néoglucogenèse au même niveau que la DHA et son métabolisme diffère de ce dernier par la seule présence d'une étape supplémentaire entre sa phosphorylation par la GlyK et le DHAP. Celle-ci catalyse l'oxydation du G3P en DHAP par l'isoforme cytosolique de la glycérol 3-phosphate déshydrogénase (G3PdH) et nécessite la présence de NAD^+ comme co-facteur. Le contrôle de la gluconéogenèse à partir du glycérol est majoritairement exercé par l'étape de la G3PdH dépendante du potentiel redox cytosolique (rapport NADH/NAD^+) (Berry, Kun et al. 1973).

Chez les rats contrôles, le glycérol se répartit à 93% vers la néoglucogenèse et à 7% vers la glycolyse (figure III.9). La production de glucose par les hépatocytes contrôles pendant les 30 minutes d'incubation est de $93 \pm 2 \mu\text{mol/gps}$, avec une glycolyse (lactate + pyruvate) de $13 \pm 1 \mu\text{mol/gps}$. La consommation d'oxygène de ces hépatocytes est de $11 \pm 1 \mu\text{mol O}_2/\text{gps}/\text{min}$ (cf ANNEXE I). Les paramètres métaboliques observés sur les hépatocytes des rats du groupe beurre sont identiques à ceux mesurés chez les rats contrôles.

Les hépatocytes de rats coco ont une quantité total de glycérol métabolisé (2G+L+P) identique aux contrôles. Par contre, une augmentation de la néoglucogenèse et une diminution significative de la glycolyse sont observées en comparaison des contrôles. De plus, une légère modification de l'orientation des carbones entre les voies de néoglucogenèse/glycolyse est constatée (96% et 4% respectivement). Le glycérol, comme la DHA est phosphorylé par la GlyK. Il a été précédemment suggéré une diminution de la quantité ou de l'activité de cette enzyme dans le groupe coco. Mais le fait que la quantité totale de glycérol métabolisé par les hépatocytes coco soit identique à celle des contrôles, infirme cette hypothèse. Une inhibition de la PK par le potentiel phosphate a été proposée précédemment pour expliquer la diminution de glycolyse en présence de DHA sur hépatocytes coco. En présence de glycérol, une diminution de la glycolyse est également observée, mais elle est associée à une augmentation de la néoglucogenèse en comparaison aux hépatocytes contrôles. Une modification du potentiel redox semble plus correspondre à ce genre de modifications, induisant une stimulation du flux néoglucogénique et une inhibition du flux glycolytique (PdH)

Les régimes enrichis en lipides, huile de coco ou beurre, ne semblent pas induire de modifications majeures du métabolisme hépatique. Les variations de flux néoglucogénique et glycolytique semblent dues à une légère modification des enzymes au niveau du cycle PEP/pyruvate. La pyruvate kinase semble être l'enzyme la plus impliquée dans ces variations.

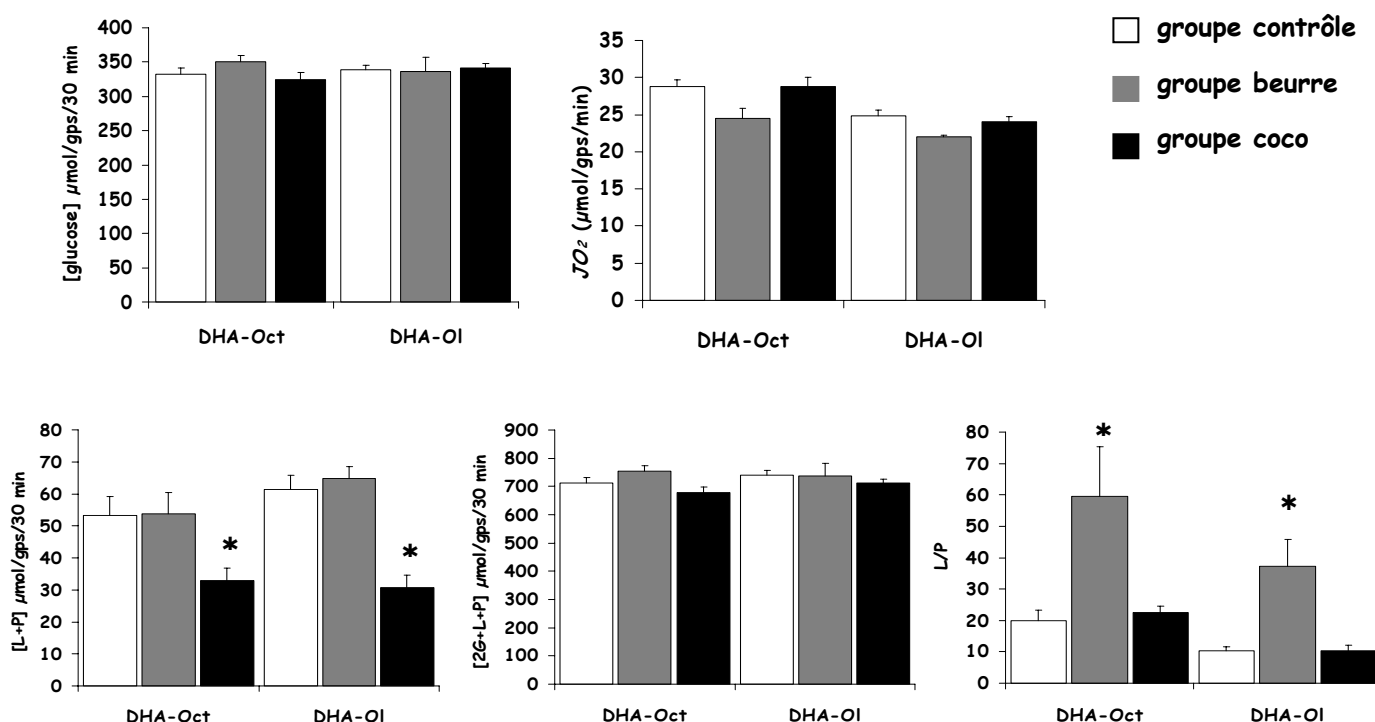
⇒ ***Néoglucogenèse à partir de DHA plus acide gras***

Le métabolisme du DHA, utilisé comme seul substrat, dépend du potentiel phosphate. Nos expérimentations ont été réalisées en présence d'acides gras (octanoate ou oléate), afin de le rendre sensible au potentiel redox. En effet, les acides gras sont β -oxydés au niveau mitochondrial, conduisant à la production équimolaire d'équivalents réduits (NADH et FADH_2), induisant une réduction du cytosol, indiquée par une augmentation du rapport lactate/pyruvate. La réduction du cytosol, due à l'addition d'acides gras, ainsi que l'augmentation du rapport ATP/ADP, induisent une inhibition de flux à travers la pyruvate kinase, et de ce fait inhibent la glycolyse.

En présence d'acides gras le métabolisme de la DHA des hépatocytes contrôles est modifié, aboutissant à une inhibition de la glycolyse (-60%) et une stimulation de la néoglucogenèse (+20%) par rapport à DHA seul. Les carbones de la DHA se réorientent donc à 92-93% vers la néoglucogenèse et à 7-8% vers la glycolyse. L'ajout des acides gras induit également une stimulation de la respiration cellulaire par l'apport d'équivalents réduits, et par conséquent de la synthèse mitochondriale d'ATP.

Les hépatocytes des rats du groupe beurre présentent une néoglucogenèse, une glycolyse et une respiration identiques à celles mesurées sur hépatocytes contrôles. Par contre, le rapport L/P est significativement augmenté en présence d'acides gras, alors que le rapport $\beta\text{OH}/\text{AcAc}$ (cf ANNEXE I), lui, est diminué en comparaison au groupe contrôle. Ces variations des rapports NADH/ NAD^+ cytosolique et mitochondrial pourraient suggérer un problème de transport du NADH entre les deux compartiments. Cependant ces modifications d'état redox du cytosol et de la mitochondrie ne se reflètent pas sur les paramètres métaboliques ou la respiration cellulaire. On peut donc, ici aussi, se poser la question de la validité de la mesure de ces deux rapports.

Figure III.10: Effet d'un régime enrichi en lipides (huile de coco ou beurre) sur le métabolisme d'hépatocytes incubés en présence de DHA ou lactate+pyruvate, associé à un acide gras (octanoate ou oléate).



Les hépatocytes de rats contrôle, beurre ou coco sont incubés en présence de DHA plus octanoate ou oléate. Les productions de glucose et de lactate + pyruvate (L+P) sont déterminées à partir des accumulations de glucose, lactate et pyruvate au terme des 30 min d'incubation. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM. $n=10$ sauf pour le groupe beurre ou $n=4$. Les comparaisons ($p<0,05$) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher : * significativement différent du groupe contrôle.

Lors de l'étude avec de la DHA seul, on observait une diminution de la glycolyse chez les hépatocytes de rats recevant un régime enrichi en coco. Après ajout d'acides gras, la glycolyse est diminuée de 70% chez les rats coco, alors qu'elle ne l'est que de 60% chez les rats contrôles, ce qui montre que la voie métabolique elle-même reste inhibable chez les hépatocytes de rats coco. On aurait pu, ici aussi, supposer qu'une augmentation plus importante du potentiel redox soit responsable de cette plus forte inhibition de la glycolyse chez les hépatocytes de rats coco incubés en présence de DHA plus octanoate. Cependant, nous n'observons pas d'augmentation du rapport lactate/pyruvate (NADH/NAD^+ cytosolique). Le métabolisme total, la néoglucogenèse et la respiration, en présence de DHA plus acides gras, ne sont pas différents entre les hépatocytes coco et contrôles.

L'ingestion d'un régime enrichi en huile de coco ou en beurre ne modifie pas la néoglucogenèse hépatique en présence de DHA et d'acides gras comme substrats. En revanche,

les hépatocytes de rats coco présentent une inhibition de leur glycolyse en comparaison de celle des contrôles. Les hépatocytes de rats du groupe beurre semblent présenter une modification de leur potentiel redox.

En résumé, un régime supplémenté en d'huile de coco ou en beurre ne provoque que des perturbations métaboliques mineures au niveau des hépatocytes de rats. L'huile de coco induit une augmentation de néoglucogenèse avec du glycérol, et une inhibition de la glycolyse avec DHA ou DHA plus acides gras. L'ensemble de ces modifications pourrait être dû à une modification du potentiel redox. Ainsi, une augmentation de celui-ci provoquerait une inhibition de l'activité des enzymes du cycle PEP/pyruvate, provoquant ainsi une orientation préférentielle des substrats vers la production de glucose plutôt que vers la glycolyse. Cependant, les mesures des rapports L/P, reflétant les rapports NADH/NAD⁺ cytosolique, ne corroborent pas ces observations. Le régime enrichi en beurre induit une augmentation de la néoglucogenèse en présence de lactate/pyruvate plus octanoate comme substrat. Il semble donc, que dans ce groupe, une modification du potentiel phosphate soit impliquée. Malgré des perturbations de natures différentes, il apparaît que les modifications induites par les deux régimes enrichis en lipides se situent au niveau du cycle PEP/pyruvate. Une étude utilisant la périfusion d'hépatocytes isolés nous permettrait de discriminer la ou les enzymes inhibées.

Cette étude du métabolisme hépatiques des groupes de rats coco et beurre avait pour but de confirmer l'intégrité des cellules, et donc la validité des résultats, ainsi que de mesurer une éventuelle augmentation de l'oxydation lipidique. Or, il ressort de cette étude que les rats coco ou beurre ne présentent pas d'augmentation d'oxydation des acides gras, ce qui ne permet donc pas d'expliquer l'absence de stéatose hépatique malgré une ingestion lipidique accrue chez ces deux groupes de rats.

9.5 Système d'exportation

Il ressort que des rats recevant une alimentation enrichie en lipides (67% kcal totale), augmentent la masse de leurs tissus adipeux blancs, mais ne présentent pas de stéatose hépatique. Or, la mesure de la consommation d'oxygène, ainsi que de la cétogenèse hépatique,

en présence d'acides gras comme substrats, ne met pas en évidence de différences entre les groupes coco ou beurre et le groupe contrôle. L'absence de stockage de lipides au niveau de foie n'est donc pas le résultat d'une augmentation de leur oxydation au sein de celui-ci. Donc, si les lipides ne sont ni stockés, ni oxydés par le foie, on peut supposer qu'ils sont exportés vers les tissus périphériques, ce qui est en accord avec l'augmentation de la masse adipeuse.

Le transport des triglycérides, du cholestérol et des phospholipides est assuré par des lipoprotéines. Le foie assure, pour une large part, la synthèse de ces lipoprotéines, le reste étant synthétisé par l'intestin. Les VLDL (very low density lipoprotein) synthétisées et sécrétées par le foie initient la voie de transport des lipides du foie vers les tissus périphériques. Les apolipoprotéines sont essentielles à l'assemblage des lipoprotéines riches en triglycérides dans le foie. L'apo E et B100 sont les composants majeurs des VLDL.

Les abondances relatives des ARNm des apo E et B100 ont été mesurés sur les foies de nos trois groupes de rats, que ce soit à l'état nourri ou après 24h de jeûne.

Tableau III.7: Effet d'un régime enrichi en lipides (huile de coco ou beurre) sur l'abondance relative des ARNm des apo B et apo E du foie.

	contrôle			coco			beurre	
	nourri	à jeun		nourri	à jeun		nourri	à jeun
ApoB/cyclo	0,97 ± 0,05	1,25 ± 0,05	£	1,10 ± 0,08	1,19 ± 0,05		0,78 ± 0,07	1,02 ± 0,07
ApoE/cyclo	0,65 ± 0,02	0,82 ± 0,04	£	0,68 ± 0,04	0,87 ± 0,04	£	0,54 ± 0,07	0,75 ± 0,07

L'expression génique des ApoB et ApoE est mesurée par RT-PCR sur des extraits de foies, à partir de primers spécifiques. La cyclophiline est utilisée comme gène de référence. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM, n=5 sauf pour le groupe beurre, n=2. Les comparaisons (p<0,05) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher ; *: vs contrôle ; £: vs nourri.

Les rats contrôles présentent une augmentation de la quantité relative des ARNm des deux apolipoprotéines après 24h de jeûne (tableau III.7). Lors d'une période de privation, les réserves énergétiques, et notamment les lipides, vont être mobilisées de manière accrue afin d'alimenter les tissus en substrats. Le transport des triglycérides étant assuré par les lipoprotéines, majoritairement via les VLDL, une augmentation de la synthèse d'apolipoprotéines pourrait donc être observée dans ces conditions. Cela est confirmé en partie par des études menées par Davis et collaborateurs (Davis, Boogaerts et al. 1985; Davis, Dluz et al. 1989), dans lesquelles il observe une augmentation de l'ARNm de l'apo E, ainsi que de la protéine sécrétée, après 3 jours de jeûne (Davis, Dluz et al. 1989). Par contre, plusieurs auteurs ont étudié l'influence du jeûne sur l'ARNm de l'apo B, et aucune variation de celui-ci n'a été observée (Davis, Boogaerts et al. 1985; Leighton, Joyner et al. 1990).

Chez les rats coco, aucune variation due au statut nutritionnel n'est observée en ce qui concerne l'ARNm de l'apo B, alors que l'ARNm de l'apo E est significativement augmenté à jeun. Une tendance à la diminution de la quantité d'ARNm des deux apolipoprotéines est observée sur les foies de rats du groupe beurre par rapport aux contrôles. Cependant, aucune variation de la quantité relative d'ARNm des deux apolipoprotéines n'est observée après 24h de jeûne. Le nombre d'échantillons de foie provenant des rats beurre étant que de deux, nous n'avons pas effectué d'étude statistique sur ce groupe.

En 1996, Srivastava et son équipe ont mené une étude afin de définir les mécanismes de régulation de l'expression des protéines apo E et B lors d'un régime enrichi en lipides saturés (huile de coco) ou en cholestérol (Srivastava 1996). Ils ont observé, lors d'un régime « high fat » (20% m/m coco) une diminution de l'ARNm de l'apo B alors que l'ARNm de l'apo E ne change pas. Cependant, l'expression génique des apolipoprotéines B ne semble pas corrélée à l'expression de la protéine dans cette condition. En effet, une augmentation des apo B plasmatiques est observée lors du régime « high fat ». En parallèle, l'association de cholestérol au régime « high fat » induit une augmentation de l'ARNm et de la protéine de l'apo E. Srivastava a donc suggéré une régulation transcriptionnelle du gène de l'apo E par le cholestérol et post-transcriptionnelle par les lipides saturés, alors que le gène de l'apo B serait uniquement régulé de manière post-transcriptionnelle par les lipides saturés.

Notre étude se rapproche de celle de Srivastava puisque nous avons également utilisé un régime enrichi en huile de coco (45% m/m) et notre régime beurre contient des acides gras saturés et environ 0,1% (m/m) de cholestérol. Cependant, nos résultats ne sont pas tout à fait identiques. En effet Srivastava observe une diminution de l'ARNm de l'apo B chez son groupe coco, alors que nous n'observons aucune différence dans notre étude. De même, il trouve une augmentation de l'ARNm de l'apo E dans son régime cholestérol + acides gras saturés, alors que celui-ci ne bouge pas chez notre groupe beurre. Cependant, si l'on considère que les gènes de l'apo B et E subissent une régulation post-transcriptionnelle, un dosage des protéines plasmatiques est donc indispensable pour estimer les effets des différents régimes sur l'expression de celles-ci.

Les régimes enrichis en huile de coco ou en beurre n'induisent pas de modification d'expression relative de l'ARNm des apo B et E. Cependant, si on se base sur des données de la littérature, une augmentation de ces protéines semble tout à fait probable, supportant donc l'hypothèse d'une augmentation des capacités d'exportation des triglycérides du foie vers les autres organes.

10. Etude du tissu adipeux brun

Malgré une ingestion de lipides largement augmentée, les rats des groupes coco et beurre ne présentent pas de modification de leur masse corporelle, et aucune accumulation de triglycérides n'a été observée au niveau hépatique. Nous avons donc recherché un autre site d'utilisation des lipides. Nous nous sommes intéressé prioritairement au tissu adipeux brun intrascapulaire (TAB). Chez les rongeurs, ce tissu est reconnu comme étant un site impliqué dans la dissipation d'énergie sous forme de chaleur (Cannon and Nedergaard 2004). Cette caractéristique thermogène est due à l'abondance des mitochondries, et surtout à la présence d'une protéine découplante ou UCP (uncoupling protein). En effet, l'activation de cette UCP1, va dissiper le gradient électrochimique de protons en facilitant leur retour vers la matrice (Nicholls and Locke 1984) et dissipe ainsi sous forme de chaleur l'énergie générée par l'oxydation des substrats. La conséquence de cette dissociation entre les oxydations et les phosphorylations est une stimulation des oxydations, donc de la respiration mitochondriale, sans augmentation concomitante de la synthèse d'ATP.

Le TAB des rats de chaque groupe a été pesé (tableau III.8), et on observe une masse de celui-ci supérieure au groupe contrôle dans les groupes coco (+23%, $p < 0,05$) et beurre (+12%), mais de manière non significative dans ce dernier.

Tableau III.8: Effet d'un régime enrichi en lipides (huile de coco ou beurre) sur la masse du TAB et l'activité de la 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase de ce tissu.

	contrôle	beurre	coco
tissu adipeux brun (mg/100g)	59 ± 3	66 ± 8	73 ± 4 *
activité de la HAD (μmol/min/mg prot)	1,2 ± 0,08	0,9 ± 0,04	1,8 ± 0,26 *

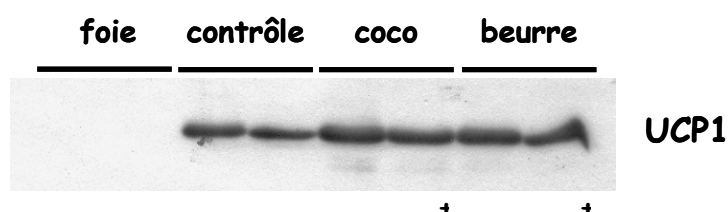
La masse du tissu adipeux brun (TAB) est exprimée par en mg/100g de masse corporelle. Des morceaux de tissus adipeux bruns congelés (40-50 mg) sont homogénéisés à 4°C grâce à un potter en verre Elvehjem. Les homogénats subissent ensuite trois cycles de congélation/décongélation à -80°C, afin de détruire les membranes mitochondriales. L'activité de la HAD est mesurée à 25°C spectrophotométriquement selon Lowry & Passonneau. L'activité est exprimée en μ moles par minute et par milligramme de protéine. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM, $n=8$ sauf pour le groupe beurre ou $n=4$. Les comparaisons ($p < 0,05$) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher. * vs. contrôle.

Parallèlement à la mesure de la quantité de TAB, nous nous sommes également intéressé aux capacités d'oxydation des lipides de ce tissu chez les rats des groupes coco et beurre. Pour cela nous avons mesuré l'activité de la 3^e enzymes de β -oxydation, la 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (HAD), dans les différents groupes de rats (tableau III.8). L'activité maximale de

la HAD sur l'homogénat de TAB du groupe beurre est similaire à celle du groupe contrôle, en revanche elle est largement augmentée chez le groupe coco (+55%, $p < 0,05$).

De plus, une nette augmentation de l'expression de la protéine de l'UCP1 est observée dans les deux groupes de rats (coco +25% et beurre +28% ; $p < 0,05$) (figure III.10). Cette augmentation de l'expression d'UCP1 a été largement décrite lors de régimes « cafétéria », elle permet de dissiper l'excès d'énergie due à l'ingestion accrue de lipides, on parle de « diet induced thermogenesis » (Rothwell and Stock 1979; Rothwell and Stock 1983; Falcou, Bouillaud et al. 1985; Rothwell, Stock et al. 1985; Giraudo, Kotz et al. 1994; Schmid, Converset et al. 2004).

Figure III.10: Effet d'un régime enrichi en lipides (huile de coco ou beurre) sur l'expression de la protéine UCP1 dans le TAB.



Quantité relative de la protéine UCP 1 présente dans les mitochondries de tissu adipeux brun de rats contrôles, coco et beurre, détectée par western blot à partir de 40 μ g de protéines mitochondriales. Des mitochondries de foie de rats contrôles ont été utilisées comme contrôle négatif. L'analyse a été réalisée sur 4 rats dans chaque groupe.

Dans cette étude, il apparaît une augmentation des capacités oxydatives des lipides dans le tissu adipeux brun des rats ayant reçu un régime enrichi en lipides, reflété par l'augmentation de l'activité de la HAD, ainsi que du contenu en UCP1 au niveau de ce tissu. Ces résultats sont cohérents avec la littérature. L'augmentation d'UCP1 laisse supposer la mise en place de phénomène de découplage au niveau du TAB, dissipant ainsi l'excès d'énergie sous forme de chaleur. Or, ce découplage va provoquer une augmentation des oxydations, et de ce fait augmenter les besoins en substrats et stimuler l'oxydation lipidique.

Les régimes enrichis en acides gras induisent une augmentation de l'expression d'UCP1 au niveau du TAB des animaux, associée à une augmentation de l'oxydation des lipides au sein de ce tissu. Les rats coco et beurre semblent développer une thermogenèse « alimentaire » afin de limiter et d'éliminer l'excès de lipides ingéré.

En résumé, l'adjonction d'huile de coco ou de beurre à l'alimentation des rats ne provoque pas de stéatose hépatique malgré la forte augmentation des apports caloriques et lipidiques. Cela n'est pas dû à une oxydation lipidique accrue au niveau hépatique, mais semble résulter d'une augmentation de l'exportation, et du stockage des lipides sous forme de triglycérides, du foie vers le tissu adipeux blanc, ainsi que de l'activation de mécanismes de dissipation d'énergie sous forme de chaleur, notamment au niveau du tissu adipeux brun via l'UCP1.

11. Discussion

Dans cette étude nous avons réalisé un régime qui reflète les habitudes alimentaires des patients atteints de NASH décrites par Musso (Musso, Gambino et al. 2003). Nous avons donc réalisé deux régimes enrichis acides gras saturés (AGS) à chaîne moyenne de manière à tenter d'induire une stéatohépatite non alcoolique chez le rat, l'un avec de l'huile de coco (86% SFA) et l'autre avec du beurre (51% SFA). Ces régimes ont été donnés *ad libitum* aux animaux dès leur sevrage, et pendant 14 semaines. Malgré une prise calorique et lipidique très largement augmentée, les rats recevant les régimes enrichis en lipides n'ont pas développé de lésions typiques d'une NASH, c'est-à-dire une stéatose, de l'inflammation et de la fibrose. On retrouve plusieurs études dans la littérature, qui traitent des conséquences de variations d'apport calorique lors de régimes enrichis en lipides chez le rat. Lors d'une augmentation de la prise calorique, la majeure partie de l'excès d'énergie ingérée est éliminée sous forme de chaleur. Cela a été notamment vérifié chez de jeunes rats, qui ne deviennent pas obèses par une augmentation de leur dépense énergétique (Rothwell and Stock 1979; Rothwell and Stock 1979) grâce à des mécanismes thermogènes au niveau de leur tissu adipeux brun (Rothwell and Stock 1983) (Rothwell and Stock 1983; Rothwell, Stock et al. 1985) et du foie (Berry, Clark et al. 1985). La présente étude menée sur le foie des trois groupes de rats montre quelques perturbations mineures du métabolisme hépatique sur les voies de néoglucogenèse/glycolyse, qui seraient dues à une modification d'activités enzymatiques au niveau du cycle PEP/pyruvate, probablement sur la PK. Cependant nous n'avons pas mis en évidence d'augmentation des capacités oxydatives lipidiques dans les foies des rats coco et beurre. En effets, la production de corps cétoniques et la respiration cellulaire en présence d'acides gras restaient inchangées par rapport aux rats contrôles.

Dans notre modèle, le foie des rats Wistar apparaît peu affecté par l'augmentation de l'ingestion lipidique. Nous avons donc émis l'hypothèse que les rats coco et beurre posséderaient des capacités d'exportation très efficaces au niveau du foie, afin d'orienter les lipides vers leur lieu de stockage périphérique via une augmentation des formes de transport des triglycérides (VLDL). En effet, il a été montré une augmentation de 15-17% des VLDL et des LDL chez des rats nourris avec un régime contenant 20% d'huile de coco hydrogénée (Srivastava 1996). Cette augmentation des vésicules de transport des lipides est associée à une augmentation des apolipoprotéines B et E plasmatiques, bien que la quantité de leur ARNm soit inchangée (Srivastava 1996). Les rats des groupes coco et beurre présentent une masse de tissu adipeux blanc augmentée, ce qui est en accord avec une exportation accrue des triglycérides du foie vers cet organe de stockage qu'est le tissu adipeux. Ce phénotype est observé dans de nombreuses études où les rats recevant un régime enrichi en différentes huiles (coco, olive, menhaden) augmentent leur tissu adipeux épидидymal (Yaqoob, Sherrington et al. 1995; Bizeau and Hazel 1999; Iossa, Lionetti et al. 1999). Cependant, on observe que le niveau d'accumulation de lipides au niveau du tissu adipeux blanc est différent en fonction du type d'acides gras présent dans l'alimentation, et plus précisément en fonction de la longueur des chaînes carbonées de ces acides gras. En effet, l'huile de coco qui est riche en acides gras saturés à chaînes moyennes (principalement de l'acide laurique ; C12 :0 à 44,6%) induit une accumulation de graisse au niveau des tissus périphériques moindre que le beurre, qui lui est riche en acides gras saturés à chaînes longues (majoritairement de l'acide palmitique ; C16 :0 à 21,7%). Plusieurs études ont démontré qu'un régime avec des triglycérides à chaînes moyennes, comme l'huile de coco, induit une diminution significative de la masse corporelle ou de la taille des dépôts graisseux à la fois chez l'homme et chez l'animal (Hill, Peters et al. 1993; St-Onge and Jones 2002; Han, Hamilton et al. 2003). Cette réduction des tissus adipeux peut être expliquée par le fait que les triglycérides à chaînes moyennes sont transportés directement vers le foie via la veine porte, et subissent un premier passage hépatique, ce qui n'est pas le cas des triglycérides à chaînes longues. Ces caractéristiques pourraient être responsables des différences d'oxydation entre triglycérides à chaîne moyenne et triglycérides à chaîne longue (Wollin, Wang et al. 2004), et pourraient donc en partie expliquer les différences en terme d'accumulation lipidique, observées au niveau du tissu adipeux blanc.

Outre l'augmentation des systèmes d'exportation et de stockage, une autre possibilité peut expliquer l'absence de stéatose hépatique malgré la surcharge lipidique : une augmentation de l'oxydation lipidique périphérique, c'est-à-dire au niveau d'autres organes que le foie, comme les muscles ou le tissu adipeux brun. Les mammifères possèdent un tissu spécialisé dans la thermogénèse, le tissu adipeux brun. Il est caractérisé par un nombre important de mitochondries contenant une protéine découplante (UCP1) en grande quantité. Cette UCP est localisée au niveau de la membrane interne mitochondriale (Cannon and Nedergaard 2004). Le froid ou les régimes alimentaires provoquent une augmentation la quantité de la protéine, ainsi que de son

activation, ce qui induit un découplage entre l'oxydation des substrats et la synthèse d'ATP accompagné d'une production de chaleur (Klingenberg, Echay et al. 1999; Cannon and Nedergaard 2004). Lors de ces processus thermogéniques, les acides gras ne sont pas seulement les substrats de la β -oxydation, mais interviennent également dans les mécanismes de découplage en tant qu'activateur de l'UCP1, tant au niveau de la transcription que de l'activité de la protéine (Silva and Rabelo 1997). Il a en effet été montré l'activation de facteurs de transcription, les « peroxisome proliferator-activated receptor » (PPAR), régulant l'expression d'UCP1 par des acides gras (Falcou, Bouillaud et al. 1985). Dans cette étude nous observons une augmentation de la masse du TAB, ainsi que de l'activité maximale d'une enzyme de la β -oxydation, la β -hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (HAD) et du contenu en UCP1 chez les rats recevant un régime enrichi en lipides. Ces résultats laissent suggérer l'implication du TAB dans l'élimination des acides gras, par une stimulation de processus thermogéniques. L'augmentation d'expression d'UCP1 permettrait de dissiper l'énergie excédentaire et de réguler ainsi la prise de poids, comme cela a été proposé par plusieurs auteurs (Rothwell and Stock 1983; Falcou, Bouillaud et al. 1985; Rothwell, Stock et al. 1985; Giraudo, Kotz et al. 1994).

Une autre voie d'oxydation des lipides pourrait également être impliquée dans la résistance des rats aux régimes enrichis en lipides : les muscles, mais cette voie n'a pas été étudiée ici. En effet, plusieurs études ont été menées sur la réponse métabolique de différents muscles lors de régimes enrichis en lipides, et une augmentation de la β -oxydation au sein de ceux-ci a été mise en évidence (Miller, Bryce et al. 1984; Nemeth, Rosser et al. 1992; Leibowitz, Dourmashkin et al. 2004). Ainsi, il a été montré une augmentation de l'activité de plusieurs enzymes de la voie d'oxydation des lipides dont la β -hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (HAD) au niveau des muscles des pattes et du diaphragme de rats recevant un régime contenant 70% de gras (Nemeth, Rosser et al. 1992; Leibowitz, Dourmashkin et al. 2004). Il ressort de ces études, que des rats recevant un régime hyperlipidique sont capables d'ajuster leur métabolisme énergétique en réponse à des variations nutritionnelles, et d'augmenter l'activité des enzymes impliquées dans l'oxydation lipidique au niveau musculaire. Une partie des acides gras est oxydée, permettant ainsi de réduire l'excès d'énergie dû à une ingestion lipidique accrue. On peut supposer que dans notre étude, les rats augmentent également leurs capacités oxydatives musculaires, qui en association avec les capacités oxydatives du TAB, permettent d'empêcher le développement de la stéatose hépatique, en dissipant l'excès calorique.

12. Conclusion

L'association de tous nos résultats et de la littérature, nous laisse penser que le rat mâle Wistar est capable de s'adapter à une ingestion excessive de lipides, en i) augmentant le stockage des acides gras au niveau des tissus périphériques, et notamment au niveau du tissu adipeux blanc, et ii) en augmentant l'oxydation des lipides par différents processus dont la β -oxydation musculaire et la thermogénèse au niveau du TAB via l'UCP1.

Dans cette étude, nous avons donc réalisé deux régime enrichi en lipides contenant une forte proportion d'acides gras saturés à chaînes moyennes, et cela dans le but de se rapprocher le plus possible du régime alimentaire de patients atteints de NASH, décrit par Musso (Musso, Gambino et al. 2003). Cependant, Il apparaît que chez le rat Wistar un régime enrichi à 51% ou 86% en lipides saturés n'est pas suffisant pour induire une stéatose ou même un stéatohépatite. La comparaison entre plusieurs études utilisant des régimes hyperlipidiques nous montre l'existence d'une très grande variabilité dans la quantité et le type d'acides gras utilisés entre ces régimes (Gauthier, Couturier et al. 2003; Gauthier, Couturier et al. 2004; Lieber, Leo et al. 2004; Fan, Zhong et al. 2005; Zou, Li et al. 2006). La composition et la durée des régimes de ces études sont présentées dans le tableau III.9. Contrairement à ce que l'on aurait pu croire, ce n'est pas le régime contenant la plus grande quantité de lipides qui induit la stéatose la plus sévère. Dans leur étude, Lieber et Zou, utilisent des alimentations contenant 35-49% (m/m) de lipides (Lieber, Leo et al. 2004; Zou, Li et al. 2006), ce qui correspond au pourcentage utilisé dans notre étude (45%). Or, tant dans notre étude que dans les leurs, la présence de stéatose n'est pas systématique, ou alors dans de très faibles proportions. En effet, dans son étude, Lieber n'observe chez ces rats « high fat », qu'une stéatose deux fois supérieure à celle des contrôles (Lieber, Leo et al. 2004), ce qui est très loin de refléter la réalité « humaine ». Par contre, une alimentation enrichie à « seulement » 10% de lipides induit une stéatose conséquente associée à des phénomènes inflammatoires (Fan, Zhong et al. 2005). Il semble donc évident que, plus que la quantité, le type d'acides gras utilisés est le facteur clé des régimes hyperlipidiques dans l'induction d'une stéatose et de différentes autres lésions hépatiques. De plus, lorsque l'on étudie la composition lipidique des différents régimes (tableau III.9) qui induisent une stéatose, on retrouve souvent de l'huile de maïs ou du lard, qui sont tous deux riches en acides gras insaturés (Gauthier, Couturier et al. 2003; Gauthier, Couturier et al. 2004; Lieber, Leo et al. 2004; Fan, Zhong et al. 2005; Zou, Li et al. 2006). De plus, on constate que tous les régimes induisant une stéatose ET une inflammation, sont riche en acides gras mono insaturés (AGMI) et poly insaturés (AGPI) (20-30% des lipides totaux) en comparaison aux régimes utilisés dans notre étude (2-5%). Les effets délétères de certains acides gras insaturés ont déjà été décrits dans la littérature. En effet, plusieurs études ont démontré le rôle pro-inflammatoire des acides gras poly insaturés n-6 et leur implication dans des

phénomènes de stress oxydant et dans le développement de NASH (Ghosh, Kewalramani et al. 2006 ; Simopoulos 2006). Les effets délétères de ces acides gras seraient associés à une augmentation de la peroxydation lipidique, impliquée dans le stress oxydant, ainsi qu'à une diminution de concentration des enzymes antioxydantes,.

Au cours des deux cents dernières années, les pays occidentaux ont vu leurs habitudes alimentaires énormément se modifier, avec une très forte augmentation de leurs apports en acides gras n-6. Le ratio n-6/n-3 qui était de 1 pour 1 est passé à 15-20 pour 1 (Simopoulos 1999; Ghosh, Kewalramani et al. 2006). L'acide arachidonique (n-6) et l'acide eicosapentanoïque (n-3) sont des précurseurs de la formation d'eicosanoïdes, et ont des effets opposés sur le métabolisme. Les pathologies cardiovasculaires, le diabète, l'obésité, certains cancers et bien d'autres pathologies sont associés à une augmentation de la production thromboxane A₂, de leukotriène B₄, IL-1 β , IL-6 et de TNF. Tous ces facteurs augmentent, consécutivement à une augmentation de l'ingestion d'acides gras n-6 et diminuent avec une augmentation de l'ingestion d'acides gras n-3 (Simopoulos 2002). Différentes études ont démontré les effets pro-inflammatoires des acides gras n-6, leur ingestion étant associée à une exacerbation du stress oxydant hépatique (Yoo, Ning et al. 1991; Simopoulos 2002) et à la potentialisation du développement de la NASH. Il ressort de ces études, que le développement de la NASH serait favorisé par une alimentation riche en AGMI et AGPI, spécialement en n-6, plutôt que par des AGS. Mais ces résultats contredisent les observations effectuées par l'équipe de Musso, dans laquelle ils ont mesuré une ingestion journalière d'environ 5% (m/M) d'AGPI dans la population générale contre 3,5% chez des patients atteints de NASH (Musso, Gambino et al. 2003).

Tableau III.9: Caractéristiques lipidiques de différents régimes enrichis en lipides induisant une stéatose ou une stéatohépatite.

souche de rat	régime coco	régime beurre	Lieber	Zou	Rivera	Gauthier	Fan
	Wistar	Wistar	Sprague Dawley	Sprague Dawley	Wistar	Sprague Dawley	Sprague Dawley
lipide (w/w)	45%	45%	30,1% huile de maïs	35,7%	15% huile de maïs	3,4% huile de maïs	10% huile de maïs
	huile de coco	beurre	17,6% huile d'olive	huile de maïs	50% saccharose	14,6% lard	2% cholestérol
			1,7% huile de carthame				
AGS (% lipides)	87	51,4	13	13	13	34	39
AGMI (% lipides)	5,8	21	41	24	27,6	42	45
AGPI (% lipides)	1,8	3	42	59	54,7	20	21
durée du régime (semaine)	14	14	3	6	6	16	8
stéatose	non	non	légère	légère	non	oui	oui
inflammation	non	non	oui	oui	non	nd	nd
fibrose	non	non	oui	nd	non	nd	nd

abréviations: AGS, acide gras saturé; AGMI, acide gras mono insaturé; AGPI, acide gras poly insaturé; nd, non déterminé.

En résumé : Un régime enrichi en lipides saturés ne semble donc pas être un modèle idéal pour induire une stéatohépatite ou même une stéatose chez le rat. De nombreuses études semblent démontrer que l'utilisation d'acides gras mono ou poly insaturés soit plus efficace dans l'induction d'une NASH chez le rongeur. Il apparaît ici, que le facteur clé impliqué dans le développement d'une stéatose associée à des phénomènes inflammatoires, soit l'induction de peroxydation lipidique et d'une production de cytokines pro-inflammatoires par les acides gras poly insaturés.

Il ne faut pas exclure non plus l'hypothèse d'une résistance propre au rat Wistar face à une surcharge lipidique alimentaire (West and York 1998). En effet, des travaux préliminaires menés au sein de notre équipe semblent montrer des sensibilités différentes face au régime coco et beurre, suivant que les rats soient de souche Wistar ou Sprague Dawley, ces derniers présentant une prise de poids plus importante et plus rapide. Il serait intéressant de réaliser une étude à grande échelle sur plusieurs espèces de rongeurs (rats, souris, hamster, lapin ...) afin de déterminer de manière plus précise les caractéristiques de chaque espèce, de chaque souche, et ainsi de pouvoir mieux choisir le modèle en fonction de l'étude à mener.

Un régime alimentaire plus proche de celui des patients, et développant les stigmates associés à la NASH (obésité abdominale, hyperlipidémie, insulino-résistance) reste toujours à élaborer. Cela nous permettrait enfin d'étudier les mécanismes impliqués dans la pathogenèse de la NASH.

L'utilisation d'un régime enrichi en lipides ne nous a donc pas permis d'induire une NASH chez des rats Wistars. Cependant, ces derniers demeurent un très bon modèle pour l'étude des mécanismes d'adaptations face à une surcharge lipidique alimentaire, notamment au niveau des tissus périphériques.

Pour la suite de cette étude, nous avons choisi d'utiliser un modèle de NASH très bien caractérisé chez le rat : un régime carencé en choline et méthionine. Une étude de la bioénergétique mitochondriale de ce modèle a été tout d'abord réalisée, suivie par une étude du métabolisme hépatique. Enfin, un essai de traitement a également été tenté avec l'utilisation de deux molécules, la metformine et l'almitrine.

ANNEXE I

	Corps Cétoniques ($\mu\text{mol/gps}/30\text{min}$)			$\beta\text{OH}/\text{AcAc}$			JO_2 ($\mu\text{mol/min/gps}$)		
	contrôle	beurre	coco	contrôle	beurre	coco	contrôle	beurre	coco
Endo	61 $\pm$ 2	63 $\pm$ 4	51 $\pm$ 2 *	0,13 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,39	0,12 $\pm$ 0,01	11 $\pm$ 1	11 $\pm$ 1	10 $\pm$ 1
Ol	83 $\pm$ 5	72 $\pm$ 3	80 $\pm$ 7	1,1 $\pm$ 0,07	1,1 $\pm$ 0,09	1,7 $\pm$ 0,21 *	15 $\pm$ 1	14 $\pm$ 1	15 $\pm$ 1
Oct	124 $\pm$ 5	103 $\pm$ 6	114 $\pm$ 6	1,3 $\pm$ 0,09	1,1 $\pm$ 0,17	1,5 $\pm$ 0,16	21 $\pm$ 1	18 $\pm$ 1	20 $\pm$ 1

	Glucose ($\mu\text{mol/gps}/30\text{min}$)			L+P ($\mu\text{mol/gps}/30\text{min}$)			2G+L+P ($\mu\text{mol/gps}/30\text{min}$)		
	contrôle	beurre	coco	contrôle	beurre	coco	contrôle	beurre	coco
DHA	276 $\pm$ 6	281 $\pm$ 6	272 $\pm$ 11	136 $\pm$ 8	137 $\pm$ 4	103 $\pm$ 6 *	688 $\pm$ 7	699 $\pm$ 42	647 $\pm$ 24 *
glycérol	93 $\pm$ 2	105 $\pm$ 3	106 $\pm$ 4 *	13 $\pm$ 1	12 $\pm$ 4	8 $\pm$ 1	199 $\pm$ 5	222 $\pm$ 5	220 $\pm$ 8
DHA-Oct	333 $\pm$ 8	351 $\pm$ 8	324 $\pm$ 11	53 $\pm$ 6	54 $\pm$ 7	33 $\pm$ 4 *	719 $\pm$ 21	756 $\pm$ 18	681 $\pm$ 19
DHA-Ol	338 $\pm$ 7	337 $\pm$ 20	341 $\pm$ 8	61 $\pm$ 4	65 $\pm$ 4	31 $\pm$ 4 *	737 $\pm$ 16	739 $\pm$ 44	713 $\pm$ 14
LPO	140 $\pm$ 4	175 $\pm$ 7 *	157 $\pm$ 8						

	L/P			$\beta\text{OH}/\text{AcAc}$			JO_2 ($\mu\text{mol/min/gps}$)		
	contrôle	beurre	coco	contrôle	beurre	coco	contrôle	beurre	coco
DHA	8 $\pm$ 1	111 $\pm$ 32 *	12 $\pm$ 2	0,9 $\pm$ 0,09	0,4 $\pm$ 0,02 *	0,5 $\pm$ 0,05 *	19 $\pm$ 1	18 $\pm$ 1	18 $\pm$ 1
glycérol	15 $\pm$ 5	17 $\pm$ 4	15 $\pm$ 5	0,2 $\pm$ 0,02	0,3 $\pm$ 0,04	0,3 $\pm$ 0,04	11 $\pm$ 1	10 $\pm$ 1	12 $\pm$ 1
DHA-Oct	20 $\pm$ 3	70 $\pm$ 15 *	22 $\pm$ 2	0,6 $\pm$ 0,03	0,4 $\pm$ 0,05 *	0,6 $\pm$ 0,05	29 $\pm$ 1	24 $\pm$ 1	29 $\pm$ 1
DHA-Ol	10 $\pm$ 1	30 $\pm$ 6 *	10 $\pm$ 2	0,4 $\pm$ 0,03	0,3 $\pm$ 0,01	0,5 $\pm$ 0,03	25 $\pm$ 1	22 $\pm$ 1	24 $\pm$ 1
LPO							29 $\pm$ 1	26 $\pm$ 2	27 $\pm$ 1

Chapitre III

Résultats et discussion - Tome 2

Effets d'un régime carencé en choline et
méthionine sur la bioénergétique
mitochondriale



III-2. Effets d'un régime carencé en choline et méthionine

Lors de la première étude, nous avons constaté qu'un régime enrichi à 45% (m/m) en lipides, et plus particulièrement en acides gras saturés, n'induisait pas de NASH chez le rat Wistar. Pour la suite de notre travail sur les mécanismes d'adaptations métaboliques et mitochondriales lors d'une NASH, nous avons choisi un modèle largement caractérisé et utilisé dans la littérature: un régime carencé en choline et méthionine ou MCDD pour « Methionine and Choline Deficient Diet ».

1. Introduction

Les pathologies hépatiques non associées à une ingestion d'alcool sont devenues des pathologies communément observées dans les services de gastro-entérologie. Elles sont souvent couplées à un large spectre de modifications morphologiques des foies comme une accumulation lipidique (stéatose), une inflammation, une nécrose et parfois une cirrhose. L'association d'atteintes hépatocytaires et d'inflammation à une stéatose est reconnue sous le nom de stéatohépatite non alcoolique (NASH) (Ludwig, Viggiano et al. 1980). Longtemps considérée comme bénigne, la NASH est maintenant reconnue comme pouvant conduire au développement d'une fibrose, évoluer en cirrhose et aller même chez certains patients jusqu'à des hépatocarcinomes. La NASH est observée le plus souvent lors de cas d'obésité, de diabète de type II, d'hyperlipidémie, mais également lors d'une perte de poids rapide ou d'un court circuit jéjuno-iléal (bypass) (Chitturi and Farrell 2001).

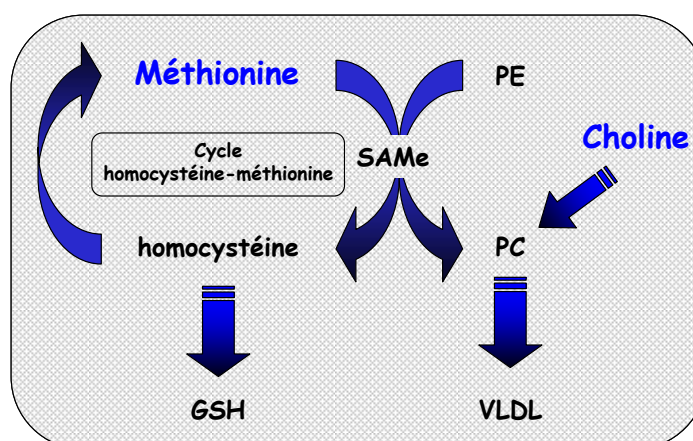
A ce jour, les études menées sur la NASH n'ont pas permis une caractérisation claire des changements physiologiques et des mécanismes moléculaires impliqués dans la transition de stéatose hépatique à stéatohépatite, et cela à cause d'un manque de modèles animaux présentant des caractéristiques identiques à la NASH humaine. Cependant, les études sur animaux ont grandement contribué à la compréhension de la NASH. Bien que plusieurs modèles de stéatose existent (Koteish and Diehl 2001), peu présentent des stéatohépatites (Koteish and Mae Diehl 2002). L'un des modèles le plus communément utilisé est un régime carencé en choline et méthionine (Weltman, Farrell et al. 1996; Kirsch, Clarkson et al. 2003), qui induit une stéatose hépatique, une nécroinflammation, et à long terme de la fibrose.

2. Description du modèle

Les mécanismes biochimiques impliqués dans la mise en place d'une NASH lors d'un régime carencé en choline et méthionine reposent sur le blocage de la synthèse de phosphatidylcholine (PC) (Lombardi, Pani et al. 1968; Ghoshal and Farber 1993). La synthèse de PC peut se faire via deux voies : i) l'incorporation directe de choline dans des composés phosphatidyl et, ii) la méthylation de phosphatidyléanolamine en phosphatidylcholine par la S-adénosyl méthionine (figure III.11).

Ces deux voies sont bloquées par la carence en choline et méthionine. La PC est un composé essentiel des VLDL, qui sont impliquées dans l'exportation des triglycérides du foie. De ce fait une carence en PC aboutit à un défaut d'exportation, et donc à l'accumulation de lipides dans le foie et au développement d'une stéatose. De plus, la carence en méthionine diminue la synthèse de glutathion réduit, ce qui va affaiblir les défenses anti-oxydantes des hépatocytes face aux attaques radicalaires.

Figure III.11 : métabolisme de la choline et de la méthionine



GSH : glutathion réduit ; PE : phosphatidyléanolamine ; PC : phosphatidylcholine ; VLDL : very low density lipoprotein ; S-AMe : S-adénosyl méthionine

Le régime carencé en choline et méthionine induit une diminution de l'exportation des lipides du foie et une diminution des défenses anti-radicalaires aboutissant au développement d'une stéatohépatite.

3. Composition des régimes

Le régime carencé en choline et méthionine provient de chez ICN (960439), et a été largement caractérisé dans la bibliographie (Weltman, Farrell et al. 1996; Leclercq, Farrell et al. 2000 ; George, Pera et al. 2003; Ip, Farrell et al. 2003; Kirsch, Clarkson et al. 2003; Starkel, Sempoux et al. 2003; Rinella and Green 2004). En ce qui concerne le régime

contrôle, et en nous basant sur l'étude réalisée par Kirsch et collaborateurs Kirsch, 2003, nous avons choisi d'utiliser le régime standard habituellement utilisé au sein de notre laboratoire plutôt que le régime MCDD supplémenté en choline et méthionine. En effet, dans cette étude les rats recevant les deux diètes « contrôles » ont montrés un même profil de croissance. La composition des régimes contrôle et MCDD est présentée dans le tableau III.9.

Tableau III.9 : composition des différents régimes alimentaires.

(g/kg)	contrôle	MCDD
kcal/kg	2900	3660
protéines	160	175*
lipides	27	100
carbohydrates	596	655
cellulose	44	30
sels minéraux	50	40
humidité	123	

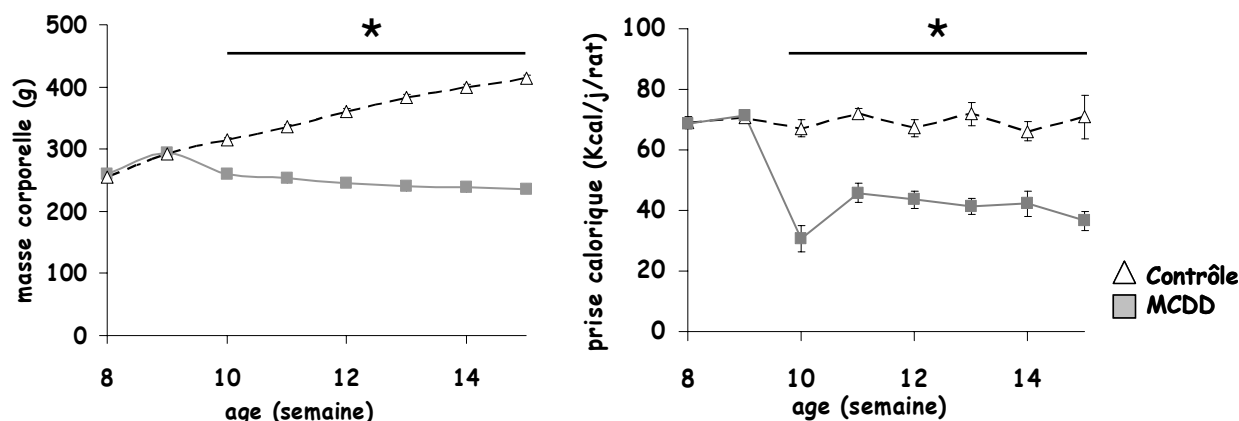
(*: exprimé en acides aminés)

4. Prise de poids et prise calorique

Après 6 semaines de régime, le poids des rats carencés en choline et méthionine est significativement inférieur à celui des rats contrôles (figure III.12). Cela est dû à un arrêt de croissance des rats MCDD dès le début du régime. On observe une perte de poids lors de la première semaine, masse corporelle qui tend ensuite à se stabiliser aux environs de 236 ± 7 g pour les rats MCDD alors que les rats contrôles continus leur croissance pour atteindre 414 ± 5 g environ, à l'âge de 15 semaines.

Une estimation de la prise alimentaire (PA) a également été réalisée. La PA suit le même profil que la prise de poids, avec une diminution de celle-ci la première semaine, qui tend ensuite à se stabiliser à environ 40 kcal/rat/j contre environ 69 kcal/rat/j pour les contrôles (figure III.12). Cependant, lorsque la PA a été exprimée par 100g de masse corporelle, les rats MCDD et contrôles présentent une PA identique (16-17 kcal/100g/jour), signifiant que les rats MCDD ne se trouvent pas en situation de sous-nutrition.

Figure III.12: Evolution de la masse corporelle et de la prise alimentaire des rats soumis à un régime carencé en choline et méthionine pendant 6 semaines.



La masse corporelle (n=38 animaux) et la prise alimentaire (n=5 cages) des rats contrôles et MCDD sont mesurées quotidiennement. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM. Les comparaisons ($p < 0,05$) sont réalisées par un test t non apparié. * : différent du contrôle.

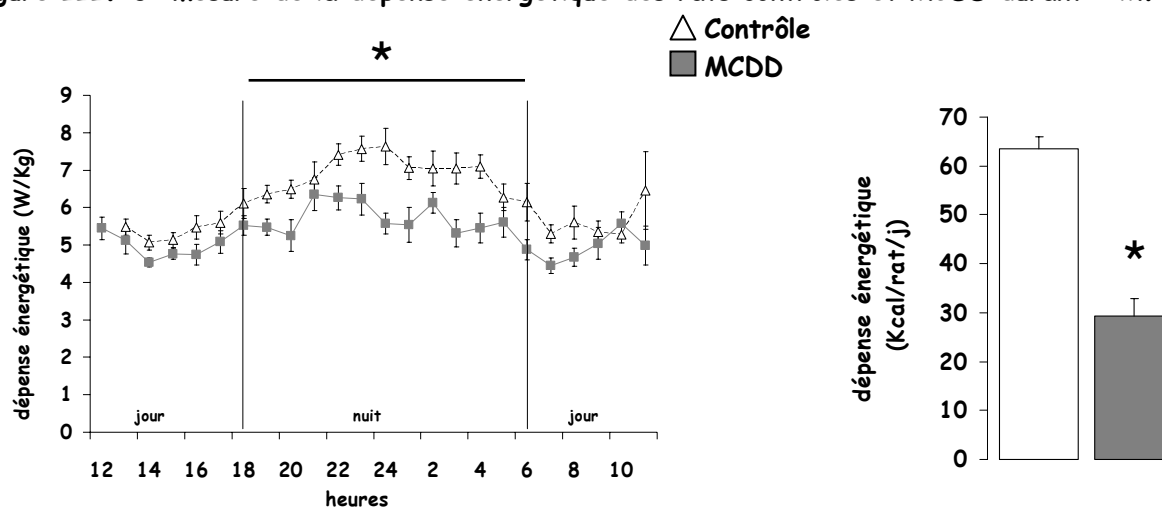
5. Dépense énergétique

Les résultats précédents montrent une perte de poids des rats MCDD en comparaison des rats contrôles. Habituellement cela est associé à un déséquilibre de la balance énergétique. Cependant la PA des rats MCDD, exprimée en kcal/100g/j, est identique à celle des contrôles. Cette différence de poids entre les deux groupes de rats pourrait être expliquée par une différence de la dépense énergétique (DE) des animaux. La DE a été évaluée par calorimétrie indirecte chez les rats contrôles ou MCDD. Les valeurs de dépense énergétique sont présentées dans la figure III.13, et sont rapportées à la masse des rats.

On obtient chez les rats contrôles un profil de dépense énergétique (DE) classiquement observé (Rothwell and Stock 1982; Blanc, Geloën et al. 2001). La DE est en moyenne de $6 \pm 0,1$ W/kg durant la période diurne (figure III.13). Les rats MCDD montrent le même profil de DE que les rats contrôles, mais avec des valeurs nettement inférieures. Pendant la journée, leur DE est en moyenne de $5 \pm 0,1$ W/kg. La période nocturne correspond à la période de prise alimentaire des rats, et s'accompagne d'une augmentation de leur activité (Perrin 2003). Cela est confirmé par une augmentation de la DE classiquement observée chez ces rongeurs (Rothwell and Stock 1982 ; Garait, Couturier et al. 2005). Les rats contrôles augmentent leur DE de 25% pendant cette période ($7 \pm 0,1$ W/kg). Les rats MCDD présentent également une DE supérieure pendant la nuit ($6 \pm 0,1$ W/kg), mais cette augmentation est moindre que celle des contrôles (+16%). Il ressort de ces résultats que les rats MCDD ont une dépense énergétique inférieure à celle des contrôles. Ces résultats sont surprenants. En effet, les rats MCDD présentent une

modification de leur répartition tissulaire (décrit ci-après), en faveur d'une augmentation de leur masse maigre et d'une diminution de leur masse grasse. De plus, ils présentent une masse corporelle inférieure aux contrôles alors que leur PA reste identique (figure III.12). Au vu de ces modifications, on aurait pu penser que leur DE (exprimée par kg) serait augmentée. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer cette DE moindre, i) Les rats MCDD ont une activité moins importante que les rats contrôles, et dépensent donc moins d'énergie ; ii) Leur masse corporelle étant inférieure à celle des contrôles, toute activité devient moins coûteuse; iii) les substrats, et notamment les lipides sont moins oxydés.

Figure III.13: mesure de la dépense énergétique des rats contrôles et MCDD durant 24h.



La dépense énergétique (W/kg ou kcal/rat/j) des rats contrôles et MCDD est mesurée sur 24h. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM, $n=9$. Les comparaisons ($p<0,05$) sont réalisées par un test t non apparié. *: différent du contrôle.

En parallèle, la dépense énergétique journalière en kcal a été calculée (figure III.13). Les rats contrôles ont une DE de 64 ± 2 kcal/rat/j. Cette valeur correspond à la quantité estimée de kcal ingérées par les rats contrôles (69 ± 1 kcal/rat/j ; figure III.12 et tableau III.10). Les rats MCDD, ont, quant à eux, une DE de 29 ± 3 kcal/rat/j, ce qui est nettement inférieure à la quantité de Kcalories ingérées (40 ± 2 kcal/rat/j ; figure III.12 et tableau III.10). De manière générale, les calories ingérées ont plusieurs voies possibles au sein d'un organisme, elles sont soit métabolisées (oxydation des substrats afin de fournir de l'énergie à la cellule), soit stockées au niveau du tissu adipeux (en cas d'excès calorique), soit éliminées dans les fèces. Cet excédant de calories ingérées, par rapport à la DE, nous laisse penser que les rats MCDD devraient augmenter leur mise en réserve et donc leur tissu adipeux, et ce n'est pas le cas, le tissu adipeux étant très nettement diminué chez les rats MCDD. D'autre part, si le métabolisme des substrats était augmenté on aurait dû avoir

une DE augmentée et ce n'est pas ce qui est observé dans cette étude (figure III.13). Par contre, l'hypothèse de « l'excrétion » des calories paraît tout à fait plausible. Le régime MCDD étant enrichi en lipides (10% m/m), et le transport de ceux-ci étant fortement modifié par la carence en choline et méthionine, on peut supposer qu'une certaine quantité de substrats, et notamment de lipides, ne soit pas absorbés au niveau intestinal, et soit éliminée plutôt que métabolisée ou stockée. De plus, les fèces des rats MCDD étaient de texture plus molle que celles des contrôles et également de couleur beaucoup plus claire. On peut donc émettre l'hypothèse que cette différence entre les calories ingérées et celles dépensées, est due, au moins en partie, à une élimination des substrats et notamment des lipides, par la voie fécale.

6. Répartition tissulaire

Tableau III.10: caractéristiques physiologiques des rats carencés en choline et méthionine après 6 semaines de régime.

	Contrôle	MCDD	
Prise calorique (kcal/j/rat)	69 ± 1	40 ± 2	*
Prise calorique (kcal/j/100g)	17 ± 1	16 ± 1	
Masse corporelle (g)	450 ± 7	230 ± 4	*
Foie (g/100g)	3,4 ± 0,1	4,5 ± 0,2	*
Soléaire (mg/100g)	39,0 ± 0,1	50,0 ± 0,1	*
Plantaris (mg/100g)	85,0 ± 0,2	94,0 ± 0,1	*
EDL (mg/100g)	45,0 ± 0,1	51,0 ± 0,1	*
Tissu adipeux blanc (g/100g)	3,5 ± 0,2	1,4 ± 0,1	*
épididymal	1,90 ± 0,11	0,79 ± 0,05	*
rétropéritonéal	1,60 ± 0,13	0,64 ± 0,05	*
Tissu adipeux brun (mg/100g)	80 ± 1	110 ± 1	*
Triglycérides (μmol/g) foie	6 ± 1	385 ± 29	*
soléaire	2,5 ± 0,2	0,6 ± 0,2	*

Les mesures de prise calorique représentent une estimation de l'ingestion journalière par rat (kcal_{total}/4). Les masses sont exprimées pour 100g de masse corporelle (masse relative). Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM, n=12. Les comparaisons (p<0,05) sont réalisées par un test *t* non apparié. *: différent du contrôle.

Les différents tissus et organes ont été prélevés et pesés afin de mieux comprendre la différence de poids entre les deux groupes de rats (tableau III.10). Les rats MCDD étant nettement plus maigres que les contrôles, les masses tissulaires sont exprimées pour 100g

de masse corporelle, afin de permettre une comparaison entre les groupes. Les rats MCDD présentent une masse de tissu adipeux blanc extrêmement diminuée (-60%) en comparaison aux contrôles. Cette réduction de masse est observée sur les deux tissus adipeux blancs prélevés, le tissu épидидymal (-59%) et le rétro-péritonéal (-60%). Cela est accompagné d'une augmentation de 34% de la masse du foie des rats MCDD (tableau III.10). Les masses des muscles des pattes postérieures sont également augmentées par rapport à celles des rats contrôles (soléaire +28%; plantaire +10%; EDL +13%), et présentent une diminution de leur contenu en triglycérides. Le tissu adipeux brun présente également une masse nettement supérieure (+37%).

Les six semaines de régime carencé en choline et méthionine ont largement affecté la répartition des lipides au sein de l'organisme des rats. En effet, les dépôts de graisse périphériques (tissus adipeux et muscle) ont diminués alors que le contenu en triglycérides hépatique a largement augmenté (X74; $p < 0,001$). Les lipides ne sont pas exportés du foie vers les autres organes, en raison d'un défaut de transport dû à la carence en choline.

7. Données plasmatiques

Du sang a été prélevé et des dosages de métabolites et d'hormones ont été réalisés avec du plasma de rats contrôles ou MCDD (tableau III.11). Le sang provient soit de rats mis à jeun depuis 24h (groupe à jeun), soit de rats ayant accès à la nourriture jusqu'au début de l'expérimentation (groupe nourri). Cependant, l'heure de la dernière prise de nourriture de ce groupe n'a pas été déterminée avec exactitude. Les rats sont euthanasiés vers 9h du matin, ils sont donc dans un état entre le post-prandial et le post-absorptif sachant que la lumière de l'animalerie s'allume à 6h le matin.

Les rats MCDD ont une glycémie à jeun plus faible que les contrôles ($5,1 \pm 0,2$ vs. $7,1 \pm 0,3$ mM), ainsi qu'une insulïnémie diminuée (20 ± 4 vs. 65 ± 1 pM) (tableau III.11). A l'état nourri, les rats contrôles ont une glycémie identique à celle mesurée après 24h de jeûne, alors que leur insulïnémie est nettement augmentée. Cela est étonnant, on aurait pu s'attendre à une augmentation de la glycémie, en parallèle de l'insulïnémie, due à la prise alimentaire récente des rats. Plusieurs facteurs peuvent expliquer cela. Premièrement, si on se base sur le postulat que les rats ont une prise alimentaire uniquement pendant la période nocturne, cela fait au moins 3h que les animaux sont passés en période diurne et ont cessé de manger au moment du sacrifice. On peut donc supposer que le pic de glycémie qui arrive rapidement après un repas est déjà revenu à un niveau basal, alors que le pic d'insuline, qui

diminue plus lentement, est, quand à lui, toujours visible. L'autre facteur pouvant expliquer l'absence de différence de glycémie est le mode de sacrifice des animaux. En effet, pour des raisons expérimentales, les animaux à jeun sont anesthésiés avec du thiopental sodique au moment du sacrifice, alors que ceux nourris ne le sont pas. Or il a été démontré un effet hyperglycémiant de certains anesthésiques de la famille des barbituriques, comme le pentobarbital (Penicaud, Ferre et al. 1987), famille à laquelle appartient le thiopental. Ces deux facteurs pourraient expliquer le fait que les rats contrôles aient une glycémie identique dans les deux conditions nutritionnelles. Les rats MCDD, quant à eux, ont une glycémie augmentée à l'état nourri par rapport au jeûne. Cependant leur glycémie reste significativement inférieure à celle mesurée chez les contrôles. Ce qui signifie, si on tient compte des facteurs décrits précédemment, que la différence de glycémie, entre l'état nourri et à jeun, observée chez le groupe de rats MCDD est en réalité plus importante. De la même manière, l'insulinémie des rats MCDD est augmentée à l'état nourri, mais reste inférieure à celle mesurée chez les rats contrôles.

Tableau III.11: caractéristiques plasmatiques des rats carencés en choline et méthionine après 6 semaines de régime.

	contrôle			MCDD			
	à jeun	nourri		à jeun	nourri		
glycémie (mM)	7,1 ± 0,3	7,4 ± 0,2		5,1 ± 0,2	*	6,2 ± 0,2	*£
insulinémie (pM)	65 ± 1	234 ± 3	£	20 ± 4	*	86 ± 3	*£
index HOMA	4,0 ± 1,6			1,0 ± 0,2			0,056
C° plasmatique (mM)							
TG	0,70 ± 0,05	2,00 ± 0,20	£	0,30 ± 0,02	*	0,30 ± 0,01	*
AGNE	1,30 ± 0,07	0,85 ± 0,09	£	0,53 ± 0,05	*	0,57 ± 0,03	*
glycérol	0,40 ± 0,02	0,36 ± 0,03		0,28 ± 0,04	*	0,26 ± 0,01	*
ALT (U/L)	22 ± 1			71 ± 6			*
AST (U/L)	28 ± 3			41 ± 3			*

TG, triglycérides ; AGNE, acides gras non estérifiés ; ALT, alanine aminotransférase ; AST, aspartate aminotransférase. Les mesures sont réalisées avec des plasmas congelés. L'index HOMA [(insuline μ U/mL X glucose mmol/L)/22,5] est calculé à partir de plasma de rats à jeun (n=6). Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM, n=12. Les comparaisons (p<0,05) sont réalisées par un test t non apparié. * significativement différent des contrôles ; £ significativement différent des « à jeun ».

Il apparaît ici que les rats MCDD ont une glycémie et une insulémie inférieures à celles des contrôles. Plusieurs facteurs pourraient être impliqués : i) une diminution de l'absorption intestinale, limitant ainsi l'apport glucidique au niveau sanguin, ii) une diminution de la stimulation de la production de glucose (glucagon, catécholamines corticostéroïdes) ou iii) une diminution de la néoglucogenèse hépatique. Les deux premiers facteurs n'ont pas été évalués, en revanche la néoglucogenèse hépatique a été mesurée, et sera présentée plus loin dans le manuscrit, avec l'ensemble de l'étude du métabolisme hépatique (III. R&D - Tome 4).

Cette diminution de la glycémie chez les rats MCDD semble donc expliquer la faible concentration d'insuline mesurée au niveau sanguin. En effet, le principal facteur contrôlant la sécrétion d'insuline est la concentration plasmatique de glucose. Son augmentation, comme après un repas, agit sur les cellules β des îlots de Langerhans pour stimuler la sécrétion d'insuline, alors que sa diminution lors du jeûne inhibe la sécrétion d'insuline. Ainsi, chez nos rats MCDD, la faible concentration d'insuline plasmatique est due à la faible glycémie des animaux. Cela est confirmé par le fait que, dans les conditions « nourri », l'augmentation de glucose plasmatique des rats MCDD, est accompagnée d'une augmentation de l'insuline. Un défaut de sécrétion d'insuline n'est donc pas responsable de la faible insulémie observée chez les rats MCDD, puisque celle-ci est stimulable en condition post-prandiale.

L'index HOMA, qui est le reflet de la sensibilité à l'insuline, a également été calculé. Cet index est nettement diminué chez les rats MCDD ($1,0 \pm 0,2$ vs. $4,0 \pm 1,6$) en comparaison aux rats contrôles, indiquant une très bonne sensibilité à l'insuline de ces rats. Cela est en accord avec les données de la littérature. Des souris et des rats nourris avec un régime MCD ont subi des tests de tolérance au glucose et à l'insuline, et leur sensibilité à l'insuline a été estimée avec un autre test de sensibilité à l'insuline, le test QUICKI (Rinella and Green 2004; Tahan, Yavuz et al. 2004). Aucune de ces études, n'a mis en évidence une perte de sensibilité à l'insuline chez ces animaux.

Le profil lipidique plasmatique a également été réalisé, avec le dosage des triglycérides (TG), des acides gras non estérifiés (AGNE) et du glycérol. Dans des conditions de jeûne, on observe dans le plasma des rats contrôles des concentrations en AGNE de 1,3 mM, et des concentrations en TG et glycérol plus faible (0,7 et 0,4 mM respectivement) (tableau III.11). Cela a tendance à s'inverser à l'état nourri. Une augmentation significative des TG est observée, alors que les AGNE sont quant à eux diminués. L'influence du statut nutritionnel sur les composés lipidiques plasmatiques est classiquement décrite dans la littérature (Frayn 1998). Lorsque l'animal est à jeun, les TG, principalement stockés au niveau du tissu adipeux, vont être hydrolysés en AGNE et glycérol. Ils sont ensuite relargués dans la circulation sanguine pour être délivrés comme substrats énergétiques aux autres

tissus, comme les muscles squelettiques et le foie. A l'inverse, en condition post-prandiale, les lipides provenant de l'alimentation et de la lipogenèse hépatique, vont être transportés dans le sang sous forme de TG pour être stockés au niveau du tissu adipeux blanc. En parallèle, la sécrétion d'insuline, consécutive au repas, va inhiber la lipolyse du tissu adipeux blanc, diminuant la libération d'AGNE et de glycérol dans le sang. Chez les rats MCDD, le statut nutritionnel n'a aucun effet sur le profil lipidique plasmatique. En effet, les valeurs sont du même ordre de grandeur entre les rats à jeun et nourris, que se soit pour les TG, les AGNE ou le glycérol. Il faut également noter que ces valeurs sont significativement inférieures à celle obtenues chez les rats contrôles à jeun, montrant ici la faible disponibilité et mobilisation, au niveau sanguin, des stocks lipidiques lors de situation de besoin (jeûne).

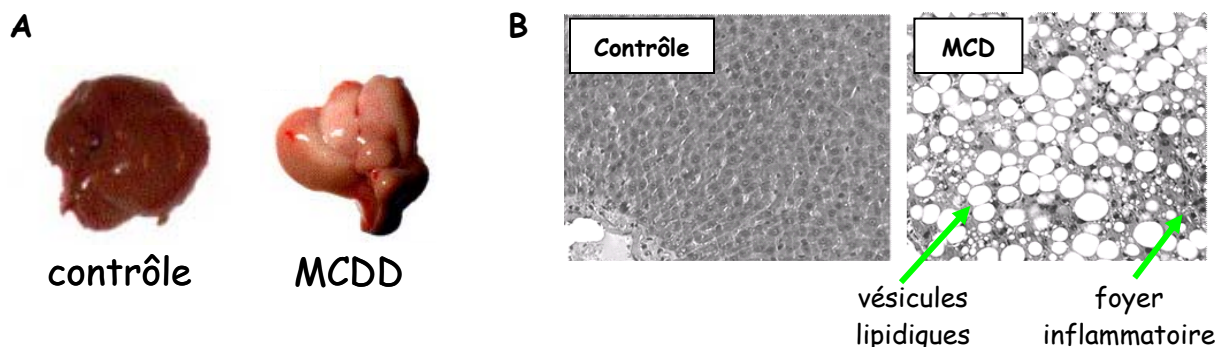
Enfin, les activités des transaminases ont également été mesurées dans le plasma des deux groupes de rats. Les transaminases (l'aspartate aminotransférase ou AST « ex SGOT » et l'alanine aminotransférase ou ALT « ex SGPT ») sont des indicateurs sensibles d'atteintes hépatocytaires. Ce sont des enzymes normalement présentes dans le sérum à une faible concentration, mais lors de cytolysse, elles se retrouvent en grande quantité dans le sérum. L'AST est retrouvée à des concentrations élevées dans les cellules du foie. L'ALT est localisée uniquement dans le cytosol, sa concentration dans les tissus non hépatiques est très faible, elle est dans ces cas confinée au cytoplasme. La forte élévation de sa concentration sérique est relativement spécifique d'une atteinte de l'hépatocyte. ALT et AST sont deux enzymes libérées en cas de lésions cellulaires en rapport avec une augmentation de la perméabilité de la membrane cellulaire ou d'une nécrose cellulaire. L'ALT tend à augmenter ou chuter de façon parallèle à l'AST, mais la libération de l'AST mitochondriale à partir de l'hépatocyte est supposée impliquée dans des lésions cellulaires plus sévères que la libération de l'isoenzyme cytoplasmique ou de l'ALT. Les nombreuses études réalisées avec des rats et souris recevant un régime MCD ont montré une nette augmentation de la concentration sérique de transaminases. (Rao, Papreddy et al. 2002; George, Pera et al. 2003; Kirsch, Clarkson et al. 2003; Kashireddy and Rao 2004; Assy, Grozovski et al. 2006). Comme attendu, l'ALT et l'AST sont également significativement augmentées chez les rats MCDD de notre étude (X3,2 et X1,5 respectivement). Cette augmentation nous confirme la présence de dommages cellulaires hépatiques dus au régime. Ces dommages en association avec la stéatose et les facteurs d'inflammation, nous confirment la présence de NASH dans le foie des rats MCDD.

8. Données hépatiques

Lors d'une première observation, à l'échelle macroscopique, le foie des rats MCDD apparaît pâle et gras en comparaison avec les rats contrôles (figure III.14A). L'examen

histologique révèle une stéatose macrovésiculaire sévère dans les hépatocytes de rats MCDD affectant plus de 60% des cellules (figure III.14B). La nécrose n'est que faiblement observée et aucune fibrose n'a été détectée.

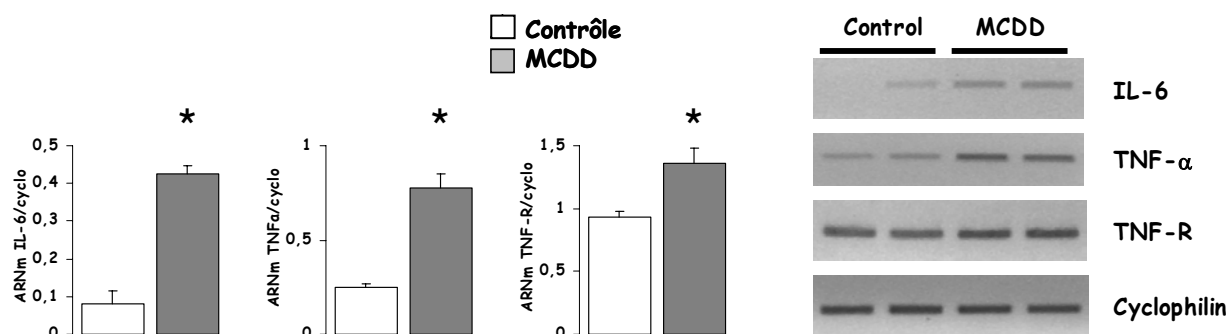
Figure III.14: coupe histologique de foie de rat contrôle et MCDD.



Observation macroscopique (A) et microscopique (B) des foies de rats contrôles et MCDD. Les échantillons de foie sont marqués avec de l'hématoxyline et de l'éosine (grossissement X10).

L'analyse histologique nous confirme la forte accumulation de lipides hépatiques, que nous avons constaté lors du dosage de triglycérides (tableau III.10), et la présence de foyers inflammatoires. Une étude par RT-PCR semi quantitative a également été menée au niveau hépatique, sur différents gènes connus pour être surexprimés lors de phénomènes inflammatoires (Tilg and Diehl 2000; Crespo, Cayon et al. 2001 ; Starkel, Sempoux et al. 2003 ; Nagasawa, Inada et al. 2006).

Figure III.15 : Expression des gènes marqueurs de l'inflammation dans le foie de rats contrôles et MCDD.



L'expression des gènes pour IL-6, TNF- α et le récepteur au TNF dans le foie a été réalisée par RT-PCR à partir de primers spécifiques. La cyclophiline est utilisée comme gène de référence. L'analyse a été réalisée avec 5 rats dans chaque groupe. Les comparaisons ($p < 0,05$) sont réalisées par un test t non apparié. * significativement différent des contrôles

La figure III.15 présente l'abondance relative de l'ARNm codant pour les gènes de l'interleukine 6 (IL-6), du TNF- α (tumor necrosis factor α) et du récepteur au TNF- α (TNF-R).

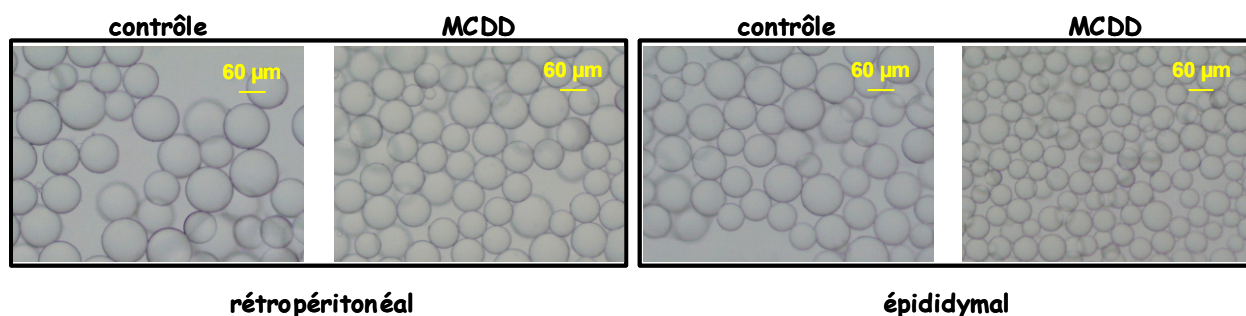
Les ARNm de ces trois gènes sont largement augmentés dans le foie des rats MCDD (+437%, +212%, +46% respectivement, $p < 0,01$), démontrant ainsi la présence d'un phénomène inflammatoire dans les foies des rats MCDD. En effet, le TNF- α et l'IL-6 sont reconnus comme étant des cytokines pro-inflammatoires et pro-fibrotiques (Starkel, Sempoux et al. 2003; Dela Pena, Leclercq et al. 2005). Elles sont libérées par les cellules de Kupffer en réponse à un stress cellulaire et sont impliquées dans l'activation des cellules étoilées hépatiques (Tilg and Diehl 2000; Vrba and Modriansky 2002). L'activation de ces cellules joue un rôle important dans la fibrogenèse et dans le développement de pathologies hépatiques, dont la stéatohépatite (Diehl 2002).

Les rats MCDD développent une NASH caractérisée par une stéatose massive et des foyers inflammatoires au niveau hépatique.

9. Morphologie des adipocytes isolés

La carence en choline et méthionine inhibant les systèmes de transport des lipides du foie vers le tissu adipeux, la masse de celui-ci est largement diminuée ($1,4 \pm 0,1$ vs. $3,5 \pm 0,2$ g/100g). Afin de rechercher les facteurs impliqués dans cette modification de masse adipeuse, des adipocytes ont été isolés à partir des tissus adipeux rétropéritonéal et épидидymal des rats contrôles et MCDD, et leur taille a été évaluée.

Figure III.16: Observation microscopique des adipocytes épидидymaux et rétropéritonéaux de rats contrôle et MCDD après 6 semaines de régime.



Les adipocytes des groupes contrôles et MCDD sont observés sous microscope et mesurés à l'aide d'un micromètre intégré.

Ces cellules sont observées au microscope optique (figure III.16) afin de mesurer leur diamètre et de calculer leur volume (tableau III.12). Les adipocytes rétropéritonéaux ont un diamètre supérieur à celui des adipocytes du tissu épидидymal, et cela chez les deux groupes de rats (tableau III.12). De plus, il apparaît que les adipocytes de rats MCDD ont un

diamètre, et donc un volume inférieur aux rats contrôles, et cela quel que soit le type de tissu adipeux. Cela est tout à fait en accord avec une large diminution du stockage de lipides sous forme de triglycérides, et cela du fait d'un défaut d'exportation des triglycérides caractéristique du régime MCDD.

Tableau III.12: Détermination de la taille des adipocytes de tissu adipeux épидидymal et rétropéritonéal de rats MCDD.

	Diamètre (μm)			Volume (mm^3)		
	contrôle	MCDD		contrôle	MCDD	
rétropéritonéal	104 $\pm$ 3	76 $\pm$ 10	P=0,054	597 $\pm$ 56	265 $\pm$ 98	*
épididymal	75 $\pm$ 7	56 $\pm$ 1	*	243 $\pm$ 61	93 $\pm$ 3	*

Le diamètre des cellules des groupes contrôles et MCDD est mesuré sous microscope, permettant ainsi le calcul du volume de chaque adipocyte. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM, n=4. * significativement différent des contrôles (p<0,05).

Les rats MCDD ont une diminution de leur masse adipeuse qui résulte d'une diminution de la taille des adipocytes la constituant, exprimant une absence de stockage des lipides sous forme de TG au sein de ce tissu. Cela est dû à un défaut d'exportation des lipides, sous forme de VLDL, du foie vers les autres tissus (tissus adipeux blanc, muscle).

10. Oxydation phosphorylante mitochondriale

10.1 Paramètres de l'oxydation phosphorylante

Afin d'étudier les modifications du métabolisme énergétique des cellules hépatiques lors de la mise en place d'une NASH, les paramètres de l'oxydation phosphorylante de mitochondries isolées de foies de rats contrôles ou MCDD ont été mesurés et sont présentés dans la tableau III.13. Nous avons utilisé des substrats différents pour effectuer ces mesures. Tout d'abord du glutamate/malate, qui fournit la mitochondrie en NADH et donc alimenter le complexe I de la chaîne respiratoire, et du succinate/malate, qui fournit du FADH₂ au complexe II. Ces expériences ont été réalisées en absence et en présence de sérum albumine bovine (BSA) afin de discriminer un rôle potentiel des acides gras libres sur le fonctionnement mitochondrial. Une titration de BSA a été effectuée afin de déterminer la concentration nécessaire pour chélater les acides gras présents dans le milieu d'incubation. Elle a été déterminée à 3 mg/mL (0,3% m/v).

En absence de BSA dans le milieu respiratoire, nous observons une respiration nettement plus forte chez les deux groupes de mitochondries, et cela quel que soit le substrats et l'état respiratoire étudié. De plus, comme classiquement décrit, la respiration est supérieure en présence de succinate/malate, qu'en présence de glutamate/malate. Le glutamate fourni du NADH qui est oxydé au niveau du complexe I, tandis que le succinate fourni du FADH₂ qui entre au niveau du complexe II, court-circuitant ainsi le complexe I. De ce fait, en comparaison à l'utilisation du NADH, le nombre de protons expulsés lorsque la chaîne respiratoire oxyde du FADH₂ est plus faible pour une même quantité d'oxygène consommé. De manière simplifiée, la mitochondrie doit respirer plus vite avec du succinate, pour maintenir un même gradient de protons de part et d'autre de la membrane interne qu'avec du glutamate.

Tableau III.13 : Respiration (JO_2) des mitochondries de foie provenant de rats contrôles ou MCDD

JO_2 (natomO/min/mg prot) avec succinate/malate						
- BSA			+ BSA			
	état non phosphorylant	état 4	état 3	état non phosphorylant	état 4	état 3
contrôle	41 ± 3	36 ± 4	108 ± 11	25 ± 1	22 ± 1	137 ± 5
MCDD	62 ± 3	52 ± 3	192 ± 12	37 ± 2	32 ± 2	203 ± 12
	*	*	*	*	*	*

JO_2 (natomO/min/mg prot) avec glutamate/malate						
- BSA			+ BSA			
	état non phosphorylant	état 4	état 3	état non phosphorylant	état 4	état 3
contrôle	24 ± 1	17 ± 1	83 ± 7	13 ± 1	9 ± 1	75 ± 7
MCDD	28 ± 2	22 ± 2	121 ± 9	17 ± 1	14 ± 1	108 ± 9
	*	*	*	*	*	*

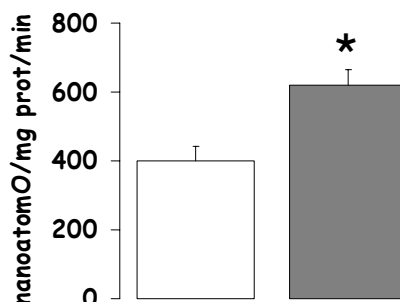
Les mitochondries de foies de rats (1 mg/ml) contrôles ou MCDD ont été incubées dans un milieu KCl ± BSA (0,3% final) à 37°C, en présence de 5/0,5 mM succ/mal plus 1,25 µM roténone ou 5/1,25 mM de glut/mal. La consommation d'oxygène est mesurée par oxygraphie. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM ; n=13. Les comparaisons (p<0,05) sont réalisées par un test *t* non apparié. *: différent du contrôle .

Les mitochondries de rats MCDD sont dans un environnement extrêmement riche en lipides. Or, les acides gras sont considérés comme un découplant naturel de l'oxydation phosphorylante. En effet, il a été démontré que l'ajout d'acides gras sur des mitochondries

provoque un léger découplage, induisant une diminution du potentiel de membrane, une augmentation de la respiration à l'état non phosphorylant, et une diminution du rapport ADP/O (Polcic, Sabova et al. 1997; Korshunov, Korkina et al. 1998 ; Samartsev, Simonyan et al. 2000; Popova, Bodrova et al. 2004; Di Paola and Lorusso 2006). De plus, les acides gras présents dans le milieu peuvent être utilisés comme substrats par les mitochondries, augmentant d'autant leur fourniture en équivalent réduits, induisant ainsi une stimulation de la respiration. Afin de pallier à cette différence, de la BSA (0,3% final) est ajoutée afin de chélater les lipides. Comme attendu, en présence de BSA, les respirations des deux groupes de rats sont nettement plus faibles en conditions non phosphorylantes. Cependant les mêmes différences sont toujours observées entre les deux groupes de mitochondries. En présence de succinate/malate ou glutamate/malate, la respiration à l'état non phosphorylant des mitochondries de rats MCDD est significativement plus forte (+48% et +30% respectivement) que celle des rats contrôles. Cette différence persiste en état 4, après addition d'oligomycine (inhibiteur de l'ATP synthase) (+45 et 55%). La respiration à l'état 4 est contrôlée principalement par les pertes d'énergie (*proton leak*, *redox slipping* et activités ATPasiques contaminantes) et dans une moindre mesure par la chaîne respiratoire et les transporteurs de substrats (Pietrobon, Zoratti et al. 1983; Brand 1990). La stimulation de la vitesse de respiration à l'état non phosphorylant peut donc être imputée au moins à deux phénomènes : (i) la contamination par une activité ATPasique importante et (ii) une modification des propriétés intrinsèques (augmentation des pertes énergétiques) des mitochondries. Après addition d'oligomycine, la vitesse de respiration des mitochondries de rats MCDD reste supérieure à celle des mitochondries de rats contrôles, or l'oligomycine inhibe les activités ATPasiques contaminantes de sorte que la différence de respiration observée à l'état 4 n'est pas liée à une différence d'activité ATPasique. Nos résultats suggèrent donc que la différence de respiration à l'état 4 est le fait d'une modification des propriétés intrinsèques des mitochondries. Deux mécanismes pourraient être impliqués dans ces modifications, un *proton leak* et/ou un *redox slipping*.

En présence de BSA, la respiration en état 3, est augmentée en présence de succinate/malate et diminuée en présence de glutamate/malate. Mais quel que soit l'effet de la BSA sur la respiration à l'état 3, on observe toujours une respiration supérieure chez les mitochondries de rats MCDD en comparaison avec les contrôles (+45%) (tableau III.13). Ces résultats nous laissent supposer une augmentation de la quantité de chaîne respiratoire, ou tout du moins de la cytochrome c oxydase, dans le groupe MCDD.

Figure III.17 : Activité maximale de la cytochrome *c* oxydase des mitochondries de foies provenant de rats contrôles ou MCDD



Les mitochondries de foie de rats (1 mg/ml) contrôle (blanc) ou MCDD (gris) ont été incubées dans un milieu KCl + BSA (0,3% final) à 37°C, supplémenté avec 1 mM TMPD plus 5 mM d'ascorbate plus 3,6 μ M de myxotiazol plus 75 μ M de DNP. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM ; n=6 ; Les comparaisons ($p < 0,05$) sont réalisées par un test *t* non apparié. *: différent du contrôle.

Le TMPD/ascorbate est un couple donneur/accepteur d'électrons au niveau de la cytochrome *c* oxydase (COX), dernier complexe de la chaîne respiratoire. La respiration découplée avec ce substrat permet donc d'évaluer la vitesse maximale de la COX. La respiration des mitochondries des rats MCDD en présence de TMPD/ascorbate est supérieure (+54%) à celle des contrôles (figure III.17). Une augmentation de la quantité de COX pourrait donc expliquer l'augmentation de la respiration en état 3 observée chez les mitochondries MCDD.

La COX est composée de deux hèmes, *a* et *a*₃. Au vu de l'augmentation de 54% de son activité, et afin de vérifier notre hypothèse, la quantité de COX a été évaluée en mesurant le contenu en cytochromes des mitochondries de rats contrôles et MCDD (tableau III.14).

Tableau III.14: contenu en cytochromes des mitochondries de foie de rats contrôles ou MCDD

	Contenu en cytochromes (pmol/mg protéines)		
	<i>a</i> + <i>a</i> ₃	<i>b</i>	<i>c</i> + <i>c</i> ₁
contrôle	53 $\pm$ 8	99 $\pm$ 13	153 $\pm$ 12
MCDD	80 $\pm$ 8	94 $\pm$ 12	212 $\pm$ 15
	*		*

Le contenu en cytochromes des mitochondries est déterminé par spectrophotométrie, en étudiant la différence de densité optique entre les spectres réduit/ oxydé, entre 540nm et 630 nm selon les cytochromes. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM, n=9 ; Les comparaisons ($p < 0,05$) sont réalisées par un test *t* non apparié. * vs. contrôle.

Les rats carencés en choline et méthionine ont une augmentation du contenu en cytochrome aa_3 et cc_1 des mitochondries tandis que le cytochrome b est inchangé. Ainsi, une augmentation de 51% du contenu en cytochromes aa_3 s'accompagne d'une augmentation de 54% de l'activité de la COX.

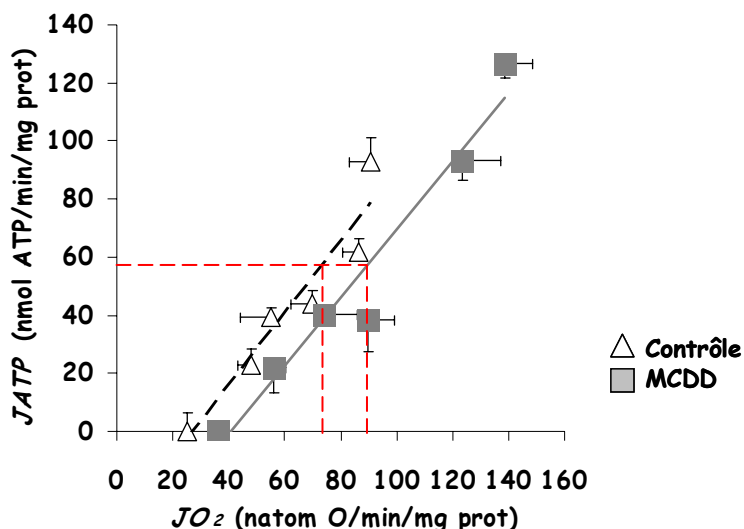
Le régime carencé en choline et méthionine induit une augmentation de la respiration mitochondriale. Cette consommation d'oxygène accrue en condition non phosphorylante semble due à une augmentation des pertes énergétiques. Alors que l'augmentation de la respiration en condition phosphorylante semble due à une augmentation de la quantité et de l'activité de la cytochrome c oxydase.

10.2 Efficacité de la synthèse d'ATP

Afin d'étudier les conséquences des pertes énergétiques sur l'efficacité de l'oxydation phosphorylante, nous avons évalué le rapport ATP/O. Celui-ci correspond au rapport entre le flux de synthèse d'ATP et celui de consommation d'oxygène. Il apprécie l'efficacité avec laquelle l'énergie provenant de l'oxydation des substrats est convertie en énergie permettant la synthèse d'ATP. En pratique, il faut donc mesurer simultanément les deux flux. Cependant, en état 3, l'efficacité de l'oxydation phosphorylante est mesurée dans des conditions éloignées de celles qui existent dans une cellule intacte, car des concentrations saturantes en substrats respiratoires et en ADP sont nécessaires.

Pour palier à ce désavantage, nous avons établi la relation entre synthèse d'ATP et flux respiratoire dans une situation où le niveau d'oxydation phosphorylante est modulé par des changements de *turnover* de l'ADP induits par des additions croissantes d'hexokinase en présence de glucose. Cette méthode consiste à régénérer des petites concentrations d'ADP en transformant du glucose en glucose-6-phosphate en présence d'hexokinase et d'ATP. La titration est effectuée en variant les concentrations d'hexokinase, ce qui revient à titrer la quantité d'ADP apportée, donc le travail à effectuer (Fontaine 1995). Nous avons mesuré la production d'ATP en présence de succinate/malate.

Figure III.18: Effet d'une carence en choline et méthionine sur la relation entre la synthèse d'ATP (J_{ATP}) et la consommation d'oxygène (JO_2) de mitochondries isolées.



Les mitochondries de foies de rats (1 mg/ml) contrôle ou MCDD ont été incubées dans un milieu KCl + BSA (0,3% final) à 37°C, en présence de 5/0,5mM succ/mal, 1,25µM de roténone, 20mM de glucose, 125µM d'ATP et 1mM de $MgCl_2$. La synthèse d'ATP est modulée par différentes concentrations d'hexokinase (0,2-2 U/mL). Le flux de synthèse d'ATP est calculé à partir du dosage enzymatique du glucose-6-phosphate. La consommation d'oxygène est mesurée par oxygraphie. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM. n=8.

La figure III.18 montre que les relations entre synthèse d'ATP et consommation d'oxygène des deux groupes sont linéaires et parallèles, le groupe MCDD étant décalé vers la droite. Cela signifie que pour synthétiser une même quantité d'ATP, les mitochondries de rats MCDD consomment plus d'oxygène que les mitochondries contrôles. Les rats MCDD ont un rendement mitochondriale moindre que les rats contrôles. De plus, on constate que les capacités de synthèse d'ATP sont supérieures chez les mitochondries MCDD par rapport aux contrôles, comme nous le montre la partie haute de la droite qui correspond à la plus forte concentration d'ADP (état 3). Des études menées sur des rats de statuts thyroïdiens différents, connus pour moduler la quantité de COX, ont montré qu'une augmentation de la respiration à l'état 3 était associée à une augmentation de la quantité de cytochrome aa_3 , et inversement (Paradies, Ruggiero et al. 1993; Nogueira, Rigoulet et al. 2001). De plus, Nogueira et collaborateurs ont démontré que la quantité de cytochrome aa_3 était également corrélée à la synthèse d'ATP (Nogueira, Walter et al. 2002). En effet, des rats hyperthyroïdiens présentent une augmentation de leur contenu en cytochrome aa_3 , de leur respiration à l'état 3, ainsi que de leur capacité de synthèse d'ATP. A l'opposé, les rats hypothyroïdiens, qui ont un contenu en cytochrome aa_3 diminué, ont une respiration et une synthèse d'ATP inférieures aux contrôles. Ces résultats montrent donc que l'état 3 et la capacité de synthèse d'ATP des mitochondries de foie, sont fonction, en partie au moins, de la quantité de COX.

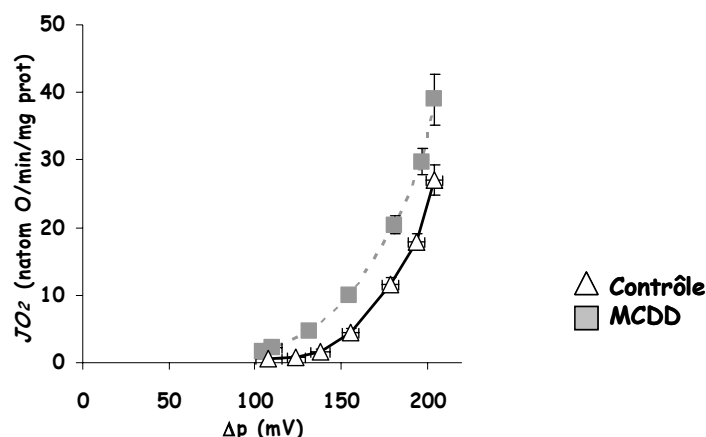
Cela est en accord avec nos propres résultats. La capacité accrue de synthèse d'ATP des mitochondries de rats MCDD observée sur la figure III.18, pourrait donc être expliquée par l'augmentation du contenu en cytochrome aa_3 mesurée dans ce groupe.

10.3 Mécanismes de découplage de la chaîne respiratoire

Nous avons exploré encore plus en avant les mécanismes impliqués dans les pertes énergétiques observées avec les mitochondries de rats MCDD en état non phosphorylant. En présence de succinate et d'oligomycine, la respiration a été titrée avec du malonate, un inhibiteur de la succinate déshydrogénase (figure III.19). Dans ces conditions non phosphorylantes, l'efflux de protons catalysé par la chaîne respiratoire est égal à leur influx dans la matrice mitochondriale dû au *proton leak* à travers la membrane mitochondriale interne (Brand 1990; Brand 1990; Brand, Chien et al. 1994; Brand, Chien et al. 1994) et/ou au changement d'efficacité de la chaîne respiratoire (*slipping* des pompes à protons) (Pietrobon, Azzone et al. 1981; Murphy and Brand 1987; Papa, Capitanio et al. 1991; Fontaine, Devin et al. 1997). Nous avons ainsi décrit une relation non-linéaire appelée courbe de « Nicholls » (Nicholls 1974). La courbe expérimentale peut être divisée en deux parties distinctes : ohmique pour de faibles valeurs de force protonmotrice et non-ohmique pour de fortes valeurs.

La courbe des mitochondries de rats MCDD est décalée vers la gauche, et sa partie non ohmique (supérieure) est augmentée. Ainsi dans cette zone, les rats MCDD ont une force protonmotrice identique aux contrôles pour une respiration plus élevée. Ils doivent donc respirer plus que les mitochondries contrôles pour maintenir une même force protonmotrice. Ceci suggère que le régime carencé augmente les pertes énergétiques au niveau de la chaîne respiratoire. Deux phénomènes peuvent être responsable de ces pertes énergétiques, i) le *proton leak* (Brand 1990; Brand 1990; Brand, Chien et al. 1994; Brand, Chien et al. 1994) et/ou ii) le *redox slipping* (Pietrobon, Azzone et al. 1981; Murphy and Brand 1987; Papa, Capitanio et al. 1991; Fontaine, Devin et al. 1997).

Figure III.19 : Effet du régime MCD sur la relation entre consommation d'oxygène (JO_2) et force protonmotrice force (Δp) de mitochondries isolées.



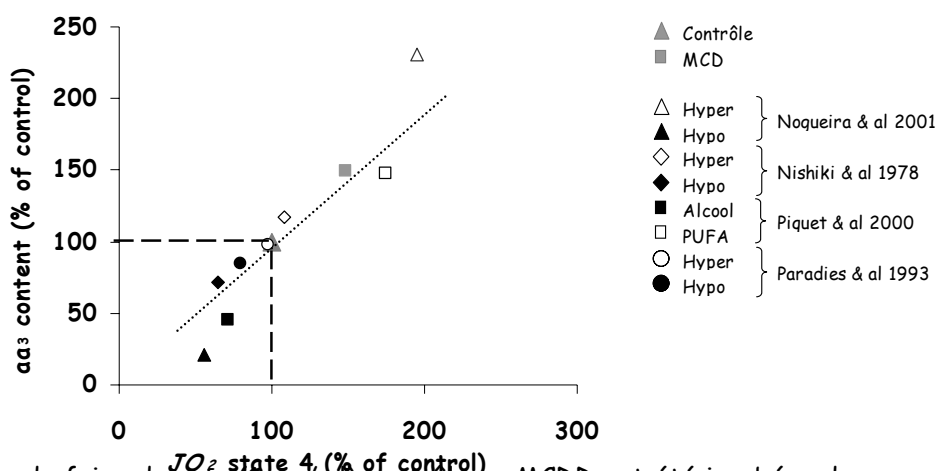
Les mitochondries de foies de rats (1 mg/ml) contrôle ou MCDD ont été incubées dans un milieu KCl + BSA (0,3% final) à 37°C, en présence de 5mM succinate plus 5 μ M de roténone, 1,25 μ g/mL d'oligomycine et 65 ng/mL de nigéricine. Le JO_2 est mesurée par oxygraphie. La respiration est modulée par l'addition de malonate (0 à 10 mM). Les mesures de Δp sont faites en parallèle dans le même milieu avec une sonde à TPMP⁺. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM. n=5.

Le proton leak correspond à un retour des protons dans la matrice par une autre voie que celle de l'ATPsynthase (Mitchell 1961). Il peut résulter d'un changement de perméabilité aux protons de la membrane interne mitochondriale, ou d'un transport via des protéines spécifiques (UCPs, ANT). Le redox slipping est une perte d'efficacité des pompes à protons, due à un découplage intrinsèque partiel et variable des réactions chimiques (transfert de protons ou synthèse d'ATP) et de transport de protons (Nicholls 1974; Pietrobon, Azzone et al. 1981; Pietrobon, Zoratti et al. 1983). De manière générale, suivant la pompe qui patine, deux conséquences sont possibles, i) un changement de la stoechiométrie H^+/O au niveau de la chaîne respiratoire, c'est-à-dire que le transfert d'électron n'est pas couplé à l'éjection de protons, on parle de *redox slipping* ; ii) un changement de la stoechiométrie H^+/ATP au niveau de l'ATPsynthase, c'est-à-dire que l'entrée de protons dans la matrice n'est pas couplé à une synthèse d'ATP, on parle de *proton slipping*. La réalisation de la courbe de Nicholls s'effectue à l'état 4 (en présence d'oligomycine), dans ces conditions le *proton slipping* n'intervient pas.

Dans notre étude, les deux mécanismes (*proton leak* et *redox slipping*) semblent être impliqués dans l'augmentation des pertes énergétiques des mitochondries de rats MCDD. En effet, le décalage de la courbe de Nicholls vers la gauche peut être dû à une augmentation du *leak*, et l'augmentation de la partie non-ohmique semble démontrer la présence d'un *slipping* (ou *leak* non-ohmique) plus important. Le décalage du rapport P/O vers la droite oriente notre hypothèse vers un phénomène de *slipping*. En effet Groen et al. (Groen, Berden et al. 1990) ont démontré qu'un *slipping*, induit expérimentalement, décalait

la relation vers la droite. L'augmentation de la quantité de cytochrome aa_3 et de la V_{max} de la COX, nous pousse d'autant plus dans cette voie, car cette enzyme est connue pour être un site potentiel de phénomène de *slipping* (Azzone, Zoratti et al. 1985; van Dam, Shinohara et al. 1990; Papa, Capitanio et al. 1991).

Figure III.20: corrélation entre le contenu en cytochrome aa_3 , et la respiration à l'état 4.



Les mitochondries de foies de rats (1 mg/ml) contrôle ou MCDD ont été incubées dans un milieu KCl + BSA (0,3% final) à 37°C, en présence de 5/0,5mM succ/mal, 1,25 μ M de roténone et d'oligomycine 1,25 μ g/mg de protéines. La consommation d'oxygène est mesurée par oxygraphie. En parallèle, le contenu en cytochromes des mitochondries est déterminé par spectrophotométrie, en étudiant la différence de densité optique entre les spectres réduit/oxydé, entre 540nm et 630 nm.

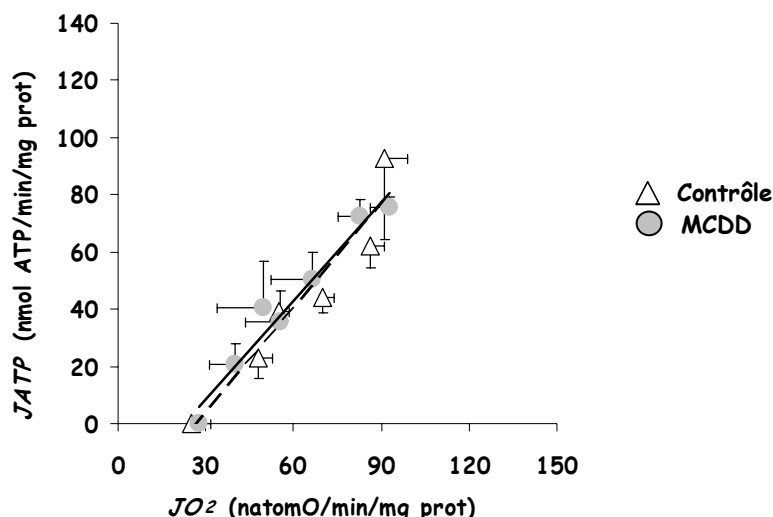
Des travaux antérieurs ont permis l'hypothèse d'une régulation du *slipping* par la quantité de COX (Piquet, Nogueira et al. 2000). Cette hypothèse a d'ailleurs été étayée par différentes autres études, qui ont démontré une corrélation entre la respiration à l'état 4, reflétant les pertes énergétiques, et la quantité de cytochrome aa_3 (figure III.20) (Nishiki, Erecinska et al. 1978; Paradies, Ruggiero et al. 1993; Piquet, Nogueira et al. 2000; Nogueira, Rigoulet et al. 2001). Lorsqu'on ajoute nos résultats et qu'on recalcule le facteur de corrélation ($r^2=0,89$), ceux-ci se superposent parfaitement sur la droite précédemment établie, nous confortant dans la supposition d'une régulation de la respiration des mitochondries MCDD par un mécanisme de *slipping* au niveau de la COX.

Le régime carencé en choline et méthionine induit une augmentation des pertes énergétiques, qui sont responsables d'une diminution de l'efficacité mitochondriale en comparaison aux rats contrôles. Ces pertes énergétiques semblent être dues entre autre à un redox slipping au niveau de la COX et/ou à un proton leak.

10.4 Modulation de l'oxydation phosphorylante par ajout de cyanure

Afin de discriminer les deux mécanismes impliqués dans le découplage, et de tester l'hypothèse que cette diminution du rapport P/O chez les rats MCDD soit liée à un *slipping* de la COX, nous avons réitéré cette expérience en ajoutant du cyanure, un inhibiteur spécifique de la COX, aux mitochondries de rats MCDD. L'hypothèse était que l'ajout d'une faible concentration de cyanure, qui en inhibant légèrement l'activité de la COX, ramènerait la respiration non couplée des mitochondries MCDD au même niveau que celle des mitochondries contrôles, ramènerait l'efficacité des mitochondries du groupe MCDD à celle du groupe contrôle. Une titration de la respiration en condition non phosphorylante au cyanure a permis d'établir la concentration nécessaire pour obtenir une respiration MCDD initiale identique aux contrôles ; elle se situe en moyenne à 15 μ M.

Figure III.21: Effet du NaCN sur le rapport P/O de mitochondries isolées de foies de rats MCDD.

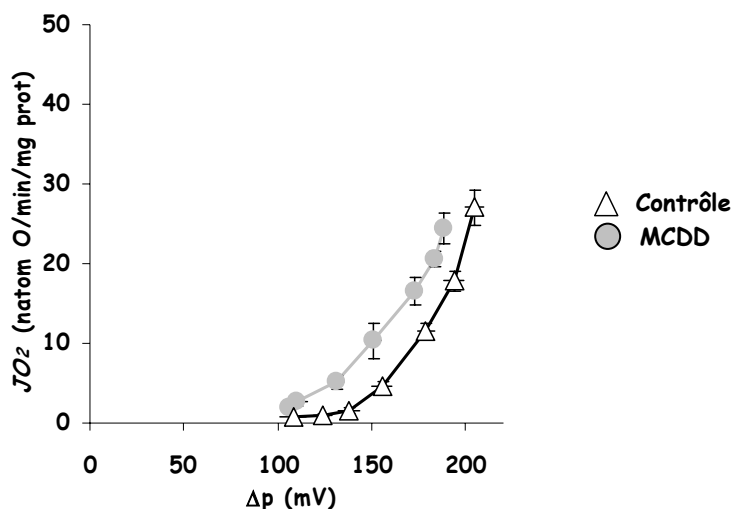


Les mitochondries de foie de rats (1 mg/ml) contrôle ou MCDD+CN ont été incubées dans un milieu KCl + BSA (0,3% final) à 37°C, en présence de 5/0,5mM succ/mal, 1,25 μ M de roténone, 20mM de glucose, 125 μ M d'ATP et 1mM de MgCl₂ et 15 μ M de NaCN. La synthèse d'ATP est modulée par différentes concentrations d'hexokinase (0,2-2 U/mL). Le flux de synthèse d'ATP est calculé à partir du dosage enzymatique du glucose-6-phosphate. La consommation d'oxygène est mesurée par oxygraphie. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM. n=5

Lorsqu'on mesure la relation entre la synthèse d'ATP et la consommation d'oxygène (P/O), en présence de cyanure, avec les mitochondries de rats MCDD, on observe que celle-ci est complètement superposée à la droite des mitochondries contrôles (figure III.21). En d'autres termes, lorsque la COX est légèrement inhibée par du cyanure, les mitochondries de rats MCDD retrouvent une efficacité semblable à celle des contrôles, ainsi qu'un même niveau de synthèse d'ATP. Cela nous confirme donc l'implication de la COX dans les mécanismes de perte d'efficacité des mitochondries de rats MCDD.

En parallèle, la courbe de Nicholls est réalisée avec la même concentration de cyanure, afin de confirmer l'implication de la COX dans les pertes énergétiques observées chez les mitochondries de rats MCDD (figure III.22).

Figure III.22: Effet du NaCN sur la titration de la force protonmotrice (Δp) et de la respiration mitochondriale (JO_2) en l'absence de phosphorylation.



Les mitochondries de foies de rats (1 mg/ml) contrôle ou MCDD + CN ont été incubées dans un milieu KCl + BSA (0,3% final) à 37°C, en présence de 5mM succinate plus 5μM de roténone, 1,25 μg/mL d'oligomycine et 65 ng/mL de nigericine. La consommation d'oxygène est mesurée par oxygraphie. La respiration est modulée par l'addition de malonate (0 à 10 mM). Les mesures de Δp sont faites en parallèle dans le même milieu avec du TPMP⁺. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM. n=5.

La relation obtenue entre la respiration et la force protonmotrice est toujours de type non linéaire. Cependant, la zone non ohmique qui était augmentée chez le groupe MCDD, est ramenée au même niveau que les contrôles par l'ajout de NaCN. Il apparaît donc ici que l'augmentation de la zone non ohmique observée chez les mitochondries des rats MCDD (figure III.22) est due à une augmentation de la quantité et de l'activité de la COX. Cela tend également à nous confirmer l'implication d'un *slipping* de la COX dans les pertes énergétiques mesurées dans ce groupe. La courbe de Nicholls des mitochondries de rats MCDD reste tout de même décalée vers la gauche. Cela laisse supposer l'implication d'un autre mécanisme qu'un *slipping* de la COX, dans les pertes énergétiques observées chez les mitochondries de rats MCDD. Ces pertes énergétiques dépendantes du potentiel de membrane, sont certainement la conséquences d'une fuite de protons (*leak*) à travers la membrane interne mitochondriale.

Les pertes énergétiques induites par le régime carencé en choline et méthionine sont dues en partie à un slipping au niveau de la cytochrome c oxydase. Un proton leak

semble également impliqué dans le découplage mitochondrial des mitochondries de rats MCDD.

10.5 Volume mitochondrial

Le volume mitochondrial est un paramètre connu pour réguler l'oxydation phosphorylante (Quinlan, Thomas et al. 1983; Halestrap 1989; McCormack, Halestrap et al. 1990). En effet, il a été montré qu'une stimulation hormonale (glucagon, vasopressine, α adrénérique) entraîne une augmentation du calcium intramitochondrial qui a pour effets : (i) l'activation de certaines déshydrogénases fournissant des équivalents réduits et (ii) l'inhibition de l'activité d'une pyrophosphatase matricielle. L'augmentation du PPI intramatriciel induit une augmentation de la perméabilité mitochondriale au potassium, ce qui entraîne une élévation de l'osmolarité qui va être compensée par une entrée d'eau suivie d'un gonflement mitochondrial. Cette augmentation du volume matriciel change le métabolisme mitochondrial, et en particulier stimule la respiration (Devin 1997). De plus, Halestrap et coll (Halestrap 1989) ont proposé que le gonflement mitochondrial *per se* soit responsable de ces modifications de l'oxydation phosphorylante.

Il apparaît que les mitochondries de rats MCDD ont des modifications de l'oxydation phosphorylante, avec une diminution de leur efficacité à l'état non phosphorylant (tableau III.13). Cette augmentation des pertes énergétiques semble mettre en jeu des mécanismes de slipping et de proton leak. Cependant, afin de pouvoir comparer les deux groupes de mitochondries, et de vérifier l'implication de ces mécanismes dans la modulation de l'efficacité mitochondriale, nous avons déterminé leur volume mitochondrial, ainsi que les deux composantes de la force protonmotive ($\Delta\Psi$ and ΔpH) en état non phosphorylant, à l'aide de sondes radioactives (tableau III.13).

Tableau III.15: Volume matriciel et force protonmotive (Δp) des mitochondries de foie de rats contrôles ou MCDD

	volume matriciel (μL / mg prot)	$\Delta\Psi$ (mV)	ΔpH (mV)	Δp (mV)	Δp avec TPMP ⁺ electrode (mV)
Control	0,30 $\pm$ 0,04	156 $\pm$ 7	48 $\pm$ 1	204 $\pm$ 4	205 $\pm$ 4
MCDD	0,33 $\pm$ 0,03	156 $\pm$ 6	49 $\pm$ 1	205 $\pm$ 4	206 $\pm$ 4

Les mitochondries de foies de rats contrôle ou MCDD été incubées dans un milieu KCl + BSA (0,3% final) à 37°C, en présence de 8mM succinate plus 5 μM de roténone. Les mesures de Δp sont effectuées soit avec du TPMP⁺, soit avec des sondes radioactives déterminant le ΔpH et le $\Delta\Psi$. Le volume matriciel est déterminé avec de [³H] H₂O et du [¹⁴C] mannitol, le ΔpH et le $\Delta\Psi$ par

la distribution de [^{14}C] TPMP et de [^3H] acétate. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM. $n=5$. Les comparaisons ($p<0,05$) sont réalisées par un test t non apparié. * vs. contrôle.

Il apparaît que les mitochondries de rats MCDD ont un volume matriciel identique à celui des mitochondries de rats contrôles. Les mesures de $\Delta\Psi$ et ΔpH sont également identiques entre les deux groupes. Les valeurs de Δp ont donc été calculées avec ces valeurs, et donnent un résultat identique à celui obtenu lors de la réalisation de la courbe de Nicholls.

Les mitochondries de rats MCDD ne présentent pas de différence de volume matriciel en comparaison aux mitochondries contrôles. Les modifications de l'oxydation phosphorylante observées dans le groupe MCDD ne sont donc pas liées à ce facteur. Cette hypothèse étant éliminée, d'autres facteurs pourraient intervenir dans la perte d'efficacité mitochondriale, comme une modification de la composition lipidique des membranes mitochondriales.

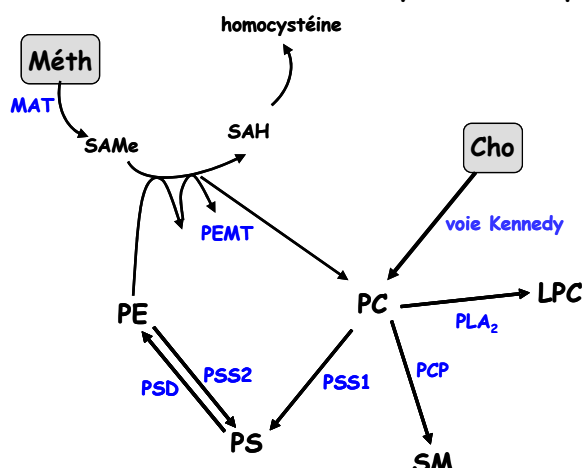
11. Causes possibles des pertes énergétiques des mitochondries MCDD

Une des causes possiblement impliquées dans la modification de l'activité de la COX, ainsi que dans les fuites de protons est une modification de la composition lipidique de la membrane mitochondriale.

11.1 Composition membranaire

La phosphatidylcholine (PC) et la phosphatidyléthanolamine (PE) sont les deux principaux phospholipides des membranes plasmiques et mitochondriales. Ils sont répartis de manière asymétrique, avec une distribution de la PC majoritairement au niveau de la membrane externe alors que la PE se retrouve plus sur la membrane interne (Devaux 1991).

Figure III.23: Interrelations entre les voies de biosynthèse des phospholipides.

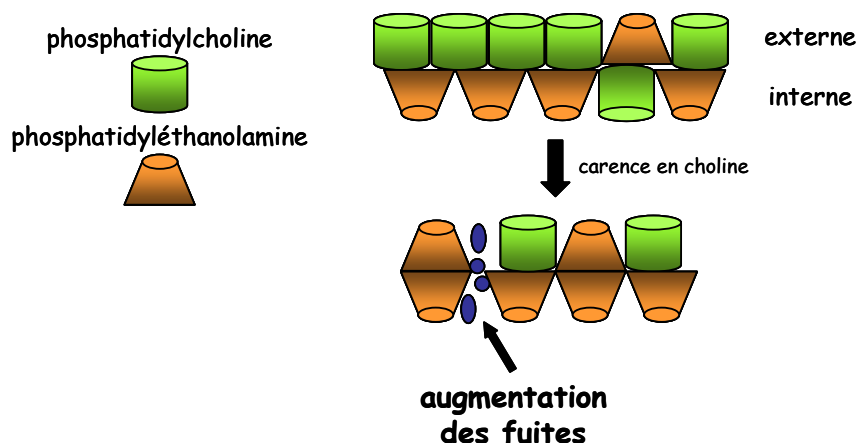


Cho, choline; Méth, méthionine; PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidyléthanolamine; PS, phosphatidylsérine; LPC, lysophosphatidylcholine; SM, sphingomyéline; PEMT, phosphatidyléthanolamine N méthyltransférase; PSD, phosphatidylsérine décarboxylase; PSS, phosphatidylsérine synthase; DAG, diacylglycérol; SAMe, S-adenosyl méthionine; MAT, méthionine adénosyltransférase; PCP, phosphatidylcholine céramidecholine phosphotransférase; SAH, S-adenosylhomocystéine. (d'après (Michel, Yuan et al. 2006)).

Dans le foie, l'homéostasie de la PC dépend de son anabolisme et de son catabolisme. La PC hépatique est synthétisée directement à partir de choline (70%) ou via la transformation de PE en PC (30%) (Li, Agellon et al. 2006). De plus, elle est le précurseur de la synthèse de sphingomyéline (SM), de la phosphatidylsérine (PS) et de la lysophosphatidylcholine (LPS) (Vance and Vance 2004) (figure III.23).

Plusieurs études ont démontré l'influence de la composition phospholipidique membranaire mitochondriale sur le fonctionnement de celle-ci (Arai, Gordon et al. 1984; Paradies, Ruggiero et al. 1993; Brand, Chien et al. 1994; Porter, Hulbert et al. 1996; Brookes, Buckingham et al. 1998; Paradies, Petrosillo et al. 2000; Piquet, Roulet et al. 2004). Il a été suggéré que le rapport PC/PE soit un modulateur important de l'intégrité membranaire, et est corrélé au potentiel de membrane mitochondrial (Li, Agellon et al. 2005; Li, Agellon et al. 2006). En effet, une augmentation de la quantité de PE par rapport à la PC induirait une perte d'intégrité membranaire. La PE est un phospholipide de forme conique, alors que la PC à une forme plus cylindrique (figure III.24). Une augmentation de PE induirait une perte de la structure de la membrane, induisant ainsi une augmentation des fuites et une diminution du potentiel de membrane (Li, Agellon et al. 2006).

Figure III.24: Influence du rapport PC/PE sur l'intégrité membranaire



Une modification de la répartition des phospholipides (PC et PE) entraîne une modification de la perméabilité membranaire. Une carence en choline provoque une diminution de synthèse de PC, ce qui diminue le rapport PC/PE, provoquant un remaniement des phospholipides de la membrane augmentant ainsi les fuites au travers de la membrane. (schéma d'après (Li, Agellon et al. 2006)).

D'autres études ont rapporté une corrélation entre le flux de proton (*leak*) à travers la membrane interne mitochondriale et la composition en acides gras de cette membrane (Porter, Hulbert et al. 1996; Brookes, Buckingham et al. 1998). Il a été démontré que la concentration en acide linoléique (C18:2n-6) est corrélée négativement au flux de protons, alors que la concentration en acide docosahexanoïque (C22:6n-3) est corrélée positivement (Brand, Couture et al. 1994; Porter, Hulbert et al. 1996; Brookes, Buckingham et al. 1998). De même, le leak est d'autant plus élevé que le rapport C20:4n-6/C18:2n-6 augmente (Brookes, Buckingham et al. 1998).

Tableau III.16: Répartition des phospholipides provenant de mitochondries de rats contrôles et MCDD

($\mu\text{g P}_{\text{total}}$)	contrôle	MCDD	
LPC	1,0 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,1	*
SM	1,1 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,1	*
PC	3,7 $\pm$ 0,3	1,9 $\pm$ 0,3	*
PI	0,9 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,1	*
PS	0,8 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,1	p=0,06
PE	1,2 $\pm$ 0,2	1,4 $\pm$ 0,1	
DPG	1,2 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,1	*
PC/PE	3,5 $\pm$ 0,7	1,3 $\pm$ 0,2	*

Après extraction, les phospholipides des mitochondries isolées de foies ont été séparés par chromatographie en couche mince. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM, n=5. Les comparaisons (p<0,05) sont réalisées par un test *t* non apparié. *: différent du contrôle.

LPC : lysophosphatidylcholine, SM : sphingomyéline, PC : phosphatidylcholine, PI : phosphatidylinositol, PS : phosphatidylsérine, PE : phosphatidyléthanolamine, DPG : diphosphatidylglycérol.

Nous avons donc effectué une analyse des différents phospholipides constituant les membranes des mitochondries de foies de rats contrôles ou carencés en choline et méthionine, ainsi que de la composition en acides gras des phospholipides. Les résultats sont présentés dans les tableaux III.16 et III.17.

Il apparaît que les mitochondries de rats MCDD présentent un remaniement très important de la répartition entre les différents phospholipides (tableau III.16). Comme on pouvait s'y attendre, en raison de la carence en choline et méthionine, la quantité de phosphatidylcholine (PC) est largement diminuée (-50%) dans les membranes des mitochondries de rats MCDD, ainsi que celle de ses dérivés comme la LPC, la sphingomyéline (SM) et la phosphatidylsérine (PS). Le phosphatidylinositol (PI) et le diphosphatidylglycérol (DPG) sont également diminués de moitié dans le groupe MCDD, alors que la phosphatidyléthanolamine (PE) ne varie pas. Des études antérieures montrent également une diminution du contenu en PC chez des rongeurs recevant un régime MCD, alors que la PE ne varie pas ou augmente très légèrement (Beare-Rogers 1971; Lyman, Sheehan et al. 1973; Yost, Chander et al. 1985). L'absence de variation de la PE pourrait être due au fait que la voie de synthèse de celle-ci, via la PEMT (phosphatidyléthanolamine N méthyltransférase), ne soit pas entièrement bloquée par la carence. En effet, la S-adenosyl méthionine est dérivée de la méthionine, et est également le substrat de la PEMT, une carence en méthionine devrait atténuer la voie de la PEMT. Cependant des études ont montré que des souris recevant un régime MCD pendant 3 mois ne développent pas un degré de NASH aussi important que des souris Knock Out pour la PEMT (Weltman, Farrell et al. 1996; Koteish and Mae Diehl 2002), laissant suggérer que, dans le cas du régime, la voie de la PEMT n'est pas entièrement bloquée. Lorsque l'on calcule le rapport PC/PE, on remarque que celui-ci est significativement diminué chez les rats MCDD ($1,3 \pm 0,2$ vs. $3,5 \pm 0,7$ chez les contrôles), ce qui est logique au vu de la diminution de PC. Les résultats obtenus sur la composition en phospholipides des membranes des mitochondries de rats MCDD semblent indiquer une modification de l'intégrité de la membrane, allant dans le sens d'une augmentation de la perméabilité membranaire, comme cela a été supposé par Li et collaborateur (Li, Agellon et al. 2006).

Outre la répartition des phospholipides membranaires, nous avons mesuré la composition en acides gras de ceux-ci. Les résultats de l'analyse sont présentés dans le tableau III.17.

Tableau III.17 : Caractéristiques des phospholipides totaux provenant de mitochondries de rats contrôles et MCDD

Acides gras	Phospholipides totaux (%)		
	Contrôle (n=5)	MCDD (n=5)	
% saturés	43 ± 5	43 ± 3	
% monoinsaturés	15 ± 3	8 ± 1	*
% polyinsaturés	42 ± 7	49 ± 3	
% n-3	8 ± 1	9 ± 1	
% n-6	33 ± 3	39 ± 2	
% n-7	7 ± 1	2,0 ± 0,1	*
% n-9	8 ± 1	7 ± 0,2	*
% n-11	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	
C18:2n-6	14,5 ± 1,1	12,6 ± 0,7	
C22:6n-3	5,8 ± 0,4	7,8 ± 0,8	*
C20:4n-6/C18:2n-6	1,22 ± 0,05	1,63 ± 0,09	*

Après extraction, les acides gras des phospholipides des mitochondries isolées de foies ont été séparés par chromatographie en couche mince. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM, n=5. Les comparaisons (p<0,05) sont réalisées par un test *t* non apparié. *: différent du contrôle.

La composition en acides gras des phospholipides des membranes mitochondriales des rats contrôles est globalement en accord avec ce qui est présenté dans la littérature (Daum 1985). Chez les rats MCDD, on constate un changement dans la répartition de différentes catégories d'acides gras. En effet, le pourcentage des acides gras monoinsaturés (MUFA) est largement diminué (-50%) chez les rats MCDD par rapport aux rats contrôles. Cette diminution se fait au profit des acides gras polyinsaturés (PUFA ; +17%), même si cette augmentation n'est pas significative (p=0,07), alors que les acides gras saturés (SFA) ne varient pas. On note également un remodelage dans la répartition entre les différents PUFA, avec une diminution des oméga 7 (-62%) et 9 (-13%) et une légère augmentation des oméga 6 (+13%) chez les rats MCDD. La composition plus détaillée en acides gras des phospholipides a également été réalisée (résultats non présentés). Si l'on se réfère à des études antérieures, il a été rapporté que des variations de quantité de C18:2n-6 et C22:6n-3 pouvaient moduler l'intégrité de la membrane mitochondriale, et donc sa perméabilité (Brand, Couture et al. 1994; Porter, Hulbert et al. 1996; Brookes, Buckingham et al. 1998). Or, dans notre étude, on observe une variation de la quantité de ces acides gras. L'acide

linoléique (C18:2n-6) est diminué (-13%), mais de manière non significative, et l'acide docosahexanoïque (C22:6n-3) est quant à lui augmenté de 35% ($p < 0,05$). De même, le rapport C20:4n-6/C18:2n-6 est plus élevé dans les membranes des mitochondries des rats MCDD que dans celles des contrôles. Ici aussi, les résultats obtenus sont en faveur d'une perméabilité accrue des membranes des mitochondries de rats MCDD, qui pourrait expliquer un proton leak plus important que chez les contrôles. Cette modification de composition membranaire mitochondriale pourrait également être impliquée dans le changement d'activité de certains complexes de la chaîne respiratoire, comme la COX. En effet, de nombreuses études menées chez des rongeurs ont démontré une forte relation entre activité de la COX et composition de la membrane mitochondriale. Le groupe de Paradies a largement étudié l'influence du statut thyroïdien sur la composition membranaire et l'activité de la COX (Paradies, Ruggiero et al. 1993; Paradies, Ruggiero et al. 1993; Paradies, Ruggiero et al. 1994). Ils ont démontré l'importance de certains phospholipides, les cardiolipines ou DPG, sur l'activité de cette enzyme. D'autres études menées avec des souris ont également mis en évidence l'importance du taux d'insaturation, mais aussi de la répartition entre AGS, AGMI et AGPI (surtout oméga 6) au niveau des cardiolipines, mais également au niveau des phospholipides totaux l'activité de la COX, mais également sur l'activité des autres complexes de la chaîne respiratoire (Guerrero, Pamplona et al. 1999; Vazquez-Memije, Cardenas-Mendez et al. 2005). Les modifications observées dans la composition membranaire des mitochondries de rats MCDD pourraient donc être également impliquées dans l'augmentation d'activité de la COX, observée précédemment (tableau III.17).

Le régime MCDD induit un fort remaniement de la composition lipidique membranaire avec une diminution de la PC et des phospholipides qui en découlent, ainsi qu'une chute du rapport PC/PE. De plus, on observe une augmentation du taux d'insaturation des acides gras constituant les phospholipides. Il en résulte très certainement une augmentation de la perméabilité des membranes mitochondriales qui pourrait expliquer les pertes énergétiques démontrées dans les mitochondries des rats MCDD.

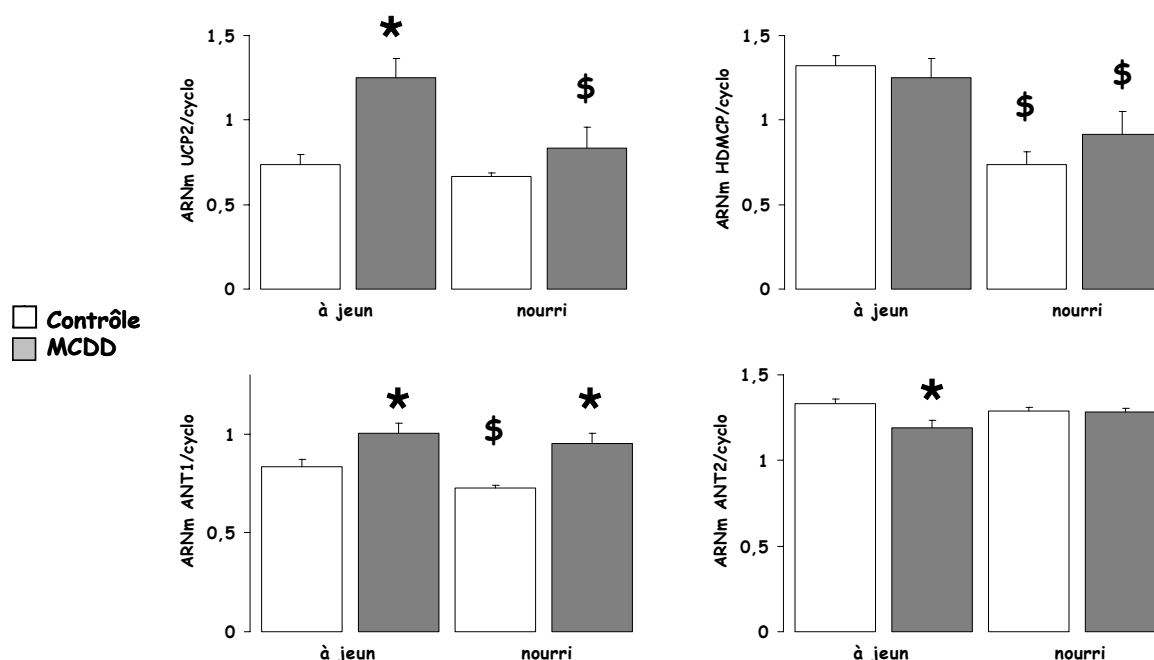
11.2 Protéines découplantes (UCPs et ANT)

Il existe d'autres mécanismes pouvant être impliqués dans un phénomène de découplage. Le retour des protons dans la matrice mitochondriale peut être dû entre autre, à des protéines dites « découplantes ». Plusieurs isoformes d'UCPs ont été caractérisées à ce jour (UCP1 à 5) (Krauss, Zhang et al. 2005; Ricquier 2005; Dlaskova, Spacek et al. 2006; Sluse, Jarmuszkiewicz et al. 2006), cependant, la présence de UCP2 au niveau hépatique reste encore très controversée (Fisler and Warden 2006; Mattiasson and Sullivan 2006). De manière générale, l'expression d'UCP2 est très faible dans les hépatocytes sains, mais il a été montré une augmentation de son expression par différents facteurs comme le stress oxydant et la stéatose (McCarty 2005), ou lors d'infections bactériennes (Cortez-Pinto, Yang et al. 1998). De plus, Tan et collaborateurs ont proposé récemment une nouvelle protéine découplante : HDMCP (Hepatocellular Carcinoma Down-regulated Mitochondrial Carrier Protein) (Tan, Ooi et al. 2004). Cette protéine est exprimée spécifiquement dans le foie, au niveau mitochondrial, et présente une forte homologie de séquence avec les protéines de la famille des transporteurs mitochondriaux. De plus, comme les UCPs, elle permet la dissipation du gradient de protons lorsqu'elle est surexprimée. Une autre protéine a également été montrée comme pouvant induire un découplage ; l'ANT (adenine nucleotid translocator) (Roussel, Chainier et al. 2000; Lombardi, Silvestri et al. 2002; Di Paola and Lorusso 2006; Shabalina, Kramarova et al. 2006). Dans ce cadre, les ARNm d'UCP2, de HDMCP et de l'ANT1 et 2 ont été détectés par RT-PCR sur des foies de rats contrôles et MCDD, à jeun ou nourris (figure III.25).

Les rats MCDD ont une glycémie à jeun plus faible que les contrôles ($5,1 \pm 0,2$ vs. $7,1 \pm 0,3$ mM), ainsi qu'une insulïnémie diminuée (20 ± 4 vs. 65 ± 1 pM) (tableau III.11). A l'état nourri, les rats contrôles ont une glycémie identique à celle mesurée après 24h de jeûne, alors que leur insulïnémie est nettement augmentée. Cela est étonnant, on aurait pu s'attendre à une augmentation de la glycémie, en parallèle de l'insulïnémie, due à la prise alimentaire récente des rats. Plusieurs facteurs peuvent expliquer cela. Premièrement, si on se base sur le postulat que les rats ont une prise alimentaire uniquement pendant la période nocturne, cela fait au moins 3h que les animaux sont passés en période diurne et ont cessé de manger au moment du sacrifice. On peut donc supposer que le pic de glycémie qui arrive rapidement après un repas est déjà revenu à un niveau basal, alors que le pic d'insuline, qui diminue plus lentement, est, quand à lui, toujours visible. L'autre facteur pouvant expliquer l'absence de différence de glycémie est le mode de sacrifice des animaux. En effet, pour des raisons expérimentales, les animaux à jeun sont anesthésiés avec du thiopental sodique au moment du sacrifice, alors que ceux nourris ne le sont pas. Or il a été démontré un effet hyperglycémiant de certains anesthésiques de la famille des barbituriques, comme le pentobarbital (Penicaud, Ferre et al. 1987), famille à laquelle appartient le thiopental. Ces

deux facteurs pourraient expliquer le fait que les rats contrôles aient une glycémie identique dans les deux conditions nutritionnelles. Les rats MCDD, quant à eux, ont une glycémie augmentée à l'état nourri par rapport au jeûne. Cependant leur glycémie reste significativement inférieure à celle mesurée chez les contrôles. Ce qui signifie, si on tient compte des facteurs décrits précédemment, que la différence de glycémie, entre l'état nourri et à jeun, observée chez le groupe de rats MCDD est en réalité plus importante. De la même manière, l'insulinémie des rats MCDD est augmentée à l'état nourri, mais reste inférieure à celle mesurée chez les rats contrôles.

Figure III.25: Expression des gènes de protéines découplantes dans le foie de rats contrôles et MCDD



Une analyse par RT-PCR de l'expression des gènes UCP2, HDMCP et ANT1 et ANT2 est réalisée dans le foie de rats contrôles et MCDD. La cyclophiline est utilisée comme gène de référence. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM. $n=6$. Les comparaisons ($p<0,05$) sont réalisées par un test t non apparié. * vs. Contrôle, \$ vs. à jeun.

Comme l'a décrit Dorner et al (Dorner, Olesch et al. 1999), l'expression d'ANT2 est supérieure dans le foie à celle d'ANT1 (données non montrées). Chez l'animal contrôle l'expression d'ANT2 ne varie pas en fonction de l'état nutritionnel, alors qu'une diminution de la quantité d'ARNm d'ANT1 est induite par le jeûne. Les rats MCDD présentent un niveau d'expression d'ANT2 identique aux rats contrôles en condition « nourri », alors que celui-ci est diminué significativement après 24h de jeûne (figure III.25). Par contre, on observe que le niveau d'ARNm d'ANT1 est supérieur chez les rats MCDD par rapport à celui des contrôles, et cela quel que soit l'état nutritionnel.

Dans notre étude sur mitochondries isolées, réalisée avec des animaux nourris, il semble que UCP2, qui présente une augmentation d'expression mais non significative, et ANT1 puissent être impliquées dans le découplage mitochondrial observé chez les rats MCDD. Cependant, l'expression génique demanderait à être confirmée par la mesure de la quantité de protéine, spécialement pour UCP2, dont il a été démontré que l'expression de l'ARNm n'est pas toujours corrélée au contenu en protéine (Petzke, Riese et al. 2006).

12. Conséquences fonctionnelles du découplage des mitochondries MCDD

Afin de déterminer les conséquences potentielles du changement bioénergétique du groupe MCDD, et donc du découplage mitochondrial, la capacité d'utilisation des lipides a été mesurée. Pour cela de l'octanoyl-carnitine a été fourni comme substrat aux mitochondries de ce groupe (tableau III.18). En présence d'octanoyl-carnitine, les respirations en état phosphorylant et non phosphorylant, 3 et 4 sont significativement supérieures (37 à 40% ; $p < 0,01$) pour les mitochondries MCDD par rapport aux mitochondries contrôles.

Tableau III.18 : Respiration (JO_2) des mitochondries de foies provenant de rats contrôles ou MCDD

	JO_2 (natomO/min/mg prot) avec oct-carn		
	+ BSA		
	état 4	état oligo	état 3
contrôle	13 ± 1	10 ± 1	35 ± 2
MCDD	18 ± 1	14 ± 1	48 ± 3
	*	*	*

Les mitochondries de foies de rats (1 mg/ml) contrôles ou MCDD ont été incubées dans un milieu KCl + BSA (0,3% final) à 37°C, en présence de 100µM d'octanoyl-carnitine. La consommation d'oxygène est mesurée par oxygraphie. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM ; n=9. Les comparaisons ($p < 0,05$) sont réalisées par un test *t* non apparié. *: différent du contrôle.

Le régime MCDD induit une oxydation accrue des lipides au niveau mitochondrial. Ainsi, la mise en place de mécanismes modulant l'efficacité mitochondriale, induisant un découplage des mitochondries, aurait pour conséquence d'augmenter l'oxydation des acides gras hépatiques.

Les mitochondries sont également connues pour être un des principaux sites de production de radicaux libres de l'oxygène. Cette production dépend de plusieurs facteurs comme, la vitesse de respiration, le statut redox des complexes de la chaîne respiratoire ou encore du potentiel de membrane (Korshunov, Skulachev et al. 1997). Nous avons donc étudié les conséquences de la perte d'efficacité des mitochondries du groupe MCDD sur la production de radicaux libres de l'oxygène (tableau III.19). Pour cela nous avons mesuré la quantité de H₂O₂ produit au niveau mitochondrial.

La production de H₂O₂ par les mitochondries de rats MCDD est nettement diminuée en comparaison avec le groupe contrôle (97 ± 9 vs. 138 ± 22 pmolH₂O₂/min/mg prot). La consommation d'oxygène des mitochondries a été mesurée en parallèle, dans les mêmes conditions (tampon, substrats, température) que celle de la mesure de production d'H₂O₂. Cela nous permet de calculer la fraction d'oxygène déviée vers la synthèse d'H₂O₂, au lieu d'être réduit en eau. Les mitochondries de rats MCDD ont une production d'H₂O₂ diminuée de 42% par rapport aux rats contrôles lorsque celle-ci est exprimée en pmol H₂O₂/natmO.

Tableau III.19 : Production de peroxyde d'hydrogène sur mitochondries de foie et activités des enzymes antioxydantes sur homogénat

	Contrôle	MCDD	
<u>H₂O₂ production</u>			
(pmol H ₂ O ₂ /mg prot/min)	138 ± 22	97 ± 9	*
(pmol H ₂ O ₂ /natomO)	12 ± 1	7 ± 1	*
<u>CAT</u>	0,55 ± 0,01	0,33 ± 0,02	*
<u>GPx</u>	0,29 ± 0,01	0,13 ± 0,01	*
<u>SOD</u> mitochondriale	6,0 ± 0,4	5.8 ± 0.5	
cytosolique	19,6 ± 1,7	12,4 ± 1,4	*

Un morceau de foie de rats est homogénéisé dans un tampon d'extraction (KH₂PO₄ 100mM, DTT 1mM, EDTA 2mM). Après centrifugation, le surnageant est utilisé pour mesurer l'activité de la catalase (CAT), de la superoxyde dismutase (SOD) cytosolique et mitochondriale, et la glutathion peroxydase (GPx). Les activités sont exprimées en U/mg de protéines. La production d'H₂O₂ est mesurée par fluorimétrie sur mitochondries isolées de foies (1 mg/ml) contrôles ou MCDD incubées dans un milieu KCl + BSA (0,3% final) à 30°C, en présence de succinate (5mM), d'acide homovanilique et de peroxydase de raifort. La consommation d'oxygène est mesurée par oxygraphie à 30°C. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM ; n=8 pour les activités et n=6 pour la production de H₂O₂. Les comparaisons (p<0,05) sont réalisées par un test *t* non apparié. *: différent du contrôle .

Dans cette expérience, l'H₂O₂ mesuré reflète en fait la balance entre la production mitochondriale et l'élimination par les systèmes antioxydants. La catalase (CAT) la

superoxyde dismutase (SOD) mitochondriale et cytoplasmique, ainsi que la glutathion peroxydase (GPx) ont été mesurées sur un homogénat de foie des deux groupes de rats (tableau III.19). Les activités des enzymes CAT et GPx sont significativement diminuées en comparaison aux contrôles (respectivement -40% et -55%). La SOD présente plusieurs isoformes qui sont réparties dans la mitochondrie et le cytosol. Les rats MCDD ont une activité cytosolique de la SOD qui est également diminuée par rapport aux contrôles (-37%). Par contre, l'activité de la SOD mitochondriale est inchangée entre les deux groupes. Il apparaît donc que la plus faible quantité d'H₂O₂ mesurée avec les mitochondries de rats MCDD n'est pas due à des capacités d'élimination accrues, mais à une diminution de production par la chaîne respiratoire.

En résumé, le régime MCD induit un découplage des mitochondries. Ce découplage se traduit entre autre par une diminution de la force protonmotrice (Δp). Cela a plusieurs conséquences : i) une augmentation des capacités d'oxydation des acides gras, et ii) une diminution de la production de radicaux libres de l'oxygène. En effet, lors d'un découplage, l'oxydation des substrats par les mitochondries est augmentée ce qui permet de maintenir le potentiel de membrane. Au niveau cellulaire, la conséquence sera une utilisation du surplus d'acides gras présent dans son cytoplasme du fait de la stéatose. De même, la diminution du potentiel de membrane, et donc de la production de ROS, pourrait au niveau mitochondrial, et de ce fait au niveau de la cellule, limiter le stress oxydant d'origine mitochondriale. En conclusion, des altérations de la fonction mitochondriales se mettent en place lors d'une stéatohépatie induites par un régime carencé en choline et méthionine. Le découplage mitochondrial permettrait de limiter la stéatose hépatique et le stress oxydant associés à celle-ci.

13. Discussion

Dans cette étude, nous avons utilisé un modèle très bien caractérisé de NASH: un régime carencé en choline et méthionine (MCD), afin d'induire cette pathologie chez des rats Wistar. Comme attendu, après 6 semaines de régime MCD, les foies des rats traités présentent des lésions typiques d'une NASH établie, incluant une stéatose macrovésiculaire

et de l'inflammation. Ces observations sont en accord avec de récentes données obtenues par plusieurs autres groupes (Kirsch, Clarkson et al. 2003; Starkel, Sempoux et al. 2003). Chez ces rats recevant un régime MCD, la stéatohépatite est associée à un niveau de triglycérides circulants extrêmement faible, ce qui confirme la dysfonction du système d'exportation des lipides hépatiques due à la carence en choline (Lombardi, Pani et al. 1968). Comme cela a également été décrit précédemment, le régime MCD induit une très massive stéatose, qui s'accompagne de phénomènes inflammatoires. Cette inflammation est mise en évidence par une forte augmentation de l'expression des ARNm de l'IL-6 et du TNF- α (Starkel, Sempoux et al. 2003; Dela Pena, Leclercq et al. 2005; Dela Pena 2007) et par la présence de loci inflammatoires sur coupes histologiques. Cette inflammation est la conséquence de la détérioration du système antioxydant, induite par la carence en méthionine. Ces atteintes provoquent de sérieux dommages hépatiques, provoquant une augmentation des transaminases sériques (ALT et AST) indiquant ainsi une dégénérescence cellulaire hépatique.

Outre les lésions hépatiques typiques de la NASH, les animaux présentent également des dysfonctionnements mitochondriaux. En effet, il apparaît que la bioénergétique mitochondriale est largement affectée, entraînant une augmentation de la respiration mitochondriale (état 4 et 3), et une diminution du rendement énergétique. Deux mécanismes semblent être impliqués dans cette perte d'efficacité mitochondriale, un « redox slipping » au niveau de la cytochrome c oxydase, et un « proton leak ».

En effet, les données de cette présente étude montrent, qu'après 6 semaines de régime MCD, les mitochondries de foies de rats ont une respiration largement augmentée quelque soit le substrat utilisé (glutamate/malate, succinate/malate, octanoyl-carnitine). De plus, une augmentation de l'activité maximale de la COX, ainsi que de son contenu en cytochrome aa_3 , est observée. Cependant, ces résultats contredisent certaines études menées sur des foies de patients atteints de NASH, et qui observent une diminution de 30% à 50% de l'activité des complexes I, II, III et IV de la chaîne respiratoire (Haque and Sanyal 2002; Perez-Carreras, Del Hoyo et al. 2003). Mais, dans un même temps, notre étude est en accord avec d'autres résultats obtenus sur des souris *ob/ob*, qui sont un modèle de souris obèses présentant de la stéatose hépatique (Koteish and Mae Diehl 2002; Diehl 2005). Dans ce modèle de souris naturellement KO, une augmentation de la respiration en état phosphorylant et non phosphorylant est observée au niveau des mitochondries hépatiques (Chavin, Yang et al. 1999). De même, des rats recevant une alimentation carencée en choline pendant 4 semaines, et développant une stéatose, présentent également une augmentation de leur respiration en état phosphorylant et non phosphorylant (Oliveira, Coelho et al. 2006). Cependant, dans autre étude menée avec la même alimentation carencée en choline, mais sur 7 jours uniquement, une inhibition de la respiration des

mitochondries de foie est observée en condition non phosphorylante (Hensley, Kotake et al. 2000). Ainsi, l'ensemble de ces résultats sur rongeurs nous laisse supposer un changement progressif du métabolisme mitochondrial, induit par le régime. Il résulterait donc de ces changements une augmentation de la quantité de chaîne respiratoire dans les mitochondries, ainsi qu'une augmentation de l'activité respiratoire mais seulement au-delà d'un certain délai, lorsque la NASH est bien établie.

Les résultats présentés ici montrent donc pour la première fois que l'augmentation de l'activité oxydative des mitochondries de rats recevant un régime MCD est associée à une diminution de l'efficacité de l'oxydation phosphorylante. Trois mécanismes pourraient contribuer à ces modifications de consommation d'oxygène : i) un changement de « proton leak » à travers la membrane interne mitochondriale, ii) une diminution de l'efficacité des pompes de la chaîne respiratoire (slipping), iii) une modification de la quantité de cytochrome de la chaîne respiratoire. Les résultats obtenus montrent clairement une diminution du rendement de l'oxydation phosphorylante mitochondriale, comme l'indique le décalage vers la droite de la relation du P/O des mitochondries de rats MCDD (figure III.18). Or, l'ajout d'une faible quantité de cyanure (inhibiteur de la Cox) rétablit ce rendement à un niveau semblable à celui des contrôles, ce qui nous laisse suggérer l'implication de la cytochrome c oxydase dans les pertes énergétiques observées chez les mitochondries de rats MCDD. Cette hypothèse nous semble d'autant plus vraisemblable que la COX est connue pour être un site potentiel de phénomène de slipping (Azzone, Zoratti et al. 1985; van Dam, Shinohara et al. 1990; Papa, Capitanio et al. 1991). Dans un même temps, les mitochondries MCDD présentent une relation entre la respiration en état non phosphorylant et le potentiel de membrane (courbe de Nicholls (Nicholls 1974) ; (figure III.19) décalée vers la gauche en comparaison des contrôles, laissant suggérer un « proton leak » (Brand, Chien et al. 1994), ainsi qu'une augmentation de sa partie non-ohmique (à forts potentiels), qui pourrait être due à un phénomène de slipping. Mais, malgré tout ces résultats, nous ne pouvons pas discriminer de manière exacte quel mécanisme : « redox slipping » et/ou « proton leak » est réellement impliqué dans les modifications de l'oxydation phosphorylante observée chez les rats MCDD. Par contre, il apparaît de manière incontestable une implication de la COX dans la modification du rendement de l'oxydation phosphorylante dans ce groupe.

Quelque soit le mécanisme (redox slipping ou proton leak) impliqué dans les pertes énergétiques observées sur mitochondries MCDD, il apparaît clairement dans cette étude que l'augmentation du contenu de COX joue un rôle clé dans les processus d'adaptations de ces mitochondries. En effet, i) l'activité ET la quantité de cytochrome aa_3 sont augmentées de 54%, et ii) l'addition d'une faible quantité de cyanure sur les mitochondries MCDD ramène la respiration non phosphorylante, ainsi que l'efficacité de l'oxydation phosphorylante, à un niveau semblable à celui des contrôles. Ces observations, effectuées sur les mitochondries

de rats MCDD, sont supportées par des études antérieures rapportant l'existence d'une relation entre les modifications de capacités oxydatives et des changements de rendement mitochondrial (Fontaine, Moussa et al. 1996; Piquet, Nogueira et al. 2000; Piquet, Roulet et al. 2004). En effet, lorsque, nous effectuons une corrélation entre les valeurs de respiration non phosphorylante, reflétant les pertes énergétiques, et la quantité de cytochrome aa_3 , des rats MCDD et contrôles, ainsi qu'à partir de valeurs d'études antérieures menées sur différents modèles d'altération du métabolisme hépatique (hypo-hyperthyroïdisme, carence en PUFA, ingestion chronique d'alcool; (Nishiki, Erecinska et al. 1978; Paradies, Ruggiero et al. 1993; Piquet, Nogueira et al. 2000; Nogueira, Rigoulet et al. 2001), nous obtenons une très bonne corrélation linéaire entre ces valeurs ($R^2 = 0,89$; $p < 0,0001$, (figure III.20)). Une telle corrélation confirme la relation causale entre la quantité de COX et le rendement de l'oxydation phosphorylante déjà proposée par plusieurs auteurs.

Cependant, il est tout de même important de noter que le potentiel de membrane (Δp), en condition non phosphorylante (état 4), n'est pas complètement restauré sur les mitochondries de rats MCDD par l'ajout de cyanure, nous indiquant l'implication d'un autre mécanisme que le redox slipping dans les pertes d'efficacité : le proton leak. Cette dernière observation est renforcée par une étude antérieure qui a observé une légère, mais significative, augmentation de l'ARNm de UCP2 dans le foie de rats MCDD (Starkel, Sempoux et al. 2003). Les protéines découplantes (UCPs) font parties de la super famille des transporteurs anioniques mitochondriaux. Elles résident au niveau de la membrane interne mitochondriale et catalysent la conductance aux protons, dissipant ainsi le gradient électrochimique de proton et découplant le transport d'électron de la synthèse d'ATP au niveau de la chaîne respiratoire. Cependant, dans notre étude, nous n'avons pas mis en évidence de changement significatif dans l'expression de l'ARNm des différentes protéines potentiellement impliquées dans un découplage : UCP2, ANT ou HDMCP. En revanche, l'étude de la composition membranaire des mitochondries de rats MCDD a montré un très fort remaniement des phospholipides, allant dans le sens d'une fluidification de la membrane, et donc d'une augmentation probable des fuites au travers de celles-ci. Il ressort donc de tous ces résultats, que le régime MCDD induit sur le foie de rats, et notamment sur les mitochondries, de forts remaniements et adaptations. La question se pose donc de savoir quelles sont les conséquences de ces modifications d'un point de vue physiologique.

De manière surprenante, cette étude montre une diminution de la production de H_2O_2 au niveau des mitochondries de foies de rats MCDD. En parallèle, les activités des enzymes antioxydantes, mesurées sur homogénats de foie, sont soit diminuées soit inchangées en comparaison aux foies de rats contrôles. Or, si on prend comme postulat que la mitochondrie est le site principal de production de radicaux libres (Jezek and Hlavata 2005), nos résultats sont en contradictions avec les principes généraux de mise en place de la NASH (Day and

James 1998). Il a été observé chez des patients atteints de NASH (Fromenty, Robin et al. 2004; Pessayre and Fromenty 2005), ainsi que chez le rat (Hensley, Kotake et al. 2000), que lors de la mise en place de la stéatose, les hépatocytes font face à un nouvel environnement riche en lipides, ce qui favorise la survenue d'un stress oxydant. Dans son étude Hensley (Hensley, Kotake et al. 2000) mesure la production de ROS après seulement 7 jours de régime carencé en choline. Vu les fortes différences de durée de régime entre les deux études, on peut émettre l'hypothèse de mécanismes adaptatifs différents en fonction du temps. En effet, dans notre travail, l'étude de la bioénergétique mitochondriale s'effectue après 6 semaines de régime. Il apparaît dans ce cas que les mitochondries de foies développent des mécanismes permettant de limiter le stress oxydant et ses conséquences délétères sur la mitochondrie et la cellule. Nous avons démontré deux mécanismes d'adaptation permettant d'induire une diminution de la production de ROS par la mitochondrie chez les rats MCDD. Tout d'abord, l'augmentation du contenu en cytochrome aa_3 qui diminue les contraintes cinétiques sur les transporteurs d'électrons au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire. Cela a pour conséquence de diminuer l'état redox de ces transporteurs d'électrons et de ce fait de diminuer la probabilité de générer un anion superoxyde (Papa 1997). Dans un deuxième temps, l'augmentation du slipping de la COX, ainsi que du proton leak au niveau de la membrane interne mitochondriale, contribuent à limiter la production de ROS (Brookes 2005), notamment en diminuant le potentiel de membrane mitochondrial. Ces deux mécanismes peuvent également avoir un effet bénéfique sur l'accumulation de lipides au niveau des foies des rats MCDD. En effet, le slipping ET le leak peuvent contribuer à la stimulation de la consommation d'oxygène mitochondriale et à la diminution du rapport NADH/NAD⁺, deux phénomènes connus pour activer la β -oxydation des lipides (Garcia-Martinez, Sibille et al. 2001). De plus, l'oxydation accrue de l'octanoyl-carnitine par les mitochondries de rats, observée dans cette étude, nous indique l'augmentation des capacités hépatiques à utiliser les acides gras comme substrats respiratoires. Cela permettrait ainsi aux rats MCDD de limiter la stéatose hépatique.

14. Conclusion

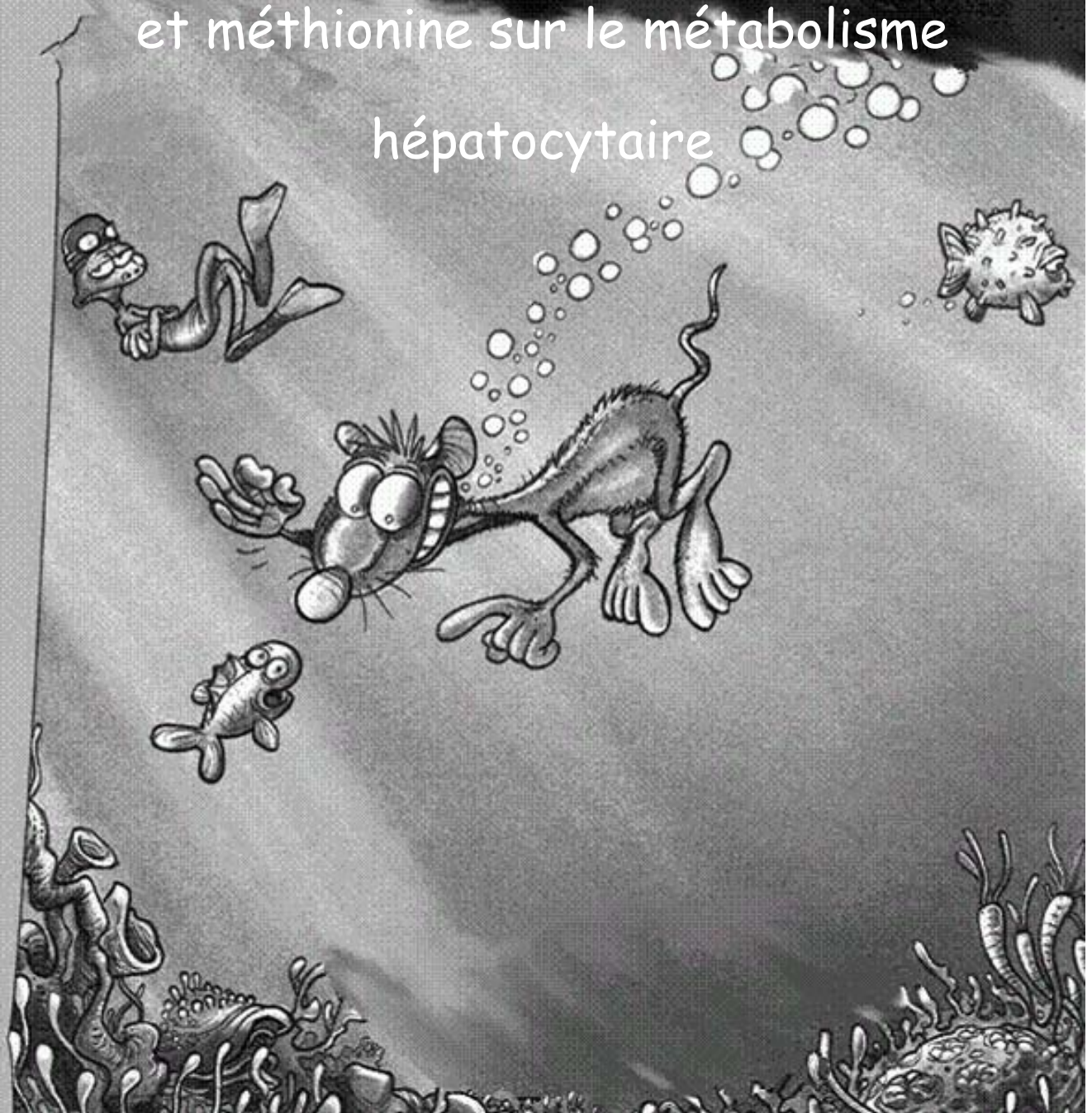
Au terme des 6 semaines de régime carencé en choline et méthionine, les rats développent une stéatohépatite, avec mise en place d'une stéatose et de foyers inflammatoires au niveau hépatique. Les résultats obtenus dans cette étude mettent en évidence le développement de mécanismes de découplage (redox slipping et proton leak) des mitochondries des rats MCDD. Les mitochondries hépatiques des rats MCDD montrent une légère diminution d'efficacité du transfert d'énergie et une augmentation de leur contenu et de l'activité de la cytochrome c oxydase. Ces modifications permettent une diminution de

la production mitochondriale d'H₂O₂ et une stimulation de la consommation d'oxygène, notamment à partir d'acides gras comme substrats. Ces adaptations ont probablement pour but de limiter l'accumulation de lipides hépatiques et le stress oxydant mais ne sont pas totales. A ce stade de mise en place de la stéatohépatite, les rats MCDD ont donc mis en place des mécanismes adaptatifs qui leur permettent de lutter contre les deux facteurs importants de cette pathologie : la stéatose (first hit) et le stress oxydant (second hit).

Chapitre III

Résultats et discussion - Tome 3

Effets d'un régime carencé en choline
et méthionine sur le métabolisme
hépatocytaire



III-3. Effets d'un régime carencé en choline et méthionine sur le métabolisme hépatocytaire

1. Introduction

Nous avons vu dans l'étude précédente (III. Tome 2), que les mitochondries de foie de rats MCDD mettaient en place des mécanismes adaptatifs, mettant en jeu une diminution de l'efficacité mitochondriale, permettant de limiter le développement de la NASH. Notre hypothèse dans cette partie du travail était que ce découplage mitochondrial avait des conséquences au niveau cellulaire et permettrait notamment d'augmenter l'utilisation des lipides présents au niveau du foie. Dans ce but, nous avons effectué une étude avec des hépatocytes isolés.

Lors des isolations des hépatocytes à partir des foies de rats MCDD, nous avons constaté que dès la première centrifugation nous obtenions deux populations hépatocytaires contre une seule pour les rats contrôles. Les cellules se répartissaient donc entre une population de cellules de petite taille de forme irrégulière (dans le culot), et une deuxième population de cellules plus grosses, rondes, semblables à des adipocytes (flottant à la surface). Cette deuxième population correspondrait en fait au hépatocytes chargés en lipides, refoulant leur noyau et le cytoplasme contre la membrane cellulaire, ce qui explique leur phénotype « adipocytaire ». Nous avons donc appelé la première population « MCDD » et la deuxième « fatty-MCDD ». Il semble donc que les hépatocytes des foies de rats MCDD ne soient pas atteints de manière homogène par la NASH. De plus, et comme il sera démontré plus loin dans ce chapitre, les deux types cellulaires sont capables de synthétiser du glucose. Cette constatation confirme que ces cellules sont bien des hépatocytes et que les cellules isolées ne sont pas de type non parenchymateuses, comme des cellules de Küpffer ou un autre type cellulaire présent dans le foie.

De manière classique, les résultats des mesures de métabolisme obtenus à partir d'hépatocytes isolés sont exprimés en $\mu\text{mol/}$ gramme de poids sec/ min. Mais au vu des différences phénotypiques entre les trois populations cellulaires (contrôle, MCDD, fatty-MCDD), il nous semblait que ce mode d'expression n'était pas le plus approprié dans cette étude. En effet, les hépatocytes « fatty-MCDD » ayant une grande quantité de lipides dans leur cytoplasme, on peut supposer que le poids sec de ces cellules ne reflétera pas la même activité métabolique que les cellules contrôles. Nous avons donc envisagé d'exprimer les résultats par milligramme de protéines, mais n'ayant pas pu non plus vérifier une possible variation de la quantité de protéines entre les groupes, ce mode d'expression ne nous a pas semblé judicieux. Le troisième mode d'expression envisagé, a été d'exprimer les résultats

par rapport à l'activité de la citrate synthase (CS). En effet, cette enzyme est considérée comme reflétant la quantité de mitochondrie. Mais dans notre cas nous ne pouvons pas exclure une modification de la quantité de mitochondries au sein des hépatocytes des différents groupes de rats. Nous avons donc choisi d'exprimer les résultats en terme de nombre de cellules. Un comptage sur lame de Mallassez a donc été effectué avec chaque lot cellulaire expérimental, et les résultats sont exprimés en $\mu\text{mol}/10^5$ cellules/min. Toutefois, quelque soit le mode d'expression, les résultats suivaient le même type de variations.

2. Respiration cellulaire

Lors de l'étude effectuée avec des mitochondries isolées de foies de rats MCDD, une augmentation de la consommation d'oxygène a été observée quel que soit le substrat utilisé (glutamate, succinate, dérivés d'acides gras). Nous avons donc voulu confirmer cette observation sur cellule entière. Pour cela, nous avons mesuré la respiration en absence et en présence d'oligomycine (inhibiteur de l'ATPase) des trois populations d'hépatocytes, les cellules issues de foies de rats contrôles, et les deux populations cellulaires (MCDD et fatty-MCDD) issues de foies de rats MCDD. L'étude a été réalisée en condition endogène (sans ajout de substrat), avec dihydroxyacétone (DHA) ou en présence de DHA + octanoate. Les résultats sont présentés dans le tableau III.24.

Tableau III.20: Effet d'un régime MCDD sur la respiration hépatocytaire

	JO_2 ($\mu\text{mol}/10^5$ cell/min)					
	contrôle		MCDD		Fatty-MCDD	
endogène	1,5 ± 0,1	\$	3,2 ± 0,5	★\$	1,5 ± 0,4	£
+ oligomycine	0,7 ± 0,2	\$	1,0 ± 0,3	\$	0,6 ± 0,3	
DHA	2,7 ± 0,2	\$	4,4 ± 0,4	★	2,2 ± 0,4	£
+ oligomycine	1,3 ± 0,2		2,0 ± 0,3		1,4 ± 0,3	
DHA + octanoate	3,8 ± 0,2		5,3 ± 0,6	★	2,3 ± 0,5	★£
+ oligomycine	1,8 ± 0,2		2,0 ± 0,3		1,0 ± 0,2	£

Les hépatocytes ont été isolés de rats contrôles et MCDD, à jeun depuis 24 heures. Les cellules sont incubées en pots fermés sans ajout de substrat (endo) ou en présence de DHA (20mM) plus 4 mM d'octanoate et oligomycine (6,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$), à 37°C sous atmosphère oxygénée O_2/CO_2 (19/1). Le milieu contient 2% d'albumine et la respiration a été mesurée avec une électrode de Clark. Les résultats sont exprimés en μmol d' $\text{O}_2/10^5$ cell/min et en moyenne ± SEM. n=10-13. Les comparaisons ($p < 0,05$) sont réalisées avec une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher.

* : significativement différent du groupe contrôle. £ : significativement différent du groupe MCDD. \$: significativement différent de l'octanoate.

En condition endogène, c'est-à-dire sans ajout de substrat, la consommation d'oxygène est significativement augmentée dans les cellules MCDD en comparaison avec les cellules contrôles (tableau III.24), en revanche, aucune différence n'est observée avec le groupe « fatty-MCDD ». L'addition d'oligomycine inhibe la respiration des hépatocytes contrôles de 55%, nous indiquant ainsi la part de la respiration non couplée à la synthèse d'ATP. La respiration insensible à l'oligomycine est quasiment identique dans le groupe « fatty-MCDD » à celle des contrôles, en revanche, elle est nettement plus élevée chez les cellules MCDD en comparaison avec les cellules du groupe contrôle, et cela quelque soit le substrat utilisé, laissant supposer un découplage mitochondrial dans ce groupe cellulaire.

L'incubation des hépatocytes contrôles avec de la DHA induit une augmentation de la respiration de 80%. La DHA étant métabolisée, elle fournit des équivalents réduits à la chaîne respiratoire, stimulant ainsi la consommation d'oxygène. Dans cette condition, l'ajout d'oligomycine inhibe la respiration du groupe contrôle de 52%. Les hépatocytes MCDD et « fatty-MCDD » présentent également une augmentation de leur respiration en présence de DHA, mais moins importante que celle observée avec les cellules contrôles (+37% et +47% respectivement).

L'addition d'acides gras (octanoate) stimule la respiration des hépatocytes contrôles (+40%). Cette stimulation est due à une augmentation de la disponibilité en NADH et FADH₂ pour la chaîne respiratoire (Brown, Lakin-Thomas et al. 1990; Nobes, Hay et al. 1990). L'ajout d'oligomycine sur les hépatocytes contrôles avec DHA + octanoate induit une inhibition de la consommation d'oxygène de 52%. L'effet stimulant des acides gras sur la consommation d'oxygène est moins important avec les cellules MCDD (+20%) qu'avec les cellules contrôles et est inexistant sur la respiration des cellules du groupe « fatty-MCDD ».

Quels que soient les substrats utilisés, les cellules MCDD présentent une respiration largement supérieure à celle des cellules contrôles, que ce soit en présence ou en absence d'oligomycine. Ces données confirment les résultats obtenus avec les mitochondries MCDD, où nous avons montré une augmentation de la respiration couplée (état 3) et de la respiration non couplée à une synthèse d'ATP (état 4). Cette respiration augmentée ne semble pas être une respiration extra-mitochondriale (peroxysomale...), puisque l'ajout de cyanure (inhibiteur de la cytochrome oxydase) a le même effet inhibiteur sur les 3 populations cellulaires (données non présentées). Avec les cellules MCDD, la respiration résiduelle en présence d'oligomycine est supérieure à celle des cellules contrôles, et nous laisse supposer un découplage mitochondrial et donc des capacités de réoxydation mitochondriales augmentées. Ce résultat correspond à ce que nous avons démontré avec les mitochondries isolées de rats MCDD (proton leak et slipping de la COX). La respiration

cellulaire couplée supérieure peut avoir diverses causes. Elle pourrait être la conséquence d'une utilisation de substrats endogènes, comme des acides gras, mais cette hypothèse nous paraît peu probable puisque les cellules sont incubées 45 minutes. De plus, cette hypothèse n'explique en rien la respiration oligomycine insensible augmentée. L'autre explication possible de cette respiration couplée supérieure dans les cellules MCDD pourrait être une quantité de mitochondrie augmentée dans ces cellules, et/ou une quantité d'enzymes de la chaîne respiratoire augmentée par mitochondrie. Cette dernière hypothèse corrobore tout à fait nos résultats avec les mitochondries isolées, où nous avons démontré une augmentation de la quantité et de l'activité de la cytochrome oxydase dans les mitochondries MCDD, ainsi qu'une augmentation des capacités de synthèse d'ATP (P/O).

Les hépatocytes « fatty-MCDD » quant à eux, présentent une respiration identique à celle des hépatocytes contrôles, lorsqu'ils sont étudiés sans substrat ou avec de la DHA. Cependant, cette respiration n'est pas, comme pour les autres types cellulaires, stimulée par l'ajout d'acides gras. L'observation sous microscope de ces cellules montre clairement un refoulement des organites vers la membrane, l'intérieur de la cellule étant majoritairement « occupé » par les lipides stockés. On peut supposer que i) dans les cellules « fatty-MCDD » qui sont chargées de lipides, les acides gras endogènes soient en permanence oxydés, et que l'ajout d'un acide gras exogène ne modifie en rien le métabolisme cellulaire et/ou que ii) les cellules « fatty-MCDD » soient des cellules « dysfonctionnantes ». L'absence d'effet de l'octanoate serait due à une altération du métabolisme cellulaire, et notamment de la fonction mitochondriale et donc de l'oxydation des lipides. Cette altération du métabolisme pourrait résulter d'un effet délétère des acides gras sur les membranes mitochondriales et/ou d'une quantité moindre de mitochondries. Afin de vérifier l'intégrité des cellules, nous avons étudié la néoglucogénèse hépatique dans chacune des populations d'hépatocytes.

Les hépatocytes de rats MCDD sont divisés en deux populations. La première population, MCDD, présente une consommation d'oxygène (couplée et non couplée) nettement supérieure à celle des cellules contrôles, confirmant ainsi les résultats obtenus lors de l'étude effectuée avec les mitochondries MCDD. La deuxième population, siège du stockage des lipides au niveau du foie, ne présente aucune stimulation de sa respiration en présence d'acide gras et semble être constituée de cellules « dysfonctionnantes ».

3. Métabolisme d'hépatocytes isolés

Dans un premier temps, et afin de vérifier l'intégrité de nos populations hépatocytaires, la néoglucogenèse hépatique est mesurée. L'ingestion d'un régime carencé en choline et méthionine induit un très fort remodelage de la composition des membranes mitochondriales (cf étude III. Tome 2 §11.2). On peut supposer qu'il en est de même au niveau des membranes cytoplasmiques. Or, l'intégrité de ces membranes est un facteur très important dans le maintien du métabolisme cellulaire. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons étudié la néoglucogenèse hépatique, dans chacun des groupes de rats, celle-ci étant le reflet de l'état énergétique de la cellule et donc de son intégrité.

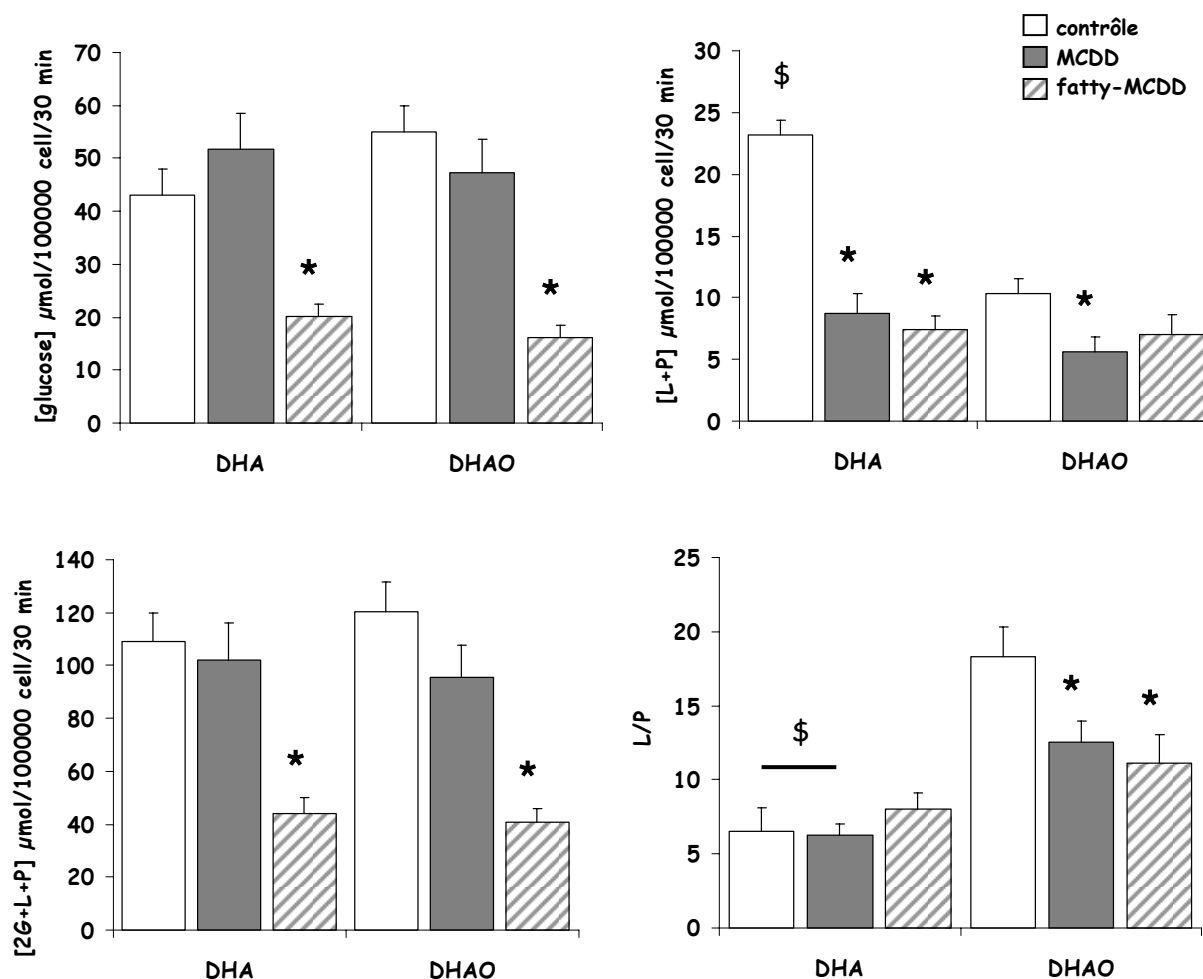
3.1 Néoglucogenèse à partir de DHA en présence ou non d'acide gras

La néoglucogenèse est évaluée à partir de DHA. Cet hydrate de carbone, phosphorylé en DHAP par la glycérokinase, entre au carrefour de la glycolyse et de la néoglucogenèse, et s'oriente vers l'une ou l'autre des voies en fonction de l'état énergétique de la cellule. La quantité de DHA métabolisé est exprimée par la somme du glucose, du pyruvate et du lactate (2G+L+P). L'ajout d'acide gras est connu pour modifier l'orientation des carbones entre néoglucogenèse/glycolyse, il est ensuite effectué sur nos différents lots cellulaires.

Conformément à ce qui a été décrit, le métabolisme de la DHA, contrôlé au niveau de la pyruvate kinase par le potentiel phosphate, s'oriente à 20% (L+P/2G+L+P) vers la glycolyse et 80% vers la néoglucogenèse (2G/2G+L+P) dans les hépatocytes contrôles. Dans cette condition, la néoglucogenèse des hépatocytes de rats MCDD tend à être supérieure à celle des contrôles, mais de manière non significative ($51,7 \pm 7$ vs. $43,1 \pm 5$ $\mu\text{mol}/10^5\text{cell}/\text{min}$), alors que la glycolyse (L+P) est nettement diminuée ($8,8 \pm 1$ vs. $23,2 \pm 2$ $\mu\text{mol}/10^5\text{cell}/\text{min}$. $p < 0,05$). Par contre, lorsqu'on regarde la quantité totale de DHA métabolisée (2G+L+P), on constate que celle-ci est identique entre les hépatocytes contrôles et MCDD. Il ressort de ces résultats une orientation des carbones de la DHA vers la néoglucogenèse à 91,6% dans le groupe MCDD, la glycolyse ne représentant plus que 8,4% de la DHA utilisée. A noter que cette répartition des carbones entre les deux voies est généralement observée lors de situations où l'état énergétique (ATP/ADP) et/ou l'état redox (NADH/NAD⁺) cellulaires augmentent, ce qui est démontré lors de l'ajout d'acides gras. Dans le groupe « fatty-MCDD », le métabolisme total de la DHA est nettement inférieur à celui observé avec les cellules contrôles (-56%). En effet, la néoglucogenèse et la glycolyse par les cellules « fatty-MCDD » sont nettement inférieures à celles des cellules contrôles (figure III.28). En revanche, les hépatocytes « fatty-MCDD » conservent une répartition des carbones de la DHA entre les deux voies relativement proche de celle mesurée avec les

hépatocytes contrôles (glyc : 15,5% et néogluc : 84,5%), avec, une petite tendance vers l'augmentation de la néoglucogenèse. Néanmoins, ce qui est important de noter, c'est la faible quantité de DHA métabolisée en comparaison avec les cellules contrôles.

Figure III.26: Effet d'un régime MCDD sur le métabolisme d'hépatocytes incubés en présence de DHA associé ou non à un acide gras (octanoate).



Les hépatocytes de rats contrôle, MCDD ou Fatty-MCDD sont incubés en présence de 20 mM de DHA $\pm$ 4 mM d'octanoate. Les productions de glucose et de lactate + pyruvate (L+P) sont déterminées à partir des accumulations de glucose, lactate et pyruvate durant les 30 min d'incubation. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM. $n=6-10$. Les comparaisons ($p<0,05$) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher : * significativement différent du groupe contrôle. \$: significativement différent de l'octanoate.

En présence d'acides gras le métabolisme de la DHA des hépatocytes contrôles est modifié avec une orientation des carbones à 91% vers la néoglucogenèse et à 9% vers la glycolyse. Cette réorientation des carbones à travers les différentes voies métaboliques est

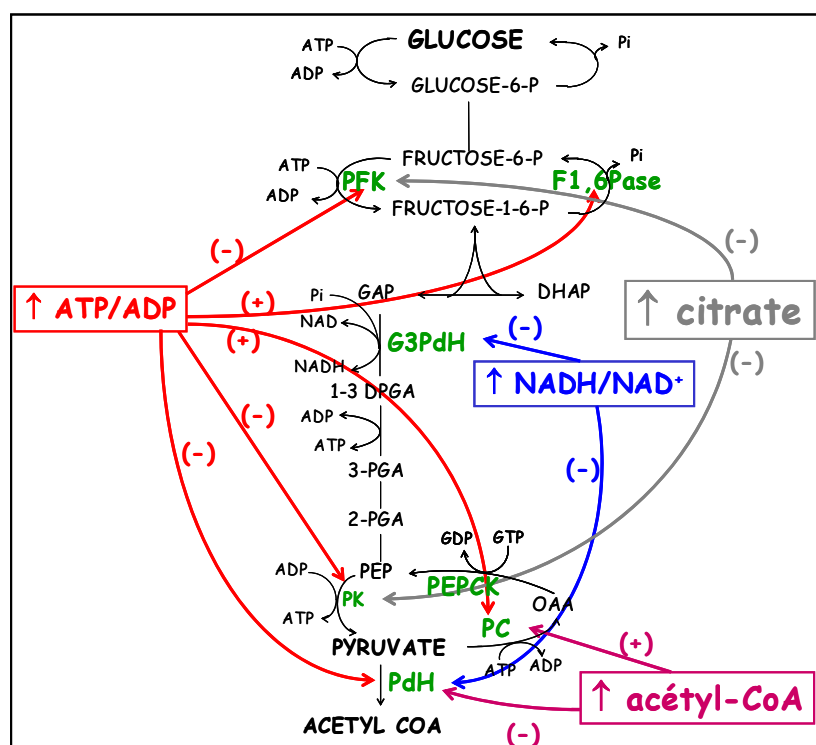
due à une réduction ($\uparrow$ NADH/NAD⁺) du cytosol en présence d'acides gras, aboutissant à une inhibition de la glycolyse (-55%), une stimulation de la néoglucogenèse (+27%) ainsi qu'une augmentation du rapport L/P. En effet, l'addition d'octanoate rend le métabolisme de la DHA sensible au potentiel redox, car les acides gras diminuent la concentration de phosphoénolpyruvate (PEP) en modifiant l'équilibre glyceraldéhyde-3-phosphate/PEP, ce qui diminue le flux à travers la pyruvate kinase. L'ajout des acides gras induit également une stimulation de la respiration cellulaire par l'apport d'équivalents réduits, et par conséquent une synthèse mitochondriale d'ATP augmentée (tableau III.24). Dans le groupe MCDD, l'ajout d'octanoate n'a aucun effet sur la néoglucogenèse, la glycolyse ou la quantité de DHA métabolisée en comparaison avec DHA seul. Le rapport L/P est augmenté par l'ajout d'octanoate, mais reste cependant significativement inférieur au rapport L/P des rats contrôles. Les hépatocytes « fatty-MCDD » présentent une néoglucogenèse, une glycolyse, un rapport L/P et une quantité de DHA métabolisée inchangés qu'ils soient incubés avec de la DHA seule ou additionnée d'octanoate. Ces résultats semblent montrer une « incapacité » des hépatocytes MCDD à métaboliser les substrats.

Cette étude montre la présence d'altérations métaboliques dans les deux populations hépatocytaires isolées à partir des foies de rats MCDD.

Il apparaît que les hépatocytes MCDD présentent une orientation préférentielle des carbones de la DHA vers la néoglucogenèse, et une absence de stimulation de celle-ci par les acides gras. Or, en condition contrôle, la répartition de la DHA dans la voie de glycolyse/néoglucogenèse est fonction du potentiel phosphate (ATP/ADP), via une régulation de la PK par celui-ci (figure III.29). Donc, le fait que la glycolyse soit inhibée chez les hépatocytes MCDD pourrait être due à une inhibition du flux au travers de la PK, laissant supposer une augmentation du rapport ATP/ADP dans les cellules MCDD. De plus, une augmentation du potentiel phosphate serait en accord avec les résultats obtenus sur mitochondries isolées où nous avons montré une augmentation des capacités maximales de synthèse d'ATP (P/O) des mitochondries MCDD (cf chap III Tome 2, §10.2). Lors d'une incubation en présence de DHA et d'acides gras, l'oxydation de ces derniers augmente la fourniture en acétyl-CoA et en NADH et FADH₂, stimulant ainsi la synthèse d'ATP. Ainsi, l'augmentation de la quantité d'acétyl-CoA, du rapport NADH/NAD⁺ et ATP/ADP induisent une diminution de la glycolyse, en inhibant la PdH, la PK et la PFK, et une augmentation de la néoglucogenèse, en stimulant la PC et la F1,6 Pase (figure III.29). Contrairement aux contrôles, l'ajout d'acides gras ne stimule pas la néoglucogenèse des hépatocytes MCDD, les cellules ne semblent pas « sensibles » aux variations du potentiel redox. De plus, l'augmentation du rapport L/P, reflet du rapport NADH/NAD⁺ cytosolique, est 2 fois moins importante que chez les contrôles (+180% vs +88% respectivement). Cette stimulation moindre du rapport L/P peut avoir plusieurs causes, i) les acides gras sont oxydés en

proportion plus faible, mais cette hypothèse semble peu favorable si on se réfère à l'augmentation de la respiration et plus loin dans le manuscrit à l'augmentation de la cétogénèse, ou alors ii) l'oxydation est inchangée mais le transfert des équivalents réduits de la matrice vers le cytosol est perturbé ou enfin iii) l'hypothèse la plus probable est que la respiration mitochondriale étant augmentée (notamment du fait de la diminution du rendement mitochondrial), cela augmente les capacités de réoxydation cellulaires. La mesure de l'oxydation de l'octanoate nous permettra de confirmer ou pas cette hypothèse.

Figure III.27: Effet des acides gras sur les enzymes des voies néoglucogénique et glycolytique hépatique



PFK, phosphofructokinase ; F1,6Pase, fructose 1,6 biphosphatse ; G3PDH, glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase ; PK , pyruvate kinase ; PEPCK, phosphoénolpyruvate carboxykinase ; PC, pyruvate carboxylase ; PdH, pyruvate déshydrogénase.

Les hépatocytes « fatty-MCDD », quant à eux, présentent une réelle diminution de leur métabolisme, comme nous le montre la très faible quantité de DHA métabolisée en comparaison aux contrôles. Or, lorsqu'on observe ces cellules sous microscope optique, on constate qu'une grosse gouttelette lipidique occupe quasiment toute la cellule, le noyau et les organites étant repoussés en périphérie. On peut donc émettre l'hypothèse que la « machinerie » métabolique est extrêmement altérée au sein de ces hépatocytes, expliquant ainsi que pour une même quantité de cellules, le métabolisme soit plus faible. Une autre hypothèse pourrait être que, les membranes étant complètement modifiées, et la cellule étant surchargée en lipides, l'activité ou la quantité des enzymes du métabolisme soient

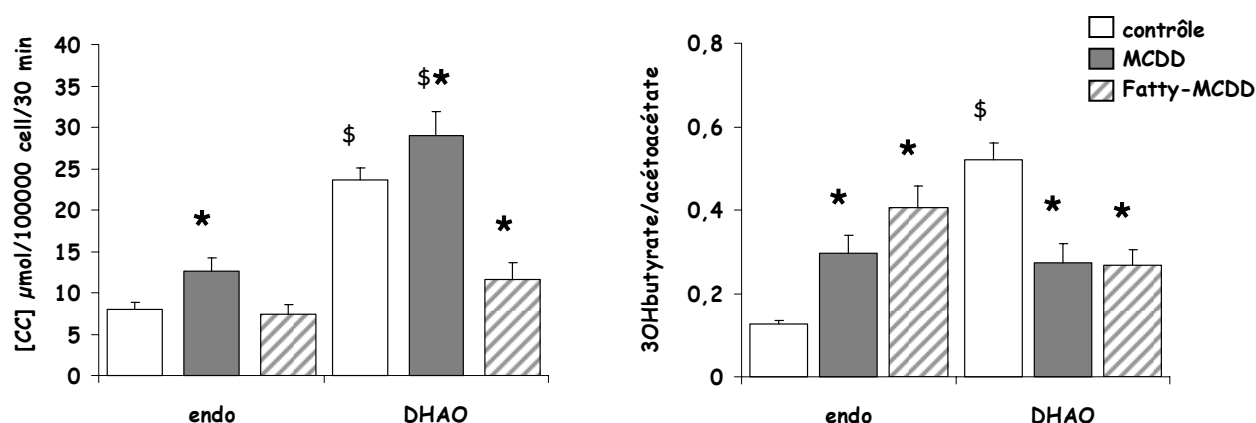
modifiées, de même que le transport membranaire de la DHA puisse être altéré. Enfin nous ne pouvons pas occulter une mauvaise estimation de la quantité de cellules, qui pourrait induire un biais dans l'expression des résultats.

Le métabolisme de la DHA est orienté vers la néoglucogenèse plutôt que vers la glycolyse dans les hépatocytes MCDD, démontrant une augmentation du potentiel phosphate dans ces cellules du fait d'une augmentation des capacités de synthèse d'ATP des mitochondries. De plus l'adjonction d'acides gras dans ce groupe ne modifie ni leur néoglucogenèse ni leur glycolyse. Dans les hépatocytes MCDD, le métabolisme de la DHA semble insensible aux modifications de l'état redox par l'octanoate, suggérant fortement une augmentation des capacités de réoxydation des équivalents réduits du fait d'une augmentation de la respiration mitochondriale. Les hépatocytes « fatty-MCDD » ont une diminution de leur métabolisme total, et une absence d'effets des acides gras sur celui-ci. Ces cellules semblent très altérées par la surcharge lipidique et dysfonctionnantes.

3.2 Production de corps cétoniques

Afin d'étudier les capacités d'oxydation des acides gras par les hépatocytes de rats MCDD, nous avons mesuré la formation de corps cétoniques ainsi que le rapport 3-OHbutyrate/acétoacétate, qui reflète à une constante près le rapport NADH/NAD⁺ mitochondrial. Les résultats sont présentés en figure III.30.

Figure III.28 : Effet d'un régime MCDD sur la production de corps cétoniques (3OHbutyrate + acétoacétate), le rapport 3OHbutyrate/acétoacétate.



Les hépatocytes de rats contrôle, MCDD ou « fatty-MCDD » sont incubés sans ajout de substrat (endo) ou en présence de DHA (20mM) plus 4 mM d'octanoate. La production de corps cétoniques (CC), est calculée à partir de la production de β-hydroxybutyrate et acétoacétate au terme de 30 min d'incubation. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. n=6-10. Les comparaisons

($p < 0,05$) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher : * significativement différent du groupe contrôle. \$: significativement différent de l'octanoate.

Comme attendu en condition contrôle, la production de corps cétoniques augmente significativement en présence d'acides gras (+200%). En condition basale (sans substrats) la cétogenèse est très faible et provient principalement de la lipolyse et de la protéolyse cellulaires. Les acides gras sont oxydés au niveau de la mitochondrie et conduisent à la synthèse d'acétyl-CoA. Cette β -oxydation produit des équivalents réduits, l'apport d'acides gras entraîne ainsi une augmentation du rapport 3-hydroxybutyrate/acétoacétate (X4). De plus, les acétyl-CoA synthétisés vont soit entrer dans le cycle de Krebs et fournir des équivalents réduits provoquant une stimulation de la respiration (cf table III.24), soit être transformés en acétoacétyl-CoA et former ainsi des corps cétoniques.

Les hépatocytes de rats MCDD présentent une cétogenèse supérieure à celle des rats contrôles en conditions endogène (+60%). L'effet stimulateur des acides gras sur la cétogenèse (figure III.30) et la respiration (tableau III.24) sont également observés. Par contre, l'ajout d'octanoate ne modifie pas le rapport 3-hydroxybutyrate/acétoacétate.

Les hépatocytes MCDD présentent une cétogenèse plus élevée que les contrôles en condition endogène, signifiant soit i) la présence d'acides gras au sein même de la cellule, soit ii) que les capacités de réoxydation mitochondriales sont augmentées, ce qui stimule l'oxydation des acides gras et limite l'augmentation du rapport NADH/NAD⁺ (rapport 3-hydroxybutyrate/acétoacétate) lors d'apports exogènes d'acides gras.

Les hépatocytes « fatty-MCDD » ont une cétogenèse identique à celle des contrôles, et celle-ci n'est pas augmentée en présence d'acides gras. Le rapport 3-hydroxybutyrate/acétoacétate reste également identique entre les deux conditions. Les hépatocytes « fatty-MCDD » montrent un profil d'oxydation lipidique identique au profil d'oxydation de la DHA, c'est-à-dire faible et non stimuable par l'ajout d'acides gras.

Les hépatocytes MCDD présentent une oxydation lipidique supérieure à celle des contrôles, démontrée par une augmentation de la respiration et de la cétogenèse. Par contre, l'ajout d'acides gras exogènes modifie peu le potentiel redox mitochondrial. Ces résultats suggèrent une augmentation des capacités de réoxydation des équivalents réduits dans les mitochondries de foies de rats MCDD. Cette hypothèse est cohérente avec l'augmentation de la respiration mitochondriale démontrée avec les mitochondries isolées. Les hépatocytes « fatty-MCDD » ont une oxydation lipidique diminuée, et une absence d'effets des acides gras sur celle-ci. Ces résultats nous confortent dans notre hypothèse d'un métabolisme hépatocytaire effondré dans ce groupe.

Sur les deux populations d'hépatocytes isolées à partir de rats MCDD, il semble que l'une d'entre elle est métaboliquement « non fonctionnelle », les hépatocytes « fatty-MCDD », et les hépatocytes MCDD présentent des adaptations métaboliques avec un métabolisme des hydrates de carbone préférentiellement orienté vers la néoglucogenèse via une augmentation du potentiel phosphate et un métabolisme lipidique augmenté grâce à des capacités oxydatives mitochondriales accrues.

3.3 Néoglucogenèse à partir de glycérol ou LPO

Conjointement à l'étude de la néoglucogenèse à partir de DHA nous avons étudié celle-ci à partir de glycérol et de lactate/pyruvate + octanoate. Le glycérol entre au même niveau de la voie métabolique que la DHA, mais le contrôle de la néoglucogenèse est majoritairement exercé par le potentiel redox cytosolique au niveau de la glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPdH) (Berry, Kun et al. 1973). L'utilisation du lactate/pyruvate, en condition de jeûne, dépend principalement de la PK et de la PC (Groen, van Roermund et al. 1986). Nous avons donc comparé le métabolisme hépatique de ces deux substrats ainsi que leur orientation vers la glycolyse ou la néoglucogenèse (tableau III.25).

Tableau III.21 : Effet d'un régime MCDD sur le métabolisme d'hépatocytes incubés en présence de glycérol ou LPO.

	Glucose ($\mu\text{mol}/10^5 \text{ cell}/30\text{min}$)			L+P ($\mu\text{mol}/10^5 \text{ cell}/30\text{min}$)			2G+L+P ($\mu\text{mol}/10^5 \text{ cell}/30\text{min}$)		
	contrôle	MCDD	Fatty-MCDD	contrôle	MCDD	Fatty-MCDD	contrôle	MCDD	Fatty-MCDD
glycérol	11 $\pm$ 2	19 $\pm$ 3	8 $\pm$ 2	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	6 $\pm$ 3	24 $\pm$ 2	40 $\pm$ 6	22 $\pm$ 6
		*				*		*	
LPO	26 $\pm$ 4	42 $\pm$ 7	8 $\pm$ 4						
		*							

	L/P			JO_2 ($\mu\text{mol } O_2/10^5 \text{ cell}/\text{min}$)		
	contrôle	MCDD	Fatty-MCDD	contrôle	MCDD	Fatty-MCDD
glycérol	21 $\pm$ 2	41 $\pm$ 6	28 $\pm$ 6	2,6 $\pm$ 0,4	4,2 $\pm$ 0,7	2,2 $\pm$ 0,4
		*			*	
LPO				4,1 $\pm$ 0,4	5,1 $\pm$ 0,5	1,4 $\pm$ 0,4
						*

Les hépatocytes contrôles, MCDD et « fatty-MCDD », de rats à jeun depuis 24 heures, sont incubées en pots fermés en présence de glycérol ou lactate/pyruvate + octanoate. Le milieu contient 2% d'albumine et la respiration a été mesurée avec une électrode de Clark. Les résultats sont exprimés en $\mu\text{mol d'O}_2/10^5 \text{ cell/min}$ et en moyenne $\pm$ SEM. Les productions de glucose et de lactate + pyruvate (L+P) sont déterminées à partir des accumulations de glucose, lactate et pyruvate au terme des 30 min d'incubation. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM. $n=6-10$. $n=10-13$. Les comparaisons ($p<0,05$) sont réalisées avec une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher. * : significativement différent du groupe contrôle.

En condition contrôle, le glycérol s'oriente à 8% vers la glycolyse et 92% vers la néoglucogenèse dans les hépatocytes, avec un flux total de $24 \pm 2 \mu\text{mol}/10^5 \text{ cell}/30 \text{ min}$ (tableau III.25). Lorsqu'on regarde la quantité totale de glycérol métabolisée par les hépatocytes MCDD, on constate que celle-ci est significativement supérieure aux contrôles (+66%), et qu'elle est associée à une augmentation de la néoglucogenèse (+72%) alors que la glycolyse ne varie pas. Les hépatocytes de rats MCDD ont une orientation des carbones du glycérol préférentiellement vers la néoglucogenèse plutôt que vers la glycolyse (95% et 5% respectivement) en comparaison aux contrôles. Une augmentation du rapport lactate/pyruvate, ainsi que de la respiration, est également observée. Les hépatocytes « fatty-MCDD » quant à eux, métabolisent une quantité totale de glycérol identique aux contrôles. Cependant, le métabolisme du glycérol est différent des contrôles, puisqu'il s'oriente à 27% vers la glycolyse et seulement à 73% vers la néoglucogenèse, contre 8% et 92% en condition « contrôle ». Le rapport L/P et la respiration ne sont pas modifiés dans ce groupe.

Lorsque les hépatocytes sont incubés en présence de lactate/pyruvate + octanoate (LPO), on observe une néoglucogenèse (+61%), plus importantes dans le groupe MCDD en comparaison aux contrôles. La respiration tend également à être supérieure (+24%), mais de manière non significative. Les hépatocytes « fatty-MCDD » présentent une production de glucose identique aux contrôles, mais avec une respiration significativement diminuée (-66%).

Les résultats observés avec du glycérol comme substrat dans le groupe MCDD sont en parfait accord avec nos hypothèses précédentes. En effet, le métabolisme total du glycérol est régulé principalement au niveau de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (G3PDH) par le potentiel redox cytosolique (Berry, Kun et al. 1973). Il a été montré qu'une augmentation de ce dernier, comme lors d'une incubation couplée glycérol + octanoate (Guigas 2003), induisait une diminution du métabolisme du glycérol et de la néoglucogenèse. A l'inverse une diminution du rapport NADH/NAD^+ dans des hépatocytes de rats carencés en acides gras polyinsaturés induit une augmentation du métabolisme total du glycérol (Piquet, Fontaine et al. 1996). Dans les hépatocytes MCDD, on peut ainsi supposer que l'augmentation du métabolisme total du glycérol soit la conséquence d'une

augmentation de la disponibilité en NAD^+ dans ces cellules du fait d'une augmentation des capacités de réoxydation des équivalents réduits par les mitochondries MCDD. L'augmentation du rapport lactate/pyruvate, qui est le reflet du rapport NADH/NAD^+ cytosolique, ne soutient apparemment pas cette hypothèse, toutefois, il est important de souligner que les expériences ont été réalisées dans des flacons fermés, avec des concentrations saturantes en substrats, c'est-à-dire dans un état pseudo-stationnaire et que dans ces conditions, le rapport L/P peut ne pas être à l'équilibre avec le rapport NADH/NAD^+ . La néoglucogenèse à partir de glycérol est supérieure à celle des contrôles, ce résultat conforte l'hypothèse d'une augmentation du potentiel phosphate qui avait été supposée avec la DHA. Parallèlement à cela, les hépatocytes MCDD présentent également une production de glucose accrue en présence de LPO, en comparaison aux hépatocytes contrôles. Or, le contrôle de la néoglucogenèse à partir de lactate et pyruvate est régulé par le potentiel phosphate au niveau de plusieurs enzymes, notamment la PC, la PK et la F1,6bPase (Groen, van Roermund et al. 1986). L'octanoate va être oxydé et fournir de l'acétyl-CoA, des équivalents réduits, et permet d'inhiber la voie glycolytique et stimuler la voie néoglucogénique. Ces résultats vont encore une fois dans le sens de l'hypothèse d'une augmentation du potentiel phosphate dans les cellules MCDD, certainement comme conséquence d'une augmentation des capacités de synthèse d'ATP des mitochondries.

Les résultats obtenus avec hépatocytes « fatty-MCDD » nous confortent dans notre hypothèse d'un effondrement du métabolisme de ce groupe consécutif à un dysfonctionnement de ces cellules. De plus, le fait qu'avec le glycérol nous trouvons un métabolisme comparable à celui des cellules contrôles nous permet d'écarter l'hypothèse d'une mauvaise évaluation de la quantité de cellules « fatty-MCDD » et donc d'une mauvaise estimation des résultats.

Les hépatocytes de rats MCDD présentent une stimulation de leur néoglucogenèse à partir de LPO et de glycérol ce qui suggère une augmentation du potentiel phosphate dans les cellules MCDD. L'augmentation du métabolisme total du glycérol démontre également une augmentation des capacités de réoxydation des mitochondries MCDD.

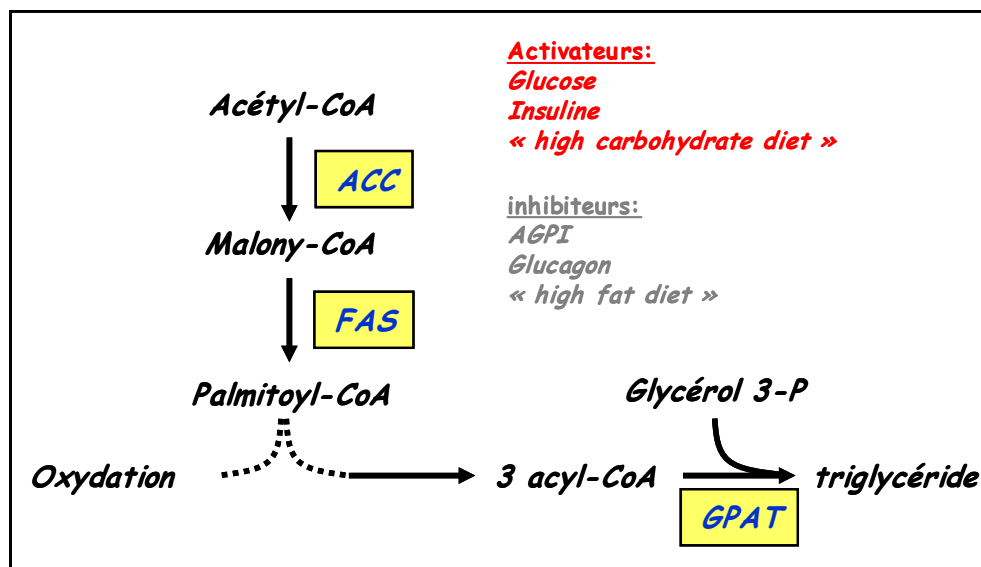
En résumé, avec le régime MCDD, nous avons isolé 2 populations distinctes de cellules des foies de rats. Une population de morphologie « normale » les cellules MCDD et une population qui présente une surcharge lipidique, les cellules « fatty-MCDD ». Le régime MCDD provoque des modifications différentes du métabolisme hépatocytaire dans les 2 sous-populations cellulaires. Avec les cellules MCDD, le métabolisme des hydrates de carbones semble orienté préférentiellement vers la production de glucose et n'est pas stimuable par les acides gras, tandis que le métabolisme des lipides est augmenté. Les hépatocytes « fatty-MCDD » quant à eux présentent un effondrement total du métabolisme intermédiaire. Il semble que ces cellules ne développent pas d'adaptations métaboliques, ce qui à des effets délétères conduisant à un dysfonctionnement cellulaire et à une surcharge en lipides.

Dans cette première partie des expériences, nous avons étudié le versant oxydatif du métabolisme des lipides, avec la mesure de la consommation d'oxygène et de la synthèse de corps cétoniques. Mais le foie est également un site important de synthèse d'acides gras à partir de substrats non lipidiques comme le glucose. Il nous a donc semblé important d'étudier la lipogenèse hépatique chez les rats MCDD, et plus particulièrement deux enzymes clés de cette voie métabolique : l'Acétyl Coenzyme A Carboxylase (ACC) et la Fatty Acid Synthase (FAS).

4. Lipogenèse hépatique

La lipogenèse *de novo* (LDN) permet la synthèse de nouvelles molécules d'acides gras à partir de substrats non lipidiques, principalement des carbohydrates. La première étape de la LDN, qui permet la synthèse de malonyl-CoA à partir d'acétyl-CoA et de CO₂, est contrôlée par l'ACC (Wakil, Stoops et al. 1983). Il existe deux isoformes de cette enzyme (Widmer, Fassihi et al. 1996): ACC1, prédominant dans le foie et ACC2 dans les autres tissus comme le cœur et le muscle squelettique. L'étape suivante de la LDN est contrôlée par la FAS et permet la synthèse de palmitate, qui sera par la suite soit oxydé au niveau de la mitochondrie, soit utilisé pour la synthèse d'autres acides gras et de triglycérides. La régulation de la LDN s'effectue à plusieurs niveaux : hormonal, métabolique et nutritionnel. L'insuline et le glucose ont un effet stimulateur sur la LDN, tandis que les acides gras et principalement les acides gras polyinsaturés, le glucagon et une restriction calorique la diminue (figure III.31).

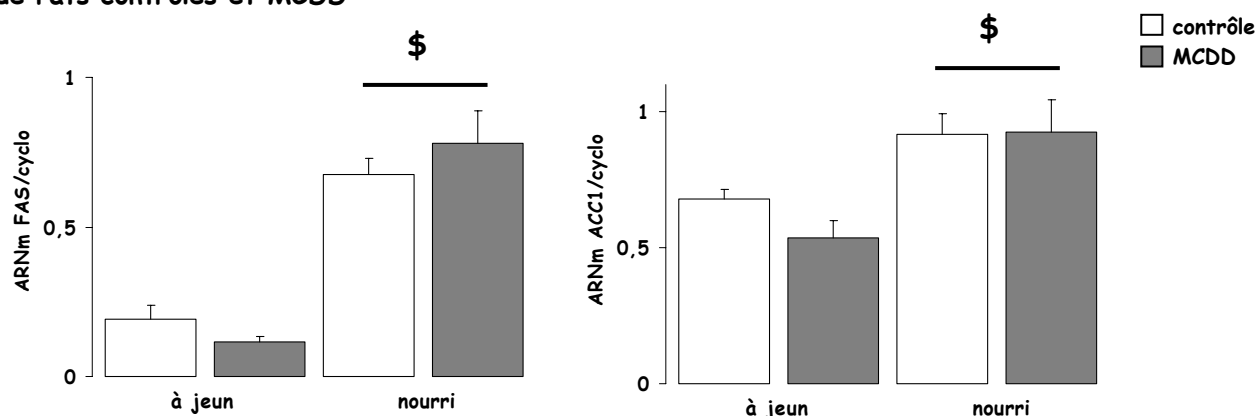
Figure III.29 : Expression des gènes marqueurs la lipogenèse (FAS et ACC1) dans le foie de rats contrôles et MCDD



D'après (Foufelle and Ferre 2002).

Le profil d'expression des ARNm de FAS et ACC1 des foies de rats contrôles correspond à ce qui est classiquement décrit dans la littérature, avec une augmentation de la transcription de ces deux ARNm à l'état nourri par rapport à l'état de jeûne (Foufelle, Girard et al. 1996; Foufelle and Ferre 2002; Letexier 2004). Les rats MCDD, présentent le même profil que les contrôles, avec une augmentation de la quantité d'ARNm de FAS et ACC1 en condition nourri (figure III.32). On note tout de même une tendance à une expression moindre des deux ARNm dans les foies de rats MCDD à jeûne, en comparaison aux contrôles, mais de manière non significative.

Figure III.30 : Expression des gènes marqueurs la lipogenèse (FAS et ACC1) dans le foie de rats contrôles et MCDD



L'expression des gènes pour FAS et ACC1 dans le foie a été réalisée par RT-PCR à partir de primers spécifiques. La cyclophiline est utilisée comme gène de référence. L'analyse a été réalisée avec 5 rats dans chaque groupe. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM. Les comparaisons ($p < 0,05$) sont réalisées avec une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher. \$: significativement différent de à jeûne.

Ces résultats pourraient paraître surprenants en premier abord. En effet, les acides gras du foie ont plusieurs provenances, l'alimentation, la lipolyse adipocytaire et la lipogenèse *de novo*. La stéatose hépatique résulte d'un dysfonctionnement dans une ou plusieurs de ces voies (synthèse, export, oxydation). Or, Donnelly et collaborateur (Donnelly, Smith et al. 2005) ont estimé la part de chaque voie dans l'accumulation de lipides hépatiques chez des patients atteints de NAFLD recevant une alimentation contrôlée. Il apparaît chez ces sujets une forte augmentation de la lipogenèse *de novo* en comparaison des sujets contrôles (26% vs 5% respectivement). Cette augmentation de LDN a également été observée dans d'autres études menées sur des patients obèses (Diraison, Dusserre et al. 2002), des patients diabétiques de type 2 (Forcheron, Cachefo et al. 2002) et des patients ayant une NAFLD (Diraison, Yankah et al. 2003), mais également sur différents modèles animaux recevant un régime enrichi en sucres (Kim, Ellmerer et al. 2003 ; Samuel, Liu et al. 2004). Dans toutes ces études, l'augmentation de la LDN serait la conséquence de l'insulinorésistance et de l'hyperglycémie. En effet, l'insuline et le glucose sont des activateurs de différents facteurs de transcription comme SREBP-1c (sterol receptor binding protein 1-c) et ChREBP (carbohydrate response element binding protein) qui sont impliqués dans la transcription des gènes de la lipogenèse (Foufelle and Ferre 2002; Yahagi, Shimano et al. 2002; Browning and Horton 2004; Eberle, Hegarty et al. 2004 ; Tamura and Shimomura 2005).

Si on se réfère aux résultats obtenus dans l'étude III tome 2, et comme cela a déjà été décrit pour ce modèle, les animaux recevant un régime MCD présentent une hypoglycémie et une hypoinsulinémie en comparaison des contrôles (George, Pera et al. 2003; Ip, Farrell et al. 2003; Rinella and Green 2004; Assy, Grozovski et al. 2006; Leclercq, Lebrun et al. 2007). Les facteurs classiquement décrits dans l'induction de la LDN ne semblent donc pas être impliqués dans ce modèle. De plus, une étude récente a estimé par western blot la quantité de protéine ACC phosphorylée, qui est la forme inactive, par rapport à la quantité d'ACC totale (Leclercq, Lebrun et al. 2007). Il apparaît, une fois normalisé, que la quantité de protéine non activée est identique dans les foies de souris MCDD en comparaison à des souris contrôles. Les résultats que nous avons obtenus semblent donc en accord avec les autres données portant sur ce modèle. Cependant, il serait intéressant de mesurer l'activité de ACC et de FAS afin de confirmer ce que les ARNm et les protéines nous indiquent.

Les foies de rats MCDD présentent une lipogenèse de novo identique à celle observée sur le foie des rats contrôles. Cela pourrait être dû à l'absence de stimulation par l'insuline et le glucose. La stéatose majeure trouvée dans les foies des rats MCDD, ne semble pas être la conséquence d'une lipogenèse de novo accrue, mais très vraisemblablement, comme

nous l'avons déjà supposé par ailleurs, la conséquence d'une altération de l'exportation des lipides hors du foie.

5. Discussion

Dans le chapitre précédent nous avons montré la présence d'adaptations mitochondriales dans les foies des rats MCDD. Dans cette partie, nous avons poursuivi l'étude de la NASH induite par un régime carencé en choline et méthionine et nous l'avons élargie au niveau cellulaire en nous intéressant plus particulièrement aux modifications du métabolisme hépatique.

Nous avons mis en évidence 2 populations distinctes de cellules hépatocytaires dans les foies de rats recevant un régime carencé en méthionine et choline, une population de morphologie « normale » et une population qui présente une surcharge lipidique. Or il apparaît que les modifications du métabolisme hépatocytaire observées dans les 2 sous-populations cellulaires sont totalement différentes. La première population cellulaire (MCDD) présente un métabolisme des hydrates de carbones orienté préférentiellement vers la production de glucose et n'est pas stimuable par les acides gras, tandis que le métabolisme des lipides est augmenté. Il apparaît que ces conséquences métaboliques sont liées aux modifications des fonctions mitochondriales décrites dans le chapitre III Tome 2. En effet, l'augmentation de la respiration mitochondriale couplée à la synthèse d'ATP, avec l'augmentation de la COX, et l'augmentation des capacités de synthèse d'ATP, conduit à une augmentation du potentiel phosphate cellulaire et à une stimulation des voies consommatrices d'énergie comme la néoglucogenèse. Par ailleurs, l'augmentation de la respiration non couplée à la synthèse d'ATP, via un proton leak et un slipping de la COX, mais aussi de la respiration couplée, augmente les capacités de réoxydation des équivalents réduits et stimule ainsi les voies utilisant le NAD^+ comme la β -oxydation. Les hépatocytes MCDD présentent donc des adaptations métaboliques qui permettraient de maintenir une certaine production de glucose nécessaire à l'organisme et de limiter la stéatose hépatique.

La deuxième population de cellules (fatty-MCDD) présente un effondrement total du métabolisme intermédiaire. Il semble que ces cellules ne développent pas d'adaptations métaboliques, ce qui a des effets délétères conduisant à un dysfonctionnement cellulaire et à une surcharge en lipides.

La compréhension des mécanismes adaptatifs développés dans les cellules MCDD permettant de limiter la surcharge lipidique semble primordiale pour l'élaboration de traitements de la NASH. La mitochondrie et plus particulièrement la vitesse de réoxydation de celle-ci semble une cible thérapeutique de première importance.

ANNEXE II

	Corps Cétoniques ($\mu\text{mol}/10^5 \text{ cell}/30\text{min}$)			$\beta\text{OH}/\text{AcAc}$			JO_2 ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gps}$)		
	contrôle	MCDD	Fatty-MCDD	contrôle	MCDD	Fatty-MCDD	contrôle	MCDD	Fatty-MCDD
Endo	7,9 $\pm$ 0,9	12,6 $\pm$ 1,6 *	7,4 $\pm$ 1,1	0,13 $\pm$ 0,01	0,30 $\pm$ 0,04 *	0,41 $\pm$ 0,05 *	1,5 $\pm$ 0,1	3,2 $\pm$ 0,5 *	1,5 $\pm$ 0,4
DHAO	7,9 $\pm$ 1,0	6,1 $\pm$ 0,6 *	4,7 $\pm$ 1,5 *	0,52 $\pm$ 0,04	0,27 $\pm$ 0,05 *	0,27 $\pm$ 0,04 *	3,8 $\pm$ 0,2	5,3 $\pm$ 0,6 *	2,3 $\pm$ 0,5

	Glucose ($\mu\text{mol}/10^5 \text{ cell}/30\text{min}$)			L+P ($\mu\text{mol}/10^5 \text{ cell}/30\text{min}$)			2G+L+P ($\mu\text{mol}/10^5 \text{ cell}/30\text{min}$)		
	contrôle	MCDD	Fatty-MCDD	contrôle	MCDD	Fatty-MCDD	contrôle	MCDD	Fatty-MCDD
DHA	43 $\pm$ 5	52 $\pm$ 7	20 $\pm$ 2 *	23 $\pm$ 1	9 $\pm$ 2 *	7 $\pm$ 1 *	109 $\pm$ 11	102 $\pm$ 14	44 $\pm$ 6 *
DHA-Oct	55 $\pm$ 6	47 $\pm$ 6	16 $\pm$ 2 *	10 $\pm$ 1	6 $\pm$ 1 *	7 $\pm$ 2	120 $\pm$ 11	96 $\pm$ 12	41 $\pm$ 5 *
glycérol	11 $\pm$ 2	19 $\pm$ 3 *	8 $\pm$ 2	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	6 $\pm$ 3 *	24 $\pm$ 2	40 $\pm$ 6 *	22 $\pm$ 6
LPO	26 $\pm$ 4	42 $\pm$ 7 *	8 $\pm$ 4						

	L/P			JO_2 ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gps}$)		
	contrôle	MCDD	Fatty-MCDD	contrôle	MCDD	Fatty-MCDD
	6,5 $\pm$					
DHA	1,6	6,3 $\pm$ 0,7	8,0 $\pm$ 1,1	2,7 $\pm$ 0,2	4,4 $\pm$ 0,4 *	2,2 $\pm$ 0,4
DHA-Oct	18,3 $\pm$ 2,0	11,9 $\pm$ 1,3 *	11,1 $\pm$ 1,9 *	3,8 $\pm$ 0,2	5,3 $\pm$ 0,6 *	2,3 $\pm$ 0,5 *
glycérol	21 $\pm$ 2	41 $\pm$ 6 *	28 $\pm$ 6	2,6 $\pm$ 0,4	4,2 $\pm$ 0,7 *	2,2 $\pm$ 0,4
LPO				4,1 $\pm$ 0,4	5,1 $\pm$ 0,5	1,4 $\pm$ 0,4 *

Chapitre III

Résultats et discussion - Tome 4

Effets d'un traitement à l'almitrine ou à la metformine sur un régime carencé en choline et méthionine



III-4. Effet d'un traitement à l'almitrine ou à la metformine sur les rats MCDD

1. Rationnel

La stéatose hépatique étant considérée comme l'élément promoteur (first hit) de la mise en place de la NASH, le but de cette quatrième étude était de trouver une molécule pouvant modifier l'oxydation des acides gras dans le foie, et de ce fait le stockage de ceux-ci. Ainsi, un traitement ayant pour but de limiter la mise en place de la stéatose ou de la faire régresser lorsqu'elle est déjà en place, ouvrirait de nouvelles perspectives thérapeutiques. Pour cela, nous avons choisi deux molécules pouvant moduler l'utilisation des lipides dans le foie par un potentiel effet sur le métabolisme intermédiaire et l'efficacité mitochondriale.

L'almitrine : cette molécule est utilisée habituellement lors de traitement de patients souffrants d'insuffisance respiratoire. Il a été également démontré un effet de ce médicament sur le couplage de l'oxydation phosphorylante (Castaing, Manier et al. 1986). En effet, des études menées sur mitochondries de levure, de cœur de boeuf et de foie de rat, ont démontrées que l'almitrine : i) inhibe l'activité ATPasique, ii) diminue le rapport ATP/O sans modifier la force protonmotrice et iii) n'a pas d'action directe sur l'activité de la chaîne respiratoire. Il a donc été proposé que l'action inhibitrice de l'almitrine sur l'ATPase soit la conséquence d'un changement de stoechiométrie H^+/ATP (Rigoulet, Ouhabi et al. 1989; Rigoulet, Fraisse et al. 1990; Jumelle-Laclau, Rigoulet et al. 1993). En résumé, l'almitrine modifie la stoechiométrie de l'ATPase/ATPsynthase mitochondriale (Leverve, Sibille et al. 1998). Ce « proton slipping » induit par l'Almitrine est responsable d'une perte d'efficacité de la mitochondrie qui pourrait conduire à une augmentation de la vitesse de respiration des mitochondries, donc de la vitesse d'oxydation des substrats mitochondriaux comme les acides gras, et pourrait ainsi avoir une action bénéfique sur la stéatose.

La Metformine : Ce médicament est utilisé comme traitement du diabète de type II. La metformine a une action anti-hyperglycémiant qui pourrait être expliquée par un effet de la molécule au niveau de différents tissus cibles : réduction de l'absorption du glucose au niveau intestinal, diminution de la production hépatique de glucose et/ou augmentation de la capture cellulaire et de l'utilisation du glucose par les tissus périphériques liée ou non à une modification de la synthèse et/ou de la sensibilité à l'insuline. En outre, certains mécanismes via l'AMPK, comme une modification du métabolisme lipidique, pourraient également contribuer à l'effet anti-hyperglycémiant de la Metformine. En effet, Zhou et al. ont montré

que la Metformine entraînait une augmentation de l'oxydation lipidique sur des hépatocytes en culture (Zhou, Myers et al. 2001).

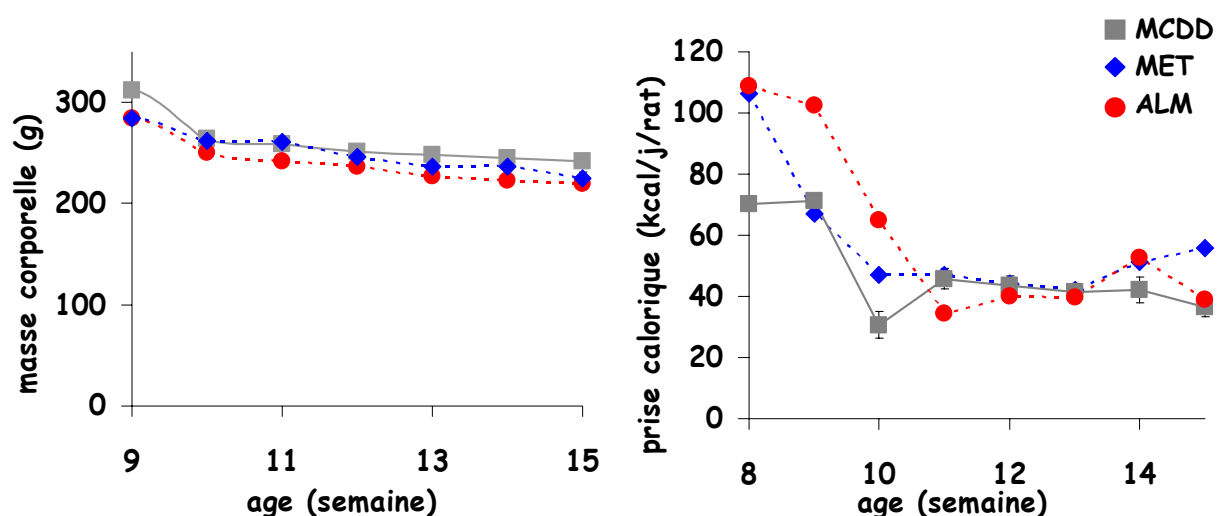
Notre choix c'est porté sur ces deux molécules, almitrine et metformine, dans le but d'augmenter l'oxydation des lipides hépatiques et ainsi limiter la stéatose.

2. Prise de poids et prise calorique

Comme précédemment décrit, les rats reçoivent un régime carencé en choline et méthionine à l'âge de 9 semaines, et cela pendant 6 semaines. Deux traitements pharmacologiques ont été testés sur ce régime.

Dans notre étude, après 10 jours de régime MCDD, les rats reçoivent soit de la Metformine (groupe MET), soit de l'Almitrine (ALM) dans leur eau de boisson, et cela jusqu'à la fin du régime. Les concentrations des deux solutions sont calculées de manière à délivrer 50mg/kg/j de Metformine (Guigas 2003) ou 15mg/kg/j d'Almitrine aux rats (Kreher, Keriell et al. 1996). Les deux solutions sont changées tous les jours. Les rats recevant le régime MCDD constitue le groupe contrôle. Un suivi de la prise alimentaire et de la prise de poids est effectué chaque semaine. On notera que les caractéristiques du groupe MCDD (poids, prise alimentaire ...) de cette étude sont identiques à celle observées lors de l'étude précédente.

Figure III.22: Evolution de la masse corporelle et de la prise alimentaire des rats soumis à un régime MCDD pendant 6 semaines, associé ou non à un traitement à l'Almitrine ou à la Metformine.



La masse corporelle et la prise alimentaire des rats recevant un régime carencé en choline et méthionine pendant 6 semaines (MCDD), associé ou non à un traitement, apporté dans l'eau de boisson durant les 4 dernières semaines et demi de régime, à l'almitrine (ALM ; 15mg/kg/j) ou à

la metformine (MET ; 50 mg/kg/j) sont mesurées quotidiennement. Les résultats sont exprimés en moyenne + SEM, n=7. Les comparaisons ($p < 0,05$) sont réalisées par un test t non apparié.

Comme précédemment décrit, on observe une perte de poids lors des premières semaines de régime MCDD, poids qui tend ensuite à se stabiliser au environ de 241 ± 1 g au terme des 6 semaines de régime (figure III.22). Le groupe ALM et MET montrent le même profil de masse corporelle que celui des rats MCDD, et présentent respectivement une masse de 220 ± 4 g et 224 ± 7 g au terme du régime. Le pourcentage de perte de poids induite par les 6 semaines de régime ± traitement est identique entre les trois groupes de rats (MCDD : $23 \pm 0,2$ % ; MET : $21 \pm 0,8$ % ; ALM : $21 \pm 0,8$ %).

Comme lors de l'étude III Tome 2, les rats sont stabulés à 4 par cage. Les résultats présentés sont donc une estimation de la prise calorique quotidienne par rat (kcaltotal/4). Le profil de la prise calorique suit celui de la prise de poids, avec une diminution de celle-ci lors des trois premières semaines chez le groupe MCDD. La quantité de calories ingérées se stabilise au environ de 35-40 kcal/rat/jour, jusqu'à la fin du régime (figure III.22). Les groupes ALM et MET suivent le même profil que celui observé chez les rats MCDD. On note tout de même que le groupe MET stabilise sa prise calorique dès la première semaine, alors qu'il faut attendre la troisième semaine pour les groupe MCDD et ALM. Néanmoins, au terme du traitement, aucune différence significative n'est observée entre les animaux traités et non traités.

Nos résultats ne montrent un léger effet de la metformine sur la courbe de poids. Pourtant, l'administration de la molécule entraîne une perte de poids chez les patients (Watanabe, Kanner et al. 1989 ; Lee and Morley 1998; Paolisso, Amato et al. 1998), effet lié, entre autre, à une réduction de la prise alimentaire (Paolisso, Amato et al. 1998 ; Kim, Kim et al. 2006). D'autres études menées chez le rongeur, montrent, comme avec les patients, un effet anorexigène de la metformine (Rouru, Huupponen et al. 1992; Rouru, Huupponen et al. 1993; Rouru, Pesonen et al. 1995; Song, Andrikopoulos et al. 2001; Kim, Kim et al. 2006)

Quelques études ont été menées sur l'influence de l'almitrine sur la prise de poids et l'ingestion calorique de patients. Suivant les études, l'almitrine induit, ou non, une perte de poids. En fait, il apparaît une perte de poids conséquente des patients, dans les cas de neuropathie induite par le traitement à l'almitrine (Belec, Larrey et al. 1989; Bouche, Lacomblez et al. 1989; Gherardi, Belec et al. 1989), alors que celle-ci reste légère, voir négligeable dans le reste des cas (Gorecka, Sliwinski et al. 2003; Sans-Torres, Domingo et al. 2003). Chez des rongeurs traités pendant 3 semaines avec de l'almitrine, aucune modification de la prise alimentaire des rats n'est observée, malgré un léger ralentissement de la prise de poids (Kreher, Keriél et al. 1996).

Dans notre étude, le régime MCD induit par lui-même une modification de la prise alimentaire et de la prise de poids. On peut donc supposer que les effets potentiels de la Metformine et de l'Almitrine sur la prise de poids soient présents mais masqués dans ceux du régime.

3. Répartition tissulaire

Différents tissus et organes ont été prélevés et pesés afin d'observer un effet potentiel de l'almitrine ou de la metformine sur leur masse (tableau III.31). Les masses tissulaires sont exprimées pour 100g de masse corporelle.

Les rats MCDD présentent une répartition tissulaire identique à celle observée lors de l'étude précédente. Les six semaines de régime carencé en choline et méthionine ont largement affecté la répartition des lipides au sein de l'organisme, avec un stockage de TG au niveau hépatique et une forte diminution de la masse grasse (tableau III.31). La répartition tissulaire observée chez les groupes ALM et MET est identique à celle du groupe MCDD. Dans la littérature, la perte de poids induite par la metformine est associée à une diminution de la masse grasse, notamment du tissu adipeux épидидymal et rétropéritonéal (Lin, Yang et al. 2000; Song, Andrikopoulos et al. 2001; Kim, Kim et al. 2006). L'absence d'effet, dans notre étude, de la metformine sur la répartition tissulaire peut s'expliquer par le fait que les rats MCDD ont déjà une très faible quantité de tissu adipeux blanc.

Tableau III.31: caractéristiques physiologiques des rats MCDD, ALM et MET

	MCDD	ALM	MET
Masse corporelle (g)	241 ± 1	220 ± 4 *	224 ± 7 *
Foie (g/100g)	4,6 ± 0,2	4,6 ± 0,3	5,1 ± 0,3
Tissu adipeux blanc (g/100g)	1,3 ± 0,2	1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,2
épididymal	0,62 ± 0,10	0,55 ± 0,07	0,64 ± 0,03
rétropéritonéal	0,68 ± 0,10	0,66 ± 0,07	0,70 ± 0,07
Triglycéride (μmol/g) foie	185 ± 23	183 ± 22	180 ± 25

Les animaux reçoivent un régime carencé en choline et méthionine pendant 6 semaines (MCDD), associé ou non à un traitement, apporté dans l'eau de boisson durant les 4 dernières semaines et demi de régime, à l'almitrine (ALM ; 15mg/kg/j) ou à la metformine (MET ; 50 mg/kg/j). Les mesures de prise calorique représente une estimation de l'ingestion journalière par rat (Kcal_{total}/4). Les masses sont exprimées pour 100g de masse corporelle (masse relative). Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM, n=7. Les comparaisons (p<0,05) sont réalisées par un test t non apparié. * significativement différent des contrôles.

La quantité de triglycérides hépatique est nettement inférieure dans cette étude par rapport à l'étude précédente (185 vs. 385 $\mu\text{mol/g}$). Cela peut être dû à un problème lors de l'extraction des lipides, ou lors du dosage. Quoiqu'il en soit, cela n'empêche nullement la comparaison entre nos trois groupes de rats. En effet, l'extraction de lipides a été réalisée lors d'une même expérimentation, et les mêmes produits ont été utilisés. Nous constatons dans le tableau III.31 que la quantité de triglycérides hépatiques n'est pas modifiée par l'un ou l'autre des traitements, et reste identique au groupe MCDD. Il a été démontré qu'un traitement de souris *ob/ob* avec de la metformine empêchait l'accumulation de lipides au niveau du foie (Lin, Yang et al. 2000) du fait d'une inhibition de l'expression de facteurs liés à l'insulinorésistance, comme le $\text{TNF-}\alpha$. Or, les rats MCDD ne présentent pas d'insulinorésistance, et l'accumulation de TG hépatiques est due à un défaut d'exportation, ceci pourrait expliquer l'absence d'effet de la Metformine dans notre étude.

4. Données plasmatiques

Du sang a été prélevé et des dosages de métabolites ont été réalisés avec du plasma. Le profil lipidique a été réalisé, avec le dosage des triglycérides (TG), des acides gras non estérifiés (AGNE) et du glycérol.

Tableau III.32: caractéristiques plasmatiques des rats carencés en choline et méthionine après 6 semaines de régime et/ou traitement.

	MCDD	ALM		MET
glycémie (mM)	5,9 $\pm$ 0,5	5,7 $\pm$ 0,2		5,6 $\pm$ 0,4
TG (mM)	0,32 $\pm$ 0,03	0,23 $\pm$ 0,02	★	0,27 $\pm$ 0,04
AGNE (mM)	0,53 $\pm$ 0,07	0,44 $\pm$ 0,08		0,34 $\pm$ 0,03 ★
glycérol (mM)	0,24 $\pm$ 0,01	0,18 $\pm$ 0,01	★	0,17 $\pm$ 0,01 ★

Les animaux reçoivent un régime carencé en choline et méthionine pendant 6 semaines (MCDD), associé ou non à un traitement, apporté dans l'eau de boisson durant les 4 dernières semaines et demi de régime, à l'almitrine (ALM ; 15mg/kg/j) ou à la metformine (MET ; 50 mg/kg/j). Les mesures sont réalisées avec du plasma congelé d'animaux nourris. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM, n=7. Les comparaisons ($p < 0,05$) sont réalisées par un test *t* non apparié. ★ significativement différent du groupe MCDD.

Comme lors de l'étude III Tome 2 §7, les rats MCDD à l'état nourri présentent une glycémie aux environs de 6 mM, ce qui est inférieur aux valeurs observées dans des

conditions contrôles dans la littérature (Minassian, Tarpin et al. 1998; Song, Andrikopoulos et al. 2001; Zhou, Myers et al. 2001; Simon, del Puy Portillo et al. 2002; couturier 2003). Le traitement des rats avec de la metformine ou de l'almitrine n'induit aucune modification de la glycémie, les trois groupes présentent une glycémie identique (tableau III.32). La metformine a une action anti-hyperglycémiant démontrée (Cusi, Consoli et al. 1996; Abbasi, Carantoni et al. 1998; Hundal, Krssak et al. 2000), or les rats MCDD présentent déjà une glycémie inférieure aux contrôles (étude III Tome 2 § 7), cela peut expliquer l'absence de variation de celle-ci dans le groupe MET. On peut également imaginer que i) les cibles d'action de la metformine (AMPK...) n'ont aucune incidence sur la glycémie des animaux recevant le régime carencé en choline et méthionine, ou encore que ii) les atteintes hépatiques engendrées par le régime MCDD ne sont pas réversibles par un traitement pharmacologique. Le profil lipidique plasmatique des rats MCDD correspond à celui observé dans l'étude III tome 2 §7. Le traitement à l'almitrine induit une diminution significative des triglycérides et du glycérol plasmatique. Les tissus de stockage (tissu adipeux blanc) ainsi que le niveau de stéatose hépatique n'étant pas modifiés par l'almitrine, on peut supposer que cette diminution des triglycérides est dû à une augmentation de leur captation et de leur utilisation, alors que celle du glycérol semble désigner une inhibition de la lipolyse bien que la diminution des AGNE ne soit pas significative, ou une augmentation de l'utilisation du glycérol en tant que substrat énergétique. Les rats MET présentent, quant à eux, une diminution significative des AGNE et du glycérol plasmatique, sans modification de la concentration de triglycérides. Or, outre son action sur la glycémie, il a été montré une action de la metformine sur le métabolisme lipidique. Ainsi, chez des patients diabétiques, la metformine est décrite comme entraînant une amélioration du profil lipidique. A la suite d'un traitement chronique à la metformine, il est fréquemment observé une diminution de la concentration plasmatique des triglycérides (Johnson, Webster et al. 1993; Jeppesen, Zhou et al. 1994; Cusi, Consoli et al. 1996) ainsi que des acides gras libres (Jeppesen, Zhou et al. 1994; Abbasi, Carantoni et al. 1998; Hundal, Krssak et al. 2000). Les études réalisées sur les rats sont, quand à elles, plus controversées. Certains ne voient aucune modification du profil lipidique après un traitement à la metformine (Mithieux, Guignot et al. 2002), alors que d'autres mesurent des variations de concentration de TG et/ou AGNE plasmatiques (Song, Andrikopoulos et al. 2001; Zhou, Myers et al. 2001). De plus, l'équipe de Zhou a démontré une augmentation de l'oxydation lipidique sur hépatocytes isolés en culture, via une activation de l'AMP kinase (Zhou, Myers et al. 2001). On peut donc supposer que la diminution de AGNE et de glycérol observé chez le groupe MET est due à une augmentation de leur utilisation, notamment au niveau hépatique.

Comme lors de l'étude III, les six semaines de régime carencé en choline et méthionine induisent un ralentissement de la prise alimentaire ainsi que de la prise de poids des animaux. Une modification de la répartition tissulaire et des données plasmatiques, est également retrouvée dans cette étude. Le traitement des rats MCDD avec de la metformine ou de l'almitrine n'induit pas de modification sur la prise de poids et la prise alimentaire des animaux. Nous n'avons observé aucune modification de la glycémie et de la répartition tissulaire des animaux traités pharmacologiquement. En revanche, une tendance à l'« amélioration » du profil lipidique plasmatique est observée qui irait dans le sens d'une augmentation de la captation et/ou de l'utilisation des TG et AGNE.

5. Paramètres de l'oxydation phosphorylante

Dans le but de vérifier un effet potentiel des deux traitements sur le métabolisme intermédiaire et l'efficacité mitochondriale, la respiration a été mesurée sur mitochondries isolées de rats MCDD avec ou sans traitement à la metformine ou l'almitrine. Du glutamate/malate et du succinate/malate/roténone ont été utilisés comme substrats, en présence de BSA (0,3% final). La consommation d'oxygène a été mesurée en condition non phosphorylante ($\pm$ oligo) et en condition phosphorylante, après ajout d'ADP (état 3). Les résultats sont présentés dans le tableau III. 33. Les deux traitements sont décrits comme ayant une action au niveau mitochondrial, l'un en augmentant l'oxydation lipidique (metformine), et donc la fourniture en substrats à la chaîne respiratoire (Zhou, Myers et al. 2001), et l'autre en faisant « patiner » l'ATPase (almitrine), (Rigoulet, Ouhabi et al. 1989; Rigoulet, Fraisse et al. 1990; Jumelle-Laclau, Rigoulet et al. 1993; Leverve, Sibille et al. 1998)).

Tableau III.33 : Respiration (JO_2) des mitochondries de foie provenant de rats contrôles ou MCDD traités ou non à la metformine ou à l'almitrine

	JO_2 (natomO/min/mg prot)					
	succ/mal			glut/mal		
	état non phosphorylant	état 4 oligo	état 3	état non phosphorylant	état 4 oligo	état 3
MCDD	38 $\pm$ 4	33 $\pm$ 3	174 $\pm$ 23	18 $\pm$ 1	15 $\pm$ 2	113 $\pm$ 16
ALM	36 $\pm$ 5	33 $\pm$ 3	160 $\pm$ 16	22 $\pm$ 5	16 $\pm$ 2	106 $\pm$ 11
MET	34 $\pm$ 2	33 $\pm$ 1	164 $\pm$ 8	16 $\pm$ 2	14 $\pm$ 1	99 $\pm$ 4

Les animaux reçoivent un régime carencé en choline et méthionine pendant 6 semaines (MCDD), associé ou non à un traitement, apporté dans l'eau de boisson durant les 4 dernières semaines et

demi de régime, à l'almitrine (ALM ; 15mg/kg/j) ou à la metformine (MET ; 50 mg/kg/j). Les mitochondries de foie de rats (1 mg/ml) MCDD, ALM et MET ont été incubées dans un milieu KCl + BSA (0,3% final) à 37°C, en présence de 5/0,5 mM succ/mal plus 1,25 μ M roténone ou 5/1,25 mM de glut/mal. La consommation d'oxygène est mesurée par oxygraphie. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM ; n=7. Les comparaisons (p<0,05) sont réalisées par une ANOVA suivi d'un test post hoc PLSD Fisher.

La consommation d'oxygène des mitochondries des rats MCDD, en état phosphorylant (état 3) et non phosphorylant est statistiquement identique à celle mesurée lors de l'étude III Tome 2 §10.1, et ce quel que soit le substrat. En présence de succinate/malate ou glutamate /malate, la respiration en état non phosphorylant des mitochondries de rats MET et ALM, est identique à celle des rats MCDD. La respiration couplée à la synthèse d'ATP (état 3, après ajout d'ADP) est également identique entre les trois groupes. L'ajout d'oligomycine, un inhibiteur de l'ATPase, ramène la respiration à un niveau identique à celui mesuré en état non phosphorylant, et cela dans les trois groupes de mitochondries. Les différents traitements ne semblent pas modifier les pertes énergétiques (leak et slip) puisque les respirations à l'état non phosphorylant et en état 4 sont du même ordre de grandeur chez les trois groupes de mitochondries étudiées.

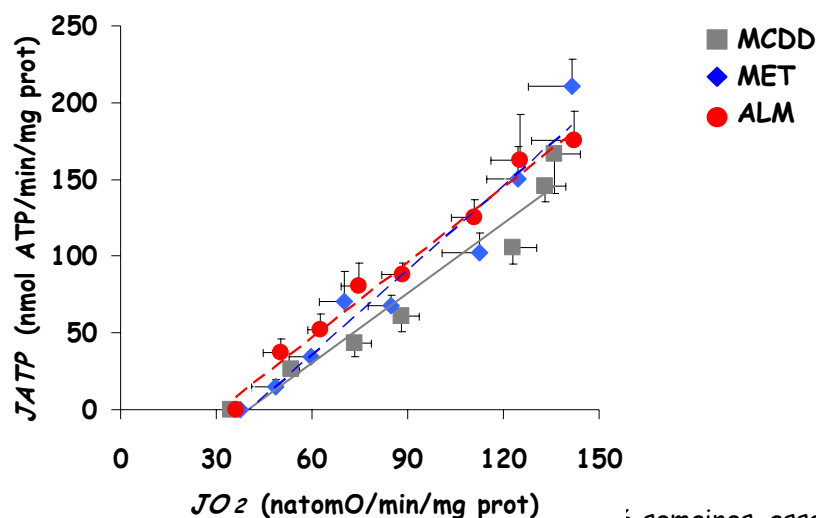
L'absence d'effet de l'almitrine sur la respiration mitochondriale n'est pas étonnante. En effet, des études ont montrées sur hépatocytes isolés et incubés (Leverve, Fontaine et al. 1994) mais aussi sur mitochondries isolées (Rigoulet, Ouhabi et al. 1989; Rigoulet, Fraisse et al. 1990; Jumelle-Laclau, Rigoulet et al. 1993), que l'almitrine induisait une diminution du rapport ATP/ADP, dans le cytosol et dans la mitochondrie, sans modification de la respiration, ni de la force protonmotrice. A l'opposé, le fait que le traitement à la metformine n'ait pas d'effet sur la respiration mitochondriale est surprenant. En effet, plusieurs études ont mis en évidence un effet inhibiteur de la metformine sur le complexe I de la chaîne respiratoire (El-Mir, Nogueira et al. 2000; Owen, Doran et al. 2000 ; Guigas 2003; Brunmair, Staniek et al. 2004; Batandier, Guigas et al. 2006). Cependant le mode d'action de la metformine sur mitochondries reste discuté. En effet Owen et coll. (Owen, Doran et al. 2000) suggèrent que la drogue a un mode de pénétration lent à travers la membrane mitochondriale interne, ou elle inhibe directement le complexe I de la chaîne respiratoire. A l'opposé, El-Mir et coll. (El-Mir, Nogueira et al. 2000) ont démontré que la metformine diminuait rapidement la respiration d'hépatocytes intacts pré-incubés avec la drogue. Par contre, et de manière surprenante, ils ont observé que la metformine n'exerçait aucun effet lorsqu'elle était mise directement au contact avec des mitochondries isolées de foies ou d'hépatocytes perméabilisés, ce qui semble exclure une interaction directe de la molécule avec la mitochondrie. La recherche par ces auteurs de la voie de signalisation pouvant expliquer cet effet particulier a conduit à plusieurs constatations : l'effet cellulaire de la metformine i) est dose dépendant, ii) et apparaît être sensible à la température car il est

complètement aboli à 15°C. La disparition des effets cellulaires de la metformine suite à la modification de l'état physico-chimique de la membrane plasmique par le froid a conduit les auteurs à proposer un mode d'action de la drogue lié à un événement membranaire, pouvant éventuellement passer par un mécanisme d'internalisation de la molécule (El-Mir, Nogueira et al. 2000). Cette hypothèse est renforcée par de récents travaux sur des oocytes de xénope, où l'effet inhibiteur de la metformine sur le complexe I disparaît à basse température ou lorsque celle-ci est mise en contact directe avec une fraction enrichie en mitochondries (Detaille, Guigas et al. 2002). Cependant, l'incorporation de liposomes contenant de la metformine à cette fraction mitochondriale induit à nouveau l'effet inhibiteur de la metformine, ce qui est en accord avec une fusion des vésicules avec la membrane mitochondriale. Il ressort de ces études que le mode d'action de la metformine serait dépendant de l'état physico-chimique de la membrane plasmique. Or dans notre étude nous avons observé un fort remaniement de la composition de celle-ci au niveau mitochondrial. On peut supposer qu'il en est de même au niveau de la membrane plasmique, empêchant ainsi l'internalisation de la metformine et son action inhibitrice au niveau du complexe I de la chaîne respiratoire. Le manque d'effet de la metformine serait lié aux altérations de la composition membranaire, dues au régime MCDD.

6. Efficacité de la synthèse d'ATP

Nous avons ensuite étudié les conséquences de ces traitements sur l'efficacité de l'oxydation phosphorylante, et nous avons évalué la relation entre la synthèse d'ATP et la consommation d'oxygène à différents niveaux d'activité de la mitochondrie. Nous avons étudié le rendement de l'oxydation phosphorylante à des concentrations sous-saturantes d'ADP, avec le système hexokinase et en présence de succinate/malate.

Figure III.23: Effet d'un traitement à l'almitrine ou à la metformine sur la relation entre la synthèse d'ATP (J_{ATP}) et la consommation d'oxygène (JO_2) de mitochondries isolées de foies de rats recevant un régime carencé en choline et méthionine.



Les animaux reçoivent un régime carencé en choline et méthionine pendant 4 semaines, associé ou non à un traitement, apporté dans l'eau de boisson durant les 4 dernières semaines et demi de régime, à l'almitrine (ALM ; 15mg/kg/j) ou à la metformine (MET ; 50 mg/kg/j). Les mitochondries de foie de rats (1 mg/ml) MCDD, ALM et MET ont été incubées dans un milieu KCl + BSA (0,3% final) à 37°C, en présence de 5/0,5mM succ/mal, 1,25µM de roténone, 20mM de glucose, 125µM d'ATP et 1mM de MgCl₂. La synthèse d'ATP est modulée par différentes concentrations d'hexokinase (0,2-2 U/mL). Le flux de synthèse d'ATP est calculé à partir du dosage enzymatique du glucose-6-phosphate. La consommation d'oxygène est mesurée par oxygraphie. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. n=7.

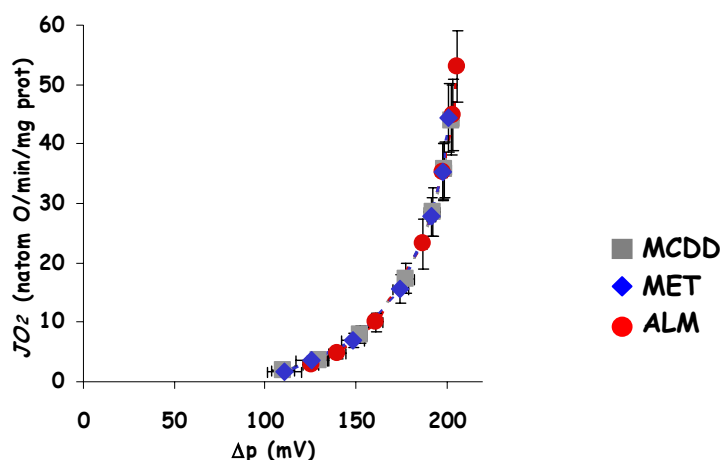
Comme précédemment décrit chez le groupe MCDD, la relation entre synthèse d'ATP et consommation d'oxygène est linéaire, est semblable à celle observée lors de l'étude III Tome 2 §10.2. La figure III.23 montre que les relations des trois groupes sont linéaires, parallèles et quasiment superposées. Cela signifie que les trois groupes de mitochondries ont le même rendement mitochondrial. Ces résultats sont étonnants, notamment pour le groupe ALM. En effet, même si l'almitrine n'induit pas de modification de consommation d'oxygène au niveau mitochondrial, elle est reconnue pour induire un changement de stoechiométrie au niveau de l'ATPase, avec une augmentation du ratio H⁺/ATP (il faut plus de protons pour la synthèse d'une même quantité d'ATP). Cela induit une forte diminution de la synthèse d'ATP, se traduisant par un rapport ATP/O plus faible (Rigoulet, Ouhabi et al. 1989; Rigoulet, Fraisse et al. 1990; Jumelle-Laclau, Rigoulet et al. 1993). On aurait donc pu s'attendre à ce que la relation soit décalée vers la droite. On peut donc également se poser la question de l'influence de la composition membranaire sur l'action de l'almitrine sur la mitochondrie. En effet, Jumelle-Laclau et coll. ont décrit un effet âge-dépendent de l'almitrine sur la stoechiométrie H⁺/ATP au niveau de l'ATPase (Jumelle-Laclau, Rigoulet et al. 1993). Cet effet est en fait lié aux modifications de composition

membranaire des mitochondries au cours de la croissance de l'animal, et plus particulièrement au niveau de l'acide linoléique (C18 :2) et de l'acide docosahexanoïque (C20 :6). Dans cette étude, une action de l'almitrine apparaît chez des rats âgés de 10 semaines, alors qu'aucun effet n'était mesurable à 5 semaines. Parallèlement à l'âge, l'acide docosahexanoïque diminue alors que l'acide linoléique augmentent entre 5 et 10 semaines (Jumelle-Laclau, Rigoulet et al. 1993). Or, le régime MCDD induit l'effet inverse de l'âge, c'est-à-dire une augmentation de l'acide docosahexanoïque et une diminution de l'acide linoléique (données non montrées). Cela pourrait donc expliquer l'absence d'effet de l'almitrine sur le rendement mitochondriale du groupe ALM. L'absence d'effet de la metformine est également surprenante. En effet, Guigas et coll. (Guigas 2003) ont observé une augmentation du rapport ATP/O avec succinate/malate/roténone et en condition saturante d'ADP, sur mitochondries de foie de rats traités à la metformine pendant 10 jours. On aurait donc pu s'attendre à un décalage de la droite reliant la synthèse d'ATP à la respiration des mitochondries du groupe MET vers la gauche. Or ce n'est pas le cas, la droite étant quasiment superposée à celle du groupe MCDD (figure III.23). Ici aussi, on peut supposer que l'absence d'effet de la metformine sur le rendement mitochondrial est due à la modification de la composition lipidique des membranes, empêchant l'action de celle-ci.

7. Efficacité de la chaîne respiratoire

Nous avons mesuré les pertes énergétiques observées chez les mitochondries de rats MCDD, ALM et MET en état non phosphorylant. Pour cela nous avons étudié la relation entre la respiration (état 4) et la force protonmotrice des mitochondries en décrivant la courbe de Nicholls. Pour ce faire, en présence de succinate, la respiration a été titrée avec du malonate, un inhibiteur de la succinate déshydrogénase (figure III.24).

Figure III.24: Effet d'un traitement à l'almitrine ou à la metformine sur des mitochondries MCDD : titration de la force protonmotrice (Δp) et de la respiration mitochondriale (JO_2) en l'absence de phosphorylation.



Les animaux reçoivent un régime carencé en choline et méthionine pendant 6 semaines (MCDD), associé ou non à un traitement, apporté dans l'eau de boisson durant les 4 dernières semaines de régime, à l'almitrine (ALM; 15mg/kg/j) ou à la metformine (MET; 50 mg/kg/j). Les mitochondries de foie de rats (1 mg/ml) MCDD, traités à l'almitrine ou traités à la metformine ont été incubées dans un milieu KCl + BSA (0,3% final) à 37°C, en présence de 5mM succinate plus 5 μ M de roténone, 1,25 μ g/mL d'oligomycine et 65 ng/mL de nigréicine. La consommation d'oxygène est mesurée par oxygraphie. La respiration est modulée par l'addition de malonate (0 à 10 mM). Les mesures de Δp sont faites en parallèle dans le même milieu avec du TPMP⁺. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM. n=5.

Comme cela est habituellement décrit, la relation entre la respiration et la force protonmotrice est non linéaire, avec une zone ohmique et non ohmique (Nicholls 1974; Brand 1990; Fontaine, Moussa et al. 1996). Les courbes obtenues avec des mitochondries de rats traités à l'almitrine ou à la metformine sont totalement identiques à celle des rats MCDD. Cela semble logique en ce qui concerne le groupe ALM. En effet, des études antérieures n'ont pas mis en évidence de modification de la force protonmotrice par un traitement à l'almitrine (Rigoulet, Ouhabi et al. 1989; Rigoulet, Fraisse et al. 1990). En ce qui concerne les mitochondries du groupe MET, on aurait pu s'attendre à une modification du potentiel de membrane de celles-ci. En effet, une étude menée par Batandier et coll. a montrée une diminution du potentiel de membrane de mitochondries isolées à partir d'un foie préalablement perfusé avec de la metformine (Batandier, Guigas et al. 2006), lorsque celui-ci est mesuré en présence de succinate. Comme précédemment, on peut supposer que l'absence d'effet de la metformine est due à la modification de la composition lipidique des membranes, empêchant l'action de celle-ci.

Le traitement de rats ayant reçus un régime carencé en choline et méthionine, avec de l'almitrine ou de la metformine, n'induit pas de modification de la bioénergétique mitochondriale. L'absence d'effet sur les paramètres de la respiration (JO_2 , ATP/O, $D\Psi$)

semble due à une modification de la composition des membranes plasmique et mitochondriale, empêchant ainsi les mécanismes d'action des deux molécules.

Le choix d'un traitement à l'almitrine ou à la metformine avait un but bien précis, tenter d'empêcher le développement d'une stéatose hépatique, qui est considérée comme la première étape (first hit) du processus de pathogenèse de la NASH, ou tout du moins améliorer celle-ci. Ces deux molécules, par des mécanismes différents, pouvaient stimuler l'utilisation des lipides hépatiques. Nous nous sommes également intéressé à l'influence de ces deux molécules sur la production de radicaux libres, ceux-ci étant impliqués dans les mécanismes de stress oxydant (second hit) déclenchant une NASH.

Tout d'abord, et afin de déterminer les conséquences potentielles des différents traitements sur la capacité d'utilisation des lipides, la consommation d'oxygène des mitochondries des groupes MCDD, ALM et MET a été mesurée avec des dérivés d'acides gras comme substrats. Pour cela de l'octanoyl-carnitine a été fourni aux mitochondries (tableau III.34). Les respirations en état phosphorylant (état 3) et non phosphorylant sont identiques entre les trois groupes de mitochondries. Pourtant, on aurait pu s'attendre à une augmentation de l'utilisation des lipides, et donc de la respiration en présence d'acides gras en ce qui concerne la metformine, comme cela a précédemment été décrit (Zhou, Myers et al. 2001).

Tableau III.34 : Respiration (JO_2) des mitochondries de foie provenant de rats MCDD traités ou non à l'almitrine ou à la metformine en présence d'un dérivé d'acide gras.

	JO_2 (natomO/min/mg prot)		
	oct-carn		
	état non phosphorylant	état 4 oligo	état 3
MCDD	19 ± 1	16 ± 2	43 ± 2
ALM	24 ± 3	22 ± 3	48 ± 8
MET	21 ± 3	20 ± 3	48 ± 11

Les animaux reçoivent un régime carencé en choline et méthionine pendant 6 semaines (MCDD), associé ou non à un traitement, apporté dans l'eau de boisson durant les 4 dernières semaines et demi de régime, à l'almitrine (ALM; 15mg/kg/j) ou à la metformine (MET; 50 mg/kg/j). Les mitochondries de foie de rats (1 mg/ml) ont été incubées dans un milieu KCl ± BSA (0,3% final) à 37°C, en présence de 100µM d'octanoyl-carnitine. La consommation d'oxygène est mesurée par oxygraphie. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM ; n=9. Les comparaisons (p<0,05) sont réalisées par un test t non apparié. *: différent du contrôle .

Comme lors de l'étude III Tome 2 §12, la production d'H₂O₂ a également été mesurée sur les mitochondries des groupes MCDD, ALM et MET. Les capacités

enzymatiques antioxydantes ont été mesurées sur homogénat de foie des trois groupes (Tableau III.35).

Tableau III.35 : Enzymes antioxydantes et production de peroxyde d'hydrogène

<u>H₂O₂ production</u>	<u>MCDD</u>	<u>ALM</u>	<u>MET</u>
pmol H ₂ O ₂ /mg prot/min	90 ± 14	130 ± 17	103 ± 23
pmol H ₂ O ₂ /natom O	10 ± 1	12 ± 2	9 ± 2
CAT (U/mg prot)	0,30 ± 0,03	0,28 ± 0,03	0,27 ± 0,03
GPx (U/mg prot)	0,15 ± 0,02	0,16 ± 0,03	0,16 ± 0,03
SOD (U/mg prot) mito	4,6 ± 0,9	4,2 ± 0,4	3,6 ± 0,3
cyto	8,3 ± 1,2	7,4 ± 0,7	7,9 ± 1,1

Les animaux reçoivent un régime carencé en choline et méthionine pendant 6 semaines (MCDD), associé ou non à un traitement, apporté dans l'eau de boisson durant les 4 dernières semaines de régime, à l'almitrine (ALM; 15mg/kg/j) ou à la metformine (MET; 50 mg/kg/j). La production d'H₂O₂ est mesurée sur mitochondrie, comme décrit précédemment. Un morceau de foie de rats est homogénéisé dans un tampon d'extraction (KH₂PO₄ 100mM, DTT 1mM, EDTA 2mM).Après centrifugation, le surnageant est utilisé pour mesurer l'activité de la catalase (CAT), de la superoxyde dismutase (SOD) cytosolique et mitochondriale, et la glutathion peroxydase (GPx). Les activités sont exprimées en U/mg de protéines. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM ; n=8 pour les activités et n=6 pour la production de H₂O₂. Les comparaisons (p<0,05) sont réalisées par un test *t* non apparié. ★: différent du contrôle .

La production de H₂O₂ dépend de plusieurs facteurs comme, la vitesse de respiration, ou encore du potentiel de membrane (Korshunov, Skulachev et al. 1997). Nous avons donc étudié les conséquences des deux traitements sur la production de radicaux libres de l'oxygène. La production de H₂O₂ des mitochondries de rats MCDD est identique à celle mesurée dans l'étude II (Tableau III.35), qu'elle soit exprimée en pmolH₂O₂/min/mg protéine (90 ± 14 vs. 97 ± 9) ou lorsque celle-ci est exprimée en pmol H₂O₂/natomO (7 ± 1 vs. 10 ± 1). Les traitements n'induisent pas de modification de la production d'H₂O₂ des mitochondries des groupes ALM et MET (Tableau III.35). Cependant, on note tout de même une tendance à une augmentation dans le groupe ALM, lorsqu'elle est exprimée en pmolH₂O₂/min/mg protéine, mais qui n'est pas significative en raison des forts SEM. Cette différence disparaît quand la production est rapportée par nanoatomes d'oxygène. La production de ROS dépendant entre autre de la vitesse de respiration, ou du potentiel de

membrane (Korshunov, Skulachev et al. 1997), et l'almitrine ne modulant ni l'un ni l'autre, il n'est pas étonnant de trouver aucune modification de la production d'H₂O₂ dans ce groupe. Par contre, un effet inhibiteur de la metformine sur la production de ROS a déjà été décrit sur cellule et sur mitochondrie (Bonfont-Rousselot, Raji et al. 2003; Ouslimani, Peynet et al. 2005 ; Batandier, Guigas et al. 2006). Cet effet passerait par une activation de la NAD(P)H oxydase (cellule de Kupffer) et du complexe I de la chaîne respiratoire qui inhibe la production d'anion superoxyde via un retour inverse des électrons vers le Complexe I. Or, aucun effet de la metformine n'est mesuré sur les mitochondries du groupe MET. Ici encore, on peut supposer que l'absence d'effet de la molécule est due au remaniement de la composition en phospholipides des membranes plasmiques et mitochondriale.

Lorsque l'on mesure l'H₂O₂, celui-ci reflète en fait la balance entre la production mitochondriale et l'élimination par les systèmes antioxydants. La première manière de limiter un stress oxydant est de limiter la production de ROS, et la deuxième, de stimuler les défenses antioxydantes. Nous avons donc mesuré les effets d'un traitement à l'almitrine ou à la metformine sur l'activité d'enzymes antioxydantes : la catalase (CAT) la superoxyde dismutase (SOD) mitochondriale et cytoplasmique, ainsi que la glutathion peroxydase (GPx). Les mesures ont été réalisées sur homogénat de foie des trois groupes de rats (tableau III.35). Les activités enzymatiques obtenues pour le groupe MCDD sont identiques à celle mesurées lors de l'étude III Tome 2 §12. Mais aucun effet des traitements n'est observé sur les activités SOD, CAT et GPx. Une étude, menée sur des astrocytes en culture a montré que la diminution de l'activité de la SOD mitochondriale après 15h d'exposition hypoxique était reversée par l'addition d'almitrine (Copin, Ledig et al. 1992). Cette étude suggère un rôle stimulateur de l'almitrine sur l'activité de la SOD mitochondriale lorsque celle-ci est faible, résultat non retrouvé dans notre étude. En ce qui concerne la metformine, plusieurs études ont été réalisées sur des érythrocytes de patients diabétiques afin de déterminer l'état des défenses antioxydantes lors d'une insulino-résistance, ainsi que les conséquences d'un traitement des patients à la metformine sur celles-ci. Il apparaît, chez ces patients diabétiques, que l'activité des enzymes antioxydantes (SOD et GPx) est plus faible que chez les individus contrôles (Pavlovic, Kocic et al. 2000) et un traitement à la metformine induit une augmentation de l'activité de ces enzymes. Dans notre étude, aucune variation d'activité n'est observée après un traitement à la metformine.

L'absence d'effet des deux molécules sur la production d'H₂O₂ et sur l'activité des enzymes antioxydantes n'est pas surprenante. En effet, il a été démontré, ou suggéré, que le mode d'action de la metformine et de l'almitrine était très dépendant de la composition lipidique des membranes. Or nous avons observé un fort remaniement de la composition

membranaire causé par le régime MCDD. Cela pourrait donc expliquer le fait que la metformine et l'almitrine n'aient pas d'action sur les différents paramètres mitochondriaux des groupes ALM et MET.

8. Discussion

La première étape de la pathogenèse de la NASH étant le développement d'une stéatose, il nous a donc paru intéressant de tester différentes molécules pouvant moduler l'accumulation de lipides hépatique. Dans cette étude, nous avons utilisé deux molécules pouvant modifier l'oxydation des acides gras dans le foie par un potentiel effet sur le métabolisme intermédiaire et l'efficacité mitochondriale. Nous avons choisi de tester la Metformine, qui est la molécule la plus largement utilisée dans le traitement du diabète de type II, et l'almitrine, qui est habituellement utilisée dans le traitement d'insuffisances respiratoires associées aux bronchites chroniques. La Metformine a été choisie pour son effet sur le métabolisme lipidique. Il a été démontré une diminution de l'activité de l'acetyl-CoA carboxylase (ACC) sur des hépatocytes isolés de rats, ainsi qu'une augmentation de l'oxydation des lipides (Zhou, Myers et al. 2001). Le but de ce traitement était d'augmenter la β -oxydation et donc de diminuer le stockage de lipides hépatiques. L'Almitrine a été choisie pour son action sur le couplage entre oxydation et phosphorylation, et notamment sur la stoechiométrie de l'ATPase/ATPsynthase. Un transfert de protons plus important est nécessaire pour obtenir un même nombre de moles d'ATP formé, augmentant de ce fait la respiration (Rigoulet, Ouhabi et al. 1989; Rigoulet, Fraisse et al. 1990; Jumelle-Laclau, Rigoulet et al. 1993; Leverve, Sibille et al. 1998; Rigoulet, Leverve et al. 1998). L'almitrine a été utilisée dans le but d'augmenter la respiration mitochondriale, afin de stimuler l'utilisation de substrats et donc l'oxydation des lipides hépatiques.

Dans cette étude, nous avons réitéré les expérimentations réalisées lors de l'étude III Tome 2 sur les animaux recevant les différents traitements. Mais au vu des résultats obtenus, il semblerait que ni l'almitrine, ni la metformine ne provoquent une amélioration de la NASH chez les rats. En effet, le traitement des rats MCDD avec de la metformine ou de l'almitrine n'induit pas de modification de la prise alimentaire, ni de la prise de poids des animaux, ni de la répartition tissulaire et des données plasmatiques. Les traitements n'induisent pas non plus de modification de la bioénergétique mitochondriale (JO_2 , ATP/O, $\Delta\Psi$), ni sur la production d' H_2O_2 ou sur l'activité des enzymes antioxydantes.

L'absence d'effet de ces deux molécules sur l'ensemble des paramètres mesurés pourrait être due au régime MCDD en lui-même. En effet, les cibles des traitements, plus particulièrement en ce qui concerne la metformine, au niveau de l'organisme en entier sont

déjà modifiées par le régime MCDD (prise alimentaire, prise de poids, répartition tissulaire, données plasmatiques). On peut donc supposer que les effets potentiels de la Metformine et de l'Almitrine soient présents mais masqués dans ceux du régime. Le fait que la metformine et l'almitrine n'aient pas d'action non plus sur les différents paramètres mitochondriaux pourrait également être dû aux modifications résultant du régime. En effet, il a été démontré, ou suggéré, que le mode d'action des deux molécules sur la mitochondrie était très dépendant de la composition lipidique des membranes (Jumelle-Laclau, Rigoulet et al. 1993; El-Mir, Nogueira et al. 2000 ; Owen, Doran et al. 2000 ; Demaille, Guigas et al. 2002). Or nous avons observé un fort remaniement de la composition membranaire mitochondriale causé par le régime MCDD. Ce remaniement membranaire empêcherait donc l'action mitochondriale de la metformine et de l'almitrine, ce qui expliquerait qu'il n'y ait pas d'amélioration de la stéatose chez les rats recevant un régime carencé en choline et méthionine.

Il ressort donc de cette étude, que dans le cas bien précis d'une NASH induite par un régime carencé en choline et méthionine, un traitement de 4 semaine et demi avec de la Metformine ou de l'Almitrine, n'induit pas de modification de la quantité de triglycérides hépatiques. Cette étude ne remet pour autant pas en question les études réalisées sur un traitement des patients atteints de NASH par la metformine. En effet, la pathologie « humaine » est très étroitement liée à une insulino-résistance ou un diabète et à une obésité abdominale. Or la metformine va améliorer, ces versants là de la NASH. Dans le modèle MCDD, les cibles habituelles de la metformine ne sont pas présentes. Il n'y a pas d'hyperglycémie, d'insulino-résistance ou d'obésité. De plus, la metformine a des effets non mitochondriaux qui pourraient expliquer une efficacité clinique de la molécule, alors que dans notre étude nous n'avons regardé que la mitochondrie.

On peut donc conclure en disant que le régime carencé en choline et méthionine est un très bon modèle en ce qui concerne les mécanismes cellulaires et mitochondriaux mis en place au niveau du foie, une fois la pathologie BIEN installée. Par contre, ce modèle se semble pas approprié pour l'étude d'un traitement contre la NASH. En effet, les modifications observées au niveau de l'organisme en entier sont trop éloignées des celles présentes chez les patients. La mise au point d'un modèle animal de développements de la NASH, mais présentant également les autres caractéristiques (insulino-résistance, obésité abdominale ...) reste donc d'actualité.

Chapitre IV

Conclusion & Perspectives



IV. Conclusion & Perspectives

A ce jour, les études menées sur la NASH n'ont pas permis une caractérisation claire des mécanismes participant à la mise en place de la pathologie du fait d'un manque de modèles animaux présentant des caractéristiques identiques à la NASH humaine. Plusieurs mécanismes pourraient être impliqués comme (i) une stimulation de la lipogenèse et/ou (ii) une inhibition de l'oxydation des acides gras, le tout en réponse à une hyperinsulinémie. L'implication d'un dysfonctionnement mitochondrial dans le développement de la NASH a également été avancée.

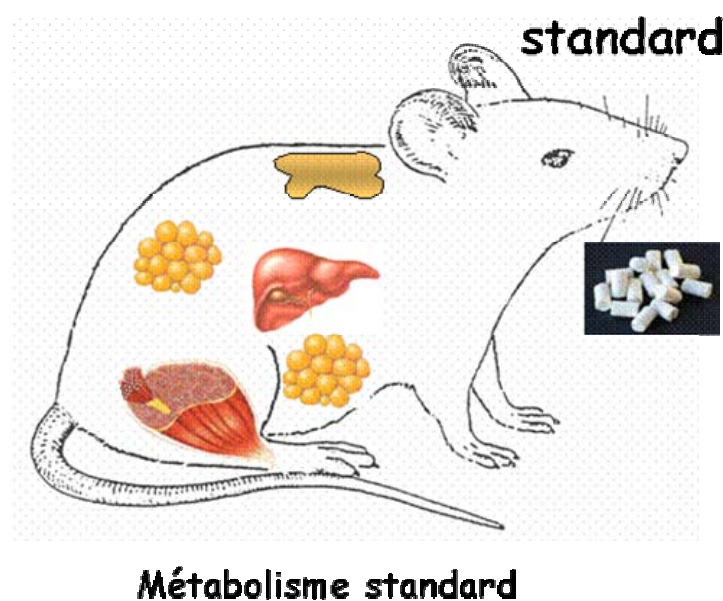
La première partie de notre travail a consisté à tenter de mettre au point un régime alimentaire enrichi en lipides saturés chez le rat Wistar dans le but d'induire une NASH, et d'évaluer les adaptations du métabolisme hépatique (métabolisme hépatocytaire et bioénergétique mitochondriale) en réponse à ce régime. Il ressort de cette étude que l'adjonction d'huile de coco ou de beurre à la nourriture proposée aux rats ne provoque pas de stéatose hépatique chez le rat Wistar, malgré une forte augmentation des apports caloriques et lipidiques. Cependant, si les régimes n'induisent pas d'accumulation de lipides au niveau hépatique, ils modifient grandement la répartition tissulaire. On observe en effet, une augmentation de la masse des tissus de stockage, comme le tissu adipeux blanc, et des tissus de « dissipation d'énergie », comme le tissu adipeux brun. Cette absence de stéatose hépatique n'est pas due à une oxydation lipidique accrue au niveau hépatique, mais résulte d'une augmentation de l'exportation, et du stockage des lipides sous forme de triglycérides, du foie vers le tissu adipeux blanc, ainsi que de l'activation de mécanismes de dissipation d'énergie sous forme de chaleur, notamment au niveau du tissu adipeux brun via l'UCP1. Les rats recevant un régime enrichi en huile de coco ou en beurre développent une thermogenèse « alimentaire » permettant de limiter et d'éliminer l'excès de lipides ingéré.

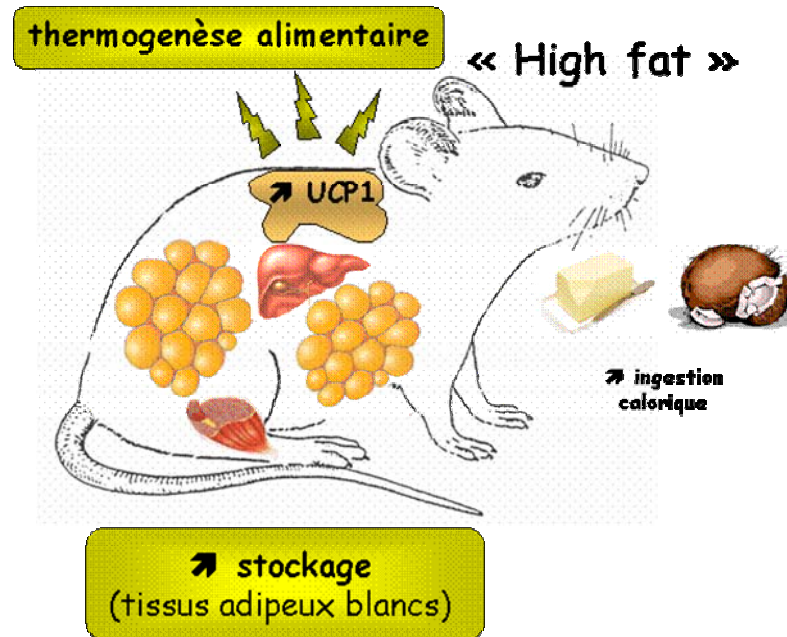
En conclusion, il ressort donc de cette étude que le rat mâle Wistar est capable de s'adapter à une ingestion excessive de lipides, en i) augmentant le

stockage des lipides au niveau des tissus périphériques, et notamment au niveau du tissu adipeux blanc, et ii) en augmentant l'oxydation des acides gras par différents processus dont la thermogénèse au niveau du tissu adipeux brun.

Un régime enrichi en lipides saturés ne semble donc pas être un modèle idéal pour induire une stéatohépatite ou même une stéatose chez le rat mâle Wistar. Un régime alimentaire proche de celui des patients, et développant les stigmates associés à la NASH (obésité abdominale, hyperlipidémie, insulino-résistance) reste toujours à élaborer. Cela nous permettrait enfin d'étudier les mécanismes impliqués dans la pathogenèse de la NASH.

Figure IV.1 : Adaptations métaboliques à une augmentation de la prise calorique chez le rat Wistar





La deuxième partie du travail a consisté en l'étude des adaptations métaboliques et bioénergétiques du foie de rats recevant un régime carencé en choline et méthionine (MCDD). Ce régime est connu pour induire chez le rat une NASH caractérisée par une stéatose massive et une inflammation du tissu hépatique.

Comme décrit dans la littérature, l'ingestion du régime MCD est accompagnée d'un arrêt de la prise de poids de l'animal, tout en maintenant une prise calorique identique aux contrôles (exprimée en kcal/j/100g masse corporelle). Le régime provoque également un fort remodelage tissulaire, avec une augmentation de la masse du foie, ainsi qu'une forte diminution du tissu adipeux blanc. Ce remodelage tissulaire est dû à un défaut d'exportation des triglycérides hépatiques vers les tissus de stockage périphériques. Cela est confirmé par la faible concentration de lipides plasmatiques (AGL et TG) en comparaison aux animaux contrôles. Les rats MCDD sont également hypoglycémiques et hypoinsulinémiques. Le régime carencé en choline et méthionine induit donc de fortes modifications physiologiques en plus du développement d'une NASH.

L'étude effectuée avec des mitochondries isolées montre une forte augmentation de la respiration couplée et non couplée à une synthèse d'ATP dans le groupe MCDD, quel que soit le type de substrats utilisés (glutamate, succinate, acides gras). La respiration non couplée correspond à un découplage qui a pour conséquence de diminuer la force

protonmotrice (Δp) et le rendement mitochondrial (P/O). Deux mécanismes sont impliqués dans ce découplage, un «proton leak», probablement résultant d'une augmentation de la fluidité et donc de la perméabilité de la membrane du fait d'une modification de la composition lipidique de celle-ci, et un «redox slipping» au niveau de la cytochrome c oxydase. Ce découplage mitochondrial a plusieurs conséquences sur la fonction mitochondriale : i) une augmentation des capacités d'oxydation des acides gras, et ii) une diminution de la production de radicaux libres de l'oxygène. Ces modifications permettraient une augmentation de l'utilisation du surplus d'acides gras présents dans le cytoplasme du fait de la stéatose, et une diminution de la production de ROS afin de limiter le stress oxydant d'origine mitochondriale.

En conclusion, face à l'induction d'une NASH, des adaptations de la fonction mitochondriale apparaissent et permettent certainement de limiter la stéatose hépatique et le stress oxydant associés à celle-ci.

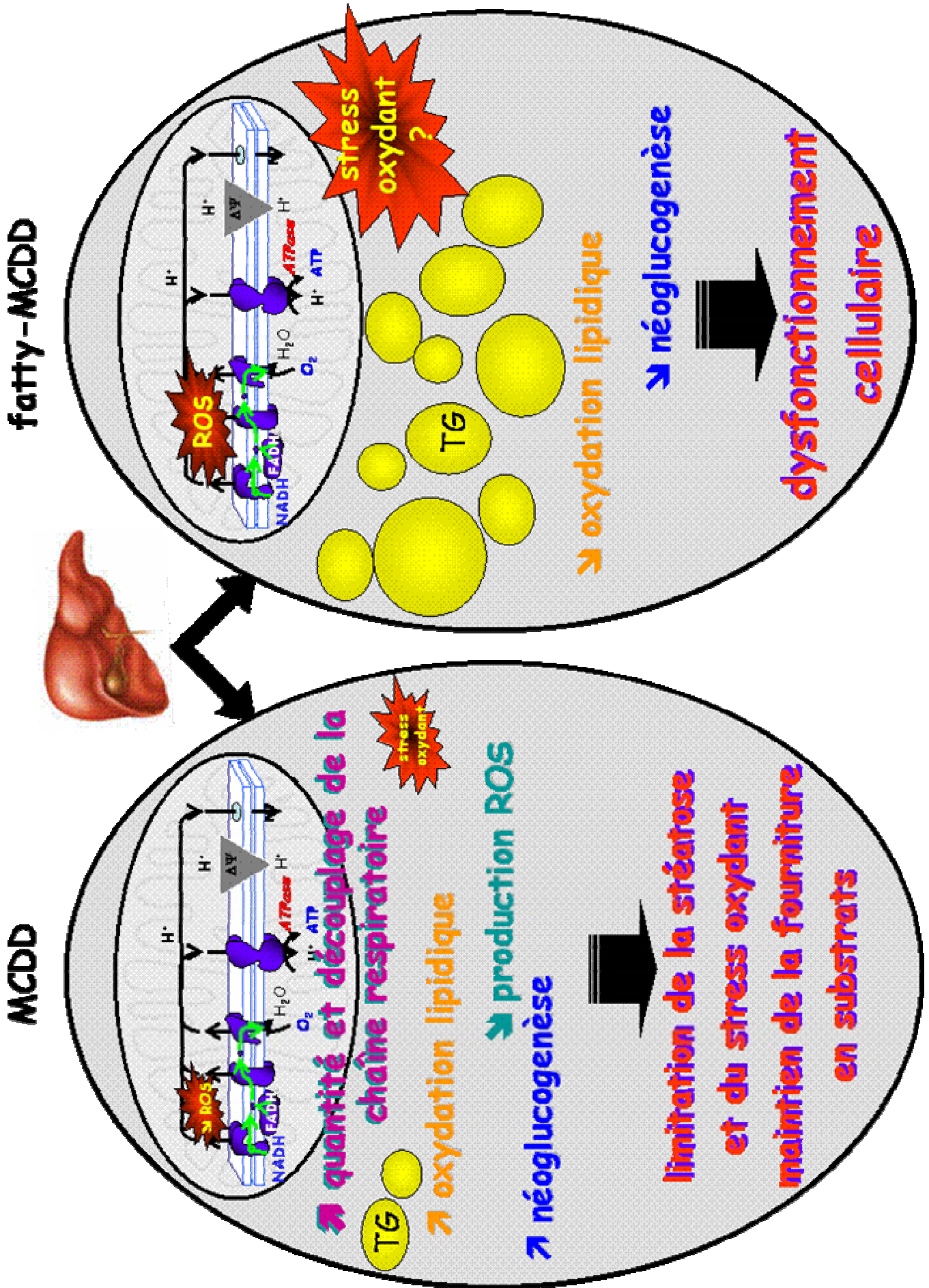
Même si les molécules testées dans notre travail ne se sont pas révélées prometteuses, la connaissance de l'adaptation de la fonction mitochondriale au cours de la NASH ouvre vers des perspectives thérapeutiques nouvelles, dont la cible ne serait pas l'insulinorésistance, mais la mitochondrie. En effet, même si au vu de la physiopathologie, la lutte contre l'insulinorésistance a évidemment sa place dans le traitement de la NASH, ce traitement a des limites. Les thiazolidinediones, qui sont certainement le traitement le plus efficace actuellement, entraînent une augmentation de la sensibilité à l'insuline, donc une augmentation du stockage périphérique des lipides, qui in fine aboutit à une augmentation de la masse grasse, bien documentée, puisqu'un effet secondaire classique des thiazolidinediones est une prise de poids. On ne parviendra donc pas avec ce type de traitement à rompre le cercle vicieux, puisque le traitement va favoriser l'aggravation de l'obésité. C'est pourquoi, rechercher une thérapeutique ayant pour cible la mitochondrie hépatique nous apparaît très pertinent, et devra faire l'objet de futures recherches.

L'étude effectuée avec des hépatocytes isolés de foies de rats recevant un régime carencé en méthionine et choline met en évidence 2 populations distinctes de cellules, une population de morphologie « normale » et une population qui présente une surcharge lipidique. Le régime MCDD provoque des modifications différentes du métabolisme hépatocytaire dans les 2 sous-populations cellulaires. La première population cellulaire présente un métabolisme des hydrates de carbones orienté préférentiellement vers la production de glucose et un métabolisme des lipides augmenté. Ces adaptations métaboliques sont la conséquence des modifications de fonction des mitochondries MCDD et résultent d'une réoxydation accrue des équivalents réduits par les mitochondries et d'une augmentation des capacités de synthèse d'ATP de celles-ci. La deuxième population de cellules, surchargées de lipides, ne développe pas d'adaptation métabolique, ce qui est certainement la cause des effets délétères conduisant à un dysfonctionnement cellulaire.

En conclusion, les foies de rats MCDD sont constitués de deux populations cellulaires, une qui semble résister aux facteurs pathogéniques de la NASH et parvient à éliminer les lipides en excès, et une deuxième qui semble être « submergée » par les atteintes et qui présente un dysfonctionnement important de son métabolisme.

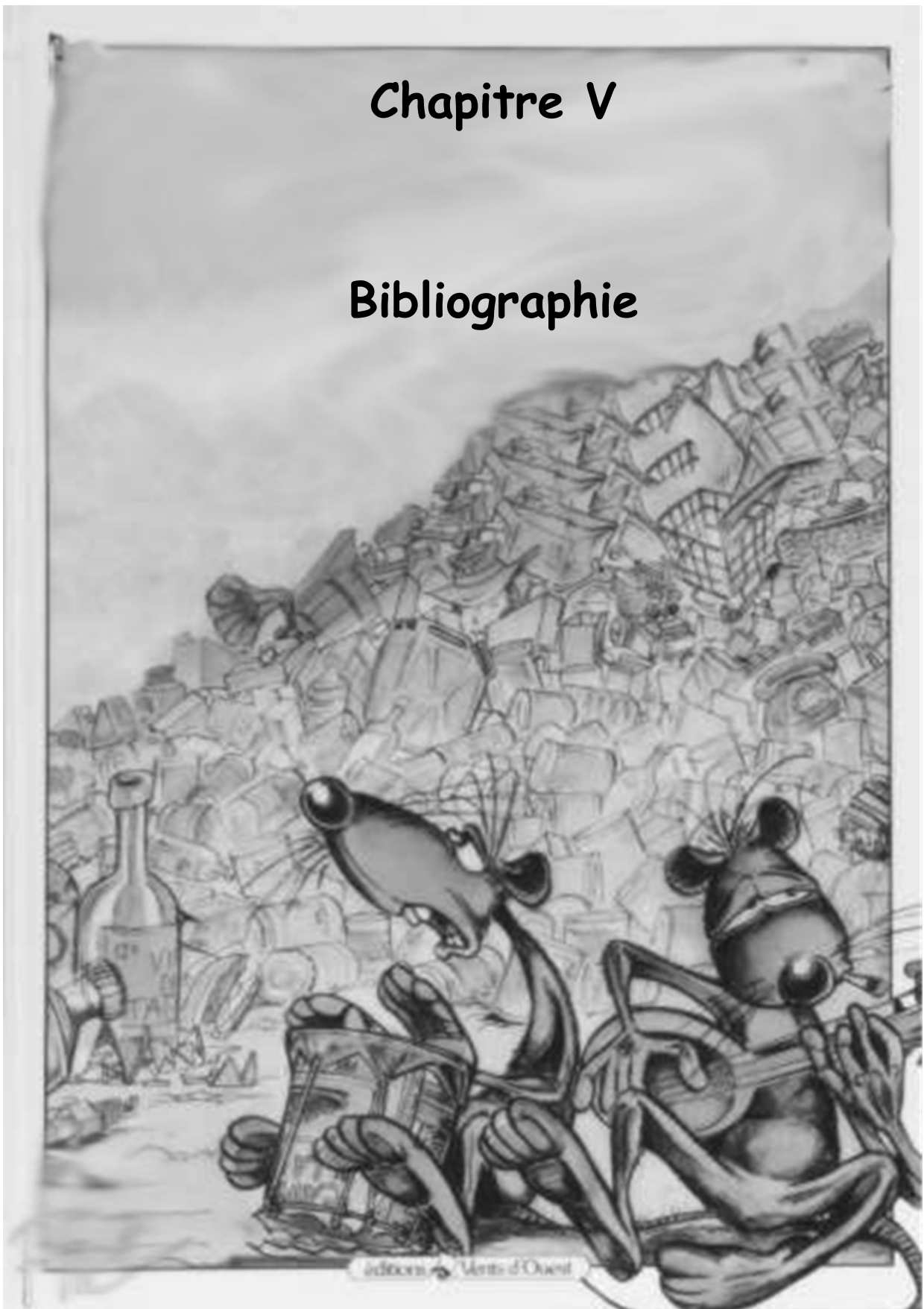
L'identification de 2 populations hépatocytaires au sein d'un foie stéatosique constitue un progrès majeur dans la connaissance de la physiopathologie de la NASH. En effet, l'étude de la sous-population adaptée et "résistante" à la NASH ouvre des perspectives de recherche physiopathologiques et thérapeutiques dans un axe qui jusqu'à présent n'a jamais été exploré.

Figure IV.2 : Schéma récapitulatif des adaptations bioénergétiques et métaboliques des rats recevant un régime MCDD



Chapitre V

Bibliographie



V. Bibliographie

A

- Abbasi, F., M. Carantoni, et al. (1998). "Further evidence for a central role of adipose tissue in the antihyperglycemic effect of metformin." *Diabetes Care* 21(8): 1301-5.
- Abdul-Malak, N. (1978). Etude au moyen de radiotraceurs du métabolisme des phospholipides des tissus de la truite arc-en-ciel (*Salmo irideus*). Effets de la salinité et de la température. *sciences*. Lyon1, Université Claude Bernard.
- Abramovitch, D. A., D. Marsh, et al. (1990). "Activation of beef-heart cytochrome c oxidase by cardiolipin and analogues of cardiolipin." *Biochim Biophys Acta* 1020(1): 34-42.
- Adler, M. and F. Schaffner (1979). "Fatty liver hepatitis and cirrhosis in obese patients." *Am J Med* 67(5): 811-6.
- Aebi, H. (1984). "Catalase in vitro." *Methods Enzymol* 105: 121-6.
- Agius, L. and K. G. Alberti (1985). "Regulation of flux through pyruvate dehydrogenase and pyruvate carboxylase in rat hepatocytes. Effects of fatty acids and glucagon." *Eur J Biochem* 152(3): 699-707.
- Alemzadeh, R., W. Jacobs, et al. (1996). "Antiobesity effect of diazoxide in obese Zucker rats." *Metabolism* 45(3): 334-41.
- Angulo, P. (2002). "Nonalcoholic fatty liver disease." *N Engl J Med* 346(16): 1221-31.
- Angulo, P., J. C. Keach, et al. (1999). "Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis." *Hepatology* 30(6): 1356-62.
- Angulo, P. and K. D. Lindor (2002). "Treatment of non-alcoholic steatohepatitis." *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 16(5): 797-810.
- Anthonsen, M. W., L. Ronnstrand, et al. (1998). "Identification of novel phosphorylation sites in hormone-sensitive lipase that are phosphorylated in response to isoproterenol and govern activation properties in vitro." *J Biol Chem* 273(1): 215-21.

- Arai, M., E. R. Gordon, et al. (1984). "Decreased cytochrome oxidase activity in hepatic mitochondria after chronic ethanol consumption and the possible role of decreased cytochrome aa3 content and changes in phospholipids." *Biochim Biophys Acta* 797(3): 320-7.
- Ardail, D., J. P. Privat, et al. (1990). "Mitochondrial contact sites. Lipid composition and dynamics." *J Biol Chem* 265(31): 18797-802.
- Arion, W. J., B. K. Wallin, et al. (1972). "The specificity of glucose 6-phosphatase of intact liver microsomes." *J Biol Chem* 247(8): 2558-65.
- Assy, N., M. Grozovski, et al. (2006). "Effect of insulin-sensitizing agents in combination with ezetimibe, and valsartan in rats with non-alcoholic fatty liver disease." *World J Gastroenterol* 12(27): 4369-76.
- Attie, A. D., R. M. Krauss, et al. (2002). "Relationship between stearoyl-CoA desaturase activity and plasma triglycerides in human and mouse hypertriglyceridemia." *J Lipid Res* 43(11): 1899-907.
- Azzone, G. F., M. Zoratti, et al. (1985). "The stoichiometry of H⁺ pumping in cytochrome oxidase and the mechanism of uncoupling." *J Inorg Biochem* 23(3-4): 349-56.

B

- Bacon, B. R., M. J. Farahvash, et al. (1994). "Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity." *Gastroenterology* 107(4): 1103-9.
- Baffy, G., C. Y. Zhang, et al. (2002). "Obesity-related fatty liver is unchanged in mice deficient for mitochondrial uncoupling protein 2." *Hepatology* 35(4): 753-61.
- Barrows, B. R. and E. J. Parks (2006). "Contributions of different fatty acid sources to very low-density lipoprotein-triacylglycerol in the fasted and fed states." *J Clin Endocrinol Metab* 91(4): 1446-52.
- Barthel, A. and D. Schmolli (2003). "Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285(4): E685-92.
- Basaranoglu, M., O. Acbay, et al. (1999). "A controlled trial of gemfibrozil in the treatment of patients with nonalcoholic steatohepatitis." *J Hepatol* 31(2): 384.

- Basdevant, A. (2006). "[Obesity epidemic: origins and consequences]." *C R Biol* 329(8): 562-9; discussion 653-5.
- Batandier, C., B. Guigas, et al. (2006). "The ROS production induced by a reverse-electron flux at respiratory-chain complex 1 is hampered by metformin." *J Bioenerg Biomembr* 38(1): 33-42.
- Beare-Rogers, J. L. (1971). "Liver phospholipids of rats fed a choline-deficient diet supplemented with choline or methionine." *Lipids* 6(9): 649-51.
- Becard, D., I. Hainault, et al. (2001). "Adenovirus-mediated overexpression of sterol regulatory element binding protein-1c mimics insulin effects on hepatic gene expression and glucose homeostasis in diabetic mice." *Diabetes* 50(11): 2425-30.
- Begrache, K., A. Igoudjil, et al. (2006). "Mitochondrial dysfunction in NASH: Causes, consequences and possible means to prevent it." *Mitochondrion*.
- Beier, K., A. Volkl, et al. (1997). "TNF-alpha downregulates the peroxisome proliferator activated receptor-alpha and the mRNAs encoding peroxisomal proteins in rat liver." *FEBS Lett* 412(2): 385-7.
- Belec, L., D. Larrey, et al. (1989). "Extensive oxidative metabolism of dextromethorphan in patients with almitrine neuropathy." *Br J Clin Pharmacol* 27(3): 387-90.
- Bennett, B. L., Y. Satoh, et al. (2003). "JNK: a new therapeutic target for diabetes." *Curr Opin Pharmacol* 3(4): 420-5.
- Berglund, L., O. Ljungstrom, et al. (1977). "Studies on the cyclic 3':5'-AMP-stimulated pig liver protein kinase reaction with pyruvate kinase as substrate." *J Biol Chem* 252(2): 613-9.
- Bergmeyer, H. (1974). *Methods of enzymatic analysis*. New York, San Fransisco, London.
- Berry, M., D. Clark, et al. (1985). "The contribution of hepatic metabolism to diet-induced thermogenesis." *Metabolism* 34: 141-7.
- Berry, M. a. F., DS (1969). "High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study." *J. Cell Biol* 43: 506-520.

- Berry, M. N., R. B. Gregory, et al. (1988). "Evidence that stimulation of gluconeogenesis by fatty acid is mediated through thermodynamic mechanisms." *FEBS Lett* 231(1): 19-24.
- Berry, M. N., E. Kun, et al. (1973). "Regulatory role of reducing-equivalent transfer from substrate to oxygen in the hepatic metabolism of glycerol and sorbitol." *Eur J Biochem* 33(3): 407-17.
- Bevan, P. (2001). "Insulin signalling." *J Cell Sci* 114(Pt 8): 1429-30.
- Bizeau, M. and J. Hazel (1999). "Dietary fat type alters glucose metabolism in isolated rat hepatocytes." *J Nutr Biochem* 10(12): 709-15.
- Blanc, S., A. Geloën, et al. (2001). "Simulated weightlessness alters the nycthemeral distribution of energy expenditure in rats." *J Exp Biol* 204(Pt 23): 4107-13.
- Blumenthal, S. A. (1983). "Stimulation of gluconeogenesis by palmitic acid in rat hepatocytes: evidence that this effect can be dissociated from the provision of reducing equivalents." *Metabolism* 32(10): 971-6.
- Bonnefont-Rousselot, D., B. Raji, et al. (2003). "An intracellular modulation of free radical production could contribute to the beneficial effects of metformin towards oxidative stress." *Metabolism* 52(5): 586-9.
- Bouche, P., L. Lacomblez, et al. (1989). "Peripheral neuropathies during treatment with almitrine: report of 46 cases." *J Neurol* 236(1): 29-33.
- Bouloumie, A., C. A. Curat, et al. (2005). "Role of macrophage tissue infiltration in metabolic diseases." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 8(4): 347-54.
- Bouskila, M., U. B. Pajvani, et al. (2005). "Adiponectin: a relevant player in PPARgamma-agonist-mediated improvements in hepatic insulin sensitivity?" *Int J Obes (Lond)* 29 Suppl 1: S17-23.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-54.
- Brady, L. J., P. S. Brady, et al. (1985). "Elevated hepatic mitochondrial and peroxisomal oxidative capacities in fed and starved adult obese (ob/ob) mice." *Biochem J* 231(2): 439-44.

- Brand, M. D. (1990). "The contribution of the leak of protons across the mitochondrial inner membrane to standard metabolic rate." *J Theor Biol* 145(2): 267-86.
- Brand, M. D. (1990). "The proton leak across the mitochondrial inner membrane." *Biochim Biophys Acta* 1018(2-3): 128-33.
- Brand, M. D., L. F. Chien, et al. (1994). "The causes and functions of mitochondrial proton leak." *Biochim Biophys Acta* 1187(2): 132-9.
- Brand, M. D., L. F. Chien, et al. (1994). "Experimental discrimination between proton leak and redox slip during mitochondrial electron transport." *Biochem J* 297 (Pt 1): 27-9.
- Brand, M. D., P. Couture, et al. (1991). "Evolution of energy metabolism. Proton permeability of the inner membrane of liver mitochondria is greater in a mammal than in a reptile." *Biochem J* 275 (Pt 1): 81-6.
- Brand, M. D., P. Couture, et al. (1994). "Liposomes from mammalian liver mitochondria are more polyunsaturated and leakier to protons than those from reptiles." *Comp Biochem Physiol Biochem Mol Biol* 108(2): 181-8.
- Brand, M. D. and M. P. Murphy (1987). "Control of electron flux through the respiratory chain in mitochondria and cells." *Biol Rev Camb Philos Soc* 62(2): 141-93.
- Bray, G. A., S. J. Nielsen, et al. (2004). "Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity." *Am J Clin Nutr* 79(4): 537-43.
- Brocks, D. G., E. A. Siess, et al. (1980). "Distinctive roles of oleate and glucagon in gluconeogenesis." *Eur J Biochem* 113(1): 39-43.
- Brookes, P. S. (2005). "Mitochondrial H(+) leak and ROS generation: an odd couple." *Free Radic Biol Med* 38(1): 12-23.
- Brookes, P. S., J. A. Buckingham, et al. (1998). "The proton permeability of the inner membrane of liver mitochondria from ectothermic and endothermic vertebrates and from obese rats: correlations with standard metabolic rate and phospholipid fatty acid composition." *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 119(2): 325-34.

- Brookes, P. S., A. J. Hulbert, et al. (1997). "The proton permeability of liposomes made from mitochondrial inner membrane phospholipids: no effect of fatty acid composition." *Biochim Biophys Acta* 1330(2): 157-64.
- Brookes, P. S., D. F. Rolfe, et al. (1997). "The proton permeability of liposomes made from mitochondrial inner membrane phospholipids: comparison with isolated mitochondria." *J Membr Biol* 155(2): 167-74.
- Brooks, S. L., N. J. Rothwell, et al. (1980). "Increased proton conductance pathway in brown adipose tissue mitochondria of rats exhibiting diet-induced thermogenesis." *Nature* 286(5770): 274-6.
- Brown, G. C. (1992). "The leaks and slips of bioenergetic membranes." *Faseb J* 6(11): 2961-5.
- Brown, G. C., P. L. Lakin-Thomas, et al. (1990). "Control of respiration and oxidative phosphorylation in isolated rat liver cells." *Eur J Biochem* 192(2): 355-62.
- Browning, J. D. and J. D. Horton (2004). "Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury." *J Clin Invest* 114(2): 147-52.
- Brunmair, B., K. Staniek, et al. (2004). "Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I: a common mechanism contributing to their antidiabetic actions?" *Diabetes* 53(4): 1052-9.
- Brunt, E. M. (1999). "Nonalcoholic steatohepatitis (NASH): further expansion of this clinical entity?" *Liver* 19(4): 263-4.
- Brunt, E. M. and D. G. Tiniakos (2002). "Pathology of steatohepatitis." *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 16(5): 691-707.
- Brustovetsky, N. and M. Klingenberg (1994). "The reconstituted ADP/ATP carrier can mediate H⁺ transport by free fatty acids, which is further stimulated by mersalyl." *J Biol Chem* 269(44): 27329-36.
- Bugianesi, E., A. Gastaldelli, et al. (2005). "Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms." *Diabetologia* 48(4): 634-42.
- Bugianesi, E., E. Gentilcore, et al. (2005). "A randomized controlled trial of metformin versus vitamin E or prescriptive diet in nonalcoholic fatty liver disease." *Am J Gastroenterol* 100(5): 1082-90.

C

- Cabrero, A., M. Alegret, et al. (2002). "Increased reactive oxygen species production down-regulates peroxisome proliferator-activated alpha pathway in C2C12 skeletal muscle cells." *J Biol Chem* 277(12): 10100-7.
- Cahill, G. F., Jr. (1970). "Starvation in man." *N Engl J Med* 282(12): 668-75.
- Cai, D., M. Yuan, et al. (2005). "Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB." *Nat Med* 11(2): 183-90.
- Caldwell, S. H., D. H. Oelsner, et al. (1999). "Cryptogenic cirrhosis: clinical characterization and risk factors for underlying disease." *Hepatology* 29(3): 664-9.
- Caldwell, S. H., R. H. Swerdlow, et al. (1999). "Mitochondrial abnormalities in non-alcoholic steatohepatitis." *J Hepatol* 31(3): 430-4.
- Campbell, J. M., T. K. Hunt, et al. (1977). "Jejunioileal bypass as a treatment of morbid obesity." *Arch Intern Med* 137(5): 602-10.
- Canbay, A., P. Taimr, et al. (2003). "Apoptotic body engulfment by a human stellate cell line is profibrogenic." *Lab Invest* 83(5): 655-63.
- Cannon, B. and J. Nedergaard (2004). "Brown adipose tissue: function and physiological significance." *Physiol Rev* 84(1): 277-359.
- Carbonera, D. and G. F. Azzone (1988). "Permeability of inner mitochondrial membrane and oxidative stress." *Biochim Biophys Acta* 943(2): 245-55.
- Carmiel-Haggai, M., A. I. Cederbaum, et al. (2005). "A high-fat diet leads to the progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats." *Faseb J* 19(1): 136-8.
- Castaing, Y., G. Manier, et al. (1986). "Improvement in ventilation-perfusion relationships by almitrine in patients with chronic obstructive pulmonary disease during mechanical ventilation." *Am Rev Respir Dis* 134(5): 910-6.
- Chakravarthy, M. V., Z. Pan, et al. (2005). ""New" hepatic fat activates PPARalpha to maintain glucose, lipid, and cholesterol homeostasis." *Cell Metab* 1(5): 309-22.
- Chakravarty, K., P. Leahy, et al. (2001). "Sterol regulatory element-binding protein-1c mimics the negative effect of insulin on phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene transcription." *J Biol Chem* 276(37): 34816-23.

- Chalasani, N., J. C. Gorski, et al. (2003). "Hepatic cytochrome P450 2E1 activity in nondiabetic patients with nonalcoholic steatohepatitis." *Hepatology* 37(3): 544-50.
- Chance, B. and G. R. Williams (1956). "Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. VI. The effects of adenosine diphosphate on azide-treated mitochondria." *J Biol Chem* 221(1): 477-89.
- Chao, F. F., D. L. Stiers, et al. (1986). "Hepatocellular triglyceride synthesis and transfer to lipid droplets and nascent very low density lipoproteins." *J Lipid Res* 27(11): 1174-81.
- Chao, L., B. Marcus-Samuels, et al. (2000). "Adipose tissue is required for the antidiabetic, but not for the hypolipidemic, effect of thiazolidinediones." *J Clin Invest* 106(10): 1221-8.
- Charlton, M., R. Sreekumar, et al. (2002). "Apolipoprotein synthesis in nonalcoholic steatohepatitis." *Hepatology* 35(4): 898-904.
- Chavin, K. D., S. Yang, et al. (1999). "Obesity induces expression of uncoupling protein-2 in hepatocytes and promotes liver ATP depletion." *J Biol Chem* 274(9): 5692-700.
- Chen, J., D. R. Petersen, et al. (2000). "Formation of malondialdehyde adducts in livers of rats exposed to ethanol: role in ethanol-mediated inhibition of cytochrome c oxidase." *Alcohol Clin Exp Res* 24(4): 544-52.
- Chen, J., S. Schenker, et al. (1998). "Inhibition of cytochrome c oxidase activity by 4-hydroxynonenal (HNE). Role of HNE adduct formation with the enzyme subunits." *Biochim Biophys Acta* 1380(3): 336-44.
- Chitturi, S., S. Abeygunasekera, et al. (2002). "NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome." *Hepatology* 35(2): 373-9.
- Chitturi, S., G. Farrell, et al. (2002). "Serum leptin in NASH correlates with hepatic steatosis but not fibrosis: a manifestation of lipotoxicity?" *Hepatology* 36(2): 403-9.
- Chitturi, S. and G. C. Farrell (2001). "Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis." *Semin Liver Dis* 21(1): 27-41.

- Cohen, P., M. Miyazaki, et al. (2002). "Role for stearyl-CoA desaturase-1 in leptin-mediated weight loss." *Science* 297(5579): 240-3.
- Collantes, R., J. P. Ong, et al. (2004). "Nonalcoholic fatty liver disease and the epidemic of obesity." *Cleve Clin J Med* 71(8): 657-64.
- Collins, S., K. W. Daniel, et al. (1994). "Impaired expression and functional activity of the beta 3- and beta 1-adrenergic receptors in adipose tissue of congenitally obese (C57BL/6J ob/ob) mice." *Mol Endocrinol* 8(4): 518-27.
- Combettes-Souverain, M. and T. Issad (1998). "Molecular basis of insulin action." *Diabetes Metab* 24(6): 477-89.
- Cook, G. A. and M. S. Gamble (1987). "Regulation of carnitine palmitoyltransferase by insulin results in decreased activity and decreased apparent K_i values for malonyl-CoA." *J Biol Chem* 262(5): 2050-5.
- Copin, J. C., M. Ledig, et al. (1992). "Free radical scavenging systems of rat astroglial cells in primary culture: effects of anoxia and drug treatment." *Neurochem Res* 17(7): 677-82.
- Cortez-Pinto, H., J. Chatham, et al. (1999). "Alterations in liver ATP homeostasis in human nonalcoholic steatohepatitis: a pilot study." *Jama* 282(17): 1659-64.
- Cortez-Pinto, H., S. Q. Yang, et al. (1998). "Bacterial lipopolysaccharide induces uncoupling protein-2 expression in hepatocytes by a tumor necrosis factor-alpha-dependent mechanism." *Biochem Biophys Res Commun* 251(1): 313-9.
- couturier, K. (2003). *Adaptations métaboliques et hormonales chez le rat anti-obèse Lou/C: influence du régime alimentaire et de l'activité physique.* Lyon, Claude Bernard.
- Crespo, J., A. Cayon, et al. (2001). "Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients." *Hepatology* 34(6): 1158-63.
- Creutzfeldt, W., H. Frerichs, et al. (1970). "Liver diseases and diabetes mellitus." *Prog Liver Dis* 3: 371-407.
- Croset, M., F. Rajas, et al. (2001). "Rat small intestine is an insulin-sensitive gluconeogenic organ." *Diabetes* 50(4): 740-6.

- Cross, D. A., D. R. Alessi, et al. (1995). "Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B." Nature 378(6559): 785-9.
- Cusi, K., A. Consoli, et al. (1996). "Metabolic effects of metformin on glucose and lactate metabolism in noninsulin-dependent diabetes mellitus." J Clin Endocrinol Metab 81(11): 4059-67.

D

- Daum, G. (1985). "Lipids of mitochondria." Biochim Biophys Acta 822(1): 1-42.
- Davis, R. A., J. R. Boogaerts, et al. (1985). "Intrahepatic assembly of very low density lipoproteins. Varied synthetic response of individual apolipoproteins to fasting." J Biol Chem 260(26): 14137-44.
- Davis, R. A., S. M. Druz, et al. (1989). "Increased translatable mRNA and decreased lipogenesis are responsible for the augmented secretion of lipid-deficient apolipoprotein E by hepatocytes from fasted rats." J Biol Chem 264(15): 8970-7.
- Day, C. and S. Saksena (2002). "Non-alcoholic steatohepatitis: Definitions and pathogenesis." J Gastroenterol Hepatol 17 Suppl 3: S377-S384.
- Day, C. P. (2002). "Pathogenesis of steatohepatitis." Best Pract Res Clin Gastroenterol 16(5): 663-78.
- Day, C. P. and O. F. James (1998). "Steatohepatitis: a tale of two "hits"?" Gastroenterology 114(4): 842-5.
- de Souza, C. J., M. Eckhardt, et al. (2001). "Effects of pioglitazone on adipose tissue remodeling within the setting of obesity and insulin resistance." Diabetes 50(8): 1863-71.
- Deamer, D. W. (1987). "Proton permeation of lipid bilayers." J Bioenerg Biomembr 19(5): 457-79.
- Deamer, D. W. and J. W. Nichols (1989). "Proton flux mechanisms in model and biological membranes." J Membr Biol 107(2): 91-103.
- DeFronzo, R. A. and E. Ferrannini (1991). "Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease." Diabetes Care 14(3): 173-94.

- Dela Pena, A., I. Leclercq, et al. (2005). "NF-kappaB activation, rather than TNF, mediates hepatic inflammation in a murine dietary model of steatohepatitis." *Gastroenterology* 129(5): 1663-74.
- Dela Pena, L., IA; Williams, J; Farrell GC. (2007). "NADPH oxidase is not an essential mediator of oxidative stress or liver injury in murine MCD diet-induced steatohepatitis." *J. Hepatol* 46: 304-13.
- Demeilliers, C., C. Maisonneuve, et al. (2002). "Impaired adaptive resynthesis and prolonged depletion of hepatic mitochondrial DNA after repeated alcohol binges in mice." *Gastroenterology* 123(4): 1278-90.
- Dentin, R., J. P. Pegorier, et al. (2004). "Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression." *J Biol Chem* 279(19): 20314-26.
- Depocas, F. and J. S. Hart (1957). "Use of the Pauling oxygen analyzer for measurement of oxygen consumption of animals in open-circuit systems and in a short-lag, closed-circuit apparatus." *J Appl Physiol* 10(3): 388-92.
- Detaille, D., B. Guigas, et al. (2002). "Obligatory role of membrane events in the regulatory effect of metformin on the respiratory chain function." *Biochem Pharmacol* 63(7): 1259-72.
- Devaux, P. F. (1991). "Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes." *Biochemistry* 30(5): 1163-73.
- Devin, A. (1997). *Contrôle et régulation du métabolisme énergétique dans le foie de rat: Influence de l'osmolarité, régulation entre nucléotides nicotiniques et adényliques. sciences biologiques et médicales. Bordeaux, Victor Segalen.*
- Devin, A., B. Guerin, et al. (1996). "Dependence of flux size and efficiency of oxidative phosphorylation on external osmolarity in isolated rat liver mitochondria: role of adenine nucleotide carrier." *Biochim Biophys Acta* 1273(1): 13-20.
- Devin, A., B. Guerin, et al. (1997). "Response of isolated rat liver mitochondria to variation of external osmolarity in KCl medium: regulation of matrix volume and oxidative phosphorylation." *J Bioenerg Biomembr* 29(6): 579-90.
- DeWind, L. T. and J. H. Payne (1976). "Intestinal bypass surgery for morbid obesity. Long-term results." *Jama* 236(20): 2298-301.

- Di Girolamo, M., J. B. Fine, et al. (1998). "Qualitative regional differences in adipose tissue growth and cellularity in male Wistar rats fed ad libitum." Am J Physiol 274(5 Pt 2): R1460-7.
- Di Girolamo, M. and S. Mendlinger (1971). "Role of fat cell size and number in enlargement of epididymal fat pads in three species." Am J Physiol 221(3): 859-64.
- Di Paola, M. and M. Lorusso (2006). "Interaction of free fatty acids with mitochondria: Coupling, uncoupling and permeability transition." Biochim Biophys Acta 1757(9-10): 1330-7.
- Diehl, A. M. (1999). "Nonalcoholic steatohepatitis." Semin Liver Dis 19(2): 221-9.
- Diehl, A. M. (2002). "Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis IV. Nonalcoholic fatty liver disease abnormalities in macrophage function and cytokines." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 282(1): G1-5.
- Diehl, A. M. (2005). "Lessons from animal models of NASH." Hepatol Res.
- Diraison, F. and M. Beylot (1998). "Role of human liver lipogenesis and reesterification in triglycerides secretion and in FFA reesterification." Am J Physiol 274(2 Pt 1): E321-7.
- Diraison, F., E. Dusserre, et al. (2002). "Increased hepatic lipogenesis but decreased expression of lipogenic gene in adipose tissue in human obesity." Am J Physiol Endocrinol Metab 282(1): E46-51.
- Diraison, F., P. Moulin, et al. (2003). "Contribution of hepatic de novo lipogenesis and reesterification of plasma non esterified fatty acids to plasma triglyceride synthesis during non-alcoholic fatty liver disease." Diabetes Metab 29(5): 478-85.
- Diraison, F., V. Yankah, et al. (2003). "Differences in the regulation of adipose tissue and liver lipogenesis by carbohydrates in humans." J Lipid Res 44(4): 846-53.
- Dittmer, J. C. and R. L. Lester (1964). "A simple specific spray for the detection of phospholipids on thin-layer chromatograms." J. Lipid Res 5: 126-127.
- Blaskova, A., T. Spacek, et al. (2006). "Certain aspects of uncoupling due to mitochondrial uncoupling proteins in vitro and in vivo." Biochim Biophys Acta 1757(5-6): 467-73.

- Donnelly, K. L., C. I. Smith, et al. (2005). "Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease." J Clin Invest 115(5): 1343-51.
- Dorner, A., M. Olesch, et al. (1999). "Transcription of the adenine nucleotide translocase isoforms in various types of tissues in the rat." Biochim Biophys Acta 1417(1): 16-24.
- Du, X. L., D. Edelstein, et al. (2000). "Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation." Proc Natl Acad Sci U S A 97(22): 12222-6.
- Dufour, J. F., C. M. Oneta, et al. (2006). "Randomized placebo-controlled trial of ursodeoxycholic acid with vitamin e in nonalcoholic steatohepatitis." Clin Gastroenterol Hepatol 4(12): 1537-43.

E

- Eberle, D., B. Hegarty, et al. (2004). "SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis." Biochimie 86(11): 839-48.
- Eckel, R. H., S. M. Grundy, et al. (2005). "The metabolic syndrome." Lancet 365(9468): 1415-28.
- Ekstrom, G. and M. Ingelman-Sundberg (1989). "Rat liver microsomal NADPH-supported oxidase activity and lipid peroxidation dependent on ethanol-inducible cytochrome P-450 (P-450IIE1)." Biochem Pharmacol 38(8): 1313-9.
- El-Mir, M. Y., V. Nogueira, et al. (2000). "Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I." J Biol Chem 275(1): 223-8.
- Engstrom, L. (1978). "The regulation of liver pyruvate kinase by phosphorylation--dephosphorylation." Curr Top Cell Regul 13: 28-51.
- Enriquez, A., I. Leclercq, et al. (1999). "Altered expression of hepatic CYP2E1 and CYP4A in obese, diabetic ob/ob mice, and fa/fa Zucker rats." Biochem Biophys Res Commun 255(2): 300-6.

Erecinska, M. and D. F. Wilson (1982). "Regulation of cellular energy metabolism." J Membr Biol 70(1): 1-14.

Espie, P., A. Devin, et al. (1997). "Energetics of isolated hepatocyte swelling induced by sodium co-transported amino acids." J Bioenerg Biomembr 29(6): 591-601.

Espie, P., B. Guerin, et al. (1995). "On isolated hepatocytes mitochondrial swelling induced in hypoosmotic medium does not affect the respiration rate." Biochim Biophys Acta 1230(3): 139-46.

F

Fadok, V. A., D. L. Bratton, et al. (1998). "Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF." J Clin Invest 101(4): 890-8.

Falchuk, K. R., S. C. Fiske, et al. (1980). "Pericentral hepatic fibrosis and intracellular hyalin in diabetes mellitus." Gastroenterology 78(3): 535-41.

Falcou, R., F. Bouillaud, et al. (1985). "Increase of uncoupling protein and its mRNA in brown adipose tissue of rats fed on 'cafeteria diet'." Biochem J 231(1): 241-4.

Fan, J. G., L. Zhong, et al. (2005). "Effects of ursodeoxycholic acid and/or low-calorie diet on steatohepatitis in rats with obesity and hyperlipidemia." World J Gastroenterol 11(15): 2346-50.

Farrell, G. C. (2005). "Signalling links in the liver: knitting SOCS with fat and inflammation." J Hepatol 43(1): 193-6.

Feldstein, A. E., A. Canbay, et al. (2003). "Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis." Gastroenterology 125(2): 437-43.

Feldstein, A. E., A. Canbay, et al. (2003). "Diet associated hepatic steatosis sensitizes to Fas mediated liver injury in mice." J Hepatol 39(6): 978-83.

Feldstein, A. E., N. W. Werneburg, et al. (2004). "Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF-alpha expression via a lysosomal pathway." Hepatology 40(1): 185-94.

- Feliu, J. E., L. Hue, et al. (1977). "Regulation in vitro and in vivo of adenosine 3':5'-monophosphate-dependent inactivation of rat-liver pyruvate kinase type L." Eur J Biochem 81(3): 609-17.
- Ferret, P. J., R. Hammoud, et al. (2001). "Detoxification of reactive oxygen species by a nonpeptidyl mimic of superoxide dismutase cures acetaminophen-induced acute liver failure in the mouse." Hepatology 33(5): 1173-80.
- Fisk, C. H. and Y. Subbarow (1925). "The colorimetric determination of phosphorous." J. Biol. Chem. 66: 375-400.
- Fisler, J. S. and C. H. Warden (2006). "Uncoupling proteins, dietary fat and the metabolic syndrome." Nutr Metab (Lond) 3(1): 38.
- Flegal, K. M., M. D. Carroll, et al. (1998). "Overweight and obesity in the United States: prevalence and trends, 1960-1994." Int J Obes Relat Metab Disord 22(1): 39-47.
- Flegal, K. M., M. D. Carroll, et al. (2002). "Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2000." Jama 288(14): 1723-7.
- Flohe, L. and F. Otting (1984). "Superoxide dismutase assays." Methods Enzymol 105: 93-104.
- Folch, J., M. Lees, et al. (1957). "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues." J Biol Chem 226(1): 497-509.
- Fong, D. G., V. Nehra, et al. (2000). "Metabolic and nutritional considerations in nonalcoholic fatty liver." Hepatology 32(1): 3-10.
- Fontaine, E. (1995). *Contrôle de l'oxydation phosphorylante. Modification du couplage et rôle de la membrane mitochondriale externe.* Biologie. Grenoble, Joseph Fourier.
- Fontaine, E. M., A. Devin, et al. (1997). "The yield of oxidative phosphorylation is controlled both by force and flux." Biochem Biophys Res Commun 232(2): 532-5.
- Fontaine, E. M., M. Moussa, et al. (1996). "Effect of polyunsaturated fatty acids deficiency on oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria." Biochim Biophys Acta 1276(3): 181-7.

- Forcheron, F., A. Cachefo, et al. (2002). "Mechanisms of the triglyceride- and cholesterol-lowering effect of fenofibrate in hyperlipidemic type 2 diabetic patients." *Diabetes* 51(12): 3486-91.
- Foretz, M., D. Carling, et al. (1998). "AMP-activated protein kinase inhibits the glucose-activated expression of fatty acid synthase gene in rat hepatocytes." *J Biol Chem* 273(24): 14767-71.
- Foster, J. D. and R. C. Nordlie (2002). "The biochemistry and molecular biology of the glucose-6-phosphatase system." *Exp Biol Med (Maywood)* 227(8): 601-8.
- Foufelle, F. and P. Ferre (2002). "New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c." *Biochem J* 366(Pt 2): 377-91.
- Foufelle, F., J. Girard, et al. (1996). "Regulation of lipogenic enzyme expression by glucose in liver and adipose tissue: a review of the potential cellular and molecular mechanisms." *Adv Enzyme Regul* 36: 199-226.
- Frayn, K. N. (1998). "Non-esterified fatty acid metabolism and postprandial lipaemia." *Atherosclerosis* 141 Suppl 1: S41-6.
- Friedman, J. M. and J. L. Halaas (1998). "Leptin and the regulation of body weight in mammals." *Nature* 395(6704): 763-70.
- Fromenty, B. and D. Pessayre (1995). "Inhibition of mitochondrial beta-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity." *Pharmacol Ther* 67(1): 101-54.
- Fromenty, B., M. A. Robin, et al. (2004). "The ins and outs of mitochondrial dysfunction in NASH." *Diabetes Metab* 30(2): 121-38.
- Fukuda, K., M. Kojiro, et al. (1993). "Cross-linked cytokeratin polypeptides in liver and hepatoma cells: possible association with the process of cell degeneration and death." *Hepatology* 17(1): 118-24.
- Fukuda, K., R. L. Xie, et al. (1991). "Demonstration of cross-linked cytokeratin polypeptides in transplantable rat hepatoma cells." *Biochem Biophys Res Commun* 176(1): 441-6.

- Galambos, J. T. and C. E. Wills (1978). "Relationship between 505 paired liver tests and biopsies in 242 obese patients." Gastroenterology 74(6): 1191-5.
- Gao, D., C. Wei, et al. (2004). "Oxidative DNA damage and DNA repair enzyme expression are inversely related in murine models of fatty liver disease." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 287(5): G1070-7.
- Gao, Z., D. Hwang, et al. (2002). "Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex." J Biol Chem 277(50): 48115-21.
- Garait, B., K. Couturier, et al. (2005). "Fat intake reverses the beneficial effects of low caloric intake on skeletal muscle mitochondrial H(2)O(2) production." Free Radic Biol Med 39(9): 1249-61.
- Garcia-Martinez, C., B. Sibille, et al. (2001). "Overexpression of UCP3 in cultured human muscle lowers mitochondrial membrane potential, raises ATP/ADP ratio, and favors fatty acid vs. glucose oxidation." Faseb J 15(11): 2033-5.
- Garcia-Ruiz, I., P. de la Torre, et al. (2002). "Sp1 and Sp3 transcription factors mediate malondialdehyde-induced collagen alpha 1(I) gene expression in cultured hepatic stellate cells." J Biol Chem 277(34): 30551-8.
- Garcia-Ruiz, I., C. Rodriguez-Juan, et al. (2006). "Uric acid and anti-TNF antibody improve mitochondrial dysfunction in ob/ob mice." Hepatology 44(3): 581-91.
- Gardner, L. B., Z. Liu, et al. (1993). "The role of glucose-6-phosphatase in the action of insulin on hepatic glucose production in the rat." Diabetes 42(11): 1614-20.
- Garlid, K. D. (1994). "Mitochondrial cation transport: a progress report." J Bioenerg Biomembr 26(5): 537-42.
- Gauthier, M. S., K. Couturier, et al. (2004). "Effects of introducing physical training in the course of a 16-week high-fat diet regimen on hepatic steatosis, adipose tissue fat accumulation, and plasma lipid profile." Int J Obes Relat Metab Disord 28(8): 1064-71.
- Gauthier, M. S., K. Couturier, et al. (2003). "Concurrent exercise prevents high-fat-diet-induced macrovesicular hepatic steatosis." J Appl Physiol 94(6): 2127-34.

- George, J., N. Pera, et al. (2003). "Lipid peroxidation, stellate cell activation and hepatic fibrogenesis in a rat model of chronic steatohepatitis." *J Hepatol* 39(5): 756-64.
- Gerich, J. E., C. Meyer, et al. (2001). "Renal gluconeogenesis: its importance in human glucose homeostasis." *Diabetes Care* 24(2): 382-91.
- Gherardi, R., L. Belec, et al. (1989). "Almitrine-induced peripheral neuropathy and weight loss." *J Neurol* 236(6): 374.
- Ghosh, S., G. Kewalramani, et al. (2006). "Induction of mitochondrial nitrative damage and cardiac dysfunction by chronic provision of dietary omega-6 polyunsaturated fatty acids." *Free Radic Biol Med* 41(9): 1413-24.
- Ghoshal, A. K. and E. Farber (1993). "Choline deficiency, lipotrope deficiency and the development of liver disease including liver cancer: a new perspective." *Lab Invest* 68(3): 255-60.
- Gilmore, R., N. Cohn, et al. (1979). "Fluidity of LM cell membranes with modified lipid compositions as determined with 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene." *Biochemistry* 18(6): 1042-9.
- Girard, J., P. Ferre, et al. (1997). "Mechanisms by which carbohydrates regulate expression of genes for glycolytic and lipogenic enzymes." *Annu Rev Nutr* 17: 325-52.
- Giraud, S. Q., C. M. Kotz, et al. (1994). "Rat hypothalamic NPY mRNA and brown fat uncoupling protein mRNA after high-carbohydrate or high-fat diets." *Am J Physiol* 266(5 Pt 2): R1578-83.
- Glick, Z., R. J. Teague, et al. (1981). "Brown adipose tissue: thermic response increased by a single low protein, high carbohydrate meal." *Science* 213(4512): 1125-7.
- Glosli, H., O. A. Gudbrandsen, et al. (2005). "Down-regulated expression of PPARalpha target genes, reduced fatty acid oxidation and altered fatty acid composition in the liver of mice transgenic for hTNFalpha." *Biochim Biophys Acta* 1734(3): 235-46.
- Gomez-Perez, F. J., C. A. Aguilar-Salinas, et al. (2002). "Further insight on the hypoglycemic and nonhypoglycemic effects of troglitazone 400 or 600 mg/d: effects

- on the very-low-density and high-density lipoprotein particle distribution." *Metabolism* 51(1): 44-51.
- Gong, P. and A. I. Cederbaum (2006). "Nrf2 is increased by CYP2E1 in rodent liver and HepG2 cells and protects against oxidative stress caused by CYP2E1." *Hepatology* 43(1): 144-53.
- Gonzalez, A. A., R. Kumar, et al. (2004). "Metabolic adaptations to fasting and chronic caloric restriction in heart, muscle, and liver do not include changes in AMPK activity." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287(5): E1032-7.
- Gonzalez-Manchon, C., M. S. Ayuso, et al. (1989). "Control of hepatic gluconeogenesis: role of fatty acid oxidation." *Arch Biochem Biophys* 271(1): 1-9.
- Gorecka, D., P. Sliwinski, et al. (2003). "Effects of almitrine bismesylate on arterial blood gases in patients with chronic obstructive pulmonary disease and moderate hypoxaemia: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled study." *Respiration* 70(3): 275-83.
- Gornall, A. G., Bardawill, C J., David, M M. (1949). "Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction." *J. Biol. Chem.* 177: : 751-766.
- Groen, A., H. Sips, et al. (1982). "Intracellular compartmentation and control of alanine metabolism in rat liver parenchymal cells." *Eur. J. Biochem* 122: 87-93.
- Groen, A. K., C. W. van Roermund, et al. (1986). "Control of gluconeogenesis in rat liver cells. Flux control coefficients of the enzymes in the gluconeogenic pathway in the absence and presence of glucagon." *Biochem J* 237(2): 379-89.
- Groen, A. K., R. C. Vervoorn, et al. (1983). "Control of gluconeogenesis in rat liver cells. I. Kinetics of the individual enzymes and the effect of glucagon." *J Biol Chem* 258(23): 14346-53.
- Groen, B. H., J. A. Berden, et al. (1990). "Differentiation between leaks and slips in oxidative phosphorylation." *Biochim Biophys Acta* 1019(2): 121-7.
- Guerrero, A., R. Pamplona, et al. (1999). "Effect of thyroid status on lipid composition and peroxidation in the mouse liver." *Free Radic Biol Med* 26(1-2): 73-80.
- Guigas, B. (2003). Contribution à l'étude des effets cellulaires de la Metformine : Effets de la Metformine, du glucagon et des acides gras sur le contrôle et la

régulation de la gluconéogenèse hépatique à partir de différents hydrates de carbone: Relations entre effets mitochondriaux de la Metformine et mort cellulaire. Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives. Grenoble, Université Joseph Fourier: 313.

Gutknecht, J. (1987). "Proton conductance through phospholipid bilayers: water wires or weak acids?" J Bioenerg Biomembr 19(5): 427-42.

H

Halestrap, A. P. (1975). "The mitochondrial pyruvate carrier. Kinetics and specificity for substrates and inhibitors." Biochem J 148(1): 85-96.

Halestrap, A. P. (1989). "The regulation of the matrix volume of mammalian mitochondria in vivo and in vitro and its role in the control of mitochondrial metabolism." Biochim Biophys Acta 973(3): 355-82.

Han, J., J. A. Hamilton, et al. (2003). "Medium-chain oil reduces fat mass and down-regulates expression of adipogenic genes in rats." Obes Res 11(6): 734-44.

Haque, M., Mirshahi F, Campbell-Sargent C, Sterling RK, Luketic VA, Shiffman VA (2002). "Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is associated with hepatocyte mitochondrial DNA depletion." Hepatology 36: 403A.

Haque, M. and A. J. Sanyal (2002). "The metabolic abnormalities associated with non-alcoholic fatty liver disease." Best Pract Res Clin Gastroenterol 16(5): 709-31.

Hardie, D. G., J. W. Scott, et al. (2003). "Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system." FEBS Lett 546(1): 113-20.

Harrison, S. A., S. Kadakia, et al. (2002). "Nonalcoholic steatohepatitis: what we know in the new millennium." Am J Gastroenterol 97(11): 2714-24.

Hashimoto, T., T. Fujita, et al. (1999). "Peroxisomal and mitochondrial fatty acid beta-oxidation in mice nullizygous for both peroxisome proliferator-activated receptor alpha and peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase. Genotype correlation with fatty liver phenotype." J Biol Chem 274(27): 19228-36.

Hatzitolios, A., C. Savopoulos, et al. (2004). "Efficacy of omega-3 fatty acids, atorvastatin and orlistat in non-alcoholic fatty liver disease with dyslipidemia." Indian J Gastroenterol 23(4): 131-4.

- Heid, H. W., R. Moll, et al. (1998). "Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases." *Cell Tissue Res* 294(2): 309-21.
- Hellerstein, M. K., R. A. Neese, et al. (1997). "Hepatic gluconeogenic fluxes and glycogen turnover during fasting in humans. A stable isotope study." *J Clin Invest* 100(5): 1305-19.
- Hellerstein, M. K., J. M. Schwarz, et al. (1996). "Regulation of hepatic de novo lipogenesis in humans." *Annu Rev Nutr* 16: 523-57.
- Hensley, K., Y. Kotake, et al. (2000). "Dietary choline restriction causes complex I dysfunction and increased H₂O₂ generation in liver mitochondria." *Carcinogenesis* 21(5): 983-9.
- Hers, H. G. and L. Hue (1983). "Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis." *Annu Rev Biochem* 52: 617-53.
- Herzig, S., F. Long, et al. (2001). "CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1." *Nature* 413(6852): 179-83.
- Hill, J. O., J. C. Peters, et al. (1993). "Lipid accumulation and body fat distribution is influenced by type of dietary fat fed to rats." *Int J Obes Relat Metab Disord* 17(4): 223-36.
- Himms-Hagen, J. (1990). "Brown adipose tissue thermogenesis: interdisciplinary studies." *Faseb J* 4(11): 2890-8.
- Himms-Hagen, J. and M. E. Harper (2001). "Physiological role of UCP3 may be export of fatty acids from mitochondria when fatty acid oxidation predominates: an hypothesis." *Exp Biol Med (Maywood)* 226(2): 78-84.
- Hirosumi, J., G. Tuncman, et al. (2002). "A central role for JNK in obesity and insulin resistance." *Nature* 420(6913): 333-6.
- Hoch, F. L. (1992). "Cardiolipins and biomembrane function." *Biochim Biophys Acta* 1113(1): 71-133.
- Hotamisligil, G. S., P. Arner, et al. (1995). "Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance." *J Clin Invest* 95(5): 2409-15.
- Hruszkewycz, A. M. (1988). "Evidence for mitochondrial DNA damage by lipid peroxidation." *Biochem Biophys Res Commun* 153(1): 191-7.

- Hruszkewycz, A. M. and D. S. Bergtold (1990). "The 8-hydroxyguanine content of isolated mitochondria increases with lipid peroxidation." Mutat Res 244(2): 123-8.
- Huang, M. A., J. K. Greenson, et al. (2005). "One-year intense nutritional counseling results in histological improvement in patients with non-alcoholic steatohepatitis: a pilot study." Am J Gastroenterol 100(5): 1072-81.
- Hue, L. (1981). "The role of futile cycles in the regulation of carbohydrate metabolism in the liver." Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol 52: 247-331.
- Hue, L. (2001). Regulation of gluconeogenesis in liver. The endocrine pancreas and regulation of metabolism, O.U. Press. II: 649-657.
- Hue, L., L. Maisin, et al. (1988). "Palmitate inhibits liver glycolysis. Involvement of fructose 2,6-bisphosphate in the glucose/fatty acid cycle." Biochem J 251(2): 541-5.
- Hui, J. M., A. Hodge, et al. (2004). "Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin?" Hepatology 40(1): 46-54.
- Hundal, R. S., M. Krssak, et al. (2000). "Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes." Diabetes 49(12): 2063-9.

I

- Ichai, C., L. Guignot, et al. (2001). "Glucose 6-phosphate hydrolysis is activated by glucagon in a low temperature-sensitive manner." J Biol Chem 276(30): 28126-33.
- Iizuka, K., R. K. Bruick, et al. (2004). "Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis." Proc Natl Acad Sci U S A 101(19): 7281-6.
- Ikejima, K., Y. Takei, et al. (2002). "Leptin receptor-mediated signaling regulates hepatic fibrogenesis and remodeling of extracellular matrix in the rat." Gastroenterology 122(5): 1399-410.
- Ioannou, G. N., N. S. Weiss, et al. (2003). "Is obesity a risk factor for cirrhosis-related death or hospitalization? A population-based cohort study." Gastroenterology 125(4): 1053-9.

- Iossa, S., L. Lionetti, et al. (1999). "Fat balance and hepatic mitochondrial function in response to fat feeding in mature rats." *Int J Obes Relat Metab Disord* 23: 1122-8.
- Iossa, S., L. Lionetti, et al. (2003). "Effect of high-fat feeding on metabolic efficiency and mitochondrial oxidative capacity in adult rats." *Br J Nutr* 90(5): 953-60.
- Ip, E., G. C. Farrell, et al. (2003). "Central role of PPARalpha-dependent hepatic lipid turnover in dietary steatohepatitis in mice." *Hepatology* 38(1): 123-32.
- Itoh, K., N. Wakabayashi, et al. (1999). "Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain." *Genes Dev* 13(1): 76-86.
- Itoh, S., Y. Tsukada, et al. (1979). "Five patients with nonalcoholic diabetic cirrhosis." *Acta Hepatogastroenterol (Stuttg)* 26(2): 90-7.

J

- James, O. and C. Day (1999). "Non-alcoholic steatohepatitis: another disease of affluence." *Lancet* 353(9165): 1634-6.
- Jeppesen, J., M. Y. Zhou, et al. (1994). "Effect of metformin on postprandial lipemia in patients with fairly to poorly controlled NIDDM." *Diabetes Care* 17(10): 1093-9.
- Jezek, P. (2002). "Possible physiological roles of mitochondrial uncoupling proteins--UCPn." *Int J Biochem Cell Biol* 34(10): 1190-206.
- Jezek, P. and L. Hlavata (2005). "Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism." *Int J Biochem Cell Biol* 37(12): 2478-503.
- Jitrapakdee, S. and J. C. Wallace (1999). "Structure, function and regulation of pyruvate carboxylase." *Biochem J* 340 (Pt 1): 1-16.
- Johnson, A. B., J. M. Webster, et al. (1993). "The impact of metformin therapy on hepatic glucose production and skeletal muscle glycogen synthase activity in overweight type II diabetic patients." *Metabolism* 42(9): 1217-22.
- Jumelle-Laclau, M., M. Rigoulet, et al. (1993). "Relationships between age-dependent changes in the effect of almitrine on H(+)-ATPase/ATPsynthase and the pattern of membrane fatty acid composition." *Biochim Biophys Acta* 1141(1): 90-4.

K

- Kahn, C. R., D. M. Neville, Jr., et al. (1973). "Insulin-receptor interaction in the obese-hyperglycemic mouse. A model of insulin resistance." *J Biol Chem* 248(1): 244-50.
- Kashireddy, P. V. and M. S. Rao (2004). "Lack of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in mice enhances methionine and choline deficient diet-induced steatohepatitis." *Hepatol Res* 30(2): 104-110.
- Katz, J. and J. D. McGarry (1984). "The glucose paradox. Is glucose a substrate for liver metabolism?" *J Clin Invest* 74(6): 1901-9.
- Kelley, D. E., T. M. McKolanis, et al. (2003). "Fatty liver in type 2 diabetes mellitus: relation to regional adiposity, fatty acids, and insulin resistance." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285(4): E906-16.
- Kern, P. A., M. Saghizadeh, et al. (1995). "The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase." *J Clin Invest* 95(5): 2111-9.
- Kern, W. H., A. H. Heger, et al. (1973). "Fatty metamorphosis of the liver in morbid obesity." *Arch Pathol* 96(5): 342-6.
- Kersten, S., J. Seydoux, et al. (1999). "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting." *J Clin Invest* 103(11): 1489-98.
- Kido, Y., J. Nakae, et al. (2001). "Clinical review 125: The insulin receptor and its cellular targets." *J Clin Endocrinol Metab* 86(3): 972-9.
- Kim, H. I. and Y. H. Ahn (2004). "Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in the glucose-sensing apparatus of liver and beta-cells." *Diabetes* 53 Suppl 1: S60-5.
- Kim, J. K., J. J. Fillmore, et al. (2001). "Tissue-specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(13): 7522-7.
- Kim, S. P., M. Ellmerer, et al. (2003). "Primacy of hepatic insulin resistance in the development of the metabolic syndrome induced by an isocaloric moderate-fat diet in the dog." *Diabetes* 52(10): 2453-60.

- Kim, Y. W., J. Y. Kim, et al. (2006). "Metformin restores leptin sensitivity in high-fat-fed obese rats with leptin resistance." Diabetes 55(3): 716-24.
- Kirsch, R., V. Clarkson, et al. (2003). "Rodent nutritional model of non-alcoholic steatohepatitis: species, strain and sex difference studies." J Gastroenterol Hepatol 18(11): 1272-82.
- Kitamura, T., Y. Kitamura, et al. (1999). "Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B by the serine-threonine kinase Akt." Mol Cell Biol 19(9): 6286-96.
- Klingenberg, M. (1961). "[On the reversibility of oxidative phosphorylation. IV. Relation between the redox state of cytochrome c and the phosphorylation potential of adenosine triphosphate.]." Biochem Z 335: 263-72.
- Klingenberg, M., K. Echtay, et al. (1999). "Structure-function relationship in UCP1." Int J Obes Relat Metab Disord 23(Suppl 6): S24-9.
- Klingenberg, M. and W. Slenczka (1959). "[Pyridine nucleotide in liver mitochondria. An analysis of their redox relationships.]." Biochem Z 331: 486-517.
- Knowler, W. C., E. Barrett-Connor, et al. (2002). "Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin." N Engl J Med 346(6): 393-403.
- Kohlroser, J., J. Mathai, et al. (2000). "Hepatotoxicity due to troglitazone: report of two cases and review of adverse events reported to the United States Food and Drug Administration." Am J Gastroenterol 95(1): 272-6.
- Kono, H., I. Rusyn, et al. (2000). "NADPH oxidase-derived free radicals are key oxidants in alcohol-induced liver disease." J Clin Invest 106(7): 867-72.
- Kopelman, P. G. (2000). "Obesity as a medical problem." Nature 404(6778): 635-43.
- Korshunov, S. S., O. V. Korkina, et al. (1998). "Fatty acids as natural uncouplers preventing generation of O₂·- and H₂O₂ by mitochondria in the resting state." FEBS Lett 435(2-3): 215-8.
- Korshunov, S. S., V. P. Skulachev, et al. (1997). "High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria." FEBS Lett 416(1): 15-8.

- Koteish, A. and A. M. Diehl (2001). "Animal models of steatosis." Semin Liver Dis 21(1): 89-104.
- Koteish, A. and A. Mae Diehl (2002). "Animal models of steatohepatitis." Best Pract Res Clin Gastroenterol 16(5): 679-90.
- Krauss, S., C. Y. Zhang, et al. (2005). "The mitochondrial uncoupling-protein homologues." Nat Rev Mol Cell Biol 6(3): 248-61.
- Kreher, P., C. Keriel, et al. (1996). "Action potentials in right and left ventricles from chronic hypoxic rats: effect of almitrine." Am J Physiol 271(5 Pt 2): H1856-63.
- Kristal, B. S., B. K. Park, et al. (1996). "4-Hydroxyhexenal is a potent inducer of the mitochondrial permeability transition." J Biol Chem 271(11): 6033-8.
- Kugelmas, M., D. B. Hill, et al. (2003). "Cytokines and NASH: a pilot study of the effects of lifestyle modification and vitamin E." Hepatology 38(2): 413-9.
- Kurland, I. J. and S. J. Pilkis (1995). "Covalent control of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: insights into autoregulation of a bifunctional enzyme." Protein Sci 4(6): 1023-37.
- Kushnareva, Y., A. N. Murphy, et al. (2002). "Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state." Biochem J 368(Pt 2): 545-53.

L

- Lande, M. B., J. M. Donovan, et al. (1995). "The relationship between membrane fluidity and permeabilities to water, solutes, ammonia, and protons." J Gen Physiol 106(1): 67-84.
- LaNoue, K. F. and A. C. Schoolwerth (1979). "Metabolite transport in mitochondria." Annu Rev Biochem 48: 871-922.
- Lardy, H. and P. E. Hughes (1984). "Regulation of gluconeogenesis at phosphoenolpyruvate carboxykinase." Curr Top Cell Regul 24: 171-9.
- Laurent, A., C. Nicco, et al. (2004). "Pivotal role of superoxide anion and beneficial effect of antioxidant molecules in murine steatohepatitis." Hepatology 39(5): 1277-85.

- Laurin, J., K. D. Lindor, et al. (1996). "Ursodeoxycholic acid or clofibrate in the treatment of non-alcohol-induced steatohepatitis: a pilot study." *Hepatology* 23(6): 1464-7.
- Le Roith, D. and Y. Zick (2001). "Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance." *Diabetes Care* 24(3): 588-97.
- Leclercq, I. A., G. C. Farrell, et al. (2000). "CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis." *J Clin Invest* 105(8): 1067-75.
- Leclercq, I. A., J. Field, et al. (2000). "Constitutive and inducible expression of hepatic CYP2E1 in leptin-deficient ob/ob mice." *Biochem Biophys Res Commun* 268(2): 337-44.
- Leclercq, I. A., V. A. Lebrun, et al. (2007). "Intrahepatic insulin resistance in a murine model of steatohepatitis: effect of PPARgamma agonist pioglitazone." *Lab Invest* 87(1): 56-65.
- Lee, A. and J. E. Morley (1998). "Metformin decreases food consumption and induces weight loss in subjects with obesity with type II non-insulin-dependent diabetes." *Obes Res* 6(1): 47-53.
- Lee, J. Y., J. Ye, et al. (2003). "Reciprocal modulation of Toll-like receptor-4 signaling pathways involving MyD88 and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT by saturated and polyunsaturated fatty acids." *J Biol Chem* 278(39): 37041-51.
- Lee, J. Y., L. Zhao, et al. (2004). "Saturated fatty acid activates but polyunsaturated fatty acid inhibits Toll-like receptor 2 dimerized with Toll-like receptor 6 or 1." *J Biol Chem* 279(17): 16971-9.
- Lee, Y., M. Y. Wang, et al. (2001). "Liporegulation in diet-induced obesity. The antisteatotic role of hyperleptinemia." *J Biol Chem* 276(8): 5629-35.
- Lee, Y., X. Yu, et al. (2002). "PPAR alpha is necessary for the lipopenic action of hyperleptinemia on white adipose and liver tissue." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(18): 11848-53.
- Leibowitz, S. F., J. T. Dourmashkin, et al. (2004). "Acute high-fat diet paradigms link galanin to triglycerides and their transport and metabolism in muscle." *Brain Res* 1008(2): 168-78.

- Leighton, J. K., J. Joyner, et al. (1990). "Fasting decreases apolipoprotein B mRNA editing and the secretion of small molecular weight apoB by rat hepatocytes: evidence that the total amount of apoB secreted is regulated post-transcriptionally." *J Lipid Res* 31(9): 1663-8.
- Leonarduzzi, G., A. Scavazza, et al. (1997). "The lipid peroxidation end product 4-hydroxy-2,3-nonenal up-regulates transforming growth factor beta1 expression in the macrophage lineage: a link between oxidative injury and fibrosclerosis." *Faseb J* 11(11): 851-7.
- Letexier, D. (2004). *Régulation nutritionnelle de la lipogenèse: comparaison entre foie et tissu adipeux et entre homme et rat.* Lyon, Claude Bernard.
- Letteron, P., B. Fromenty, et al. (1996). "Acute and chronic hepatic steatosis lead to in vivo lipid peroxidation in mice." *J Hepatol* 24(2): 200-8.
- Leverve, X., B. Sibille, et al. (1998). "Oxidative phosphorylation in intact hepatocytes: quantitative characterization of the mechanisms of change in efficiency and cellular consequences." *Mol Cell Biochem* 184(1-2): 53-65.
- Leverve, X. M., E. Fontaine, et al. (1994). "Decrease in cytosolic ATP/ADP ratio and activation of pyruvate kinase after in vitro addition of almitrine in hepatocytes isolated from fasted rats." *Eur J Biochem* 224(3): 967-74.
- Li, Z., L. B. Agellon, et al. (2006). "The ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine influences membrane integrity and steatohepatitis." *Cell Metab* 3(5): 321-31.
- Li, Z., L. B. Agellon, et al. (2005). "Phosphatidylcholine homeostasis and liver failure." *J Biol Chem* 280(45): 37798-802.
- Li, Z., S. Yang, et al. (2003). "Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease." *Hepatology* 37(2): 343-50.
- Lieber, C. S. (1997). "Cytochrome P-4502E1: its physiological and pathological role." *Physiol Rev* 77(2): 517-44.
- Lieber, C. S., M. A. Leo, et al. (2004). "Model of nonalcoholic steatohepatitis." *Am J Clin Nutr* 79(3): 502-9.
- Lin, E. C. (1977). "Glycerol utilization and its regulation in mammals." *Annu Rev Biochem* 46: 765-95.

- Lin, H. Z., S. Q. Yang, et al. (2000). "Metformin reverses fatty liver disease in obese, leptin-deficient mice." Nat Med 6(9): 998-1003.
- Lindor, K. D., K. V. Kowdley, et al. (2004). "Ursodeoxycholic acid for treatment of nonalcoholic steatohepatitis: results of a randomized trial." Hepatology 39(3): 770-8.
- Llado, I., S. Rodriguez-Cuenca, et al. (2002). "Gender effects on adrenergic receptor expression and lipolysis in white adipose tissue of rats." Obes Res 10(4): 296-305.
- Lombardi, A., E. Silvestri, et al. (2002). "Skeletal muscle mitochondrial free-fatty-acid content and membrane potential sensitivity in different thyroid states: involvement of uncoupling protein-3 and adenine nucleotide translocase." FEBS Lett 532(1-2): 12-6.
- Lombardi, B., P. Pani, et al. (1968). "Choline-deficiency fatty liver: impaired release of hepatic triglycerides." J Lipid Res 9(4): 437-46.
- Lopez, J. M., M. K. Bennett, et al. (1996). "Sterol regulation of acetyl coenzyme A carboxylase: a mechanism for coordinate control of cellular lipid." Proc Natl Acad Sci U S A 93(3): 1049-53.
- Louet, J. F., F. Chatelain, et al. (2001). "Long-chain fatty acids regulate liver carnitine palmitoyltransferase I gene (L-CPT I) expression through a peroxisome-proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha)-independent pathway." Biochem J 354(Pt 1): 189-97.
- Louet, J. F., G. Hayhurst, et al. (2002). "The coactivator PGC-1 is involved in the regulation of the liver carnitine palmitoyltransferase I gene expression by cAMP in combination with HNF4 alpha and cAMP-response element-binding protein (CREB)." J Biol Chem 277(41): 37991-8000.
- Lowry, O. H. and J. V. Passonneau (1973). A flexible system of enzymatic analysis, Academic Press, New York.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, et al. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem 193(1): 265-75.
- Ludwig, J., T. R. Viggiano, et al. (1980). "Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease." Mayo Clin Proc 55(7): 434-8.

- Luvisetto, S., D. Pietrobon, et al. (1987). "Uncoupling of oxidative phosphorylation. 1. Protonophoric effects account only partially for uncoupling." *Biochemistry* 26(23): 7332-8.
- Luyckx, F. H., C. Desai, et al. (1998). "Liver abnormalities in severely obese subjects: effect of drastic weight loss after gastroplasty." *Int J Obes Relat Metab Disord* 22(3): 222-6.
- Lyman, R. L., G. Sheehan, et al. (1973). "Phosphatidylethanolamine metabolism in rats fed a low methionine, choline-deficient diet." *Lipids* 8(2): 71-9.

M

- Malassagne, B., P. J. Ferret, et al. (2001). "The superoxide dismutase mimetic MnTBAP prevents Fas-induced acute liver failure in the mouse." *Gastroenterology* 121(6): 1451-9.
- Mansouri, A., C. Demeilliers, et al. (2001). "Acute ethanol administration oxidatively damages and depletes mitochondrial dna in mouse liver, brain, heart, and skeletal muscles: protective effects of antioxidants." *J Pharmacol Exp Ther* 298(2): 737-43.
- Marchesini, G., M. Brizi, et al. (2001). "Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome." *Diabetes* 50(8): 1844-50.
- Marchesini, G., M. Brizi, et al. (2001). "Metformin in non-alcoholic steatohepatitis." *Lancet* 358(9285): 893-4.
- Marchesini, G., M. Brizi, et al. (1999). "Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance." *Am J Med* 107(5): 450-5.
- Marchesini, G., E. Bugianesi, et al. (2003). "Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome." *Hepatology* 37(4): 917-23.
- Matsushashi, T., X. Liu, et al. (1996). "Mechanism of the formation of megamitochondria in the mouse liver induced by chloramphenicol." *Toxicol Lett* 86(1): 47-54.
- Matsusue, K., M. Haluzik, et al. (2003). "Liver-specific disruption of PPARgamma in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes." *J Clin Invest* 111(5): 737-47.

- Matteoni, C. A., Z. M. Younossi, et al. (1999). "Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity." *Gastroenterology* 116(6): 1413-9.
- Mattiasson, G. and P. G. Sullivan (2006). "The emerging functions of UCP2 in health, disease, and therapeutics." *Antioxid Redox Signal* 8(1-2): 1-38.
- Mayerson, A. B., R. S. Hundal, et al. (2002). "The effects of rosiglitazone on insulin sensitivity, lipolysis, and hepatic and skeletal muscle triglyceride content in patients with type 2 diabetes." *Diabetes* 51(3): 797-802.
- McCarty, M. F. (2005). "High mitochondrial redox potential may promote induction and activation of UCP2 in hepatocytes during hepatothermic therapy." *Med Hypotheses* 64(6): 1216-9.
- McCormack, J. G. (1985). "Characterization of the effects of Ca^{2+} on the intramitochondrial Ca^{2+} -sensitive enzymes from rat liver and within intact rat liver mitochondria." *Biochem J* 231(3): 581-95.
- McCormack, J. G., A. P. Halestrap, et al. (1990). "Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism." *Physiol Rev* 70(2): 391-425.
- McCullough, A. (2005). *The epidemiology and risk factors of NASH. Fatty liver disease. NASH and related disorders.* Malden, Farell GC, George J, de la M Hall P, McCullough AJ, editors.: 23-37.
- McGarry, J. D. and D. W. Foster (1980). "Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production." *Annu Rev Biochem* 49: 395-420.
- Meijer, A. J. and K. Van Dam (1974). "The metabolic significance of anion transport in mitochondria." *Biochim Biophys Acta* 346(3-4): 213-44.
- Memon, R. A., G. S. Hotamisligil, et al. (2000). "Upregulation of uncoupling protein 2 mRNA in genetic obesity: lack of an essential role for leptin, hyperphagia, increased tissue lipid content, and TNF- α ." *Biochim Biophys Acta* 1484(1): 41-50.
- Michel, V., Z. Yuan, et al. (2006). "Choline transport for phospholipid synthesis." *Exp Biol Med (Maywood)* 231(5): 490-504.
- Miele, L., A. Grieco, et al. (2003). "Hepatic mitochondrial beta-oxidation in patients with nonalcoholic steatohepatitis assessed by ^{13}C -octanoate breath test." *Am J Gastroenterol* 98(10): 2335-6.

- Miller, W. C., G. R. Bryce, et al. (1984). "Adaptations to a high-fat diet that increase exercise endurance in male rats." *J Appl Physiol* 56(1): 78-83.
- Minassian, C., S. Tarpin, et al. (1998). "Role of glucose-6 phosphatase, glucokinase, and glucose-6 phosphate in liver insulin resistance and its correction by metformin." *Biochem Pharmacol* 55(8): 1213-9.
- Mitchell, P. (1961). "Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism." *Nature* 191: 144-8.
- Mithieux, G. (2001). "New data and concepts on glutamine and glucose metabolism in the gut." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 4(4): 267-71.
- Mithieux, G., J. C. Bordeto, et al. (1993). "Characteristics and specificity of the inhibition of liver glucose-6-phosphatase by arachidonic acid. Lesser inhibitability of the enzyme of diabetic rats." *Eur J Biochem* 213(1): 461-6.
- Mithieux, G., N. Daniele, et al. (1998). "Liver microsomal glucose-6-phosphatase is competitively inhibited by the lipid products of phosphatidylinositol 3-kinase." *J Biol Chem* 273(1): 17-9.
- Mithieux, G., L. Guignot, et al. (2002). "Intrahepatic mechanisms underlying the effect of metformin in decreasing basal glucose production in rats fed a high-fat diet." *Diabetes* 51(1): 139-43.
- Mithieux, G., F. V. Vega, et al. (1990). "The liver glucose-6-phosphatase of intact microsomes is inhibited and displays sigmoid kinetics in the presence of alpha-ketoglutarate-magnesium and oxaloacetate-magnesium chelates." *J Biol Chem* 265(33): 20364-8.
- Mithieux, G. and C. Zitoun (1996). "Mechanisms by which fatty-acyl-CoA esters inhibit or activate glucose-6-phosphatase in intact and detergent-treated rat liver microsomes." *Eur J Biochem* 235(3): 799-803.
- Miwa, I., Y. Kito, et al. (1994). "Purification and characterization of triokinase from porcine kidney." *Prep Biochem* 24(3-4): 203-23.
- Miyazaki, Y., L. Glass, et al. (2001). "Effect of rosiglitazone on glucose and non-esterified fatty acid metabolism in Type II diabetic patients." *Diabetologia* 44(12): 2210-9.

- Miyazaki, Y., A. Mahankali, et al. (2002). "Effect of pioglitazone on abdominal fat distribution and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients." J Clin Endocrinol Metab 87(6): 2784-91.
- Miyazaki, Y., R. Pipek, et al. (2003). "Tumor necrosis factor alpha and insulin resistance in obese type 2 diabetic patients." Int J Obes Relat Metab Disord 27(1): 88-94.
- Mokdad, A. H., B. A. Bowman, et al. (2001). "The continuing epidemics of obesity and diabetes in the United States." Jama 286(10): 1195-200.
- Morand, C., C. Remesy, et al. (1993). "Fatty acids are potent modulators of lactate utilization in isolated hepatocytes from fed rats." Am J Physiol 264(5 Pt 1): E816-23.
- Motohashi, H., T. O'Connor, et al. (2002). "Integration and diversity of the regulatory network composed of Maf and CNC families of transcription factors." Gene 294(1-2): 1-12.
- Munday, M. R., M. R. Milic, et al. (1991). "The short-term regulation of hepatic acetyl-CoA carboxylase during starvation and re-feeding in the rat." Biochem J 280 (Pt 3): 733-7.
- Murphy, M. P. and M. D. Brand (1987). "Variable stoichiometry of proton pumping by the mitochondrial respiratory chain." Nature 329(6135): 170-2.
- Musi, N., H. Yu, et al. (2003). "AMP-activated protein kinase regulation and action in skeletal muscle during exercise." Biochem Soc Trans 31(Pt 1): 191-5.
- Musso, G., R. Gambino, et al. (2003). "Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis." Hepatology 37(4): 909-16.

N

- Nagasawa, T., Y. Inada, et al. (2006). "Effects of bezafibrate, PPAR pan-agonist, and GW501516, PPARdelta agonist, on development of steatohepatitis in mice fed a methionine- and choline-deficient diet." Eur J Pharmacol 536(1-2): 182-91.
- Nagle, J. F. (1987). "Theory of passive proton conductance in lipid bilayers." J Bioenerg Biomembr 19(5): 413-26.

- Nair, S., A. M. Diehl, et al. (2004). "Metformin in the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a pilot open label trial." *Aliment Pharmacol Ther* 20(1): 23-8.
- Nemeth, P. M., B. W. Rosser, et al. (1992). "Metabolic response to a high-fat diet in neonatal and adult rat muscle." *Am J Physiol* 262(2 Pt 1): C282-6.
- Neuschwander-Tetri, B. A., E. M. Brunt, et al. (2003). "Improved nonalcoholic steatohepatitis after 48 weeks of treatment with the PPAR-gamma ligand rosiglitazone." *Hepatology* 38(4): 1008-17.
- Neuschwander-Tetri, B. A. and S. H. Caldwell (2003). "Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference." *Hepatology* 37(5): 1202-19.
- Newgard, C. B., S. V. Moore, et al. (1984). "Efficient hepatic glycogen synthesis in refeeding rats requires continued carbon flow through the gluconeogenic pathway." *J Biol Chem* 259(11): 6958-63.
- Nguyen, M. T., H. Satoh, et al. (2005). "JNK and tumor necrosis factor-alpha mediate free fatty acid-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes." *J Biol Chem* 280(42): 35361-71.
- Nguyen, T., C. S. Yang, et al. (2004). "The pathways and molecular mechanisms regulating Nrf2 activation in response to chemical stress." *Free Radic Biol Med* 37(4): 433-41.
- Nicholls, D. G. (1974). "The influence of respiration and ATP hydrolysis on the proton-electrochemical gradient across the inner membrane of rat-liver mitochondria as determined by ion distribution." *Eur J Biochem* 50(1): 305-15.
- Nicholls, D. G. and R. M. Locke (1984). "Thermogenic mechanisms in brown fat." *Physiol Rev* 64(1): 1-64.
- Nielsen, S., Z. Guo, et al. (2004). "Splanchnic lipolysis in human obesity." *J Clin Invest* 113(11): 1582-8.
- Nishiki, K., M. Erecinska, et al. (1978). "Evaluation of oxidative phosphorylation in hearts from euthyroid, hypothyroid, and hyperthyroid rats." *Am J Physiol* 235(5): C212-9.
- Nobes, C. D., W. W. Hay, Jr., et al. (1990). "The mechanism of stimulation of respiration by fatty acids in isolated hepatocytes." *J Biol Chem* 265(22): 12910-5.

- Nobili, V., A. Pastore, et al. (2005). "Glutathione metabolism and antioxidant enzymes in patients affected by nonalcoholic steatohepatitis." Clin Chim Acta 355(1-2): 105-11.
- Nogueira, V. (2001). Régulation de l'oxydation phosphorylante : importance physiologique de la modulation du couplage entre oxydation et phosphorylation. grenoble, joseph fourier.
- Nogueira, V., M. Rigoulet, et al. (2001). "Mitochondrial respiratory chain adjustment to cellular energy demand." J Biol Chem 276(49): 46104-10.
- Nogueira, V., L. Walter, et al. (2002). "Thyroid status is a key regulator of both flux and efficiency of oxidative phosphorylation in rat hepatocytes." J Bioenerg Biomembr 34(1): 55-66.
- Nordlie, R. C., J. D. Foster, et al. (1999). "Regulation of glucose production by the liver." Annu Rev Nutr 19: 379-406.

O

- Ochs, R. S. and R. A. Harris (1986). "Mechanism for the oleate stimulation of gluconeogenesis from dihydroxyacetone by hepatocytes from fasted rats." Biochim Biophys Acta 886(1): 40-7.
- Ogawa, Y., Y. Murata, et al. (1998). "Tamoxifen-induced fatty liver in patients with breast cancer." Lancet 351(9104): 725.
- Olefsky, J. M. (1976). "Decreased insulin binding to adipocytes and circulating monocytes from obese subjects." J Clin Invest 57(5): 1165-72.
- Oliveira, C. P., A. M. Coelho, et al. (2006). "Liver mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of experimental nonalcoholic fatty liver disease." Braz J Med Biol Res 39(2): 189-94.
- Oliver, A. E. and D. W. Deamer (1994). "Alpha-helical hydrophobic polypeptides form proton-selective channels in lipid bilayers." Biophys J 66(5): 1364-79.
- Ouslimani, N., J. Peynet, et al. (2005). "Metformin decreases intracellular production of reactive oxygen species in aortic endothelial cells." Metabolism 54(6): 829-34.

Owen, M. R., E. Doran, et al. (2000). "Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain." Biochem J 348 Pt 3: 607-14.

P

Pajvani, U. B., M. Hawkins, et al. (2004). "Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity." J Biol Chem 279(13): 12152-62.

Paolisso, G., L. Amato, et al. (1998). "Effect of metformin on food intake in obese subjects." Eur J Clin Invest 28(6): 441-6.

Papa, S., N. Capitanio, et al. (1991). "The cytochrome chain of mitochondria exhibits variable H⁺/e⁻ stoichiometry." FEBS Lett 288(1-2): 183-6.

Papa, S. G., F. Capitanio N. (1997). "A Possible Role of Slips in Cytochrome C Oxidase in the Antioxygen Defense system of the Cell." Bioscience Reports 17(1): 23-31.

Paradies, G., G. Petrosillo, et al. (2000). "The effect of reactive oxygen species generated from the mitochondrial electron transport chain on the cytochrome c oxidase activity and on the cardiolipin content in bovine heart submitochondrial particles." FEBS Lett 466(2-3): 323-6.

Paradies, G., F. M. Ruggiero, et al. (1993). "Decreased cytochrome oxidase activity and changes in phospholipids in heart mitochondria from hypothyroid rats." Arch Biochem Biophys 307(1): 91-5.

Paradies, G., F. M. Ruggiero, et al. (1993). "Age-dependent decrease in the cytochrome c oxidase activity and changes in phospholipids in rat-heart mitochondria." Arch Gerontol Geriatr 16(3): 263-72.

Paradies, G., F. M. Ruggiero, et al. (1994). "Enhanced cytochrome oxidase activity and modification of lipids in heart mitochondria from hyperthyroid rats." Biochim Biophys Acta 1225(2): 165-70.

Park, H., V. K. Kaushik, et al. (2002). "Coordinate regulation of malonyl-CoA decarboxylase, sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, and acetyl-CoA

- carboxylase by AMP-activated protein kinase in rat tissues in response to exercise." *J Biol Chem* 277(36): 32571-7.
- Park, H. S., M. W. Kim, et al. (1995). "Effect of weight control on hepatic abnormalities in obese patients with fatty liver." *J Korean Med Sci* 10(6): 414-21.
- Parola, M., M. Pinzani, et al. (1993). "Stimulation of lipid peroxidation or 4-hydroxynonenal treatment increases procollagen alpha 1 (I) gene expression in human liver fat-storing cells." *Biochem Biophys Res Commun* 194(3): 1044-50.
- Patel, T. B., L. L. Barron, et al. (1984). "The stimulation of hepatic gluconeogenesis by acetoacetate precursors. A role for the monocarboxylate translocator." *J Biol Chem* 259(12): 7525-31.
- Paterson, J. M., N. M. Morton, et al. (2004). "Metabolic syndrome without obesity: Hepatic overexpression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in transgenic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(18): 7088-93.
- Pavlovic, D., R. Kocic, et al. (2000). "Effect of four-week metformin treatment on plasma and erythrocyte antioxidative defense enzymes in newly diagnosed obese patients with type 2 diabetes." *Diabetes Obes Metab* 2(4): 251-6.
- Pecqueur, C., M. C. Alves-Guerra, et al. (2001). "Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation." *J Biol Chem* 276(12): 8705-12.
- Penicaud, L., P. Ferre, et al. (1987). "Effect of anesthesia on glucose production and utilization in rats." *Am J Physiol* 252(3 Pt 1): E365-9.
- Perez-Carreras, M., P. Del Hoyo, et al. (2003). "Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis." *Hepatology* 38(4): 999-1007.
- Perrin, D. (2003). *Caractérisation de la balance énergétique et de son contrôle monoaminergique central et périphérique chez un modèle de rat ne développant pas d'obésité, le rat Lou/C.* Lyon, Claude Berbard.
- Perseghin, G., K. Petersen, et al. (2003). "Cellular mechanism of insulin resistance: potential links with inflammation." *Int J Obes Relat Metab Disord* 27 Suppl 3: S6-11.

- Pessayre, D., A. Berson, et al. (2001). "Mitochondria in steatohepatitis." Semin Liver Dis 21(1): 57-69.
- Pessayre, D. and B. Fromenty (2005). "NASH: a mitochondrial disease." J Hepatol 42(6): 928-40.
- Pessayre, D., B. Fromenty, et al. (2004). "Mitochondrial injury in steatohepatitis." Eur J Gastroenterol Hepatol 16(11): 1095-105.
- Pessayre, D., A. Mansouri, et al. (2002). "Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. V. Mitochondrial dysfunction in steatohepatitis." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 282(2): G193-9.
- Petzke, K. J., C. Riese, et al. (2006). "Short-term, increasing dietary protein and fat moderately affect energy expenditure, substrate oxidation and uncoupling protein gene expression in rats." J Nutr Biochem.
- Phillips, S. A., T. P. Ciaraldi, et al. (2003). "Modulation of circulating and adipose tissue adiponectin levels by antidiabetic therapy." Diabetes 52(3): 667-74.
- Pietrobon, D., G. F. Azzone, et al. (1981). "Effect of funiculosin and antimycin A on the redox-driven H⁺-pumps in mitochondria: on the nature of 'leaks'." Eur J Biochem 117(2): 389-94.
- Pietrobon, D. and S. R. Caplan (1985). "Flow-force relationships for a six-state proton pump model: intrinsic uncoupling, kinetic equivalence of input and output forces, and domain of approximate linearity." Biochemistry 24(21): 5764-76.
- Pietrobon, D., M. Zoratti, et al. (1983). "Molecular slipping in redox and ATPase H⁺ pumps." Biochim Biophys Acta 723(2): 317-21.
- Pilkis, S. J., T. H. Claus, et al. (1995). "6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: a metabolic signaling enzyme." Annu Rev Biochem 64: 799-835.
- Pilkis, S. J., M. R. el-Maghrabi, et al. (1988). "Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis." Annu Rev Biochem 57: 755-83.
- Pilkis, S. J. and D. K. Granner (1992). "Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis." Annu Rev Physiol 54: 885-909.
- Piquet, M. A. (1999). *Métabolisme énergétique et remaniements membranaires :*
- Effets de la carence alimentaire en acides gras polyinsaturés
 - Conséquences de l'ingestion chronique d'éthanol. grenoble, joseph fourier.

- Piquet, M. A., E. Fontaine, et al. (1996). "Uncoupling effect of polyunsaturated fatty acid deficiency in isolated rat hepatocytes: effect on glycerol metabolism." Biochem J 317 (Pt 3): 667-74.
- Piquet, M. A., V. Nogueira, et al. (2000). "Chronic ethanol ingestion increases efficiency of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria." FEBS Lett 468(2-3): 239-42.
- Piquet, M. A., M. Roulet, et al. (2004). "Polyunsaturated fatty acid deficiency reverses effects of alcohol on mitochondrial energy metabolism." J Hepatol 41(5): 721-9.
- Polcic, P., L. Sabova, et al. (1997). "Fatty acids induced uncoupling of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria requires an intact ADP/ATP carrier." FEBS Lett 412(1): 207-10.
- Poonawala, A., S. P. Nair, et al. (2000). "Prevalence of obesity and diabetes in patients with cryptogenic cirrhosis: a case-control study." Hepatology 32(4 Pt 1): 689-92.
- Popova, I. V., M. E. Bodrova, et al. (2004). "Uncoupling effect of fatty acids in halo- and alkalotolerant bacterium *Bacillus pseudofirmus* FTU." Biochemistry (Mosc) 69(10): 1165-9.
- Porter, R. K., A. J. Hulbert, et al. (1996). "Allometry of mitochondrial proton leak: influence of membrane surface area and fatty acid composition." Am J Physiol 271(6 Pt 2): R1550-60.
- Portincasa, P., I. Grattagliano, et al. (2005). "Nonalcoholic steatohepatitis: recent advances from experimental models to clinical management." Clin Biochem 38(3): 203-17.
- Portoukalian, J., R. Meister, et al. (1978). "Improved two-dimensional solvent system for thin-layer chromatographic analysis of polar lipids on silica gel 60 precoated plates." J. Chromatogr. 152: 569-574.
- Powell, E. E., W. G. Cooksley, et al. (1990). "The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years." Hepatology 11(1): 74-80.

- Previs, S. F., D. J. Withers, et al. (2000). "Contrasting effects of IRS-1 versus IRS-2 gene disruption on carbohydrate and lipid metabolism in vivo." *J Biol Chem* 275(50): 38990-4.
- Printz, R. L., M. A. Magnuson, et al. (1993). "Mammalian glucokinase." *Annu Rev Nutr* 13: 463-96.
- Promrat, K., G. Lutchman, et al. (2004). "A pilot study of pioglitazone treatment for nonalcoholic steatohepatitis." *Hepatology* 39(1): 188-96.

Q

- Quinlan, P. T., A. P. Thomas, et al. (1983). "Measurement of the intramitochondrial volume in hepatocytes without cell disruption and its elevation by hormones and valinomycin." *Biochem J* 214(2): 395-404.

R

- Radziuk, J. and S. Pye (2001). "Hepatic glucose uptake, gluconeogenesis and the regulation of glycogen synthesis." *Diabetes Metab Res Rev* 17(4): 250-72.
- Rallidis, L. S., C. K. Drakoulis, et al. (2004). "Pravastatin in patients with nonalcoholic steatohepatitis: results of a pilot study." *Atherosclerosis* 174(1): 193-6.
- Randle, P. J., P. B. Garland, et al. (1965). "The glucose fatty acid cycle in obesity and maturity onset diabetes mellitus." *Ann N Y Acad Sci* 131(1): 324-33.
- Rao, M. S., K. Papreddy, et al. (2002). "Prevention/reversal of choline deficiency-induced steatohepatitis by a peroxisome proliferator-activated receptor alpha ligand in rats." *In Vivo* 16(2): 145-52.
- Ratzliff, V., L. Bonyhay, et al. (2002). "Survival, liver failure, and hepatocellular carcinoma in obesity-related cryptogenic cirrhosis." *Hepatology* 35(6): 1485-93.
- Ravussin, E. (2005). "Physiology. A NEAT way to control weight?" *Science* 307(5709): 530-1.
- Reddy, J. K. (2001). "Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. III. Peroxisomal beta-oxidation, PPAR alpha, and steatohepatitis." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281(6): G1333-9.

- Richard, D., P. Boily, et al. (1988). "Energy balance and facultative diet-induced thermogenesis in mice fed a high-fat diet." Can J Physiol Pharmacol 66(10): 1297-302.
- Ricquier, D. (2005). "Respiration uncoupling and metabolism in the control of energy expenditure." Proc Nutr Soc 64(1): 47-52.
- Rigoulet, M., A. Devin, et al. (1998). "Flux-force relationships in intact cells: a helpful tool for understanding the mechanism of oxidative phosphorylation alterations?" Biochim Biophys Acta 1365(1-2): 117-24.
- Rigoulet, M., L. Fraisse, et al. (1990). "Flux-dependent increase in the stoichiometry of charge translocation by mitochondrial ATPase/ATP synthase induced by almitrine." Biochim Biophys Acta 1018(1): 91-7.
- Rigoulet, M., X. Leverve, et al. (1998). "Quantitative analysis of some mechanisms affecting the yield of oxidative phosphorylation: dependence upon both fluxes and forces." Mol Cell Biochem 184(1-2): 35-52.
- Rigoulet, M., R. Ouhabi, et al. (1989). "Almitrine, a new kind of energy-transduction inhibitor acting on mitochondrial ATP synthase." Biochim Biophys Acta 975(3): 325-9.
- Rinella, M. E. and R. M. Green (2004). "The methionine-choline deficient dietary model of steatohepatitis does not exhibit insulin resistance." J Hepatol 40(1): 47-51.
- Riu, E., F. Bosch, et al. (1996). "Prevention of diabetic alterations in transgenic mice overexpressing Myc in the liver." Proc Natl Acad Sci U S A 93(5): 2198-202.
- Robbins, B. L., J. D. Foster, et al. (1991). "Metabolic intermediates as potential regulators of glucose-6-phosphatase." Life Sci 48(11): 1075-81.
- Roberts, E. A. (2002). "Steatohepatitis in children." Best Pract Res Clin Gastroenterol 16(5): 749-65.
- Robertson, G., I. Leclercq, et al. (2001). "Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. II. Cytochrome P-450 enzymes and oxidative stress." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 281(5): G1135-9.

- Rolfe, D. F., A. J. Hulbert, et al. (1994). "Characteristics of mitochondrial proton leak and control of oxidative phosphorylation in the major oxygen-consuming tissues of the rat." *Biochim Biophys Acta* 1188(3): 405-16.
- Rosenbaum, M., R. L. Leibel, et al. (1997). "Obesity." *N Engl J Med* 337(6): 396-407.
- Roth, G., J. Kotzka, et al. (2000). "MAP kinases Erk1/2 phosphorylate sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1a at serine 117 in vitro." *J Biol Chem* 275(43): 33302-7.
- Rothwell, N. and M. Stock (1979). "A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis." *Nature* 281: 31-5.
- Rothwell, N. and M. Stock (1983). "Diet-induced thermogenesis." *Adv Nutr Res* 5: 201-20.
- Rothwell, N. J. and M. J. Stock (1979). "A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis." *Nature* 281(5726): 31-5.
- Rothwell, N. J. and M. J. Stock (1982). "Energy expenditure of 'cafeteria'-fed rats determined from measurements of energy balance and indirect calorimetry." *J Physiol* 328: 371-7.
- Rothwell, N. J. and M. J. Stock (1985). "Thermogenesis and BAT activity in hypophysectomized rats with and without corticotropin replacement." *Am J Physiol* 249(4 Pt 1): E333-6.
- Rothwell, N. J., M. J. Stock, et al. (1982). "Energy balance and mitochondrial function in liver and brown fat of rats fed "cafeteria" diets of varying protein content." *J Nutr* 112(9): 1663-72.
- Rothwell, N. J., M. J. Stock, et al. (1985). "Energy balance and brown fat activity in rats fed cafeteria diets or high-fat, semisynthetic diets at several levels of intake." *Metabolism* 34(5): 474-80.
- Rouru, J., R. Huupponen, et al. (1992). "Subchronic treatment with metformin produces anorectic effect and reduces hyperinsulinemia in genetically obese Zucker rats." *Life Sci* 50(23): 1813-20.

- Rouru, J., R. Huupponen, et al. (1993). "Effect of subchronic metformin treatment on macronutrient selection in genetically obese Zucker rats." *Pharmacol Toxicol* 72(4-5): 300-3.
- Rouru, J., U. Pesonen, et al. (1995). "Anorectic effect of metformin in obese Zucker rats: lack of evidence for the involvement of neuropeptide Y." *Eur J Pharmacol* 273(1-2): 99-106.
- Roussel, D., F. Chainier, et al. (2000). "Increase in the adenine nucleotide translocase content of duckling subsarcolemmal mitochondria during cold acclimation." *FEBS Lett* 477(1-2): 141-4.
- Ruderman, N. B., H. Park, et al. (2003). "AMPK as a metabolic switch in rat muscle, liver and adipose tissue after exercise." *Acta Physiol Scand* 178(4): 435-42.
- Rui, L., M. Yuan, et al. (2002). "SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2." *J Biol Chem* 277(44): 42394-8.

S

- Saez, D. E., C. D. Figueroa, et al. (1996). "Localization of the fructose 1,6-bisphosphatase at the nuclear periphery." *J Cell Biochem* 63(4): 453-62.
- Saha, A. K., P. R. Avilucea, et al. (2004). "Pioglitazone treatment activates AMP-activated protein kinase in rat liver and adipose tissue in vivo." *Biochem Biophys Res Commun* 314(2): 580-5.
- Saltiel, A. R. (2000). "Series introduction: the molecular and physiological basis of insulin resistance: emerging implications for metabolic and cardiovascular diseases." *J Clin Invest* 106(2): 163-4.
- Salway, J. G. (1994). *Metabolism at a glance*. Oxford, Blackwell Science, Inc.
- Samartsev, V. N., R. A. Simonyan, et al. (2000). "Comparative study on uncoupling effects of laurate and lauryl sulfate on rat liver and skeletal muscle mitochondria." *Biochim Biophys Acta* 1459(1): 179-90.
- Samuel, V. T., Z. X. Liu, et al. (2004). "Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease." *J Biol Chem* 279(31): 32345-53.

- Samuel, V. T. S., G.I. (2005). *Insulin resistance in NAFLD: potential mechanisms and therapies. Fatty liver disease. NASH and related disorders. Malden, Farell GC, George J, de la M Hall P, McCullough AJ, editors.: 38-54.*
- Sanchez-Alcazar, J. A., E. Schneider, et al. (2003). "Reactive oxygen species mediate the down-regulation of mitochondrial transcripts and proteins by tumour necrosis factor-alpha in L929 cells." Biochem J 370(Pt 2): 609-19.
- Sanchez-Alcazar, J. A., E. Schneider, et al. (2000). "Tumor necrosis factor-alpha increases the steady-state reduction of cytochrome b of the mitochondrial respiratory chain in metabolically inhibited L929 cells." J Biol Chem 275(18): 13353-61.
- Sans-Torres, J., C. Domingo, et al. (2003). "Long-term effects of almitrine bismesylate in COPD patients with chronic hypoxaemia." Respir Med 97(6): 599-605.
- Sanyal, A. J. (2005). *The pathogenesis oh NASH: Human studies. Fatty liver disease. NASH and related disorders. G. J. Farell GC, de la M Hall P, McCullough AJ, editors. malden: 76-90.*
- Sanyal, A. J., C. Campbell-Sargent, et al. (2001). "Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities." Gastroenterology 120(5): 1183-92.
- Sanyal, A. J., P. S. Mofrad, et al. (2004). "A pilot study of vitamin E versus vitamin E and pioglitazone for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis." Clin Gastroenterol Hepatol 2(12): 1107-15.
- Savage, D. B. and S. O'Rahilly (2002). "Leptin: a novel therapeutic role in lipodystrophy." J Clin Invest 109(10): 1285-6.
- Saxena, N. K., K. Ikeda, et al. (2002). "Leptin in hepatic fibrosis: evidence for increased collagen production in stellate cells and lean littermates of ob/ob mice." Hepatology 35(4): 762-71.
- Schattenberg, J. M., Y. Wang, et al. (2005). "Hepatocyte CYP2E1 overexpression and steatohepatitis lead to impaired hepatic insulin signaling." J Biol Chem 280(11): 9887-94.

- Schmehl, I., S. Luvisetto, et al. (1995). "Nature of respiratory stimulation in hyperthyroidism: the redox behaviour of cytochrome c." *FEBS Lett* 375(3): 206-10.
- Schmid, G. M., V. Converset, et al. (2004). "Effect of high-fat diet on the expression of proteins in muscle, adipose tissues, and liver of C57BL/6 mice." *Proteomics* 4(8): 2270-82.
- Schoonjans, K., B. Staels, et al. (1996). "The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation." *Biochim Biophys Acta* 1302(2): 93-109.
- Schwerzmann, K., L. M. Cruz-Orive, et al. (1986). "Molecular architecture of the inner membrane of mitochondria from rat liver: a combined biochemical and stereological study." *J Cell Biol* 102(1): 97-103.
- Seki, S., T. Kitada, et al. (2005). "Clinicopathological significance of oxidative cellular damage in non-alcoholic fatty liver diseases." *Hepatol Res* 33(2): 132-4.
- Seki, S., T. Kitada, et al. (2002). "In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver diseases." *J Hepatol* 37(1): 56-62.
- Seppala-Lindroos, A., S. Vehkavaara, et al. (2002). "Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men." *J Clin Endocrinol Metab* 87(7): 3023-8.
- Serra, D., N. Casals, et al. (1993). "Regulation of mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase protein by starvation, fat feeding, and diabetes." *Arch Biochem Biophys* 307(1): 40-5.
- Servais, S., K. Couturier, et al. (2003). "Effect of voluntary exercise on H₂O₂ release by subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria." *Free Radic Biol Med* 35(1): 24-32.
- Shabalina, I. G., T. V. Kramarova, et al. (2006). "Carboxyatractyloside effects on brown-fat mitochondria imply that the adenine nucleotide translocator isoforms Ant1 and Ant2 may be responsible for basal and fatty acid-induced uncoupling, respectively." *Biochem J*.

- Sheldon, J. G., S. P. Williams, et al. (1996). "31P NMR magnetization transfer study of the control of ATP turnover in *Saccharomyces cerevisiae*." Proc Natl Acad Sci U S A 93(13): 6399-404.
- Shepherd, P. R. and B. B. Kahn (1999). "Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus." N Engl J Med 341(4): 248-57.
- Shimomura, I., Y. Bashmakov, et al. (1999). "Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus." J Biol Chem 274(42): 30028-32.
- Siess, E. A. and O. H. Wieland (1976). "Phosphorylation state of cytosolic and mitochondrial adenine nucleotides and of pyruvate dehydrogenase in isolated rat liver cells." Biochem J 156(1): 91-102.
- Silva, J. and R. Rabelo (1997). "Regulation of the uncoupling protein gene expression." Eur J Endocrinol 136(3): 251-64.
- Simon, E., M. del Puy Portillo, et al. (2002). "Responses to dietary macronutrient distribution of overweight rats under restricted feeding." Ann Nutr Metab 46(1): 24-31.
- Simopoulos, A. P. (1999). "Evolutionary aspects of omega-3 fatty acids in the food supply." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 60(5-6): 421-9.
- Simopoulos, A. P. (2002). "The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids." Biomed Pharmacother 56(8): 365-79.
- Simopoulos, A. P. (2006). "Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases." Biomed Pharmacother 60(9): 502-7.
- Singer, S. J. and G. L. Nicolson (1972). "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes." Science 175(23): 720-31.
- Sluse, F. E., W. Jarmuszkiewicz, et al. (2006). "Mitochondrial UCPs: new insights into regulation and impact." Biochim Biophys Acta 1757(5-6): 480-5.
- Soboll, S., H. J. Seitz, et al. (1984). "Effect of long-chain fatty acyl-CoA on mitochondrial and cytosolic ATP/ADP ratios in the intact liver cell." Biochem J 220(2): 371-6.

- Soling, H. D., B. Willms, et al. (1968). "Regulation of gluconeogenesis by fatty acid oxidation in isolated perfused livers of non-starved rats." *Eur J Biochem* 4(3): 364-72.
- Song, S., S. Andrikopoulos, et al. (2001). "Mechanism of fat-induced hepatic gluconeogenesis: effect of metformin." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281(2): E275-82.
- Speth, M. and H. U. Schulze (1981). "Hormone-induced effects on the rat liver microsomal glucose-6-phosphatase system in vitro." *Biochem Biophys Res Commun* 99(1): 134-41.
- Spiegelman, B. M. and J. S. Flier (2001). "Obesity and the regulation of energy balance." *Cell* 104(4): 531-43.
- Sreekumar, R., B. Rosado, et al. (2003). "Hepatic gene expression in histologically progressive nonalcoholic steatohepatitis." *Hepatology* 38(1): 244-51.
- Srere, P. (1969). Citrate synthase. *Methods in enzymology*. E. J. M. Lowenstein, Academic Press, New York. 13: 3-11.
- Srivastava, R. (1996). "Regulation of the apolipoprotein E by dietary lipids occurs by transcriptional and post-transcriptional mechanisms." *Mol Cell Biochem* 155: 153-62.
- Starkel, P., C. Sempoux, et al. (2003). "Oxidative stress, KLF6 and transforming growth factor-beta up-regulation differentiate non-alcoholic steatohepatitis progressing to fibrosis from uncomplicated steatosis in rats." *J Hepatol* 39(4): 538-46.
- Steinberg, G. R. and D. J. Dyck (2000). "Development of leptin resistance in rat soleus muscle in response to high-fat diets." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279(6): E1374-82.
- Stewart, H. B., M. R. el-Maghrabi, et al. (1985). "Evidence for a phosphoenzyme intermediate in the reaction pathway of rat hepatic fructose-2,6-bisphosphatase." *J Biol Chem* 260(24): 12935-41.
- St-Onge, M. P. and P. J. Jones (2002). "Physiological effects of medium-chain triglycerides: potential agents in the prevention of obesity." *J Nutr* 132(3): 329-32.

- St-Pierre, J., J. A. Buckingham, et al. (2002). "Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain." *J Biol Chem* 277(47): 44784-90.
- Strauss, R. S. (1999). "Comparison of serum concentrations of alpha-tocopherol and beta-carotene in a cross-sectional sample of obese and nonobese children (NHANES III). National Health and Nutrition Examination Survey." *J Pediatr* 134(2): 160-5.
- Striffler, J. S., S. A. Garfield, et al. (1984). "Effects of glucagon on hepatic microsomal glucose-6-phosphatase in vivo." *Diabete Metab* 10(2): 91-7.
- Struck, E., J. Ashmore, et al. (1965). "[Stimulation of gluconeogenesis by long chain fatty acids and glucagon]." *Biochem Z* 343(1): 107-10.
- Stubbs, C. D. and A. D. Smith (1984). "The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function." *Biochim Biophys Acta* 779(1): 89-137.
- Sumida, Y., T. Nakashima, et al. (2003). "Serum thioredoxin levels as a predictor of steatohepatitis in patients with nonalcoholic fatty liver disease." *J Hepatol* 38(1): 32-8.
- Suzuki, A., K. Lindor, et al. (2005). "Effect of changes on body weight and lifestyle in nonalcoholic fatty liver disease." *J Hepatol* 43(6): 1060-6.

T

- Tager, J. M., R. J. Wanders, et al. (1983). "Control of mitochondrial respiration." *FEBS Lett* 151(1): 1-9.
- Taghibiglou, C., A. Carpentier, et al. (2000). "Mechanisms of hepatic very low density lipoprotein overproduction in insulin resistance. Evidence for enhanced lipoprotein assembly, reduced intracellular ApoB degradation, and increased microsomal triglyceride transfer protein in a fructose-fed hamster model." *J Biol Chem* 275(12): 8416-25.
- Tahan, V., D. Yavuz, et al. (2004). "Oral glucose tolerance deteriorates in rats fed with methionine choline deficient diet." *J Hepatol* 41(2): 352; author reply 353.
- Tamura, S. and I. Shimomura (2005). "Contribution of adipose tissue and de novo lipogenesis to nonalcoholic fatty liver disease." *J Clin Invest* 115(5): 1139-42.

- Tan, M. G., L. L. Ooi, et al. (2004). "Cloning and identification of hepatocellular carcinoma down-regulated mitochondrial carrier protein, a novel liver-specific uncoupling protein." *J Biol Chem* 279(43): 45235-44.
- Tang, M., J. J. Potter, et al. (2002). "Leptin enhances the effect of transforming growth factor beta in increasing type I collagen formation." *Biochem Biophys Res Commun* 297(4): 906-11.
- Tappel, A. L. (1978). "Glutathione peroxidase and hydroperoxides." *Methods Enzymol* 52: 506-13.
- Te Sligte, K., I. Bourass, et al. (2004). "Non-alcoholic steatohepatitis: review of a growing medical problem." *Eur J Intern Med* 15(1): 10-21.
- Thaler, H. (1962). "[The fatty liver and its pathogenetic relation to liver cirrhosis.]" *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med* 335: 180-210.
- Tiikkainen, M., R. Bergholm, et al. (2003). "Effects of identical weight loss on body composition and features of insulin resistance in obese women with high and low liver fat content." *Diabetes* 52(3): 701-7.
- Tiikkainen, M., A. M. Hakkinen, et al. (2004). "Effects of rosiglitazone and metformin on liver fat content, hepatic insulin resistance, insulin clearance, and gene expression in adipose tissue in patients with type 2 diabetes." *Diabetes* 53(8): 2169-76.
- Tiikkainen, M., M. Tamminen, et al. (2002). "Liver-fat accumulation and insulin resistance in obese women with previous gestational diabetes." *Obes Res* 10(9): 859-67.
- Tilg, H. and A. M. Diehl (2000). "Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis." *N Engl J Med* 343(20): 1467-76.
- Tremblay, A. (1999). "Physical activity and obesity." *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 13(1): 121-9.

U

- Ueki, K., T. Kondo, et al. (2004). "Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of

insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms." *Mol Cell Biol* 24(12): 5434-46.

Ueki, K., T. Kondo, et al. (2004). "Central role of suppressors of cytokine signaling proteins in hepatic steatosis, insulin resistance, and the metabolic syndrome in the mouse." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(28): 10422-7.

Ueno, T., H. Sugawara, et al. (1997). "Therapeutic effects of restricted diet and exercise in obese patients with fatty liver." *J Hepatol* 27(1): 103-7.

Uusitupa, M., V. Lindi, et al. (2003). "Long-term improvement in insulin sensitivity by changing lifestyles of people with impaired glucose tolerance: 4-year results from the Finnish Diabetes Prevention Study." *Diabetes* 52(10): 2532-8.

Uygun, A., A. Kadayifci, et al. (2004). "Metformin in the treatment of patients with non-alcoholic steatohepatitis." *Aliment Pharmacol Ther* 19(5): 537-44.

Uygun, A., A. Kadayifci, et al. (2000). "Serum leptin levels in patients with nonalcoholic steatohepatitis." *Am J Gastroenterol* 95(12): 3584-9.

V

van Dam, K., Y. Shinohara, et al. (1990). "Slipping pumps or proton leaks in oxidative phosphorylation. The local anesthetic bupivacaine causes slip in cytochrome c oxidase of mitochondria." *FEBS Lett* 277(1-2): 131-3.

van Schaftingen, E., D. R. Davies, et al. (1982). "Fructose-2,6-bisphosphatase from rat liver." *Eur J Biochem* 124(1): 143-9.

Vance, J. E. and D. E. Vance (2004). "Phospholipid biosynthesis in mammalian cells." *Biochem Cell Biol* 82(1): 113-28.

Vazquez-Memije, M. E., M. J. Cardenas-Mendez, et al. (2005). "Respiratory chain complexes and membrane fatty acids composition in rat testis mitochondria throughout development and ageing." *Exp Gerontol* 40(6): 482-90.

Verkman, A. S. and H. E. Ives (1986). "Anomalous driving force for renal brush border H^+ /OH-transport characterized by using 6-carboxyfluorescein." *Biochemistry* 25(10): 2876-82.

- Verma, S. P., D. F. Wallach, et al. (1980). "Raman analysis of the thermotropic behavior of lecithin-fatty acid systems and of their interaction with proteolipid apoprotein." Biochemistry 19(3): 574-9.
- Virkamaki, A., K. Ueki, et al. (1999). "Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance." J Clin Invest 103(7): 931-43.
- Virtanen, K. A., K. Hallsten, et al. (2003). "Differential effects of rosiglitazone and metformin on adipose tissue distribution and glucose uptake in type 2 diabetic subjects." Diabetes 52(2): 283-90.
- Vrblcic, A. S., C. D. Albright, et al. (2001). "Altered mitochondrial function and overgeneration of reactive oxygen species precede the induction of apoptosis by 1-O-octadecyl-2-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine in p53-defective hepatocytes." Faseb J 15(10): 1739-44.
- Vrba, J. and M. Modriansky (2002). "Oxidative burst of Kupffer cells: target for liver injury treatment." Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 146(2): 15-20.

W

- Wakabayashi, T. (2002). "Megamitochondria formation - physiology and pathology." J Cell Mol Med 6(4): 497-538.
- Wakil, S. J., J. K. Stoops, et al. (1983). "Fatty acid synthesis and its regulation." Annu Rev Biochem 52: 537-79.
- Watanabe, S., R. E. Kanner, et al. (1989). "Long-term effect of almitrine bismesylate in patients with hypoxemic chronic obstructive pulmonary disease." Am Rev Respir Dis 140(5): 1269-73.
- Weisberg, S. P., D. McCann, et al. (2003). "Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue." J Clin Invest 112(12): 1796-808.
- Wellen, K. E. and G. S. Hotamisligil (2003). "Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue." J Clin Invest 112(12): 1785-8.
- Weltman, M. D., G. C. Farrell, et al. (1998). "Hepatic cytochrome P450 2E1 is increased in patients with nonalcoholic steatohepatitis." Hepatology 27(1): 128-33.

- Weltman, M. D., G. C. Farrell, et al. (1996). "Increased hepatocyte CYP2E1 expression in a rat nutritional model of hepatic steatosis with inflammation." *Gastroenterology* 111(6): 1645-53.
- West, D. and B. York (1998). "Dietary fat, genetic predisposition and obesity: lessons from animal models." *Am J Clin Nutr* 67: 505S-512S.
- Westerbacka, J., K. Lammi, et al. (2005). "Dietary fat content modifies liver fat in overweight nondiabetic subjects." *J Clin Endocrinol Metab* 90(5): 2804-9.
- White, M. F. (2002). "IRS proteins and the common path to diabetes." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283(3): E413-22.
- Widmer, J., K. S. Fassihi, et al. (1996). "Identification of a second human acetyl-CoA carboxylase gene." *Biochem J* 316 (Pt 3): 915-22.
- Wilcock, C. and C. J. Bailey (1994). "Accumulation of metformin by tissues of the normal and diabetic mouse." *Xenobiotica* 24(1): 49-57.
- Wilcock, C., N. D. Wyre, et al. (1991). "Subcellular distribution of metformin in rat liver." *J Pharm Pharmacol* 43(6): 442-4.
- Williams, J. N., Jr. (1964). "A Method for the Simultaneous Quantitative Estimation of Cytochromes a, B, C1, and C in Mitochondria." *Arch Biochem Biophys* 107: 537-43.
- Williamson, D. H., P. Lund, et al. (1967). "The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver." *Biochem J* 103(2): 514-27.
- Williamson, J. R., R. Scholz, et al. (1969). "Control mechanisms of gluconeogenesis and ketogenesis. II. Interactions between fatty acid oxidation and the citric acid cycle in perfused rat liver." *J Biol Chem* 244(17): 4617-27.
- Winder, W. W. and D. G. Hardie (1999). "AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes." *Am J Physiol* 277(1 Pt 1): E1-10.
- Wojtczak, L. (1976). "Effect of long-chain fatty acids and acyl-CoA on mitochondrial permeability, transport, and energy-coupling processes." *J Bioenerg Biomembr* 8(6): 293-311.

Wollin, S. D., Y. Wang, et al. (2004). "Effects of a medium chain triglyceride oil mixture and alpha-lipoic acid diet on body composition, antioxidant status, and plasma lipid levels in the Golden Syrian hamster." *J Nutr Biochem* 15(7): 402-10.

X

Xu, Z., L. Chen, et al. (2005). "Liver-specific inactivation of the Nrf1 gene in adult mouse leads to nonalcoholic steatohepatitis and hepatic neoplasia." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(11): 4120-5.

Y

Yahagi, N., H. Shimano, et al. (2002). "Absence of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) ameliorates fatty livers but not obesity or insulin resistance in *Lep(ob)/Lep(ob)* mice." *J Biol Chem* 277(22): 19353-7.

Yang, S., H. Zhu, et al. (2000). "Mitochondrial adaptations to obesity-related oxidant stress." *Arch Biochem Biophys* 378(2): 259-68.

Yang, W. S., C. Y. Jeng, et al. (2002). "Synthetic peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, rosiglitazone, increases plasma levels of adiponectin in type 2 diabetic patients." *Diabetes Care* 25(2): 376-80.

Yaqoob, P., E. Sherrington, et al. (1995). "Comparison of the effects of a range of dietary lipids upon serum and tissue lipid composition in the rat." *Int J Biochem Cell Biol* 27(3): 297-310.

Yesilova, Z., H. Yaman, et al. (2005). "Systemic markers of lipid peroxidation and antioxidants in patients with nonalcoholic Fatty liver disease." *Am J Gastroenterol* 100(4): 850-5.

Yoo, J. S., S. M. Ning, et al. (1991). "Regulation of hepatic microsomal cytochrome P450IIE1 level by dietary lipids and carbohydrates in rats." *J Nutr* 121(7): 959-65.

Yoon, J. C., P. Puigserver, et al. (2001). "Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1." *Nature* 413(6852): 131-8.

- Yost, R. W., A. Chander, et al. (1985). "Differential response of lung and liver of juvenile rats to choline deficiency." *J Appl Physiol* 59(3): 738-42.
- You, M., M. Matsumoto, et al. (2004). "The role of AMP-activated protein kinase in the action of ethanol in the liver." *Gastroenterology* 127(6): 1798-808.
- Younossi, Z. M., A. M. Diehl, et al. (2002). "Nonalcoholic fatty liver disease: an agenda for clinical research." *Hepatology* 35(4): 746-52.
- Younossi, Z. M., F. Gorreta, et al. (2005). "Hepatic gene expression in patients with obesity-related non-alcoholic steatohepatitis." *Liver Int* 25(4): 760-71.
- Youssef, W. I. and A. J. McCullough (2002). "Steatohepatitis in obese individuals." *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 16(5): 733-47.
- Yu, J. G., S. Javorschi, et al. (2002). "The effect of thiazolidinediones on plasma adiponectin levels in normal, obese, and type 2 diabetic subjects." *Diabetes* 51(10): 2968-74.

Z

- Zelman, S. (1952). "The liver in obesity." *AMA Arch Intern Med* 90(2): 141-56.
- Zhou, G., R. Myers, et al. (2001). "Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action." *J Clin Invest* 108(8): 1167-74.
- Zou, Y., J. Li, et al. (2006). "High-fat emulsion-induced rat model of nonalcoholic steatohepatitis." *Life Sci* 79(11): 1100-7.

Stéatohépatite et adaptations métaboliques: effets d'un régime enrichi en lipides saturés, ou carencé en choline et méthionine, sur la bioénergétique et le métabolisme hépatique de rat.

La stéatohépatite non alcoolique (NASH) est une pathologie émergente dans nos pays industrialisés du fait de l'obésité et de l'insulino-résistance. A ce jour, la pathogenèse de la NASH est mal connue et il n'existe pas de traitement prévenant son évolution cirrhogène chez certains patients. Le but de ce travail consistait à étudier les modifications bioénergétiques et métaboliques de mitochondries hépatiques et d'hépatocytes isolés de rats atteints de NASH.

Dans un premier temps, nous avons élaboré un régime alimentaire enrichi en acides gras saturés afin d'induire une NASH. Au terme de 14 semaines de régime, nous n'avons pas mis en évidence de surcharge lipidique au niveau du foie des animaux recevant ce régime enrichi. Les mesures effectuées avec des mitochondries isolées de foies et avec des hépatocytes isolés n'ont montré aucune différence au niveau de la bioénergétique ou du métabolisme hépatique entre les différents groupes de rats. En revanche, une modification de la répartition tissulaire a été observée, avec une augmentation des masses des tissus adipeux blanc et brun. Dans cette étude, l'absence de stéatose hépatique et de NASH semble due à une augmentation du stockage des lipides au niveau du tissu adipeux blanc, et à une augmentation de leur oxydation par un processus thermogène au niveau du tissu adipeux brun, permettant ainsi de « brûler » l'excès calorique.

La deuxième partie du travail concernait l'étude des modifications bioénergétiques et métaboliques induites par un régime carencé en choline et méthionine connu pour induire une NASH chez le rat. Nous avons montré que les mitochondries de foie et les hépatocytes isolés de rats traités, avaient une respiration augmentée. Cette stimulation de la respiration était due à un découplage de la chaîne respiratoire par un mécanisme de « proton leak » ET de « redox slipping » au niveau de la cytochrome c oxydase. Ce découplage avait pour conséquence de stimuler l'utilisation de substrats lipidiques et de diminuer la production de radicaux libres de l'oxygène. En parallèle, l'étude avec des hépatocytes isolés nous montre une augmentation de l'oxydation lipidique et de la néoglucogenèse.

Ces résultats suggèrent des adaptations des fonctions mitochondriales et métaboliques des foies de rats atteints de NASH qui permettraient de limiter la surcharge lipidique et le stress oxydant.

Steatohepatitis and metabolic adaptations: high saturated fat or choline and methionine deficient diet effects on bioenergetic and hepatic metabolism in rat.

Non alcoholic steatohepatitis (NASH) is a raising pathology in northern countries, due to obesity and insulin-resistance. To date, NASH pathogenesis is poorly understood because suitable animal models are missing and an appropriate treatment to prevent patient NASH evolution in cirrhosis is still lacking. The aim of this work was to study the bioenergetic and metabolic modifications in hepatocyte and liver mitochondria isolated from NASH suffering rats.

In a first part, we elaborated a diet with saturated fatty acids to induce a NASH. After 14 weeks of both diets, no steatosis could be observed in the rat livers. Studies carried out on isolated hepatocytes and liver mitochondria showed no modification in the liver bioenergetic or metabolism characteristics in comparison to control rats. By contrast, a modification in tissue repartition was observed, with a mass increase in white and brown adipose tissues. In this study, the absence of liver steatosis might be due to a huge increase in white adipose tissue storage and thermogenic lipid oxidation in the brown adipose tissue, to "burn" the caloric excess.

The second part of this work was devoted to study bioenergetic and metabolic modifications induced by a choline and methionine deficient diet, known to induce NASH in rats. Liver mitochondria and hepatocytes isolated from treated rats presented an increase in the respiration rate. This higher oxygen consumption was due to an uncoupling of the respiratory chain by a "proton leak" and a "redox slipping" at the cytochrome c oxidase level. This uncoupling yielded in higher lipid oxidation and lower reactive oxygen species production. Moreover, studies with isolated hepatocytes showed an increased lipid oxidation and neoglucogenesis.

These results suggest mitochondrial and metabolic adaptations of NASH rat liver which permit to limit a lipid overload and an oxidative stress.

DISCIPLINE : Physiologie

MOTS-CLES : stéatohépatite non alcoolique (NASH), mitochondries, hépatocytes, régimes hyperlipidiques, régime carencé en choline et méthionine, découplage.

***Laboratoire de Physiologie Intégrative, Cellulaires et Moléculaires - UMR 5123 CNRS-UCB Lyon1 - Campus de La Doua, 43, Bd du 11 novembre 1918 - 69622 Villeurbanne Cedex
tel : 04-72-44-81-38 ; fax : 04-72-44-58-42***