



HAL
open science

Métabolisme énergétique mitochondrial dans le développement de la stéatose hépatique

Mélissa Flamment

► **To cite this version:**

Mélissa Flamment. Métabolisme énergétique mitochondrial dans le développement de la stéatose hépatique. Biologie cellulaire. Université d'Angers, 2009. Français. NNT: . tel-00455835

HAL Id: tel-00455835

<https://theses.hal.science/tel-00455835>

Submitted on 11 Feb 2010

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.

UNIVERSITE D'ANGERS

Année 2009

N° d'ordre 967

**METABOLISME ENERGETIQUE MITOCHONDRIAL DANS
LE DEVELOPPEMENT DE LA STEATOSE HEPATIQUE**

THESE DE DOCTORAT
Spécialité : Biologie Cellulaire

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE ET SANTE

Présentée et soutenue publiquement

le 19 juin 2009

à Angers

par Mélissa FLAMMENT

Devant le jury ci-dessous :

M. Pascal FERRE (Rapporteur), Professeur, Université de Paris 6

Mme Christiane GUILLOUZO (Rapporteur), Directeur de Recherche, INSERM

M. Fabrice BONNET (Examineur), Professeur, Université de Rennes 1

M. Pierre-Henri DUCLUZEAU (Examineur), Maître de Conférences, Université d'Angers

M. Gilles SIMARD (Examineur), Maître de Conférences, Université d'Angers

Directeur de thèse : M. Yves MALTHIERY, Professeur, Université d'Angers

Nom et coordonnées du laboratoire :

Unité INSERM U694, Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, CHU, 4 rue Larrey,
49033 ANGERS Cedex 01

ED 502

REMERCIEMENTS

Je remercie vivement :

Madame **Christiane Guillouzo** et Monsieur **Pascal Ferré** d'avoir accepté d'être rapporteurs et de donner de leur temps pour juger ce travail. Je vous prie de croire en ma profonde reconnaissance.

Monsieur **Fabrice Bonnet** d'avoir accepté de faire partie du jury et ainsi de donner de son temps pour juger ce travail.

Monsieur **Yves Malthièry** de m'avoir accueillie dans son laboratoire ainsi que pour son encadrement durant mon doctorat.

Monsieur **Pierre-Henri Ducluzeau** d'une part pour avoir été à l'initiative de ce projet et d'autre part pour son encadrement dans la réalisation de ce projet.

Monsieur **Gilles Simard** pour sa disponibilité, ses conseils et son aide aussi bien dans la réalisation de ce projet que dans la rédaction des articles et de ce manuscrit.

Je remercie également sincèrement :

La **Région Pays de la Loire** et **l'INSERM** pour m'avoir financée pendant mon doctorat.

Messieurs **Damien Roussel** et **Jean-François Dumas** pour m'avoir initiée et formée à l'étude de la fonction mitochondriale. Veuillez trouver ici l'expression de toute ma reconnaissance.

Monsieur **Yves Gallois** pour son aide précieuse concernant la mise au point du dosage des triglycérides hépatiques.

Le laboratoire **INSERM 870 et INRA 1235** de Lyon pour avoir réalisé les dosages d'ARNm et en particulier Monsieur **Hubert Vidal** et Madame **Jennifer Rieusset** pour leur aide précieuse dans la rédaction de l'article s'y rapportant.

Messieurs *Jérôme Roux, Pierre Legras, Dominique Gilbert* et *Laurent Buffet* pour les soins apportés à tous les rats des différents protocoles réalisés pendant mon doctorat mais également pour leur gentillesse et leur bonne humeur qui, mise à part la climatisation, rendaient mes séjours à l'animalerie très agréables.

L'ensemble des membres, anciens et présents, de l'unité INSERM U694 qui ont contribué par leur soutien et leur bonne humeur à rendre ces années thèses plus qu'agréables : *Agnès, Arnaud, Aziz, Caroline, Chadi, Christine, Claire, Dany, Delphine, Dominique, Frédérique, Gérald, Gyasi, Jean-Fred, Jocelyne, Julie, Julien, Laetitia, Louis, Marc, Marie-Anne, Mathilde, Matthieu, Mélanie Crouzard, Mélanie Priou, Mireille, Nadège, Nathalie, Pascal, Patrice, Soazig, Valérie, Véro et Virginie.*

Les *techniciennes et secrétaires de l'UF1*, les *techniciennes de l'UF3*, *Anne, Aurélie, Carole, Christelle, Dominique et Kelly* ainsi que Monsieur *Bernard Foui* pour leur accueil chaleureux dans le laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire.

L'*équipe de l'UF2* ou les "métabo" pour les dosages de corps cétoniques mais surtout pour m'avoir fait partager, le temps de quelques déjeuners au self ou de manips, la chaleureuse et divertissante ambiance que vous avez su créer dans votre équipe : *Cécile, Cédric, Corinne, Lydie, Mélanie*, et plus particulièrement les deux membres de l'équipe "chaîne respiratoire", *Céline* et *Naïg*, pour votre aide immense pour les dosages de complexes (vous avez réussi à transformer la corvée des dosages de complexes en loisir!) et dans la rédaction des articles et de ce manuscrit mais surtout pour votre bonne humeur et votre gentillesse.

Ma famille et mes amis pour leur soutien tout au long de ces années de thèse, et particulièrement *Aline, Amélie* et *Charlotte* : merci de m'avoir encouragée durant ce travail et d'avoir été là pour me soutenir à tout moment et ceci malgré l'éloignement géographique.

ABBREVIATIONS

2-AG : 2-arachidonoylglycérol
4-AAP : 4-aminoantipyrine
4-HNE : 4-hydroxynonanal
ACC : acétyl-CoA carboxylase
AceCS : acétyl-CoA synthétase
ACP : acyl carrier protein
ACS : acyl-CoA synthetase
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNmt : ADN mitochondrial
ADP : adenosine 5'-diphosphate
ALAT : alanine aminotransférase
AMP : adenosine 5'-monophosphate
AMPc : adenosine 3',5'-monophosphate cyclique
AMPK : AMP-activated protein kinase
ANT : adenine nucleotide translocator
ApoB : apolipoprotéine B
ARN : acide ribonucléique
ARNi : ARN interférent
ARNm : ARN messenger
ARNr : ARN ribosomique
ARNt : ARN de transfert
ASAT : aspartate aminotransférase
ATF : activating transcription factor
ATP : adenosine 5'-triphosphate
ATP/O : rapport de la consommation d'oxygène et de la synthèse d'ATP
bHLH-LZ : basic helix-loop-helix leucine zipper
BiP/GRP78 : binding protein/glucose regulated protein 78
BSA : bovine serum albumin
CART : cocaïne-amphétamine-regulated transcript
CB1 : cannabinoid receptor type 1
CB2 : cannabinoid receptor type 2
ChREBP : carbohydrate response element binding protein
CoA : coenzyme A
CPT : carnitine palmitoyltransferase
CREB : cAMP response element-binding
CRH : corticotropin-releasing hormone
CYP2E1 : cytochrome P450 2E1
DAGs : *sn*-1-acyl-2-arachidonoylglycérols
DCPIP : dichlorophenolindophenol
DEPC : diéthylpyrocarbonate
DiOC₆(3) : 3, 3'-dihexyloxacarboyanine iodide

DMEM : Dubelco's modified eagle medium
DMSO : dimethyl sulfoxide
dNTP : désoxyribonucléotides-tri-phosphates
DO : densité optique
DTNB : acide 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoïque)
EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA : ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid
ELOVL6 : élongase à longues chaînes
ERR α : estrogen-related receptor α
ESPA : N-ethyl-N-(3-sulfopropyl)m-anisidine
FAAH : fatty acid amide hydrolase
FAD : flavine adénine dinucléotide
FADH₂ : flavine adénine dinucléotide hydrogénée
FAS : fatty acid synthase
FCCP : carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone
FOXO : forkhead transcription factor O
FSC : forward scatter
G6PDH : glucose-6-phosphate déshydrogénase
GABA : γ -amino butyric acid
GDH : glutamate déshydrogénase
GGT : gamma-glutamyl transpeptidase
GK : glucokinase
GLUT : glucose transporter
GMPc : guanosine-monophosphate cyclique
GPAT : glycérol-3-phosphate acyltransférase
H1 et H2 : sites d'initiation de la transcription du brin H de l'ADNmt
HEPES : 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid
HK : hexokinase
HMG-CoA : β -hydroxy- β -méthylglutaryl-CoA
HOMA-IR : homeostasis model assessment of insulin resistance
HPRT : hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase
HSL : hormone sensitive lipase
HSP : heavy strand promoter
IKK β : inhibitor of nuclear factor κ B kinase β
IL : interleukin
Insig : insulin induced gene
IRE1 : inositol requiring enzyme 1
IRM : imagerie par résonance magnétique
IRS : insulin receptor substrate
JNK : c-Jun NH₂-terminal kinase
LDH : lactate déshydrogénase

L-PK : liver-pyruvate kinase
LPL : lipoprotéine lipase
LSP : light strand promoter
LXR : liver X receptor
MAPK : mitogen activated protein kinase
MCH : melanin-concentrating hormone
mCICCP : carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone
MDA : malondialdéhyde
Mlx : Max-like protein X
mTERF : mitochondrial transcription termination factor
NAD⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide
NADH : nicotinamide adénine dinucléotide hydrogéné
NADP⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate hydrogéné
NAFLD : non alcoholic fatty liver disease
N-ArPE : *N*-arachidonoyl-phosphatidyléthanolamine
NASH : non alcoholic steatohepatitis
NAT : *trans-N*-acyltransférase
NCEP ATPIII : national cholesterol education program adult treatment panel III
NCoR : nuclear receptor corepressor
ND : NADH déshydrogénase
NF-κB : nuclear factor-κB
NLS : nuclear localization signal
NPY : neuropeptide Y
NRF : nuclear respiratory factor
OMS : organisation mondiale de la santé
PBS : phosphate buffered saline
PCR : polymerase chain reaction
PDH : pyruvate déshydrogénase
PDK : pyruvate déshydrogénase kinase
PEP : phosphoenolpyruvate
PEPCK : phosphoenolpyruvate carboxykinase
PERK : PKR-like ER kinase
PGC1 : PPARγ coactivator 1
Pi : phosphate inorganique
PI-3 : phosphatidylinositol-3
PK : pyruvate kinase
PKA : protéine kinase A
PKC : protein kinase C
POLRMT : mitochondrial DNA-directed RNA polymerase
PP2A : protein phosphatase 2 A

PPAR : proliferator-activated receptor
PTP1B : protein tyrosine phosphatase 1B
RCPG : récepteur couplé aux protéines G
RCR : respiratory control ratio
RCRp : RCR phosphorylant
RE : réticulum endoplasmique
ROS : reactive oxygene species
RT : reverse transcription
RXR : retinoid X receptor
S1P : site 1 protease
S2P : site 2 protease
SCAP : SREBP cleavage activating protein
SCD1 : stéaroyl-CoA désaturase 1
Sir2 : silent information regulator 2
SIRT : sirtuine
SMRT : silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptor
SOD2 : superoxide dismutase 2
SREBP : sterol regulatory element-binding protein
SSC : side scatter
SVF : serum de veau foetal
TFAM : mitochondrial transcription factor A
TFBM : mitochondrial transcription factor B
TGF- β : transforming growth factor β
TLR4 : toll-like receptor 4
TMPD : *N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine
TNB : trinitrobenzène
TNF α : tumor necrosis factor α
TPMP⁺ : triphenylmethylphosphonium
UCP : uncoupling protein
UCR : uncoupling control ratio
UDCA : ursodeoxycholic acid
VDAC : voltage-dependent anion channel
VLDL : very low-density lipoprotein
Xu5P : xylulose-5-phosphate
 Δ^9 -THC : Δ^9 -tetrahydrocannabinol

**LISTES DES FIGURES
ET DES TABLEAUX**

Liste des figures

Figure 1	verso page 5
Figure 2	verso page 6
Figure 3	verso page 10
Figure 4	verso page 12
Figure 5	verso page 17
Figure 6	verso page 18
Figure 7	verso page 19
Figure 8	verso page 20
Figure 9	verso page 21
Figure 10	verso page 22
Figure 11	verso page 23
Figure 12	verso page 24
Figure 13	verso page 25
Figure 14	verso page 26
Figure 15	verso page 27
Figure 16	verso page 29
Figure 17	verso page 40
Figure 18	verso page 46
Figure 19	verso page 55
Figure 20	verso page 56
Figure 21	verso page 68
Figure 22	verso page 77
Figure 23	verso page 102
Figure 24	verso page 105
Figure 25	verso page 166
Figure 26	verso page 210
Figure 27	verso page 215
Figure 28	verso page 215
Figure 29	verso page 216
Figure 30	verso page 216
Figure 31	verso page 217

Liste des tableaux

Tableau 1	verso page 14
Tableau 2	verso page 15
Tableau 3	verso page 16
Tableau 4	verso page 50
Tableau 5	verso page 57
Tableau 6	verso page 58
Tableau 7	verso page 64
Tableau 8	verso page 70
Tableau 9	verso page 135

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS	1
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES	4
I. Métabolisme énergétique mitochondrial	5
1. La mitochondrie	5
2. La chaîne respiratoire et la phosphorylation oxydative	6
3. Régulation de la phosphorylation oxydative	7
a) <i>Régulation de la vitesse de respiration mitochondriale</i>	7
b) <i>Régulation de l'efficacité de la phosphorylation oxydative</i>	8
4. Régulation transcriptionnelle mitochondriale	11
a) <i>ADN mitochondrial</i>	11
b) <i>Facteurs de transcription mitochondriaux codés par des gènes nucléaires</i> .	11
c) <i>Régulateurs transcriptionnels des gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales</i>	13
II. Le syndrome métabolique et les NAFLD	14
1. Le syndrome métabolique	14
a) <i>Définition</i>	14
b) <i>Prévalence</i>	15
2. Les NAFLD (non alcoholic fatty liver disease)	15
a) <i>Historique et définition</i>	15
b) <i>Diagnostic et classification</i>	16
c) <i>Prévalence</i>	17
d) <i>Pathogénèse des NAFLD : la théorie des "2 hits"</i>	17
3. NAFLD : composante hépatique du syndrome métabolique	17
III. "First hit" : développement de la stéatose hépatique	18
1. Métabolisme lipidique hépatique	18
a) <i>Sources des lipides hépatiques et transport des lipides</i>	19
b) <i>Synthèse de novo des acides gras</i>	19
c) <i>Synthèse des triglycérides</i>	21
d) <i>Oxydation des acides gras</i>	22
e) <i>Cétogenèse</i>	23

<i>f) Régulation du métabolisme lipidique hépatique en conditions physiologiques</i>	23
2. Contribution de l'augmentation de la lipogénèse au développement de la stéatose hépatique : rôle de l'insulinorésistance	29
<i>a) Voies de signalisation de l'insuline et insulinorésistance</i>	30
<i>b) Insulinorésistance du tissu adipeux : lipolyse accrue</i>	32
<i>c) Augmentation de la lipogénèse hépatique : rôle de l'hyperinsulinémie et de l'hyperglycémie</i>	33
3. Stéatose hépatique et sécrétion des VLDL	36
4. Stéatose hépatique et β -oxydation mitochondriale	37
5. Stéatose hépatique et insulinorésistance hépatique	38
IV. "Second hit" : développement de la stéatohépatite	39
1. Mitochondrie : source et cible du stress oxydatif	39
<i>a) Altérations mitochondriales et NASH</i>	40
<i>b) Peroxydation lipidique</i>	41
<i>c) Augmentation de la production de TNFα</i>	42
2. Lésions hépatiques	42
<i>a) Inflammation, formation des corps de Mallory et apoptose</i>	42
<i>b) Fibrose</i>	43
V. Traitement des NAFLD	43
1. Restriction calorique et activité physique	43
2. Agents hypolipidémiants	44
3. La metformine	44
4. Les thiazolidinediones	45
5. Les anti-oxydants	45
6. L'acide ursodéoxycholique	46
VI. Le rimonabant comme traitement des NAFLD	46
1. Le système endocannabinoïde	47
<i>a) Biosynthèse des endocannabinoïdes</i>	47
<i>b) Dégradation des endocannabinoïdes</i>	48
<i>c) Récepteurs aux cannabinoïdes et voies de signalisation</i>	48
<i>d) Pharmacologie des récepteurs aux cannabinoïdes</i>	50

2. Effets du blocage des récepteurs CB1 par du rimonabant sur l'homéostasie énergétique	50
a) <i>Effets du rimonabant sur la prise alimentaire</i>	52
b) <i>Effets du rimonabant au niveau du tissu adipeux</i>	53
c) <i>Effets du rimonabant au niveau du muscle</i>	55
d) <i>Effets du rimonabant au niveau du foie</i>	56
VII. Le resvératrol comme traitement des NAFLD	57
1. Les sirtuines	57
a) <i>SIRT1 et métabolisme</i>	58
b) <i>SIRT3 et métabolisme</i>	59
c) <i>SIRT4 et métabolisme</i>	59
d) <i>Sirtuines et régulation des acétyl-CoA synthétases</i>	60
2. Resvératrol et stéatose hépatique	61
3. Resvératrol et fonction mitochondriale	62
MATERIEL ET METHODES	63
A – TRAVAUX SUR MODELES ANIMAUX	64
I. Animaux et modèles	64
1. Rats Zucker	64
2. Rats nourris avec un régime riche en gras pendant différentes durées	64
3. Rats nourris avec un régime riche en gras et traités avec du rimonabant	65
II. Isolement des mitochondries de foie	65
1. Principe	65
2. Réactifs	66
3. Protocole	66
III. Dosage protéique	66
1. Principe	66
2. Protocole	67
IV. Mesure de la consommation d'oxygène mitochondriale	67
1. Principe	67
a) <i>Principe de l'électrode de Clark</i>	67

<i>b) Principe des mesures de consommation d'oxygène</i>	68
2. Réactifs	70
3. Protocole	71
4. Expression des résultats	72
V. Détermination du rapport ATP/O	72
1. Principe	72
2. Réactifs	73
3. Protocole	74
<i>a) Mesure de la consommation d'oxygène</i>	74
<i>b) Dosage de l'ATP</i>	74
4. Expression des résultats	74
VI. Mesure du potentiel de membrane mitochondrial	75
1. Principe	75
2. Réactifs	76
3. Protocole	77
<i>a) Détermination de la relation entre la consommation d'oxygène et le</i> <i>potentiel de membrane en condition non-phosphorylante</i>	77
<i>b) Détermination de la relation entre la consommation d'oxygène et le</i> <i>potentiel de membrane en condition phosphorylante</i>	78
4. Expression des résultats	78
VII. Dosage des activités enzymatiques mitochondriales	80
1. NADH ubiquinone oxydoréductase (complexe I)	80
<i>a) Principe</i>	80
<i>b) Réactifs</i>	81
<i>c) Protocole</i>	81
<i>d) Expression des résultats</i>	82
2. Succinate ubiquinone oxydoréductase (complexe II)	82
<i>a) Principe</i>	82
<i>b) Réactifs</i>	83
<i>c) Protocole</i>	83
<i>d) Expression des résultats</i>	84
3. Ubiquinol cytochrome <i>c</i> oxydoréductase (complexe III)	84

a) <i>Principe</i>	84
b) <i>Réactifs</i>	84
c) <i>Protocole</i>	86
d) <i>Expression des résultats</i>	86
4. Cytochrome c oxydase (complexe IV)	87
a) <i>Principe</i>	87
b) <i>Réactifs</i>	87
c) <i>Protocole</i>	88
d) <i>Expression des résultats</i>	88
5. ATP synthase	88
a) <i>Principe</i>	88
b) <i>Réactifs</i>	89
c) <i>Protocole</i>	90
d) <i>Expression des résultats</i>	90
6. Citrate synthase	91
a) <i>Principe</i>	91
b) <i>Réactifs</i>	91
c) <i>Protocole</i>	92
d) <i>Expression des résultats</i>	92
VIII. Analyse de l'expression des ARNm dans le foie	93
1. Extraction des ARN totaux	93
2. Reverse transcription	93
a) <i>Principe</i>	93
b) <i>Réactifs</i>	93
c) <i>Protocole</i>	93
3. PCR quantitative en temps réel	94
a) <i>Principe</i>	94
b) <i>Protocole</i>	94
IX. Dosage de la quantité d'ADN mitochondrial	96
X. Dosage des triglycérides hépatiques	96

1. Principe	96
2. Réactifs	97
3. Protocole	97
4. Expression des résultats	97
XI. Dosages sanguins	98
1. Glycémie	98
2. Insuline, leptine, adiponectine	98
3. Acides gras libres	98
4. β -hydroxybutyrate	99
5. Triglycérides	99
XII. Expression des résultats et analyse statistique	99
B – TRAVAUX SUR MODELE CELLULAIRE	100
I. Modèle : cellules HepG2 traitées avec du resvératrol	100
1. La lignée HepG2 et son entretien	100
2. Traitement des cellules HepG2 avec du resvératrol	100
II. Mesure de la consommation d'oxygène cellulaire sur cellules entières non perméabilisées	101
1. Principe	101
2. Réactifs	102
3. Protocole	102
<i>a) Préparation des cellules</i>	<i>102</i>
<i>b) Mesure de la consommation d'oxygène</i>	<i>103</i>
<i>c) Dosage protéique</i>	<i>103</i>
4. Expression des résultats	103
III. Mesure du potentiel de membrane mitochondrial	104
1. Principe	104
2. Réactifs	104
3. Protocole	105
4. Expression des résultats	106
IV. Dosage des activités enzymatiques mitochondriales et de la LDH	107

1. NADH ubiquinone oxydoréductase (complexe I)	107
<i>a) Principe</i>	107
<i>b) Réactifs</i>	108
<i>c) Protocole</i>	109
<i>d) Expression des résultats</i>	109
2. Succinate ubiquinone oxydoréductase (complexe II)	110
<i>a) Principe</i>	110
<i>b) Réactifs</i>	110
<i>c) Protocole</i>	111
<i>d) Expression des résultats</i>	112
3. Ubiquinol cytochrome <i>c</i> oxydoréductase (complexe III)	112
<i>a) Principe</i>	112
<i>b) Réactifs</i>	112
<i>c) Protocole</i>	113
<i>d) Expression des résultats</i>	113
4. Cytochrome <i>c</i> oxydase (complexe IV)	114
<i>a) Principe</i>	114
<i>b) Réactifs</i>	114
<i>c) Protocole</i>	115
<i>d) Expression des résultats</i>	115
5. ATP synthase	116
<i>a) Principe</i>	116
<i>b) Réactifs</i>	116
<i>c) Protocole</i>	116
<i>d) Expression des résultats</i>	117
6. Citrate synthase	117
<i>a) Principe</i>	117
<i>b) Réactifs</i>	117
<i>c) Protocole</i>	118
<i>d) Expression des résultats</i>	118

7. Lactate déshydrogénase	119
<i>a) Principe</i>	119
<i>b) Réactifs</i>	119
<i>c) Protocole</i>	119
<i>d) Expression des résultats</i>	120
V. Dosage de la quantité d'ADN mitochondrial	120
RESULTATS ET DISCUSSION	121
ARTICLE 1 : Fatty liver and insulin resistance in obese Zucker rats : no role for mitochondrial dysfunction	122
Introduction de l'article 1	123
Article 1	124
Discussion de l'article 1	131
ARTICLE 2 : Regulation of hepatic mitochondrial metabolism in response to a different time of high fat diet in rats	134
Introduction de l'article 2	135
Article 2	137
Discussion de l'article 2	166
ARTICLE 3 : Effects of the cannabinoid CB1 antagonist, rimonabant, on hepatic mitochondrial function in rats fed a high fat diet	172
Introduction de l'article 3	173
Article 3	175
Discussion de l'article 3	210
TRAVAIL PRELIMINAIRE : Evaluation de la fonction mitochondriale de cellules HepG2 traitées avec du resvératrol	214
Objectif	215
Résultats et discussion	215
Perspectives	217
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	218
BIBLIOGRAPHIE	221

AVANT-PROPOS

Après des siècles de lutte contre les famines et la sous-alimentation, nous sommes désormais confrontés au phénomène inverse dans les pays industrialisés et en voie d'industrialisation : la lutte contre le surpoids et l'obésité. Le changement de mode de vie associé à l'industrialisation, illustré par la grande disponibilité des ressources alimentaires et par la sédentarisation, est en grande partie à l'origine de l'augmentation dramatique de la prévalence de l'obésité. Outre le fait que notre société tend à devenir une société d'apparence avec les conséquences que cela peut avoir au niveau psychosocial, l'obésité et le surpoids augmentent le risque de développer un grand nombre de complications d'ordre cardiovasculaire, respiratoire, ostéoarticulaire, digestif, endocrinien, rénal et métabolique. Parmi ces pathologies, les NAFLD ou "non alcoholic fatty liver disease" représentent la composante hépatique de l'obésité. Le terme NAFLD regroupe un large spectre de lésions hépatiques n'ayant pas pour origine une consommation excessive d'alcool. La forme la moins avancée est la stéatose hépatique qui correspond à une accumulation de triglycérides dans le foie. Cette stéatose peut évoluer en stéatohépatite ou NASH (non alcoholic steatohepatitis) qui correspond à une stéatose associée à une inflammation et à des lésions hépatiques. La NASH peut elle-même progresser en cirrhose puis, dans les formes les plus sévères, en hépatocarcinome. Les mécanismes conduisant au développement et à la progression des NAFLD sont loin d'être complètement élucidés rendant ainsi la mise au point d'un traitement encore délicate. La mitochondrie, étant au centre du métabolisme énergétique cellulaire *via* notamment l'oxydation des acides gras, pourrait être impliquée dans le développement de l'accumulation de lipides hépatiques caractérisant la stéatose. L'objectif de ce travail de thèse est d'étudier le métabolisme énergétique mitochondrial au cours du développement de la stéatose hépatique dans deux modèles différents, le rat Zucker obèse et le rat Sprague-Dawley alimenté avec un régime riche en lipides pendant différentes durées. Par ailleurs, l'action au niveau de la fonction mitochondriale de deux traitements potentiels de la stéatose hépatique, le rimonabant et le resvératrol, a été évaluée respectivement dans un modèle de rat alimenté avec un régime riche en lipides et dans un modèle cellulaire hépatique, les cellules HepG2. La première partie de ce manuscrit est consacrée à une exposition des données bibliographiques relatives au sujet de cette thèse. La deuxième partie décrit le matériel et les méthodes mises en place afin de répondre aux questions posées dans ce projet. Enfin, la dernière partie de ce manuscrit consiste en la présentation et la discussion des résultats obtenus au cours de ce travail de thèse.

Les travaux effectués durant mon doctorat ont donné lieu aux publications et aux communications suivantes :

Publications :

Fatty liver and insulin resistance in obese Zucker rats: no role for mitochondrial dysfunction.

Flamment M, Arvier M, Gallois Y, Simard G, Malthièry Y, Ritz P, Ducluzeau PH.
Biochimie, 2008, 90(9): 1407-13.

Is skeletal muscle mitochondrial dysfunction causal or an indirect consequence of insulin resistance in humans?

Dumas JF, Simard G, Flamment M, Ducluzeau PH, Ritz P.
Sous presse dans Diabetes and Metabolism.

Publications en soumission :

Regulation of hepatic mitochondrial metabolism in response to a different time of high fat diet in rats.

Flamment M, Gueguen N, Wetterwald C, Rieusset J, Vidal H, Simard G, Malthièry Y, Ducluzeau PH.
Soumis à Diabetologia.

Effects of the cannabinoid CB1 antagonist, rimonabant, on hepatic mitochondrial function in rats fed a high fat diet.

Flamment M, Gueguen N, Wetterwald C, Simard G, Malthièry Y, Ducluzeau PH.
Soumis à American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism.

Communications affichées :

Rimonabant et fonction mitochondriale hépatique.

Flamment M, Gueguen N, Wetterwald C, Simard G, Malthièry Y, Ducluzeau PH.
Congrès de l'ALFEDIAM en mars 2008 et Congrès de l'AFERO en janvier 2009.

The cannabinoid CB1 antagonist, rimonabant, improves hepatic mitochondrial function in rats fed a high fat diet.

Flamment M, Gueguen N, Wetterwald C, Simard G, Malthièry Y, Ducluzeau PH.
Congrès ECO en mai 2008 et Congrès EBEC en juillet 2008.

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

I. Métabolisme énergétique mitochondrial

1. La mitochondrie

Organites cellulaires eucaryotes, les mitochondries sont à l'origine de la production d'énergie nécessaire au fonctionnement cellulaire. Elles interviennent dans la phase finale de l'oxydation des substrats énergétiques (lipides, glucides et protides). Le nombre de mitochondries, compris entre 500 et 2000 par cellule, varie en fonction du type cellulaire. La taille et la forme des mitochondries sont elles aussi étroitement liées à l'activité cellulaire. Les mitochondries ne sont pas isolées ni figées dans la cellule, elles forment un réseau mitochondrial dynamique qui est finement régulé par des phénomènes de fusion et de fission (Jakobs, 2006). Ce réseau est lui-même associé aux microtubules du cytosquelette ainsi qu'aux autres organites cellulaires. Une mitochondrie isolée de son réseau est de forme ovoïde et composée de deux compartiments délimités par deux membranes (**Figure 1**) :

- **La membrane externe** est une bicouche lipidique composée d'environ 50 % de protéines et 50 % de lipides. Cette membrane est perméable à diverses molécules notamment grâce à des protéines transmembranaires. La porine ou VDAC (voltage-dependent anion channel) constitue la principale voie de passage des molécules d'une taille inférieure à 10 kDa telles que les ions, les différents métabolites et nucléotides. Les protéines, grâce à un signal d'adressage mitochondrial, traversent la membrane externe *via* des translocases (TOM : translocase of the outer membrane).

- **L'espace intermembranaire** est un espace étroit d'environ 100 angströms qui contient une forte concentration en protons rendant ainsi ce compartiment chargé positivement.

- **La membrane interne** est composée de 80 % de protéines et 20 % de phospholipides dont la cardiolipine qui est un phospholipide double rendant cette membrane imperméable aux ions notamment aux protons. En effet, la membrane interne n'est perméable qu'à l'oxygène, l'eau, le gaz carbonique, l'oxyde nitrique et l'ammoniac. Les autres molécules doivent franchir cette membrane par l'intermédiaire de transporteurs tels que la translocase des nucléotides adényliques (ANT : adenine nucleotide translocator) qui assure l'entrée de l'ADP dans la matrice et la sortie conjointe de l'ATP dans l'espace intermembranaire, le cotransporteur de phosphate inorganique/proton, le symporteur pyruvate/proton, la navette du glycérol-3-phosphate, la navette malate/aspartate, le transporteur du citrate et la carnitine palmitoyltransférase II (CPT II). Les protéines traversent la membrane interne *via* des

translocases (TIM : translocase of the inner membrane). Une des particularités de la membrane interne est de posséder de nombreux replis formant les crêtes mitochondriales. Des études tomographiques (Dimroth *et al.*, 2000, Hunte *et al.*, 2000) ont permis de mettre en évidence que ces crêtes ont une composition qui diffère de celle de la membrane interne. En effet, elles seraient reliées à la membrane interne par des jonctions de crêtes d'environ 30 nm de diamètre (Gilkerson *et al.*, 2003). C'est au niveau de ces crêtes que sont préférentiellement enchâssés les complexes de la chaîne respiratoire ainsi que l'ATP synthase.

- **La matrice** est le compartiment interne de la mitochondrie, siège de nombreuses voies métaboliques telles que le cycle de Krebs et la β -oxydation des acides gras. La mitochondrie, de par son origine endosymbiotique, possède son propre génome (ADN mitochondrial) ainsi que les éléments nécessaires à la synthèse protéique, les mitoribosomes.

2. La chaîne respiratoire et la phosphorylation oxydative

Dans une cellule eucaryote normale, environ 90 % de l'énergie nécessaire au fonctionnement cellulaire est fournie par la mitochondrie (Rolfe et Brown, 1997). Les réactions de la phosphorylation oxydative, qui ont lieu au niveau de la membrane interne mitochondriale, permettent la transformation de l'énergie contenue dans les nutriments en énergie utilisable par la cellule : l'ATP. Le système de phosphorylation oxydative est composé de la chaîne respiratoire et de l'ATP synthase. La chaîne respiratoire est une chaîne de transport d'électrons constituée de quatre complexes protéiques (**Figure 2**) :

- NADH ubiquinone oxydoréductase ou complexe I
- Succinate ubiquinone oxydoréductase ou complexe II
- Ubiquinol cytochrome *c* oxydoréductase ou complexe III
- Cytochrome *c* oxydase ou complexe IV

Chaque complexe est composé de plusieurs sous-unités protéiques codées soit par le génome nucléaire soit par le génome mitochondrial, excepté pour le complexe II qui ne contient que des protéines codées par le génome nucléaire. A ces complexes protéiques, s'ajoutent des transporteurs mobiles d'électrons, l'ubiquinone (ou coenzyme Q) et le cytochrome *c*.

La dégradation préalable des nutriments permet la formation de coenzymes réduits (NADH + H⁺ et FADH₂) qui cèdent leurs électrons aux complexes I ou II qui, par une cascade d'oxydoréduction, amènent ces électrons jusqu'à l'accepteur final, l'oxygène. Le NADH cède ses électrons au complexe I et ils sont ensuite transportés par l'ubiquinone jusqu'au complexe III. Enfin les électrons sont pris en charge par le cytochrome *c* puis libérés au niveau du

complexe IV où ils sont utilisés pour la réduction de l'oxygène en eau. Le FADH_2 cède, quant à lui, ses électrons au complexe II. Ils sont ensuite transportés par l'ubiquinone jusqu'au complexe III et suivent alors le même chemin que les électrons fournis par le NADH. Ainsi, la chaîne respiratoire permet le transfert progressif des électrons à partir des coenzymes réduits vers l'oxygène *via* une succession de systèmes redox intervenant dans un ordre établi selon leur potentiel d'oxydoréduction allant du plus réducteur vers le plus oxydant. L'énergie libérée au cours de ce transfert d'électrons sur la chaîne d'oxydoréduction permet l'expulsion de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire, au niveau des complexes I, III et IV, formant ainsi un gradient de protons de part et d'autre de la membrane interne. Ce couplage chimiosmotique aboutit à la formation d'un gradient électrochimique ou force protomotrice, qui contient l'énergie d'oxydation. Ce gradient est constitué d'un gradient de pH (la matrice devient plus basique) et d'un gradient de charges (la face matricielle de la membrane interne est chargée négativement). La théorie chimiosmotique formulée par Mitchell en 1961 postule que ce gradient électrochimique, *via* le retour des protons dans la matrice en passant par l'ATP synthase, permet à celle-ci de catalyser la réaction réversible de phosphorylation de l'ADP en ATP. La consommation d'oxygène (respiration) et la phosphorylation sont ainsi couplées *via* cette force protomotrice.

3. Régulation de la phosphorylation oxydative

La phosphorylation oxydative est régulée au niveau de sa vitesse de synthèse d'ATP et donc de respiration et au niveau de son efficacité.

a) Régulation de la vitesse de respiration mitochondriale

Deux facteurs principaux peuvent être impliqués dans le contrôle de la respiration mitochondriale : les substrats de l'oxydation et les substrats et produits de la phosphorylation (ADP et ATP).

• Les substrats de l'oxydation

Une part importante du contrôle de la respiration est exercée au niveau de l'apport en coenzymes réduits (NADH et FADH_2). Une augmentation de l'apport en substrats respiratoires stimule la respiration mitochondriale. Néanmoins cette stimulation de la respiration par l'augmentation de la concentration en substrats est tissu-dépendante. En effet,

une modification du rapport NADH/NAD^+ mitochondrial *via* un changement de la concentration en substrats respiratoires entraîne une augmentation de la vitesse de respiration et de la synthèse d'ATP sur mitochondries isolées de foie (Koretsky et Balaban, 1987), et de cœur (Moreno-Sanchez *et al.*, 1990) et sur cellules de foie (Brown *et al.*, 1990) et de cerveau (Kauppinen et Nicholls, 1986), mais ces résultats n'ont pas été retrouvés dans le muscle cardiaque *in vivo* (Jöbsis et Stainsby, 1968), ni dans le muscle squelettique *in vivo* (Wendt et Chapman, 1976) ou *in situ* sur fibres perméabilisées (Kunz *et al.*, 1993, Khuchua *et al.*, 1994). Par ailleurs, l'apport en substrats peut être régulé au niveau de leur entrée *via* les transporteurs spécifiques et par l'activité des déshydrogénases (Groen *et al.*, 1982, Tager *et al.*, 1983).

• **ADP et ATP**

Les premiers travaux sur mitochondries isolées menés par Lardy et Wellman (1952) et par Chance et Williams (1955) ont montré que la vitesse de respiration mitochondriale est fortement augmentée en présence d'un système de régénération de l'ADP (hexokinase + glucose). Ces observations aboutirent à la notion de "contrôle respiratoire" (Chance et Williams, 1956), défini comme étant le contrôle de la vitesse de transport des électrons le long de la chaîne respiratoire par la concentration cytosolique en ADP. La théorie chimiosmotique permet d'expliquer ce phénomène puisque l'ajout d'ADP stimule le fonctionnement de l'ATP synthase et induit ainsi une augmentation de la consommation du gradient de protons. La diminution de ce gradient stimule alors le fonctionnement des pompes à protons mitochondriales et donc la respiration (Nicholls et Ferguson, 1992).

b) Régulation de l'efficacité de la phosphorylation oxydative

L'efficacité de la phosphorylation oxydative est définie par la quantité d'ATP produite par molécule d'oxygène consommée (rapport ATP/O). Ce paramètre varie soit par modification de la force protomotrice (découplage extrinsèque) soit par modification de l'efficacité de pompage des protons (découplage intrinsèque).

• **Découplage extrinsèque**

Le découplage extrinsèque implique tous les composés ou mécanismes qui augmentent la perméabilité aux protons ou aux cations de la membrane interne mitochondriale et par conséquent qui induisent une diminution du gradient de protons. Dans ce cas une partie des

protons retourne dans la matrice sans passer par l'ATP synthase et ne participe donc pas à la synthèse d'ATP. Ainsi, la consommation d'oxygène est augmentée pour maintenir une même force protomotrice et cela afin de compenser la fuite de protons. Il existe deux types de fuite de protons :

- **La fuite de protons basale** qui est uniquement liée aux propriétés physicochimiques de la membrane interne. L'intensité de cette fuite est variable et les mécanismes à l'origine de cette perméabilité partielle de la membrane interne mitochondriale ne sont pas entièrement élucidés. Ainsi, Brand *et al.* (1992) ont émis l'hypothèse que l'augmentation de la fuite de protons induite par les hormones thyroïdiennes pouvait s'expliquer par une augmentation de la surface de la membrane interne mitochondriale. La composition en acides gras de la membrane semble également jouer un rôle dans la fuite de protons. En effet, Bobyleva *et al.* (1997) ont démontré que l'intensité de la fuite de protons est proportionnelle à la quantité de cardiolipines. De plus, Pehowich (1999) a montré que la composition des phospholipides, notamment leur teneur en acides gras de la famille n-6 et n-3, influence la perméabilité membranaire (plus le rapport n-6/n-3 est élevé, plus la fuite de protons est importante). Cette fuite de protons basale est physiologiquement essentielle puisqu'elle serait responsable de 33 % de la respiration basale dans les hépatocytes (Brand *et al.*, 1994) et représenterait 20 à 25 % du métabolisme de base chez le rat (Rolfe et Brand, 1996).

- **La fuite de protons inductible** par des protéines découplantes. Une famille particulière de protéines a été identifiée : les UCP (uncoupling protein). La première isoforme, UCP1 a été découverte dans le tissu adipeux brun et est impliquée dans la thermogénèse (Lin et Klingenberg, 1980). Les isoformes UCP2 à UCP5 ont ensuite été identifiées dans différents tissus sur la base de leur homologie de séquence avec la protéine UCP1 (UCP2 : Fleury *et al.*, 1997, UCP3 : Boss *et al.*, 1997, UCP4 : Mao *et al.*, 1999, UCP5 : Yu *et al.*, 2000) . L'activité découplante d'UCP1 est expliquée par sa capacité à transporter des protons. Le mécanisme d'action de cette protéine n'est pas encore clairement élucidé puisque certains auteurs pensent qu'il s'agit réellement d'un transporteur de protons activé par les acides gras alors que d'autres suggèrent qu'elle permet le retour des acides gras vers l'espace intermembranaire sous forme anionique alors qu'ils ont traversé la membrane sous forme protonée pour atteindre la matrice mitochondriale (mécanisme de flip-flop). Une activité de transport de protons a également été identifiée pour les protéines UCP2 et UCP3 (Jaburek *et al.*, 1999) et leur expression dans des cellules de mammifères permet un découplage. Cependant, dans ces expériences, les protéines sont nettement surexprimées par rapport à leur niveau

physiologique et la présence de ce mécanisme *in vivo* n'est pas complètement établie. D'autres protéines ont un rôle dans ce découplage extrinsèque. En effet, Brand *et al.* (2005) ont montré que des souris chez lesquelles le gène codant pour l'isoforme 1 de l'ANT a été inactivé présentent une conductance membranaire mitochondriale diminuée de 50 % dans le muscle. Ils ont également mis en évidence que la surexpression de l'ANT dans les mitochondries de drosophile augmente la perméabilité membranaire aux protons. De même, Shabalina *et al.* (2006) ont montré que l'ANT participe pour une large proportion à la fuite basale dans les mitochondries du tissu adipeux brun et ont proposé un modèle selon lequel l'ANT1 serait responsable de cette fuite basale et que l'ANT2 serait plutôt impliquée dans la partie de la fuite induite par les acides gras qui est dépendante de l'ANT. Le transporteur glutamate/aspartate pourrait également intervenir dans la fuite inductible par les acides gras en transportant ces derniers (Wojtczak et Wieckowski, 1999).

• **Découplage intrinsèque**

Le découplage intrinsèque implique tous les composés ou mécanismes entraînant une diminution de l'efficacité des pompes à protons. A la différence du découplage extrinsèque, le découplage intrinsèque n'est pas associé à une diminution de la force protomotrice. Le découplage intrinsèque comprend la diminution de la stœchiométrie H^+/e^- et l'augmentation de la stœchiométrie H^+/ATP .

• **Stœchiométrie H^+/e^-** : Le "slip-redox" ou "patinage" des pompes à protons au sein de la chaîne respiratoire résulte en un pompage réduit de protons pour un même nombre d'électrons transférés le long de la chaîne respiratoire conduisant ainsi à une augmentation de la respiration pour le maintien d'un même gradient de protons. Ce phénomène est en théorie possible au niveau des trois sites de pompage des protons (complexes I, III et IV). Cependant, seul un changement de la stœchiométrie H^+/e^- au niveau de la cytochrome *c* oxydase semble avoir une signification physiologique (Murphy, 1989, Papa *et al.*, 1994). Par ailleurs, l'efficacité de la chaîne respiratoire à former le gradient de protons dépend du site d'entrée des équivalents réduits. Le NADH fournit des électrons au complexe I qui permet le pompage concomitant de protons alors que le FADH₂ fournit des électrons au complexe II par lequel il n'y a pas de pompage de protons. De ce fait, le nombre de protons expulsés lorsque la chaîne respiratoire oxyde du FADH₂ est plus faible qu'au cours de l'oxydation du NADH, pour une même quantité d'oxygène consommée. Par exemple, la dégradation du glucose conduit à la formation de 10 NADH et de 2 FADH₂, soit un rapport

NADH/FADH₂ de 5, alors que la dégradation d'un acide gras à 6 carbones aboutit à la formation de 11 NADH et de 5 FADH₂, soit un rapport NADH/FADH₂ de 2,2.

• **Stœchiométrie H⁺/ATP** : Ce découplage se fait au niveau de l'ATP synthase et n'affecte pas la vitesse de respiration mitochondriale mais diminue la quantité d'ATP synthétisée pour un flux de protons donné. Bien qu'une telle augmentation de la stœchiométrie H⁺/ATP ait été mise en évidence *in vitro* (Rigoulet *et al.*, 1990, Rigoulet *et al.*, 1998), son importance *in vivo* demeure discutée.

4. Régulation transcriptionnelle mitochondriale

La mitochondrie possède son propre génome, mais celui-ci ne code que pour une partie des protéines de la chaîne respiratoire. Les autres protéines mitochondriales sont codées par le génome nucléaire. Cette double origine des protéines mitochondriales nécessite une régulation fine et coordonnée de leur expression (Scarpulla, 2006). Par conséquent, il existe des facteurs régulateurs clés codés par le génome nucléaire qui vont permettre d'une part la transcription du génome mitochondrial et d'autre part l'expression des gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales.

a) ADN mitochondrial

L'ADN mitochondrial (ADNmt) humain est une molécule bicaténaire circulaire d'environ 16 kilobases dépourvue d'introns et d'histones (**Figure 3**). Chaque mitochondrie possède un nombre variable de copies d'ADNmt (2 à 10) et une mutation de cet ADN peut être présente sur toutes les copies (homoplasmie) ou seulement sur une partie des copies (hétéroplasmie). L'ADNmt code pour 13 protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale, 22 ARN de transfert et 2 ARN ribosomiques. Les deux brins de l'ADNmt sont différenciés par leur densité dans un gradient de chlorure de césium : le brin lourd (heavy strand : H) et le brin léger (light strand : L). L'unique grande région non-codante de l'ADNmt (D-loop) contient les sites d'initiation de la transcription et l'origine de réplication du brin lourd (Shadel et Clayton, 1997).

b) Facteurs de transcription mitochondriaux codés par des gènes nucléaires

Chaque brin contient un promoteur pour l'initiation de la transcription, le HSP (heavy strand promoter) et le LSP (light strand promoter). Le promoteur HSP comprend deux sites

d'initiation de la transcription, H1 et H2 (Montoya *et al.*, 1982). La transcription de l'ADNmt aboutit à la formation d'ARN précurseurs polycistroniques englobant l'ensemble de l'information génétique de chaque brin et qui subissent une maturation afin de produire les molécules individuelles d'ARNm, d'ARNt et d'ARNr (Ojala *et al.*, 1981, Montoya *et al.*, 1981, Clayton, 1991). La mitochondrie possède son propre système de transcription, dont les éléments sont codés par le génome nucléaire :

- **POLRMT (mitochondrial DNA-directed RNA polymerase)** : L'existence d'une ARN polymérase mitochondriale dont la séquence est similaire à celle de l'ARN polymérase de la levure et à celle des polymérases de bactériophages, a été mise en évidence chez la levure (Masters *et al.*, 1987, Greenleaf *et al.*, 1986, Kelly et Lehman, 1986, Kelly *et al.*, 1986) puis dans les cellules humaines (Tiranti *et al.*, 1997). La POLRMT ne peut interagir avec la région promotrice et initier la transcription sans la présence de TFAM et d'au moins un autre facteur de transcription (TFB1M ou TFB2M) (Bogenhagen, 1996).

- **TFAM (mitochondrial transcription factor A)** : Le facteur de transcription TFAM contient deux domaines HMG (high mobility group) qui lui permettent de se fixer à l'ADN au niveau du site d'initiation de la transcription mitochondriale. A son rôle essentiel dans la transcription mitochondriale, s'ajoute un rôle dans le maintien et la stabilisation de l'ADNmt (Larsson *et al.*, 1998) ainsi que dans la régulation de la réplication de l'ADNmt (Ekstrand *et al.*, 2004).

- **TFB1M et TFB2M (mitochondrial transcription factor B1 et B2)** : Les facteurs de transcription TFB1M et TFB2M ont des séquences similaires à celles des protéines de la famille des ARNr méthyltransférases (Falkenberg *et al.*, 2002, McCulloch *et al.*, 2002). Lors de l'initiation de la transcription, TFB1M ou TFB2M forme un complexe hétérodimérique avec la POLRMT.

- **mTERF (mitochondrial transcription termination factor)** : Parmi les trois régions transcriptionnelles de l'ADNmt (débutant par H1, H2 et LSP), seulement un site de terminaison de la transcription a été complètement décrit à la fin de la région transcrite à partir de H1 juste après le gène codant pour l'ARNr 16S (Christianson et Clayton, 1988). La terminaison de la transcription à ce site est dépendante du facteur mTERF (Kruse *et al.*, 1989).

c) Régulateurs transcriptionnels des gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales

L'expression des gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales et les mécanismes de réplication et de transcription de l'ADNmt sont finement coordonnés grâce à des facteurs de transcription et des coactivateurs transcriptionnels, tels que :

- **NRF1 (nuclear respiratory factor 1)** : Le facteur de transcription NRF1 a été identifié par Evans et Scarpulla en 1989 comme le principal activateur transcriptionnel du gène codant pour le cytochrome *c* de rat. Depuis des éléments de liaison à NRF1 ont été mis en évidence notamment dans le promoteur de plusieurs gènes codant pour des sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire ainsi que dans le promoteur de gènes codant pour des protéines impliquées dans la réplication et dans la transcription de l'ADNmt telles que TFAM, POLRMT, TFB1M et TFB2M (Scarpulla, 2006).

- **NRF2 (nuclear respiratory factor 2)** : Le facteur de transcription NRF2 a été identifié comme activateur transcriptionnel du gène codant pour la sous-unité IV de la cytochrome *c* oxydase (Scarpulla, 2002). D'autres gènes codant pour des protéines mitochondriales sont également activés transcriptionnellement par NRF2 (Scarpulla, 2002, Kelly et Scarpulla, 2004) incluant TFAM, TFB1M, TFB2M et trois des quatre sous-unités de la succinate déshydrogénase.

- **ERR α (estrogen-related receptor α)** : Ce facteur appartient à la famille des récepteurs nucléaires orphelins et présente une forte similarité avec le récepteur aux œstrogènes sans pour autant pouvoir être lié par ce ligand ou d'autres. Le niveau d'expression d'ERR α est élevé dans les tissus à métabolisme oxydatif tels que les reins, le cœur et le tissu adipeux brun. ERR α a notamment un rôle régulateur de la β -oxydation en induisant l'expression du gène codant pour une enzyme de cette voie, la MCAD (medium chain acyl-coenzyme A dehydrogenase) (Huss et Kelly, 2004).

- **PGC1 α (proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) coactivator 1 α)** : Cette protéine appartient à la famille des coactivateurs transcriptionnels jouant un rôle essentiel dans l'intégration et l'orchestration du programme de biogenèse mitochondriale. PGC1 α , dont l'expression et l'activation sont régulées par des voies de signalisation initiées par des stimuli environnementaux, représente un senseur énergétique capable d'induire les adaptations mitochondriales appropriées (*Figure 4*). PGC1 α interagit notamment avec NRF1, NRF2 et ERR α afin d'induire l'expression de gènes codant pour des protéines de la chaîne respiratoire ainsi que pour les facteurs indispensables à la réplication et à la transcription mitochondriale

(Wu *et al.*, 1999, Huss *et al.*, 2002, Huss et Kelly, 2004, Kamei *et al.*, 2003, Mootha *et al.*, 2004, Schreiber *et al.*, 2004). Par ailleurs, en interagissant avec PPAR α et ERR α , PGC1 α régule l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans l'oxydation mitochondriale des acides gras (Vega *et al.*, 2000, Huss et Kelly, 2004).

- **PGC1 β (proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) coactivator 1 β)** : Ce coactivateur transcriptionnel présente une forte homologie de structure avec celle de PGC1 α (Lin J *et al.*, 2002). PGC1 β coactive en partie les mêmes facteurs de transcription que PGC1 α pour induire l'expression de gènes cibles communs tels que les gènes impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique mitochondrial (Lin J *et al.*, 2002, Kressler *et al.*, 2002, Meirhaeghe *et al.*, 2003). Cependant, PGC1 β régule d'autres facteurs de transcription qui ne sont pas des cibles de PGC1 α . En effet, PGC1 β régule la lipogenèse hépatique et la sécrétion des VLDL (very low-density lipoprotein) *via* la co-activation de la transcription de SREBP (sterol regulatory element-binding protein), LXR (liver X receptor) et FOXA2 (forkhead transcription factor A2) (Lin *et al.*, 2005, Wolfrum et Stoffel, 2006).

- **PRC (PGC1-related coactivator)** : Ce coactivateur transcriptionnel est le troisième membre de la famille PGC1. La prolifération cellulaire induit l'expression de PRC qui, en réponse, régule le métabolisme énergétique mitochondrial en interagissant notamment avec NRF1 (Scarpulla, 2008).

II. Le syndrome métabolique et les NAFLD

1. Le syndrome métabolique

a) Définition

L'obésité et les pathologies associées, telles que le diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires, sont des problèmes croissants de santé publique. L'existence d'un lien étroit entre la graisse viscérale intra-abdominale et l'insulinorésistance est maintenant bien admise et l'association de ces paramètres a été identifiée comme risque majeur pour le développement de maladies cardiovasculaires et du diabète de type 2. Ce syndrome, initialement nommé "syndrome X" par Reaven (1988) et "syndrome d'insulinorésistance" par d'autres, est désormais mieux connu sous le nom de syndrome métabolique. Deux classifications des critères de diagnostic pour le syndrome métabolique existent, celle selon le "National

Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III" (NCEP ATPIII) et celle selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (*Tableau 1*). Les caractéristiques cliniques communes à ces classifications sont l'obésité androïde, l'insulinorésistance, la dyslipidémie et l'hypertension.

b) Prévalence

La suralimentation et la sédentarité sont les deux principaux facteurs à l'origine du syndrome métabolique et l'augmentation de leur incidence explique la prévalence croissante du syndrome métabolique. En utilisant les critères du NCEP ATPIII, la prévalence du syndrome métabolique chez des adultes américains âgés de plus de 20 ans a été estimée à 23,7 % (Ford *et al.*, 2002). Dans cette étude, la prévalence n'était pas différente en fonction du sexe même si certaines caractéristiques (hypertriglycémie et hypertension) étaient plus souvent observées chez les hommes que chez les femmes. La prévalence augmente avec l'âge, atteignant 43,5 % pour la tranche d'âge 60-69 ans et 42 % pour les personnes de plus de 70 ans (Ford *et al.*, 2002). En France, l'étude DESIR (données épidémiologiques sur le syndrome d'insulinorésistance) a mis en évidence une prévalence du syndrome métabolique (selon les critères de l'OMS) de 15 % chez les hommes et de 4 % chez les femmes âgés de moins de 40 ans, de 24 % chez les hommes et de 9 % chez les femmes âgés de 40 à 55 ans et de 34 % chez les hommes et de 17 % chez les femmes âgés de plus de 55 ans (Balkau *et al.*, 2002).

2. Les NAFLD (non alcoholic fatty liver disease)

a) Historique et définition

Dans les années 50, Zelman (1952) et Westwater et Fainer (1958) ont décrit la présence de stéatose hépatique et de fibrose associées à des infiltrations inflammatoires dans le foie de patients obèses. Au cours des années 60, Thaler, après avoir observé à plusieurs occasions la présence de lésions hépatiques apparemment "alcooliques" chez des patients ne consommant pas excessivement de l'alcool, suggéra de remplacer le terme "hépatite alcoolique" par "stéatohépatite" (Thaler, 1962a, Thaler, 1962b, Thaler, 1969). Des cas similaires ont également été décrits dans les années 70 chez des patients obèses (Kern *et al.*, 1973, Galambos et Wills, 1978, Adler et Schaffner, 1979), chez des patients diabétiques (Creutzfeldt *et al.*, 1970, Itoh *et al.*, 1979, Falchuk *et al.*, 1980) et chez des patients ayant subi une chirurgie entérique (by-pass) pour obésité morbide (DeWind et Payne, 1976,

Campbell *et al.*, 1977). A l'époque, ces observations basées sur la bonne foi du patient quant à l'évaluation de sa consommation d'alcool, furent reçues avec scepticisme par de nombreux auteurs convaincus que ces patients étaient en fait de gros consommateurs d'alcool. Néanmoins, le terme de "stéatohépatite non alcoolique" (ou NASH: non alcoholic steatohepatitis) fut utilisé pour la première fois en 1980 afin de désigner les lésions hépatiques similaires à celles induites par la consommation excessive d'alcool chez des patients ne buvant pas (Ludwig *et al.*, 1980). Depuis le terme plus général de NAFLD est couramment utilisé et représente un large spectre de lésions hépatiques n'ayant pas pour origine une consommation excessive d'alcool, incluant la NASH. La forme la moins avancée est la stéatose simple qui correspond à une accumulation de triglycérides dans le foie. Cette stéatose peut évoluer en stéatohépatite (NASH) qui correspond à une stéatose associée à une inflammation et à des lésions hépatiques. La NASH peut elle-même progresser en cirrhose puis dans les formes les plus sévères, en hépatocarcinome. Les NAFLD peuvent être divisées en deux types, les NAFLD primaires associées au syndrome métabolique et les NAFLD secondaires associées à d'autres conditions telles que des maladies génétiques, la prise de médicaments, une nutrition parentérale et des chirurgies de l'obésité (gastroplastie et by-pass).

b) Diagnostic et classification

Afin de déterminer la présence d'une NAFLD le diagnostic repose sur le principe d'exclusion des autres types de maladies hépatiques (**Tableau 2**). Le motif de consultation le plus fréquent est une anomalie du bilan hépatique chez un patient se déclarant asymptomatique ou présentant seulement des symptômes cliniques non-spécifiques (asthénie, hépatomégalie...). Les niveaux d'aspartate aminotransférase (ASAT) et de gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) sont augmentés dans la plupart des cas mais peuvent être normaux chez certains patients présentant une NASH ou une cirrhose (Ong *et al.*, 2005). Les techniques d'imagerie (échographie, tomodensitométrie, IRM) sont utiles pour détecter une stéatose mais ne sont pas assez sensibles et spécifiques afin de permettre de différencier la stéatose simple de la NASH ou de diagnostiquer la fibrose. La biopsie hépatique reste le seul moyen diagnostique de référence en permettant d'affirmer la présence de lésions, de préciser l'activité inflammatoire et le degré de fibrose et d'exclure d'autres pathologies hépatiques (Skelly *et al.*, 2001, Brunt, 2004, Ahmed *et al.*, 2006). Les NAFLD sont ainsi classées selon le degré d'activité nécrotico-inflammatoire ou grade et selon le degré de fibrose ou stade (Brunt *et al.*, 1999, Kleiner *et al.*, 2005) (**Tableau 3**).

c) Prévalence

La prévalence exacte des NAFLD dans la population générale est inconnue. Néanmoins, les NAFLD représentent la cause la plus fréquente des maladies hépatiques chroniques (Browning *et al.*, 2004). La prévalence des NAFLD est comprise entre 17 et 33 % de la population générale des Etats-Unis (Browning *et al.*, 2004, Ruhl et Everhart, 2004, Farrell et Larter, 2006). Une stéatose simple est présente dans 15 à 25 % de la population générale et chez 60 à 95 % des patients obèses (Wanless et Lentz, 1990, Angulo, 2002, Browning *et al.*, 2004). La NASH est identifiée dans 2 à 3 % de la population générale et chez 20 à 25 % des patients obèses (Wanless et Lentz, 1990, Silverman *et al.*, 1990, Dixon *et al.*, 2001).

d) Pathogénèse des NAFLD : la théorie des "2 hits"

La pathogénèse des NAFLD primaires n'est pas complètement déterminée. Cependant, la théorie des "2 hits" ou "two hits hypothesis" proposée par Day et James en 1998 afin de décrire le développement de la NAFLD, est actuellement bien admise. La première phase ou "first hit" correspond à l'accumulation de triglycérides dans le foie due à un déséquilibre entre les voies conduisant à la formation et à la dégradation des triglycérides. Le développement de la stéatose fragilise les hépatocytes qui sont alors plus vulnérables face aux agressions. La deuxième phase ou "second hit" correspond au développement de lésions cellulaires et de l'apparition d'une fibrose hépatique due à un stress oxydant.

3. NAFLD : composante hépatique du syndrome métabolique

La relation entre NAFLD et le syndrome métabolique est désormais bien admise. Approximativement 90 % des patients avec une NAFLD présentent au moins une des caractéristiques du syndrome métabolique et environ 33 % présentent le diagnostic complet (Marchesini *et al.*, 2003). La présence d'un syndrome métabolique augmente le risque de développer une NAFLD que ce soit chez l'homme ou chez la femme (Hamaguchi *et al.*, 2005). De nombreuses études ont démontré que les caractéristiques du syndrome métabolique (obésité, insulino-résistance, diabète de type 2, dyslipidémie et hypertension) sont fortement associées à la présence d'une NAFLD (Falck-Ytter *et al.*, 2001, Hsiao *et al.*, 2004, Bedogni *et al.*, 2005, Bugianesi *et al.*, 2005b, Oh *et al.*, 2006). De même, les NAFLD sont fortement associées à la composante majeure du syndrome métabolique, l'insulino-résistance (Ryysy *et al.*, 2000, Marchesini *et al.*, 2001a, Seppälä-Lindroos *et al.*, 2002). Ces différents éléments

laissent à penser que les NAFLD représenteraient la composante hépatique du syndrome métabolique (Marchesini *et al.*, 2001a, Yki-Järvinen, 2005). Cependant, la place de l'insulinorésistance comme cause ou conséquence des NAFLD reste à démontrer précisément (Marchesini *et al.*, 2005, Utzschneider et Kahn, 2006). Néanmoins, dans le chapitre suivant nous verrons que l'insulinorésistance du tissu adipeux apparaît comme initiateur du développement de la stéatose hépatique et en retour l'accumulation excessive de lipides dans le foie est probablement à l'origine de l'insulinorésistance hépatique.

III. "First hit" : développement de la stéatose hépatique

Le développement d'une stéatose hépatique est la conséquence d'un déséquilibre de l'homéostasie lipidique hépatique. L'accumulation excessive de triglycérides dans le foie peut ainsi être due à plusieurs dérégulations isolées ou concomitantes :

- Augmentation de l'apport en acides gras libres hépatiques provenant soit de l'alimentation, de la lipolyse du tissu adipeux ou de la synthèse hépatique *de novo*
- Augmentation de la synthèse des triglycérides hépatiques
- Diminution de la synthèse et de la sécrétion des VLDL
- Diminution de l'oxydation des acides gras hépatiques

Afin de comprendre les dérégulations mises en jeu lors du développement d'une stéatose hépatique, il est indispensable de connaître les régulations du métabolisme lipidique hépatique en conditions physiologiques.

1. Métabolisme lipidique hépatique

Le foie joue un rôle central dans l'homéostasie lipidique, en synthétisant :

- des **acides gras** à partir des nutriments, principalement des glucides, et de l'alcool
- des **triglycérides** et des **phospholipides** à partir d'acides gras exogènes et endogènes
- du **cholestérol**, entrant dans la composition de certaines molécules et essentiel à la structure des membranes cellulaires, à partir d'acétyl-CoA
- des **acides et sels biliaires**, indispensables à la digestion des lipides, à partir du cholestérol
- des **lipoprotéines**, qui assurent le transport intertissulaire des triglycérides, des phospholipides et du cholestérol

- des molécules énergétiques utilisables par les organes gluco-dépendants, les **corps cétoniques**, *via* la β -oxydation et la cétogenèse.

a) Sources des lipides hépatiques et transport des lipides

Les lipides d'origine intra-hépatique proviennent d'une synthèse *de novo* des acides gras. Les lipides extra-hépatiques proviennent de l'alimentation ou de la lipolyse adipocytaire en période de jeûne.

- **Les lipides alimentaires** : Dans la lumière intestinale, les lipides sont émulsionnés par le brassage intestinal, hydrolysés par des lipases pancréatiques et solubilisés au sein de micelles mixtes comportant en périphérie des sels biliaires et des lipides polaires. Les acides gras ainsi libérés vont pouvoir traverser la bordure en brosse des entérocytes. Dans l'entérocyte, les acides gras sont estérifiés sous forme de triglycérides et incorporés dans des lipoprotéines, les chylomicrons, qui sont ensuite transportés dans le système lymphatique puis dans le sang vers les organes périphériques. Au niveau de l'épithélium vasculaire des tissus, les chylomicrons sont hydrolysés par la lipoprotéine lipase (LPL), à l'exception du foie et du cerveau. Les acides gras ainsi libérés entrent dans les cellules où ils sont soit stockés (tissu adipeux), soit oxydés (muscles). Les résidus de chylomicrons, les remnants, sont dirigés vers le foie. Intervient alors, la lipase hépatique qui permet la libération des acides gras restants dans les remnants. Les acides gras et les remnants appauvris en acides gras sont captés par le foie. Les remnants sont hydrolysés par une lipase-acide lysosomale pour libérer des acides gras, des acides aminés et du cholestérol. Les acides gras pénétrant dans le foie sont estérifiés en triglycérides qui vont être exportés *via* les VLDL vers les autres tissus.

- **La lipolyse adipocytaire** : En période de forte demande énergétique (jeûne, exercice), la lipolyse adipocytaire permet de rendre disponibles les réserves énergétiques en hydrolysant les triglycérides stockés pour former des acides gras libres. La lipolyse adipocytaire est catalysée entre autres par l'HSL (hormone sensitive lipase) et l'ATGL (adipocyte triglyceride lipase). Les acides gras libérés vont rejoindre les tissus non-glucodépendants. Dans le foie ils permettent la synthèse des corps cétoniques utilisables par les tissus glucodépendants.

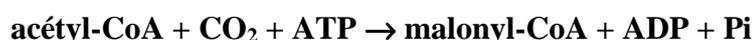
b) Synthèse de novo des acides gras

La synthèse *de novo* des acides gras ou lipogénèse a lieu dans le cytosol et est initiée à partir de l'acétyl-CoA. L'acétyl-CoA utilisé pour la synthèse des acides gras provient de l'oxydation

du pyruvate issu de la dégradation du glucose par la glycolyse, de la dégradation des acides aminés et de l'oxydation de l'alcool. La voie de synthèse des acides gras peut être divisée en quatre étapes :

- **La synthèse et le transport du citrate** : La synthèse du citrate a lieu dans la mitochondrie *via* la citrate synthase, première enzyme du cycle de Krebs, qui catalyse la condensation de l'acétyl-CoA avec l'oxaloacétate. L'oxaloacétate nécessaire à la formation du citrate provient de la carboxylation du pyruvate catalysée par la pyruvate carboxylase. Le citrate est ensuite transporté dans le cytosol par un transporteur qui lui est spécifique. Dans le cytosol, le citrate est alors clivé par l'ATP-citrate lyase en acétyl-CoA et en oxaloacétate. L'oxaloacétate formé est réduit par la malate déshydrogénase à NAD^+ en malate qui est ensuite décarboxylé par la malate déshydrogénase à NADP^+ (enzyme malique) pour reformer du pyruvate. Le $\text{NADPH} + \text{H}^+$ formé lors de cette dernière réaction, en addition de ceux formés par la voie des pentoses phosphates, va être utilisé par les réductases intervenant dans la synthèse des acides gras. L'ensemble de ce cycle s'appelle "navette citrate-malate-pyruvate" (*Figure 5*).

- **La synthèse du malonyl-CoA (3 carbones)** : Le malonyl-CoA est synthétisé par l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) avec comme coenzyme la biotine, selon la réaction :



Le malonyl-CoA ainsi formé est la molécule élémentaire à la synthèse des acides gras et est également un régulateur essentiel de la synthèse et de la dégradation des acides gras.

- **La synthèse du palmitate (16 carbones)** : Les réactions nécessaires à cette synthèse sont effectuées par un complexe enzymatique, l'acide gras synthase ou fatty acid synthase (FAS). Ce complexe contient également une protéine responsable du transport des acyles, l'ACP (acyl carrier protein). Comme le coenzyme A, cette protéine possède un groupement phosphopantéthéine-SH qui se lie au radical acyle par une liaison thioester riche en énergie (*Figure 6*). La première étape de la synthèse du palmitate consiste en la combinaison de l'acétyl-CoA avec le groupement thiol de la cystéine de la cétoacyl synthase et cette réaction est catalysée par l'acétyl transacylase. De manière concomitante, le malonyl-CoA est combiné au groupement thiol de l'ACP par la malonyl transacylase. Une fois ces éléments fixés au complexe enzymatique de la FAS, quatre réactions enzymatiques consécutives ont lieu : la condensation de l'acétyl-CoA avec le malonyl-CoA, une première réduction par un $\text{NADPH} +$

H⁺, une déshydratation et une deuxième réduction par un NADPH + H⁺ produisant le buténoyl comprenant 4 carbones (**Figure 7**). La synthèse du palmitate est le produit de la répétition de ces 4 réactions. Cette hélice, appelée hélice de Wakil, conduit ainsi successivement à la formation d'acides gras à 4, 6, 8, 10, 12, 14 et 16 carbones. L'élongation s'arrête au palmityl qui est libéré par une thioestérase sous forme de palmitate.

- **La synthèse des autres acides gras** : L'élongation des acides gras à chaîne plus longue et l'insaturation des acides gras se poursuit au niveau des microsomes.

c) *Synthèse des triglycérides*

Les triglycérides sont formés d'un glycérol et de trois acides gras. La synthèse des triglycérides a lieu au niveau du réticulum endoplasmique. Préalablement à la synthèse des triglycérides proprement dite, deux étapes concomitantes sont indispensables :

- **Activation des acides gras** : Les acides gras (exogènes ou endogènes) sont activés en acyl-CoA par les ACS (acyl-CoA synthetase) qui sont localisées dans la membrane du réticulum endoplasmique (**Figure 8**). Plusieurs ACS ont été décrites, chacune étant spécifique d'acides gras de longueurs de chaîne différentes. Des ACS sont également présentes dans la membrane externe mitochondriale et sont responsables de l'activation préalable des acides gras destinés à la β -oxydation.

- **Formation du glycérol-3-phosphate** : Le glycérol exogène est transformé en glycérol-3-phosphate par la glycérol kinase. Le glycérol-3-phosphate endogène provient de la glycolyse et est synthétisé à partir du dihydroxyacétonephosphate *via* la glycérol-3-phosphate déshydrogénase en présence de NADH + H⁺.

La synthèse proprement dite des triglycérides comporte trois étapes (**Figure 9**) :

- **Formation de l'acide phosphatidique** : Deux acyl-CoA régissent avec le glycérol-3-phosphate pour former l'acide phosphatidique. Cette réaction est catalysée par la GPAT (glycerol-3-phosphate acyltransferase).

- **Formation du diacylglycérol ou diglycéride** : L'acide phosphatidique est amputé de son groupement phosphate pour former du diacylglycérol. Cette réaction est catalysée par la phosphatidate phosphatase.

- **Formation du triacylglycérol ou triglycéride** : Le diacylglycérol réagit avec un acyl-CoA pour former du triacylglycérol. Cette réaction est catalysée par la DAGT (diacylglycerol acyltransferase).

Une fois synthétisés, les triglycérides peuvent être soit stockés sous forme de vésicule lipidique, exporter au sein des VLDL ou intégrer la voie de synthèse des phospholipides.

d) Oxydation des acides gras

L'oxydation des acides gras se fait principalement par la voie de la β -oxydation mitochondriale et est constituée de trois grandes étapes :

- **Activation des acides gras** : Cette étape a lieu dans le cytosol et consiste à la transformation des acides gras en acyl-CoA par les ACS qui sont localisées dans la membrane externe mitochondriale (*Figure 8*).

- **Transport des acyl-CoA dans la mitochondrie** : Les acides gras à courte chaîne entrent directement dans la mitochondrie alors que les acides gras à longue chaîne entrent dans la mitochondrie *via* le système carnitine palmitoyltransferase (*Figure 10*). Ce système de transport des acides gras dans la mitochondrie est composé de la carnitine palmitoyltransferase I (CPT I) située dans la membrane externe mitochondriale, de la carnitine-acylcarnitine translocase (CAT) et de la carnitine palmitoyltransferase II (CPT II) situées dans la membrane interne mitochondriale.

- **β -oxydation** : Une fois dans la mitochondrie les acyl-CoA entrent dans la voie de la β -oxydation. Comme son nom le souligne, l'oxydation mitochondriale des acides gras se fait au niveau de leur carbone β . La β -oxydation est un cycle de quatre réactions (une oxydation FAD dépendante, une hydratation, une oxydation NAD^+ dépendante et une thiolyse) qui raccourcit l'acyl-CoA de deux carbones et libère un acétyl-CoA (*Figure 11*). Ce cycle se répète un nombre de fois correspondant au nombre de paires de carbones de l'acide gras, décrivant ainsi une hélice nommée hélice de Lynen. Dans le cas d'un acide gras à nombre impair de carbones, le résidu final possédant trois carbones, le propionyl-CoA, est transformé en succinyl-CoA qui est un intermédiaire du cycle de Krebs. Dans le cas d'un acide gras insaturé, deux enzymes supplémentaires sont nécessaires, une isomérase et une réductase.

La voie de la β -oxydation a également lieu au niveau des peroxysomes pour les acides gras à très longue chaîne. La β -oxydation peroxysomale diffère de la β -oxydation mitochondriale au niveau de la première réaction. En effet dans les peroxysomes, les électrons du FADH_2 produit sont transférés directement sur l'oxygène conduisant à la formation de peroxyde d'hydrogène qui sera ensuite transformé en eau par la catalase. Cette voie permet de raccourcir les acyl-CoA à très longue chaîne de manière à obtenir des acyl-CoA à longue

chaîne qui peuvent entrer dans la mitochondrie *via* le système CPT afin de subir une β -oxydation complète.

e) Cétogenèse

La formation des corps cétoniques (acétoacétate et β -hydroxybutyrate) ou cétogenèse a lieu exclusivement dans les mitochondries hépatiques. La cétogenèse a lieu dans des conditions métaboliques associées à une vitesse élevée d'oxydation des acides gras. Les corps cétoniques sont libérés dans le sang et transportés vers les autres tissus. L'acétoacétate et le β -hydroxybutyrate constituent des composés énergétiques utilisés par les tissus extra-hépatiques en cas de besoin. La synthèse des corps cétoniques se fait à partir de l'acétyl-CoA issu de la β -oxydation selon les quatre réactions enzymatiques suivantes (*Figure 12*):

- **Formation de l'acétoacétyl-CoA** à partir de deux molécules d'acétyl-CoA, catalysée par la cétothiolase (sens inverse de la dernière réaction de la β -oxydation)

- **Formation du β -hydroxy- β -méthylglutaryl-CoA (HMG-CoA)** à partir de l'acétoacétyl-CoA, catalysée par l'HMG-CoA lyase

- **Formation de l'acétoacétate** par clivage de l'HMG-CoA, catalysée par l'HMG-CoA lyase

- **Formation du β -hydroxybutyrate** à partir de l'acétoacétate, catalysée par la β -hydroxybutyrate déshydrogénase. Cette réaction nécessite du NADH + H⁺ et est réversible. L'équilibre entre l'acétoacétate et β -hydroxybutyrate est contrôlé par le rapport NAD⁺/NADH c'est-à-dire par l'état d'oxydoréduction. Le rapport sanguin acétoacétate/ β -hydroxybutyrate représente ainsi un bon marqueur de ce rapport NAD⁺/NADH.

L'acétone, formée par décarboxylation spontanée de l'excès d'acétoacétate, est très volatile et est ainsi éliminée par la respiration.

f) Régulation du métabolisme lipidique hépatique en conditions physiologiques

Le foie est un organe clé dans la régulation de l'homéostasie énergétique par son rôle central dans le métabolisme des glucides, des protéines et des lipides. Il permet en période alimentaire le stockage de l'excès d'énergie et en période de jeûne la redistribution de cette énergie aux autres tissus (*Figure 13*). Le fonctionnement harmonieux de la synthèse et de la dégradation des acides gras hépatiques suppose l'existence de régulateurs nutritionnels (acides gras et glucose), hormonaux (insuline, glucagon, leptine et adiponectine entre autres),

transcriptionnels, enzymatiques et allostériques capables d'activer la synthèse et d'inhiber la dégradation en période alimentaire et l'inverse en période de jeûne.

- **Régulateur allostérique, le malonyl-CoA :**

Le malonyl-CoA, intermédiaire de la synthèse des acides gras, est également un inhibiteur de la CPT I hépatique. Le malonyl-CoA formé lors de la lipogenèse permet ainsi l'inhibition concomitante de l'entrée des acides gras dans la mitochondrie et donc leur oxydation.

- **Régulateurs enzymatiques, les kinases :**

Les kinases en phosphorylant leur substrat permettent d'induire ou d'inhiber l'activité de celui-ci. Parmi les kinases, l'AMP-activated protein kinase (AMPK) et la pyruvate déshydrogénase kinase 4 (PDK4) sont des points de régulation essentiels du métabolisme lipidique.

- **AMPK :** Cette protéine kinase, activée par une augmentation du rapport AMP/ATP, représente ainsi un senseur du métabolisme énergétique. En inactivant par phosphorylation l'ACC, l'AMPK permet la diminution de la concentration en malonyl-CoA et ainsi une orientation du métabolisme vers l'oxydation plutôt que vers la synthèse des acides gras. Par ailleurs, l'AMPK est à l'origine d'autres régulations du métabolisme énergétique qui sont résumées dans la *Figure 14*.

- **PDK4 :** Le complexe enzymatique de la pyruvate déshydrogénase (PDH) est responsable de la transformation du pyruvate en acétyl-CoA, reliant ainsi la glycolyse au cycle de Krebs. L'activité de ce complexe est régulée par des kinases, les pyruvate déshydrogénase kinases dont il existe quatre isoformes (PDK 1 à 4). La phosphorylation du complexe de la pyruvate déshydrogénase par les PDK le rend inactif. Dans ces conditions, la principale source d'acétyl-CoA devient la β -oxydation. L'activation des PDK et par la même l'inactivation du complexe PDH entraîne une orientation du métabolisme vers l'utilisation des acides gras préférentiellement à celle du glucose. L'expression et l'activité des différentes isoformes de la PDK sont tissus-spécifiques (Bowker-Kinley *et al.*, 1998). Les isoformes PDK 2 et 4 sont fortement exprimées dans le foie, le cœur et les muscles squelettiques (Holness *et al.*, 2003). L'activité des PDK est inhibée par l'ADP et le pyruvate et est activée par le NADH et l'acétyl-CoA (Patel et Korotchkina, 2006). L'expression de PDK2 et surtout de PDK4 est augmentée en cas de jeûne et chez des rats rendus diabétiques par un traitement à la streptozotocine (Harris *et al.*, 2001, Sugden et Holness, 2003) et diminuée par l'administration d'insuline (Wu *et al.*, 1998, Wu *et al.*, 2000). L'expression de PDK4 est

régulée par PGC1 α , ERR α et PPAR α (Ma *et al.*, 2005, Zhang *et al.*, 2006, Huang *et al.*, 2002).

- **Régulateurs transcriptionnels :**

Au niveau transcriptionnel, la régulation du métabolisme lipidique est assurée par des facteurs de transcription clés dont l'activation est dépendante de l'état nutritionnel et/ou hormonal.

- **PPAR :** Les récepteurs nucléaires PPAR (peroxisome proliferator activated receptor) sont des facteurs de transcription qui, une fois activés par leurs ligands naturels, incluant les acides gras, forment un hétérodimère avec RXR (retinoid X receptor) pour réguler la transcription de leurs gènes cibles. Trois types de PPAR existent, PPAR α , PPAR β/δ et PPAR γ , codés par trois gènes différents. Les deux plus étudiés sont PPAR α et PPAR γ . PPAR α est exprimé dans les tissus métaboliquement actifs tels que le tissu adipeux brun, le foie, les muscles et les reins (Braissant *et al.*, 1996, Su *et al.*, 1998). PPAR α régule l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique, incluant le métabolisme des lipoprotéines et du cholestérol (Fruchart *et al.*, 2001), mais surtout celle de gènes impliqués dans l'oxydation des acides gras. Dans le foie, l'activation de PPAR α entraîne une augmentation de l'expression de FATP (fatty acid transport protein) impliquée dans l'entrée des acides gras et de l'ACS responsable de l'activation des acides gras à longue chaîne (Schoonjans *et al.*, 1995, Motojima *et al.*, 1998). PPAR α induit l'expression d'enzymes clés de l'oxydation peroxysomale des acides gras telles que l'énoyl-CoA hydratase et l'acyl-CoA oxydase (Dreyer *et al.*, 1992). Au niveau de la β -oxydation mitochondriale, PPAR α induit l'expression de la CPT I (Brady *et al.*, 1989), de l'acyl-CoA déshydrogénase spécifique des acides gras à chaîne moyenne (Gulick *et al.*, 1994), l'HMG-CoA synthase impliquée dans la cétogenèse (Rodriguez *et al.*, 1994). Au niveau de la machinerie transcriptionnelle, PPAR α interagit avec PGC1 α et ERR α (Vega *et al.*, 2000, Huss et Kelly, 2004).

PPAR γ existe sous deux isoformes γ 1 et γ 2. L'isoforme γ 1 est exprimée dans de nombreux tissus (foie, muscle squelettique, colon, rétine, rate, cellules hématopoïétiques) alors que l'isoforme γ 2 est exclusivement exprimée dans le tissu adipeux. PPAR γ régule l'expression des gènes clés impliqués dans la différenciation et la fonction du tissu adipeux (Rosen *et al.*, 1999). Par ailleurs, PPAR γ semble jouer un rôle dans la régulation de la lipogenèse hépatique (Matusue *et al.*, 2003, Yu *et al.*, 2003, Gavrilova *et al.*, 2003). Il existe des ligands synthétiques des PPAR utilisés en pharmacologie comme hypolipidémiants (les fibrates,

ligands de PPAR α) et comme antidiabétiques (les thiazolidinediones (glitazones), ligands de PPAR γ).

- **SREBP-1c** : SREBP-1c est un facteur de transcription appartenant à la famille SREBP (sterol regulatory element binding protein) initialement découverte par son implication dans la régulation des gènes codant pour des enzymes impliquées dans le métabolisme du cholestérol (Wang *et al.*, 1993, Briggs *et al.*, 1993, Yokoyama *et al.*, 1993, Hua *et al.*, 1993). Il existe trois isoformes des facteurs SREBP : SREBP-1a, SREBP-1c (également nommé ADD1 pour adipocyte determination and differentiation factor 1) et SREBP-2. L'isoforme SREBP-2 est codée par le gène *SREBP-2* tandis que les isoformes SREBP-1a et SREBP-1c sont codées par un même gène, *SREBP-1*, via deux promoteurs différents. Les trois isoformes SREBP sont synthétisées sous forme de précurseurs liés à la membrane du réticulum endoplasmique (RE) et présentent une structure commune composée d'un fragment N-terminal d'environ 480 acides aminés contenant le domaine de liaison à l'ADN de type bHLH-LZ (basic helix-loop-helix leucine zipper), d'une région centrale de 80 acides aminés constituée de deux domaines transmembranaires séparés par 31 acides aminés situés dans la lumière du RE et un domaine régulateur C-terminal d'environ 590 acides aminés. Hormis le fait que la capacité d'activation de SREBP-1a est nettement supérieure à celle de SREBP-1c (Shimano *et al.*, 1997), ces deux isoformes se distinguent par leur expression tissulaire. En effet, SREBP-1c est fortement exprimé dans le foie, le tissu adipeux, les glandes surrénales, le cerveau et les muscles (Shimomura *et al.*, 1997, Ducluzeau *et al.*, 2001, Guillet-Deniau *et al.*, 2002), alors que SREBP-1a est principalement exprimé dans les lignées cellulaires et les tissus présentant une forte capacité de prolifération cellulaire tels que la rate et l'intestin (Shimomura *et al.*, 1997). Les signaux qui conduisent à l'expression et l'activation des différentes isoformes sont également distincts. Les isoformes SREBP-1a et SREBP-2 sont induites dans des situations où la concentration en cholestérol cellulaire est diminuée et vont ainsi réguler l'expression de gènes codant pour des enzymes impliquées dans le métabolisme du cholestérol (Brown et Goldstein, 1997, Brown et Goldstein, 1999). Les mécanismes à l'origine de l'activation des isoformes SREBP-1a et SREBP-2 sont bien décrits (Brown et Goldstein, 1997, Brown et Goldstein, 1999, Yang *et al.*, 2002) : Dans des conditions où la concentration en cholestérol cellulaire est normale, les précurseurs de SREBP-1a et SREBP-2 sont maintenus au niveau de la membrane du RE par un facteur senseur de la concentration en cholestérol (SCAP : SREBP cleavage activating protein) et une protéine d'ancrage (Insig : insulin induced gene) (Nohturfft *et al.*, 1998). Lorsque les concentrations en cholestérol diminuent dans les membranes cellulaires, les concentrations en

précurseurs de SREBP-1a et SREBP-2 sont augmentées *via* l'activation de leur transcription. Parallèlement, SCAP se dissocie d'Insig et escorte les précurseurs SREBP dans l'appareil de Golgi où ils sont clivés par deux protéases distinctes (S1P : site 1 protease et S2P : site 2 protease) (Sakai *et al.*, 1998). La forme mature issue de ce clivage peut ainsi être transloquée dans le noyau et activer la transcription de ses gènes cibles. Contrairement à SREBP-1a et SREBP-2, l'expression de SREBP-1c et sa présence dans le noyau ne sont pas augmentées dans des situations où la disponibilité en cholestérol est diminuée (Sheng *et al.*, 1995). Chez les rongeurs, l'expression de SREBP-1c est régulée par le statut nutritionnel dans le foie (Horton *et al.*, 1998), dans le tissu adipeux blanc (Kim *et al.*, 1998a) et dans le muscle squelettique (Bizeau *et al.*, 2003, Commerford *et al.*, 2004). En effet, dans des adipocytes et hépatocytes isolés, la transcription de SREBP-1c est induite par l'insuline (Kim *et al.*, 1998a, Foretz *et al.*, 1999a). En parallèle de l'induction de la transcription de SREBP-1c, le précurseur situé dans la membrane du RE et la forme mature nucléaire sont augmentés (Azzout-Marniche *et al.*, 2000). D'autres études ont également mis en évidence l'induction de l'expression de SREBP-1c par l'insuline dans le tissu adipeux et les muscles chez l'homme (Ducluzeau *et al.*, 2001, Sewter *et al.*, 2002). En outre, l'expression de l'ARNm de SREBP-1c est diminuée dans le foie de rats rendus diabétiques par un traitement à la streptozotocine et normalisée par un traitement par l'insuline, confirmant ainsi le rôle de l'insuline dans la régulation transcriptionnelle de SREBP-1c (Shimomura *et al.*, 1999b). Les effets de l'insuline sur l'expression de SREBP-1c sont médiés par la voie dépendante de la phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3 kinase) (Azzout-Marniche *et al.*, 2000, Fleischmann et Iynedjian, 2000). A l'inverse de l'insuline, le glucagon inhibe la transcription de SREBP-1c *via* l'AMPc (Foretz *et al.*, 1999a). Concernant, la libération de la forme mature de SREBP-1c, des études *in vivo* ont mis en évidence qu'une déplétion en stérol ne régule pas le clivage du précurseur de SREBP-1c (Sheng *et al.*, 1995). En effet, le clivage du précurseur de SREBP-1c est sous le contrôle de l'insuline (Hegarty *et al.*, 2005), mais les mécanismes impliqués ne sont pas encore élucidés. Cependant, SCAP et les protéines Insig sont impliqués dans la régulation du clivage de SREBP-1c (Matsuda *et al.*, 2001, Engelking *et al.*, 2004, Engelking *et al.*, 2005, Engelking *et al.*, 2006). Par ailleurs, l'isoforme Insig-2a est fortement exprimée dans le foie et est régulée négativement par l'insuline de manière sélective (Yabe *et al.*, 2003), suggérant ainsi que cette protéine puisse être responsable de la régulation du clivage de SREBP-1c dépendant de l'insuline et indépendant du cholestérol. Une fois sa forme mature transloquée dans le noyau, SREBP-1c induit l'expression de la glucokinase (GK) hépatique (Foretz *et al.*, 1999b, Kim SY *et al.*, 2004) et l'expression d'enzymes de la lipogénèse telles que l'ACC, la FAS, l'élongase à

longues chaînes (ELOVL6), la stéaroyl-CoA désaturase 1 (SCD1) et la GPAT (Shimano *et al.*, 1999, Moon *et al.*, 2001, Foufelle et Ferré, 2002, Horton *et al.*, 2003, Dentin *et al.*, 2005b, Gonzalez-Baro *et al.*, 2007) (**Figure 15**).

- **ChREBP** : Le facteur de transcription ChREBP (carbohydrate response element binding protein) agit en partie en synergie avec SREBP-1c. ChREBP est exprimé de manière ubiquitaire mais son ARNm est très abondant dans les tissus lipogéniques tels que le foie et le tissu adipeux (Yamashita *et al.*, 2001, Iizuka *et al.*, 2004). Le facteur de transcription ChREBP est une protéine de 94,6 kDa composée de plusieurs domaines fonctionnels dont un signal de localisation nucléaire (NLS : nuclear localization signal), un domaine de liaison à l'ADN de type bHLH-LZ, ainsi que des domaines riches en proline intervenant dans les interactions protéine/protéine. L'activité du facteur ChREBP est régulée positivement par le glucose et négativement par l'AMPc (Kawaguchi *et al.*, 2001). Le mécanisme à l'origine de l'activation de ChREBP par le glucose n'est pas totalement élucidé. Cependant, une étude a mis en évidence *via* l'utilisation d'une protéine de fusion ChREBP-GFP (green fluorescent protein) que ChREBP est rapidement relocalisé du cytoplasme vers le noyau en réponse à de fortes concentrations de glucose (Kawaguchi *et al.*, 2001). Ce résultat a été confirmé *in vivo* sur la protéine ChREBP endogène dans le foie de souris alimentées avec un régime riche en carbohydrates, en utilisant une technique de séparation des protéines cytoplasmiques et nucléaires (Dentin *et al.*, 2005a). Ainsi, le modèle actuellement proposé concernant l'activation de ChREBP repose sur une translocation nucléaire et une activation médiées par des déphosphorylations en réponse à une augmentation de la concentration de glucose (Postic *et al.*, 2007). Lorsque les concentrations en glucose sont faibles, ChREBP est localisé dans le cytoplasme et phosphorylé sur la sérine 196 adjacente au domaine NLS et sur la thréonine 666 localisée dans le domaine de fixation à l'ADN. Ces deux résidus sont des sites potentiels de phosphorylation par la PKA (protéine kinase A) (Kabashima *et al.*, 2003). Lorsque les concentrations en glucose augmentent, le flux de glucose entraîne la formation de xylulose-5-phosphate (Xu5P), un intermédiaire de la voie des pentoses phosphates. Le Xu5P en activant la PP2A (protein phosphatase 2 A), entraîne la déphosphorylation de ChREBP sur la sérine 196 provoquant ainsi sa translocation dans le noyau. La PP2A déphosphoryle ensuite ChREBP sur la thréonine 666 permettant ainsi sa fixation sur le promoteur de ses gènes cibles (Kabashima *et al.*, 2003). ChREBP régule la transcription de ses gènes cibles en formant un hétérodimère avec Mlx (Max-like protein X) (Stoekman *et al.*, 2004). Ainsi, ChREBP active la transcription du gène codant pour la pyruvate kinase hépatique (L-PK : liver-pyruvate kinase) ainsi que, comme SREBP-1c, la transcription de gènes codant pour des enzymes de la

lipogénèse, telles que l'ACC, la FAS, la SCD1 et l'ELOVL6 (Kawaguchi et al., 2001, Dentin et al., 2004, Iizuka et al., 2004, Ishii et al., 2004, Ma et al., 2006, Wang et al., 2006). L'importance du facteur ChREBP dans la régulation de la lipogénèse a été démontrée en utilisant un modèle de souris dont le gène *ChREBP* a été invalidé (Iizuka et al., 2004). En effet, dans le foie de ces souris l'expression de gènes lipogéniques (ACC et FAS) est diminuée, conduisant à une diminution du contenu en triglycérides hépatiques (**Figure 15**).

- **LXR** : Les récepteurs nucléaires LXR (liver X receptors α et β) sont activés *in vivo* par les oxystérols et autres dérivés du métabolisme du cholestérol (Lehmann et al., 1997). Le récepteur nucléaire LXR forme un hétérodimère avec RXR afin d'activer la transcription de ses gènes cibles incluant des gènes codant pour des enzymes du métabolisme du cholestérol et des acides gras. LXR régule l'expression de gènes lipogéniques tels que *FAS*, *ACC* et *SCD1* (Schultz et al., 2000, Liang et al., 2002, Chu et al., 2006), mais participe également à la transcription de SREBP-1c et ChREBP (Chen et al., 2004, Cha et Repa, 2007) comme illustré dans la **Figure 15**.

- **Régulateurs hormonaux** :

Les différents facteurs cités précédemment sont sous le contrôle de différents régulateurs hormonaux permettant le bon fonctionnement du métabolisme. Parmi ces régulateurs hormonaux l'insuline dont la sécrétion varie en fonction de l'état nutritionnel et les adipokines telles que la leptine et l'adiponectine sont des éléments majeurs dans la régulation du métabolisme énergétique. En effet, longtemps considéré comme un lieu de stockage passif des triglycérides, le tissu adipeux est également à l'origine de la production de facteurs régulateurs du métabolisme énergétique appelés adipokines. Parmi les adipokines les plus étudiées, la leptine et l'adiponectine, jouent un rôle essentiel dans la régulation du métabolisme lipidique notamment en activant l'AMPK (Minokoshi et al., 2002, Yamauchi et al., 2002).

2. Contribution de l'augmentation de la lipogénèse au développement de la stéatose hépatique : rôle de l'insulinorésistance

L'insulinorésistance du tissu adipeux a été suggérée comme étant à l'origine du développement de la stéatose hépatique. En effet, la lipolyse accrue au niveau du tissu adipeux en état d'insulinorésistance entraîne une augmentation de l'apport d'acides gras au

niveau hépatique. En parallèle, l'hyperinsulinémie et l'hyperglycémie induites par l'insulinorésistance pourraient favoriser la lipogenèse hépatique.

a) Voies de signalisation de l'insuline et insulinorésistance

L'insuline est une hormone sécrétée par les cellules β pancréatiques en période post prandiale, jouant un rôle anabolique essentiel dans la mise en réserve et l'utilisation des substrats énergétiques, glucidiques et lipidiques, en augmentant l'entrée du glucose dans les cellules, la synthèse du glycogène et la lipogenèse et en diminuant la glycolyse, la néoglucogenèse et la lipolyse. L'insuline exerce également une régulation du métabolisme protéique en augmentant la synthèse protéique et en inhibant la protéolyse. L'ensemble de ces effets résulte de la liaison de l'insuline à son récepteur spécifique présent à la surface des cellules principalement au niveau du foie, du tissu adipeux et des muscles. Le récepteur à l'insuline est formé de deux chaînes α extracellulaires reliées par des ponts disulfures à deux chaînes β transmembranaires qui, au niveau de leur domaine intracellulaire, possèdent une activité catalytique tyrosine kinase. La fixation de l'insuline à son récepteur permet une autophosphorylation des domaines tyrosine kinase permettant ainsi l'activation du récepteur. L'activité tyrosine kinase est alors responsable de la phosphorylation de protéines substrats du récepteur, les IRS (insulin receptor substrates). Les deux voies majeures de signalisation qui en découlent sont celle de la PI-3 kinase et celle des MAPK (mitogen activated protein kinases) (**Figure 16**). La fin du signal insulinémique implique une dégradation de l'hormone faisant suite à l'internalisation membranaire des complexes insuline/récepteur. La majorité des récepteurs sont recyclés au niveau de la membrane tandis que d'autres sont dégradés et d'autres nouvellement synthétisés afin de maintenir constant le pool de récepteur à la membrane. Parallèlement une inactivation du signal insulinémique est obtenue par la déphosphorylation des résidus tyrosine du récepteur et de ses substrats *via* l'action de tyrosine phosphatases telles que PTP1B (protein tyrosine phosphatase 1B) et LAR (leukocyte common antigen-related molecule) et par phosphorylation de résidus sérine ou thréonine du récepteur et de ses substrats *via* des sérine/thréonine kinases telles que les PKC (protein kinases C), la JNK (c-Jun NH₂-terminal kinase), la MAPK et IKK β (inhibitor of nuclear factor κ B kinase β). Dans le muscle et le tissu adipeux l'effet principal de l'insuline est une augmentation de l'entrée cellulaire du glucose *via* la translocation à la membrane des transporteurs du glucose GLUT 4 (glucose transporter 4). Dans le tissu adipeux l'insuline permet également l'inhibition de l'HSL responsable de la dégradation des triglycérides et ainsi de la libération d'acides gras

libres dans la circulation sanguine. Au niveau du foie, l'insuline permet l'inhibition de la production hépatique de glucose en inhibant la glycogénolyse et la néoglucogénèse.

Dans les situations d'obésité, une altération de la voie de signalisation à l'insuline, l'insulinorésistance, peut se manifester, initiant ainsi le développement d'un diabète de type 2. La première hypothèse concernant le développement de l'insulinorésistance a été émise par Randle *et al.* en 1963 et reposait sur le rôle possible de l'élévation de la concentration en acides gras libres sanguins observée en cas d'obésité et de diabète de type 2. Cette équipe a démontré que les acides gras et le glucose entraient en compétition au niveau de leur oxydation dans le muscle cardiaque de rat et a ainsi introduit le terme de "cycle glucose-acide gras" pour décrire cette relation de compétition entre le glucose et les acides gras. En effet, ils observèrent que l'oxydation des acides gras était augmentée en comparaison de l'oxydation du glucose en réponse à une concentration élevée en acides gras libres et postulèrent que cette augmentation de l'oxydation des acides gras au détriment de celle du glucose était à l'origine du développement de l'insulinorésistance. Au niveau cellulaire, cela se manifeste par une augmentation des rapports acétyl-CoA/CoA et $\text{NADH}+\text{H}^+/\text{NAD}^+$ en cas d'augmentation d'oxydation des acides gras conduisant à une inhibition de la pyruvate déshydrogénase. Parallèlement l'augmentation de la concentration en acétyl-CoA aboutit à une augmentation de la concentration en citrate qui inhibe la phosphofructokinase et ainsi entraîne l'accumulation de glucose-6-phosphate qui lui-même inhibe l'hexokinase aboutissant à une accumulation du glucose et ainsi à une diminution de l'entrée du glucose dans les cellules. Une série d'études réalisées par l'équipe de Shulman (Roden *et al.*, 1996, Dresner *et al.*, 1999, Griffin *et al.*, 1999) a remis en question cette hypothèse. Durant un clamp hyperinsulinémique-euglycémique chez des sujets sains, le maintien d'une forte concentration en acides gras libres pendant cinq heures induit la diminution de sensibilité à l'insuline attendue (diminution du captage et de l'oxydation du glucose et diminution de la synthèse de glycogène), mais plutôt qu'une augmentation de la concentration intracellulaire de glucose-6-phosphate prédite par l'hypothèse de Randle, une diminution de ce paramètre a été observée (Roden *et al.*, 1996). Afin de déterminer si la diminution de la concentration en glucose-6-phosphate est due à une diminution de l'entrée du glucose ou à une diminution de la phosphorylation du glucose, cette même équipe a mesuré la concentration en glucose intracellulaire en cas d'infusion d'acides gras ou de glycérol ("control"). Les résultats obtenus montrent une diminution de la concentration en glucose au cours de l'infusion d'acides gras comparée à celle de glycérol suggérant ainsi qu'un défaut d'entrée du glucose dans la cellule serait l'étape limitante à l'oxydation du glucose (Dresner *et al.*, 1999). En outre, l'activité de la

PI-3 kinase était diminuée dans les conditions d'infusion d'acides gras illustrant un défaut dans la signalisation à l'insuline probablement à l'origine de la diminution du captage du glucose. Ce défaut de signalisation à l'insuline semble être dû à des phosphorylations de sérines au détriment de tyrosines sur IRS-1 (Dresner *et al.*, 1999, Griffin *et al.*, 1999, Yu *et al.*, 2002). En effet, dans des modèles animaux d'insulinorésistance, IRS-1 présente une hyperphosphorylation sur des sérines (Hirosumi *et al.*, 2002, Yu *et al.*, 2002, Kim JK *et al.*, 2004, Um *et al.*, 2004, Furukawa *et al.*, 2005). En outre, l'insulinorésistance induite par une alimentation riche en lipides est abolie dans des modèles où l'activité de sérine/thréonine kinases (JNK, IKK β , S6 kinase 1, PKC- θ) est inhibée, soit par invalidation génique, soit pharmacologiquement (Yuan *et al.*, 2001, Hirosumi *et al.*, 2002, Kim JK *et al.*, 2004, Um *et al.*, 2004, Furukawa *et al.*, 2005). Ces kinases, en phosphorylant IRS-1 sur des sérines, peuvent induire soit une dissociation d'IRS-1 avec le récepteur et/ou avec la PI3-kinase (Mothe et Van Obberghen, 1996, Li *et al.*, 1999, Aguirre *et al.*, 2002, Moeschel *et al.*, 2004), soit augmenter la dégradation d'IRS-1 (Egawa *et al.*, 2000). Le mécanisme d'activation de ces sérine/thréonine kinases suite à une augmentation de l'apport en lipides reste à préciser. La quantité de triglycérides intracellulaires dans le muscle squelettique est corrélée avec le degré d'insulinorésistance (Krssak *et al.*, 1999, Perseghin *et al.*, 1999) et la diminution de cette quantité de triglycérides musculaires entraîne une augmentation de la sensibilité à l'insuline (Oral *et al.*, 2002, Rosa *et al.*, 2003). Cependant il semblerait que les triglycérides soient plus un marqueur de l'insulinorésistance qu'une cause. En effet, les athlètes entraînés, malgré une augmentation du contenu en triglycérides musculaires, présentent une sensibilité à l'insuline augmentée (Goodpaster *et al.*, 2001, Russel, 2004). Les espèces lipidiques responsables de l'inhibition de la signalisation à l'insuline seraient plutôt les intermédiaires lipidiques tels que le diacylglycérol, les acyl-CoA et les céramides (Schmitz-Peiffer, 2000, Itani *et al.*, 2002, Cooney *et al.*, 2002, Summers, 2006).

Quels que soient les mécanismes mis en jeu lors du développement de l'insulinorésistance périphérique, cela conduit à une diminution de l'entrée du glucose dans les cellules des tissus adipeux et musculaires, à une augmentation de la lipolyse adipocytaire et à une hyperinsulinémie.

b) Insulinorésistance du tissu adipeux : lipolyse accrue

Chez les patients avec une NAFLD, le contenu en triglycérides hépatiques semble être dépendant principalement de la disponibilité en acides gras libres sanguins. En effet, selon

une étude utilisant des radioisotopes, les triglycérides hépatiques sont constitués à 59 % des acides gras libres sanguins (Donnelly *et al.*, 2005). L'augmentation de la concentration sanguine en acides gras libres est essentiellement due au fait que le tissu adipeux, devenu insulino-résistant, n'assure plus sa fonction de stockage de triglycérides. En effet, l'insulino-résistance du tissu adipeux a pour conséquence majeure une augmentation de l'hydrolyse des triglycérides par l'HSL qui ne subit plus d'inhibition par l'insuline (Sanyal *et al.*, 2001, de Almeida *et al.*, 2002, Lewis *et al.*, 2002). L'entrée des acides gras dans le foie n'étant pas un phénomène régulé, dépend directement de la concentration en acides gras libres plasmatiques. L'augmentation de la lipolyse adipocytaire a ainsi des conséquences directes sur l'entrée des acides gras dans le foie. L'importance de ce défaut de régulation de la lipolyse adipocytaire dans le développement de la stéatose hépatique est confirmée par le fait que chez des souris dont le gène codant pour l'HSL a été inactivé, le contenu en triglycérides hépatiques est diminué (Voshol *et al.*, 2003, Park *et al.*, 2005). Par ailleurs, la localisation du tissu adipeux est déterminante dans cette hypothèse d'augmentation d'apport d'acides gras libres provenant de la lipolyse adipocytaire. Il existe deux types de tissus adipeux selon leur localisation, le tissu adipeux sous-cutané et le tissu adipeux viscéral. Le tissu adipeux viscéral est plus fortement associé aux NAFLD et au syndrome métabolique. En effet, une augmentation de 1 % du tissu adipeux sous-cutané est associée à une augmentation de 21 % du contenu en lipides hépatiques alors qu'une augmentation de 1 % du tissu adipeux viscéral est associée à une augmentation de 104 % du contenu en lipides hépatiques (Thomas *et al.*, 2005). Le tissu adipeux viscéral, par sa localisation mais également par des caractéristiques fonctionnelles différentes de celles du tissu adipeux sous-cutané joue un rôle essentiel dans le développement de la stéatose hépatique. D'une part le tissu adipeux viscéral est directement relié au foie *via* la circulation sanguine portale, d'autre part les adipocytes du tissu adipeux viscéral sont plus résistants à l'action anti-lipolytique de l'insuline mais plus sensibles aux effets lipolytiques des catécholamines que les adipocytes sous-cutanés (Lafontan et Girard, 2008, Girard et Lafontan, 2008).

c) Augmentation de la lipogenèse hépatique : rôle de l'hyperinsulinémie et de l'hyperglycémie

Parallèlement à l'augmentation de la disponibilité en acides gras libres due à l'augmentation de la lipolyse adipocytaire, l'hyperinsulinémie et l'hyperglycémie induites par l'insulino-résistance périphérique vont entraîner une augmentation de la lipogenèse hépatique.

Selon une étude utilisant des radioisotopes, les triglycérides synthétisés à partir des acides gras issus de la synthèse *de novo* représentent 30 % des triglycérides hépatiques (Donnelly *et al.*, 2005). Par ailleurs, d'autres études ont mis en évidence que l'augmentation de la synthèse hépatique des acides gras contribuait au développement de la stéatose hépatique dans des modèles animaux d'obésité et d'insulinorésistance (Martin, 1974, Memon *et al.*, 1994, Shimomura *et al.*, 1999a). Chez l'homme, la contribution importante de la lipogenèse au développement de la stéatose hépatique est désormais bien admise (Diraison *et al.*, 2003, Donnelly *et al.*, 2005, Nakamuta *et al.*, 2005, Postic et Girard, 2008).

Un des facteurs impliqués dans cette augmentation de la lipogenèse hépatique est le facteur de transcription SREBP-1c. En effet, l'hyperinsulinémie réactionnelle à l'insulinorésistance du tissu adipeux et des tissus musculaires va entraîner une activation du facteur de transcription SREBP-1c dans le foie, conduisant ainsi à l'augmentation de la transcription des gènes codant pour des enzymes impliquées dans la lipogenèse (Shimomura *et al.*, 1999a). Le rôle essentiel de SREBP-1c dans la lipogenèse et le développement de la stéatose hépatique a été mis en évidence chez des souris surexprimant la forme active de ce facteur dans le foie qui, en conséquence, présentent une stéatose massive due à l'activation de l'expression des gènes lipogéniques (Shimano *et al.*, 1997, Bécard *et al.*, 2001). La démonstration inverse quant à l'implication de SREBP-1c dans le développement de la stéatose hépatique a été réalisée chez les souris *ob/ob* mutées sur le gène codant pour la leptine utilisées comme modèle d'obésité et d'insulinorésistance associées à la présence d'une stéatose hépatique. L'inactivation du gène *SREBP-1* chez ces souris *ob/ob*, conduit à une diminution d'environ 50 % du contenu en triglycérides hépatiques (Yahagi *et al.*, 2002).

Hormis l'hyperinsulinémie, une autre résultante de la résistance périphérique à l'insuline, l'hyperglycémie, semble jouer un rôle non négligeable dans l'augmentation de la lipogenèse hépatique. L'hyperglycémie entraîne l'activation du facteur de transcription ChREBP qui en synergie avec SREBP-1c va augmenter l'expression des gènes codant pour les enzymes lipogéniques (Kawaguchi *et al.*, 2001, Dentin *et al.*, 2004, Iizuka *et al.*, 2004, Ishii *et al.*, 2004, Ma *et al.*, 2006, Wang *et al.*, 2006). Le lien entre ChREBP et stéatose hépatique est également suggéré par le fait que son expression est augmentée dans le foie des souris *ob/ob* présentant une stéatose massive (Dentin *et al.*, 2006). Par ailleurs, l'implication du facteur ChREBP dans le développement de la stéatose hépatique a été mise en évidence en utilisant comme modèle un croisement entre souris *ob/ob* et souris dont le gène *ChREBP* a été inactivé, résultant en une diminution du contenu en lipides hépatiques (Iizuka *et al.*, 2006). De manière plus ciblée, l'inactivation spécifiquement hépatique du facteur ChREBP *via*

l'injection d'un adénovirus contenant un ARNi de ChREBP chez des souris *ob/ob*, entraîne une diminution des triglycérides hépatiques concomitante à une diminution de la lipogenèse (Dentin *et al.*, 2006).

Un troisième facteur de transcription pouvant participer au développement de la stéatose hépatique *via* l'augmentation de la lipogenèse semble être PPAR γ . Physiologiquement peu exprimé dans le foie, PPAR γ présente une augmentation de son expression dans plusieurs modèles murins d'obésité et de diabète développant une stéatose hépatique (Memon *et al.*, 2000, Rahimian *et al.*, 2001, Chao *et al.*, 2000, Burant *et al.*, 1997, Bedoucha *et al.*, 2001, Inoue *et al.*, 2005). L'importance de l'expression de PPAR γ dans le développement de la stéatose hépatique a été démontrée par des expériences de délétion du gène PPAR γ spécifiquement dans le foie dans deux modèles murins différents d'insulinorésistance, les souris *ob/ob* et les souris transgéniques lipodystrophiques A-ZIP/F-1. L'absence d'expression hépatique de PPAR γ que ce soit chez les souris *ob/ob* ou les souris A-ZIP/F-1 entraîne une atténuation de la stéatose hépatique (Matsusue *et al.*, 2003, Gavrilova *et al.*, 2003). D'un point de vue moléculaire le lien entre PPAR γ et stéatose hépatique reste encore à préciser. Cependant, des études ont mis en évidence que SREBP-1c pouvait activer la transcription de PPAR γ ainsi que stimuler la production de ligands endogènes de PPAR γ (Kim *et al.*, 1998b, Fajas *et al.*, 1999).

L'ensemble de ces éléments souligne l'importance de l'augmentation de la lipogenèse hépatique, *via* des facteurs clés tels que SREBP-1c, ChREBP et PPAR γ , induits par l'hyperinsulinémie et l'hyperglycémie, deux résultantes de l'insulinorésistance du tissu adipeux et des tissus musculaires. Cependant, le concept d'une activation de la lipogenèse, voie activée par l'insuline *via* SREBP-1c, dans des conditions d'insulinorésistance reste difficile à appréhender. Hormis, l'hypothèse chronologique en faveur de l'apparition de l'insulinorésistance dans un premier temps au niveau du tissu adipeux et du muscle, il est probable que la lipogenèse puisse être activée par des voies indépendantes de l'insuline. D'une part, la lipogenèse est régulée en partie par le facteur ChREBP qui lui est activé par le glucose. D'autre part, la transcription et l'expression de la protéine SREBP-1c sont augmentées dans le foie de souris *ob/ob* malgré une insulinorésistance hépatique concernant la production de glucose (Shimomura *et al.*, 1999a, Shimomura *et al.*, 2000). Cette observation peut s'expliquer par le fait que la résistance à l'insuline concernant la production hépatique de glucose est la conséquence d'une diminution de l'expression d'IRS-2 alors que la transcription de SREBP-1c induite par l'insuline est médiée par IRS-1 dont l'expression n'est pas affectée chez ces souris. Par ailleurs, le TNF α (tumor necrosis factor α), une cytokine pro-

inflammatoire dont la production est augmentée avec l'inflammation hépatique et adipocytaire peut également activer SREBP-1c et ainsi augmenter la lipogenèse hépatique (Endo *et al.*, 2007). Enfin, des études récentes ont mis en évidence que SREBP-1c, de par la localisation de son précurseur, pouvait être activé indépendamment de l'insuline, suite au stress du réticulum endoplasmique présent dans le foie stéatosique (Ferré et Foufelle, 2007, Ji, 2008). Le réticulum endoplasmique (RE) est l'organite cellulaire spécialisé dans la maturation des protéines membranaires et sécrétées. Toutes altérations de l'homéostasie du RE telles que des variations des concentrations calciques et une synthèse élevée de protéines sécrétées entraînent l'activation d'une réponse adaptative du RE nommée stress du RE ou UPR (unfolded protein response) afin de limiter l'accumulation de protéines non-matures dans le RE (Foufelle et Ferré, 2007). Cette réponse physiologique du RE est régulée par trois protéines localisées dans la membrane du RE, la kinase PERK (PKR-like ER kinase), la kinase et endonucléase IRE1 (inositol requiring enzyme 1) et le facteur de transcription ATF6 (activating transcription factor 6) (Schröder et Kaufman, 2005). L'activation de ces trois protéines est régulée par leur association avec la protéine chaperone BiP/GRP78 (binding protein/glucose regulated protein 78). L'arrivée accrue de protéines dans le RE entraîne la dissociation de ces protéines d'avec BiP/GRP78 qui va s'associer aux protéines en cours de maturation. Une fois séparées de BiP/GRP78, PERK et IRE1 vont s'homodimériser, s'autophosphoryler et ainsi devenir actives. Le facteur ATF6 va transiter par l'appareil de Golgi où il va être activé par deux clivages protéolytiques médiés par les protéases S1P et S2P. Une fois activées, ces trois protéines vont permettre d'augmenter la transcription de gènes codant pour des protéines impliquées dans la maturation protéique. Dans le foie de souris obèses et insulino-résistantes, la présence d'un stress du RE a été mise en évidence en association avec une forte concentration de la forme mature de SREBP-1c et avec une lipogenèse augmentée (Ozcan *et al.*, 2004). Les mécanismes à l'origine de l'activation de SREBP-1c causée par un stress du RE ne sont pas connus. Cependant, les protéases S1P et S2P responsables des clivages de SREBP mais également du facteur ATF6 semblent être un lien potentiel entre le stress du RE et l'activation du facteur SREBP-1c dans le cadre du développement de la stéatose hépatique.

3. Stéatose hépatique et sécrétion des VLDL

Un autre mécanisme pouvant participer au développement de la stéatose hépatique est une diminution de l'export des triglycérides hépatiques *via* les VLDL. En effet, des études ont

suggéré qu'en cas de NAFLD primaire, la sécrétion de VLDL pouvait être diminuée en conséquence d'une diminution de la quantité d'apolipoprotéine B (ApoB) hépatique nécessaire à la synthèse des VLDL (Charlton *et al.*, 2002, Musso *et al.*, 2003). Chez les patients atteints de NASH, une diminution de la quantité d'ARNm codant pour l'ApoB (Sreekumar *et al.*, 2003) a été mise en évidence, suggérant ainsi que la diminution de la synthèse d'ApoB pourrait être due à une diminution de sa transcription et/ou de la stabilité de son ARNm. Etant donné que dans les conditions physiologiques, l'insuline diminue la synthèse et la stabilité de l'ApoB, l'hyperinsulinémie consécutive à l'insulinorésistance périphérique pourrait expliquer la diminution de synthèse d'ApoB (Taghibiglou *et al.*, 2000, Charlton *et al.*, 2002). Il est important de préciser que la diminution de synthèse et/ou de sécrétion d'ApoB en cas de NASH peut être associée à une concentration plasmatique d'ApoB soit diminuée, soit augmentée, et à un niveau élevé de triglycérides plasmatiques (Charlton *et al.*, 2002, Musso *et al.*, 2003). Au vu de ces données, force est de constater que le métabolisme des lipoprotéines semble être affecté de manière complexe en cas de NAFLD, que ce soit au niveau du foie mais également au niveau des tissus extra-hépatiques.

4. Stéatose hépatique et β -oxydation mitochondriale

Etant donné que la synthèse *de novo* des acides gras est augmentée au cours du développement de la stéatose hépatique, une diminution de la β -oxydation *via* l'inhibition de la CPT I par le malonyl-CoA, intermédiaire de la synthèse des acides gras, est logiquement attendue. Cependant, malgré une lipogenèse augmentée, la β -oxydation mitochondriale hépatique en cas de NAFLD semble être augmentée. En effet, chez les patients avec une NASH, la β -oxydation mitochondriale et la cétogenèse sont augmentées (Sanyal *et al.*, 2001, Chalasani *et al.*, 2003, Miele *et al.*, 2003). De même, chez les souris *ob/ob* présentant une stéatose massive la β -oxydation mitochondriale hépatique est augmentée (Brady *et al.*, 1985, Li *et al.*, 2003). Cependant les mécanismes à l'origine de cette augmentation de l'oxydation mitochondriale des acides gras ne sont pas connus. Cette augmentation paradoxale de la β -oxydation parallèlement à une augmentation de la synthèse *de novo* des acides gras peut être, au moins en partie, expliquée par l'activation de PPAR α consécutive à la grande disponibilité d'acides gras au niveau du foie en cas de stéatose. Au niveau de la β -oxydation mitochondriale, PPAR α induit l'expression de la CPT I (Brady *et al.*, 1989), de l'acyl-CoA déshydrogénase spécifique des acides gras à chaîne moyenne (Gulick *et al.*, 1994), de l'HMG-CoA synthase impliquée dans la cétogenèse (Rodriguez *et al.*, 1994). Dans deux modèles

animaux présentant une stéatose hépatique massive, les souris *ob/ob* et les souris *db/db* (souris dont le gène codant pour le récepteur de la leptine est inactivé), la quantité d'ARNm de PPAR α est augmentée (Memon *et al.*, 2000). En outre, l'activation de PPAR α au niveau du foie se ferait préférentiellement par les acides gras issus de la synthèse *de novo* (Chakravarthy *et al.*, 2005), ce qui relie l'augmentation de la lipogénèse à l'augmentation de la β -oxydation dans le contexte du développement d'une stéatose hépatique. Le gène codant pour la CPT I étant régulé transcriptionnellement par PPAR α , l'augmentation d'expression de PPAR α observée pourrait expliquer l'augmentation de l'expression de la CPT I elle-même observée dans le foie de modèles animaux présentant une stéatose (Brady *et al.*, 1985, Lee *et al.*, 2001, Paterson *et al.*, 2004). En outre, dans des modèles animaux de diabète de type 1 ou 2, l'activité de la CPT I hépatique semble augmentée en conséquence d'une diminution de son affinité pour son inhibiteur, le malonyl-CoA (Brady *et al.*, 1985, Cook et Gamble, 1987). Cependant il existe d'autres données montrant une activité de la CPT I non modifiée et une diminution de l'expression de la CPT I dans le foie de patients avec une NASH (Perez-Carreras *et al.*, 2003, Nakamuta *et al.*, 2005).

Au vu de ces données, il apparaît que la régulation de la β -oxydation au cours du développement de la stéatose hépatique n'est pas encore bien comprise du fait de la diversité des modèles utilisés et du stade de NAFLD (stéatose simple ou NASH) auquel sont réalisées les études.

5. Stéatose hépatique et insulino-résistance hépatique

L'insulino-résistance hépatique pourrait se manifester selon les mêmes mécanismes que l'insulino-résistance musculaire. L'activation de sérine kinases induite par le stress cellulaire selon plusieurs mécanismes, conduirait à l'inactivation du signal insulinémique. L'accumulation d'intermédiaires lipidiques pourrait conduire à l'activation de la PKC ϵ qui serait responsable de la phosphorylation d'IRS-2 sur des sérines et ainsi aboutirait à l'inhibition du signal insulinémique (Samuel *et al.*, 2004, Samuel *et al.*, 2007). Par ailleurs, au niveau des cellules de Kupffer, les acides gras libres activent le toll-like receptor 4 (TLR4) qui *via* la voie NF- κ B (nuclear factor- κ B) entraîne une augmentation des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α , l'IL-6 (interleukin 6) et l'IL-1 β (Shi *et al.*, 2006). Ces cytokines qui sont également produites par le tissu adipeux peuvent participer au développement de l'insulino-résistance (Bastard *et al.*, 2006, Shoelson *et al.*, 2007, de Luca et Olefsky, 2008). Le TNF α , *via* son récepteur, est capable d'activer des sérine/thréonine kinases

telles que la JNK et l'IKK β , qui vont phosphoryler les IRS sur des sérines et inhiber la signalisation de l'insuline. L'IL-6 peut induire l'insulinorésistance en activant SOCS3 (suppressor of cytokine signaling 3) qui inhibe le signal insulinémique en se liant au récepteur de l'insuline empêchant ainsi son interaction avec les IRS et en induisant la dégradation par le protéasome d'IRS-1 et IRS-2 (Emanuelli *et al.*, 2000, Senn *et al.*, 2003).

Par ailleurs, l'induction du stress du réticulum endoplasmique dans le foie d'animaux obèses (Ozcan *et al.*, 2004), aurait pour conséquence l'activation de la voie JNK qui, en phosphorylant les IRS sur des sérines, inhiberait la signalisation de l'insuline.

Quel que soit le mécanisme impliqué, l'insulinorésistance hépatique est caractérisée par une augmentation de la production hépatique de glucose.

IV. "Second hit": développement de la stéatohépatite

Si l'insulinorésistance est l'élément clé du développement de la stéatose hépatique, le stress oxydatif apparaît comme jouant un rôle fondamental dans la transition entre stéatose et stéatohépatite. En effet, les patients et les animaux atteints de NAFLD présentent, dans le foie, une augmentation des différents marqueurs de lésions oxydatives au niveau des lipides, des protéines et de l'ADN, tels que le malondialdéhyde (MDA), le 4-hydroxynonanal (4-HNE), les protéines nitrées et la 8-hydroxydéoxyguanosine (Sanyal *et al.*, 2001, Seki *et al.*, 2002, Laurent *et al.*, 2004, Seki *et al.*, 2005, García-Ruiz *et al.*, 2006,). Par ailleurs, un marqueur sanguin du stress oxydatif, la thioredoxine, est retrouvé augmenté en cas de NASH alors que les facteurs antioxydants sont diminués (Sumida *et al.*, 2003, Laurent *et al.*, 2004, Yesilova *et al.*, 2005, Nobili *et al.*, 2005).

1. Mitochondrie : source et cible du stress oxydatif

La mitochondrie est à l'origine de la production d'une grande partie des espèces oxygénées réactives ou ROS (reactive oxygen species) cellulaires. La production de ces ROS mitochondriales est dépendante du fonctionnement de la chaîne respiratoire. En effet, une partie de l'oxygène ne subit pas une réduction complète en H₂O et va former des ions superoxydes (O₂⁻) au niveau des complexes I et III (Forman et Azzi, 1999, Lenaz *et al.*, 2002). La β -oxydation des acides gras (Yamagishi *et al.*, 2001, St-Pierre *et al.*, 2002) et l'oxydation du glucose (Du *et al.*, 2000) peuvent induire une production de ROS probablement en

augmentant la quantité d'équivalents réduits ainsi que le transfert des électrons le long de la chaîne respiratoire. Une augmentation de la production de ROS a été observée chez les souris *ob/ob* ainsi que chez des rats alimentés avec un régime déficient en choline induisant une NASH (Yang *et al.*, 2000, Hensley *et al.*, 2000). Cependant le site précis de production de ROS n'a pas été mis en évidence. L'augmentation de la production de ROS au niveau mitochondrial pourrait s'expliquer par l'augmentation de la β -oxydation observée en présence d'une NASH qui serait responsable d'une augmentation de l'arrivée d'équivalents réduits au niveau de la chaîne respiratoire.

Par ailleurs, plusieurs études ont rapporté une augmentation de l'expression hépatique et/ou de l'activité du cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) chez des personnes obèses (O'Shea *et al.*, 1994), chez des patients obèses diabétiques de type 2 (Wang Z *et al.*, 2003) et chez des patients présentant une NASH (Weltman *et al.*, 1998, Chalasani *et al.*, 2003). Le mécanisme par lequel CYP2E1 est augmenté chez les patients avec une obésité, un diabète ou une NASH n'est pas encore clair, cependant l'insulinorésistance (Moncion *et al.*, 2002) et l'augmentation de la cétogenèse hépatique pourrait y contribuer. En effet, les corps cétoniques et notamment l'acétone sont des inducteurs du CYP2E1 (Gonzalez, 2005). L'augmentation d'expression et d'activité du CYP2E1 représente une source potentielle importante de production de ROS dans les hépatocytes (Chitturi et Farrell, 2001, Schattenberg *et al.*, 2005), pas seulement au niveau cytosolique mais également au niveau de la mitochondrie. En effet, en plus de sa localisation dans le réticulum endoplasmique, CYP2E1 est retrouvé en quantité significative dans la mitochondrie (Robin *et al.*, 2001, Robin *et al.*, 2002). Le CYP2E1 mitochondrial a été montré comme pouvant produire des ROS et induire ainsi une peroxydation lipidique (Raza *et al.*, 2004). En outre, l'expression et l'activité de la protéine CYP2E1 mitochondriale sont augmentées dans le foie de rats avec un diabète induit par la streptozotocine (Raza *et al.*, 2004). Au vu de ces différentes données, le CYP2E1 mitochondrial pourrait jouer un rôle dans la production de ROS au niveau mitochondrial.

a) Altérations mitochondriales et NASH

Plusieurs études ont mis en évidence que les mitochondries des patients atteints de NASH présentaient des anomalies morphologiques et fonctionnelles. En effet, les mitochondries de ces patients sont plus grosses, gonflées et présentent des inclusions paracrystallines (Cadwell *et al.*, 1999, Sanyal *et al.*, 2001). D'un point de vue fonctionnel, les activités des complexes de la chaîne respiratoire (I, II, III et IV) sont diminuées de 30 à 50 % chez les patients présentant

une NASH (Pérez-Carreras *et al.*, 2003). En outre, la synthèse d'ATP semble être diminuée chez les patients présentant une NASH (Cortez-Pinto *et al.*, 2003).

Les altérations mitochondriales observées en présence de NASH peuvent avoir plusieurs origines, elles peuvent notamment être dues à la production excessive de ROS et à une augmentation de l'expression du TNF α .

b) Peroxydation lipidique

L'augmentation de la production de ROS peut conduire à une peroxydation lipidique. En effet, il a été montré que différents traitements induisant une stéatose hépatique chez la souris, augmentaient les TBARS (thiobarbituric acid reactants) qui représentent les produits finaux de la peroxydation lipidique, ainsi que la quantité d'éthane exhalé qui est un reflet de la peroxydation lipidique (Letteron *et al.*, 1996). Une augmentation de la peroxydation lipidique a également été mise en évidence chez des animaux avec un régime carencé en choline et méthionine induisant une NASH (Leclercq *et al.*, 2000) ainsi que chez des patients présentant une NASH (Sanyal *et al.*, 2001). Cette peroxydation accrue des lipides hépatiques entraîne une augmentation de la formation d'aldéhydes réactifs tels que le MDA et le 4-HNE qui peuvent causer des lésions mitochondriales, notamment au niveau du génome mitochondrial (Hruszkewycz, 1988, Hruszkewycz et Bergtold, 1990, Demeilliers *et al.*, 2002). Etant donné que l'ADNmt code pour 13 sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire, des dommages de l'ADNmt pourraient induire un défaut de fonctionnement de la chaîne respiratoire. En outre, les produits de la peroxydation lipidique incluant le MDA et le 4-HNE peuvent directement attaquer et inactiver des complexes de la chaîne respiratoire tels que le cytochrome *c* oxydase (Chen *et al.*, 1998, Chen *et al.*, 2000). Les ROS et la peroxydation lipidique peuvent également être à l'origine des altérations structurales mitochondriales comme les inclusions cristallines dans des mitochondries plus grosses, observées chez les patients atteints de NASH (Matsushashi *et al.*, 1996, Wakabayashi, 2002, Sanyal *et al.*, 2001). Enfin, certains produits de la peroxydation lipidique auraient un effet inducteur du pore de transition de perméabilité (PTP : permeability transition pore) pouvant ainsi aboutir à la mort cellulaire par apoptose (Kristal *et al.*, 1996). L'altération de la fonction mitochondriale, en conséquence de la peroxydation lipidique, peut conduire à une formation de ROS accrue initiant ainsi un cercle vicieux (**Figure 17**).

c) Augmentation de la production de TNF α

Un autre facteur important dans le développement des dysfonctions mitochondriales observées en cas de NASH, est le TNF α . Une concentration sanguine élevée de TNF α a été observée chez les patients présentant une NASH (Pérez-Carreras *et al.*, 2003, Kugelmas *et al.*, 2003, Hui *et al.*, 2004). En outre, les concentrations de TNF α dans le foie de souris *ob/ob* sont environ 20 fois plus élevées que dans le foie de souris contrôles (Garcia-Ruiz *et al.*, 2006). Les sources hépatiques du TNF α sont probablement les hépatocytes et les cellules de Kupffer (Crespo *et al.*, 2001). Le TNF α est capable d'induire des modifications structurales et fonctionnelles mitochondriales similaires à celles observées en cas de NASH (Higuchi *et al.*, 1998, Sánchez-Alcázar *et al.*, 2000). Un traitement anti-TNF α chez la souris *ob/ob*, augmente l'activité des complexes I, II, III et V ainsi que la β -oxydation et l'histologie hépatique (Garcia-Ruiz *et al.*, 2006).

2. Lésions hépatiques

La production accrue de ROS entraîne une augmentation des produits de la peroxydation lipidique. Les ROS entraînent également l'augmentation de l'expression de cytokines telles que le TGF- β (transforming growth factor β), l'IL-8, le TNF α et le Fas-ligand (Pessayre *et al.*, 1999, Pessayre *et al.*, 2001). Ces cytokines et les produits issus de la peroxydation lipidique semblent être impliqués dans le développement des lésions hépatiques de la NASH.

a) Inflammation, formation des corps de Mallory et apoptose

Le TGF- β , le 4-HNE et l'IL-8 étant des chemo-attractants pour les neutrophiles humains, les infiltrats de neutrophiles observés en cas de NASH peuvent être la conséquence de l'augmentation de ces molécules (Pessayre *et al.*, 2001). Le TGF- β induit également la transglutaminase, une enzyme associée au cytosquelette catalysant la formation d' ϵ -lysine- γ -glutamyl à partir de la lysine d'une chaîne polypeptidique et de la glutamine d'une autre chaîne polypeptidique. L'induction de la transglutaminase par le TGF- β pourrait conduire à la polymérisation des cytokératines entraînant ainsi la formation de corps de Mallory (Pessayre *et al.*, 2001). Enfin, la voie de l'apoptose peut être initiée par l'augmentation de l'expression de Fas-ligand et du TNF α observée chez les patients présentant une NASH.

b) Fibrose

La fibrose hépatique résulte de l'activation des cellules de Kupffer et des cellules étoilées. Après avoir phagocyté les corps apoptotiques, les cellules de Kupffer activées vont produire du TGF- β qui va activer les cellules étoilées induisant ainsi leur transformation en cellules de type fibroblastique produisant du collagène. Les produits de la peroxydation lipidique peuvent également activer la fibrogenèse en favorisant la production de TGF- β par les macrophages (Leonarduzzi *et al.*, 1997) et en augmentant directement la production de collagène par les cellules étoilées (Parola *et al.*, 1993).

V. Traitement des NAFLD

A ce jour il n'existe pas de traitement spécifique des NAFLD. Le développement des NAFLD étant étroitement associé au syndrome métabolique, l'orientation des investigations concernant des traitements potentiels des NAFLD s'est faite vers les traitements des différents paramètres associés au syndrome métabolique tels que l'obésité, la dyslipidémie et le diabète.

1. Restriction calorique et activité physique

Les modifications du style de vie, incluant une perte de poids sur de longs termes par une réduction de l'apport calorique et une augmentation de l'activité physique, sont les bases d'une thérapie efficace pour le syndrome métabolique. Même si les résultats d'études concernant les patients atteints de NAFLD sont à prendre avec précaution étant donné la taille réduite des groupes, une amélioration des tests biochimiques hépatiques et de la stéatose hépatique, consécutive à une perte de poids à court terme associée à un exercice physique régulier, a été mise en évidence (Palmer et Schaffner, 1990, Ueno *et al.*, 1997, Wang RT *et al.*, 2003). Une étude a montré qu'une réduction de poids de 5 % ou plus, associée à une activité physique régulière (au moins deux fois par semaine), pendant un an entraînait une normalisation de la concentration d'ALAT (alanine aminotransférase) (Suzuki *et al.*, 2005). En outre, une intervention diététique intense peut permettre une diminution du tour de taille, de l'insulinorésistance, des triglycérides sanguins et des concentrations d'ALAT et ASAT ainsi qu'une amélioration de l'histologie hépatique chez des patients présentant une NASH (Huang *et al.*, 2005).

Une intervention pharmacologique visant une perte de poids n'est envisageable qu'après n'avoir obtenu que peu ou pas de résultats suite à un changement de style de vie. Une étude pilote comprenant 10 patients obèses présentant une NASH et traités pendant 6 mois avec de l'orlistat, inhibiteur des lipases pancréatiques et gastriques, a montré une perte de poids d'au moins 10 % associée à une diminution des niveaux d'aminotransférases, de la stéatose hépatique et de la fibrose (Harrison *et al.*, 2004).

Par ailleurs, une perte de poids induite chirurgicalement entraîne une diminution de la prévalence du syndrome métabolique, de la stéatose hépatique et de la fibrose (Mattar *et al.*, 2005). Cependant, l'utilisation de techniques chirurgicales afin d'obtenir une perte de poids est à envisager avec précaution concernant le traitement des NAFLD. En effet, une perte de poids trop rapide à la suite de ces interventions peut au contraire augmenter la stéatose hépatique probablement en conséquence de l'augmentation des acides gras libres sanguins consécutive à la lipolyse adipeuse accrue.

2. Agents hypolipidémiants

Le clofibrate et le gemfibrozil sont deux fibrates, ligands de PPAR α , dont l'utilisation comme traitements potentiels des NAFLD a été évaluée. Le traitement par du clofibrate de 16 patients présentant une hypertriglycémie et une NASH n'a pas mis en évidence de changements significatifs des concentrations en d'aminotransférases ou de l'histologie hépatique (Laurin *et al.*, 1996). Cependant, un traitement de 4 semaines chez 46 patients présentant une NASH avec du gemfibrozil entraîne une diminution des concentrations d'ALAT, ASAT et GGT (Basaranoglu *et al.*, 1999).

Dans trois études différentes, des patients avec une NAFLD et une hyperlipidémie ont été traités pendant 6 à 12 mois avec un inhibiteur de l'HMG-CoA réductase, l'atorvastatine (Horlander *et al.*, 2001, Kiyici *et al.*, 2003, Gomez-Dominguez *et al.*, 2006). Ce traitement a induit une diminution des concentrations sériques d'aminotransférases ainsi qu'une amélioration de l'histologie hépatique.

3. La metformine

La metformine est un agent insulino-sensibilisateur utilisé couramment dans le traitement de l'obésité et du diabète de type 2. Dans des hépatocytes isolés de rat, la metformine induit une diminution de la lipogenèse en activant l'AMPK (Zhou *et al.*, 2001). Chez des souris *ob/ob*, la metformine induit une diminution de l'hépatomégalie, des concentrations en

aminotransférases et de la stéatose hépatique (Lin HZ *et al.*, 2000). La première étude évaluant l'effet d'un traitement à la metformine chez des patients présentant une NASH a montré une amélioration des concentrations en aminotransférases et une diminution du volume hépatique (Marchesini *et al.*, 2001b). Dans un rapport préliminaire, un traitement de 6 mois avec de la metformine entraînait une amélioration des concentrations en enzymes hépatiques (Nair *et al.*, 2004). Cependant, après un an de traitement une absence d'effets, que ce soit sur les concentrations en aminotransférases ou sur le plan histologique, a été observée. Une autre étude chez des patients présentant une NAFLD a montré qu'un traitement associant metformine et une restriction des apports caloriques, en particulier lipidiques, induisait une amélioration des concentrations d'aminotransférases mais sans amélioration de l'histologie hépatique (Uygun *et al.*, 2004). Une autre étude a montré une amélioration des concentrations d'aminotransférases et de l'histologie hépatique suite à un traitement de 12 mois avec de la metformine (Bugianesi *et al.*, 2005a). Au vu de l'importante disparité des résultats il reste encore à affirmer l'efficacité de la metformine comme traitement des NAFLD.

4. Les thiazolidinediones

Les thiazolidinediones (pioglitazone, rosiglitazone), ligands de PPAR γ , sont des agents insulino-sensibilisateurs ayant des propriétés anti-inflammatoires et anti-fibrotiques (Buckingham, 2005). Le pioglitazone entraîne une diminution de la stéatose hépatique et de la fibrose dans un modèle de rats présentant une fibrose hépatique (Kawaguchi *et al.*, 2004). Dans la première étude humaine, un traitement avec du pioglitazone pendant 48 semaines chez des patients non-diabétiques avec une NASH (évaluée par une biopsie) normalise les concentrations d'aminotransférases et diminue la stéatose et la fibrose (Promrat *et al.*, 2004). Dans une autre étude, des patients avec NASH traités avec du rosiglitazone pendant un an présentaient une amélioration des concentrations d'enzymes hépatiques et du degré de fibrose (Neuschwander-Tetri *et al.*, 2003). Cependant, une étude sur le rosiglitazone comme traitement de la NASH a montré une augmentation des risques d'infarctus du myocarde (Nissen et Wolski, 2007). Au vu de ces données la pertinence de l'utilisation des thiazolidinediones comme traitement des NAFLD doit encore être évaluée.

5. Les anti-oxydants

Avec l'insulinorésistance, le stress oxydatif joue un rôle essentiel dans le développement des NAFLD. Par conséquent des traitements avec différents antioxydants (vitamine E, vitamine

C, bétaine) ont été évalués chez les patients atteints de NAFLD. Un traitement avec de la vitamine E pendant un an entraînait une amélioration des concentrations d'enzymes hépatiques mais pas de changement du degré de stéatose et de fibrose (Hasegawa *et al.*, 2001). La combinaison des vitamines E et C n'améliore pas les concentrations d'enzymes hépatiques, ni le degré de stéatose mais diminue la fibrose (Harrison *et al.*, 2003). Etant donné le rôle protecteur de la bétaine vis à vis de la stéatose hépatique chez le rat *via* l'augmentation de la S-adenosylméthionine, son efficacité dans le traitement de la NASH chez l'humain a été évaluée. Après un an de traitement avec de la bétaine, les concentrations d'aminotransférases et l'histologie hépatique étaient améliorées (Abdelmalek *et al.*, 2001).

6. L'acide ursodéoxycholique

L'acide ursodéoxycholique (UDCA : ursodeoxycholic acid) pourrait agir comme un agent hépatoprotecteur en minimisant la toxicité des acides biliaires et en diminuant le stress oxydant. Des études ont montré un effet bénéfique de l'UDCA chez des patients atteints de NASH. Cependant, la diminution des concentrations d'enzymes hépatiques n'était pas toujours associée à une amélioration de l'histologie hépatique (Laurin *et al.*, 1996, Lindor *et al.*, 2004, Dufour *et al.*, 2006).

A ce jour il n'existe donc pas de traitement spécifique des NAFLD, mais l'on peut supposer, étant donné l'implication de la mitochondrie dans le développement de ces pathologies, que des molécules agissant sur la fonction mitochondriale pourraient être des traitements efficaces. Le rimonabant, antagoniste des récepteurs aux endocannabinoïdes impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique et le resvératrol, un polyphénol présentant une action similaire à la restriction calorique, apparaissent comme des traitements pertinents de la stéatose hépatique.

VI. Le rimonabant comme traitement des NAFLD

Le composant naturel Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) dérivé de la plante *cannabis sativa* est responsable des effets psychotropes de la marijuana et a été utilisé en médecine bien avant que son mécanisme d'action soit découvert. Les effets anti-émétiques et inducteurs de l'appétit du cannabis sont connus depuis des siècles mais c'est seulement en 1964 qu'ils ont été

attribués au Δ^9 -THC (Gaoni et Mechoulam, 1964). L'isolement du principe actif de la marijuana, le Δ^9 -THC, a été la première étape dans l'identification d'un système endogène désormais connu sous le nom de système endocannabinoïde. Le récepteur cannabinoïde 1 (CB1 : cannabinoïd receptor type 1) cloné dans le cerveau de rat en 1988 (Devane *et al.*, 1988) est responsable de la plupart des effets de la marijuana au niveau du système nerveux central. Un second récepteur, CB2 (cannabinoïd receptor type 2), cloné en 1993 semble être le médiateur des effets immunomodulateurs de la marijuana (Munro *et al.*, 1993). L'existence de ligands endogènes de ces récepteurs, les endocannabinoïdes, a été mise en évidence par la découverte du *N*-arachidonoyléthanolamine (anandamide) et du 2-arachidonoylglycérol (2-AG) qui sont les deux principaux endocannabinoïdes (Devane *et al.*, 1992, Mechoulam *et al.*, 1995). Le système endocannabinoïde est impliqué dans des régulations permettant le maintien de l'homéostasie énergétique *via* des effets centraux mais également périphériques. L'implication de ce système dans le développement de l'obésité a, par conséquent, été beaucoup étudiée et a donné lieu à la mise au point d'antagonistes. Parmi ces antagonistes, le rimonabant, est apparu comme étant un traitement efficace de l'obésité et des complications associées même si ses effets secondaires ne sont pas encore bien appréhendés.

1. Le système endocannabinoïde

Schématiquement, le système endocannabinoïde est composé des récepteurs CB1 et CB2, des ligands endogènes (endocannabinoïdes) et des enzymes intervenant dans la synthèse et la dégradation des endocannabinoïdes (Piomelli, 2003, De Petrocellis *et al.*, 2004). Ce système a été extrêmement bien préservé au cours de l'évolution et est présent chez beaucoup d'espèces (De Petrocellis *et al.*, 1999, Onaivi *et al.*, 2002, McPartland *et al.*, 2006) à l'exception des insectes (McPartland *et al.*, 2001).

a) *Biosynthèse des endocannabinoïdes*

Les endocannabinoïdes sont synthétisés à partir de l'acide arachidonique (**Figure 18**). L'anandamide est synthétisée à partir de phospholipides membranaires selon deux réactions (Di Marzo *et al.*, 1994, Sugiura *et al.*, 1996, Cadas *et al.*, 1997). La première réaction est responsable de la formation de *N*-arachidonoyl-phosphatidyléthanolamine (*N*-ArPE) *via* le transfert d'une chaîne d'acyl-gras de la position sn-1 de glycérophospholipides au groupe amine de la phosphatidyléthanolamine. Cette réaction peut être catalysée par une *trans-N*-acyltransférase (NAT) dépendante du calcium associée à la membrane qui n'a pas encore été

identifiée précisément et par une NAT indépendante du calcium qui a récemment été caractérisée comme étant une RLP-1 (lecithin-retinol acyltransferase-like protein 1) (Jin *et al.*, 2007). La seconde réaction nécessaire à la synthèse de l'anandamide est une hydrolyse enzymatique de la *N*-ArPE catalysée par une *N*-acyl-phosphatidyléthanolamine-selective phospholipase D (NAPE-PLD) qui a récemment été clonée (Okamoto *et al.*, 2004). Le 2-AG est synthétisé à partir des *sn*-1-acyl-2-arachidonoylglycérols (DAGs) produits par l'hydrolyse soit du phosphoinositol bis-phosphate (PIP₂) catalysée par la PIP₂-selective phospholipase C soit de l'acide phosphatidique catalysée par l'acide phosphatidique phosphohydrolase (Piomelli, 2003, De Petrocellis *et al.*, 2004). Les DAGs sont ensuite convertis en 2-AG par des lipases sélectives des DAGs (Stella *et al.*, 1997). Contrairement aux autres neurotransmetteurs, les endocannabinoïdes sont très lipophiles et ne peuvent donc pas être stockés dans des vésicules lipidiques intracellulaires. Par conséquent ils sont synthétisés en fonction de la demande suite à une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire, à une dépolarisation membranaire ou encore suite à l'activation de certains récepteurs membranaires.

b) Dégradation des endocannabinoïdes

Après leur synthèse et libération, les endocannabinoïdes sont captés par les cellules *via* un transport facilité faisant intervenir un transporteur membranaire qui à ce jour n'a pas encore été caractérisé (Beltramo *et al.*, 1997, Hillard *et al.*, 1997). Une fois dans la cellule, les endocannabinoïdes sont dégradés par des enzymes spécifiques de leur nature chimique. La FAAH (fatty acid amide hydrolase) est essentiellement responsable de l'hydrolyse de l'anandamide en acide arachidonique et éthanolamine (Schmid *et al.*, 1985, Hillard *et al.*, 1995, Ueda *et al.*, 1995, Cravatt *et al.*, 1996). Le 2-AG, quant à lui, est hydrolysé par des monoacylglycérol lipases en acide arachidonique et glycérol (Goparaju *et al.*, 1999, Dinh *et al.*, 2002). L'acide arachidonique, l'éthanolamine et le glycérol sont recyclés en phospholipides membranaires afin d'être à nouveau utilisés, au moins en partie, dans la voie de biosynthèse des endocannabinoïdes.

c) Récepteurs aux cannabinoïdes et voies de signalisation

A ce jour, deux récepteurs aux cannabinoïdes ont été identifiés, CB1 et CB2 qui appartiennent à la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG) et qui présentent deux caractéristiques majeures (Howlett *et al.*, 2002). Premièrement, les

gènes codant pour ces récepteurs ne possèdent pas d'introns (Howlett *et al.*, 2002) et deuxièmement, l'homologie entre CB1 et CB2 est très faible (environ 48 %) et cela même dans les régions qui sont extrêmement conservées entre les différents membres de la famille des RCPG (Howlett *et al.*, 2002). La différence majeure entre les deux récepteurs se situe dans la partie extracellulaire qui est plus longue de 74 acides aminés concernant CB1.

• **Expression tissulaire des récepteurs aux cannabinoïdes**

Le récepteur CB1 présente une plus grande expression et plus large distribution tissulaire que CB2 (Baker *et al.*, 2006). Le récepteur CB1 est surtout exprimé au niveau du système nerveux central et représente ainsi le RCPG le plus exprimé au niveau central. Son expression est particulièrement abondante dans certaines régions cérébrales telles que les ganglions de la base, l'hippocampe, le système limbique, l'hypothalamus et le cortex (Herkenham *et al.*, 1990, Tsou *et al.*, 1998, Moldrich et Wenger, 2000, Lutz, 2002). Dans le système limbique, le récepteur CB1 est exprimé dans des régions contrôlant l'attractivité pour la nourriture et la motivation à la consommer, comme le noyau accumbens. Dans l'hypothalamus, le récepteur CB1 est exprimé dans les noyaux contrôlant la prise alimentaire. Par ailleurs, le récepteur CB1 est exprimé dans un grand nombre d'autres organes et en particulier dans les organes participant au maintien de l'homéostasie énergétique tels que le tractus gastro-intestinal (Izzo *et al.*, 2001, Pinto *et al.*, 2002), le foie (Osei-Hyiaman *et al.*, 2005), le pancréas (Matias *et al.*, 2006, Juan-Picó *et al.*, 2006), le muscle (Cavuoto *et al.*, 2007b) et le tissu adipeux (Cota *et al.*, 2003b, Bensaïd *et al.*, 2003). Le récepteur CB2, quant à lui, est principalement exprimé au niveau du système immunitaire (Baker *et al.*, 2006) et a récemment été trouvé exprimé à faible niveau dans le cerveau (Gong *et al.*, 2006). De par leur localisation différente, les récepteurs CB1 et CB2 semblent relayer des effets différents. CB1 apparaît comme étant spécifique des effets psychotropes et métaboliques des endocannabinoïdes alors que CB2 jouerait plutôt un rôle immunomodulateur.

• **Voies de signalisation du récepteur CB1**

Les récepteurs CB1 sont couplés à une protéine Gi/o et, de manière similaire à celle des récepteurs de la famille des RCPG, agissent sur l'activité cellulaire selon deux mécanismes principaux, la régulation de canaux ioniques et de l'activité de kinases intracellulaires (Howlett *et al.*, 2002, Howlett, 2004, Díaz-Laviada et Ruiz-Llorente, 2005). L'activation des récepteurs CB1 entraîne l'inhibition de canaux calciques de type N et P/Q (Mackie et Hille,

1992, Caulfield et Brown, 1992, Twitchell *et al.*, 1997) et l'ouverture de canaux potassiques ATP-dépendants (Mu *et al.*, 1999) aboutissant à une inhibition de l'activité neuronale et d'autres activités cellulaires dépendantes du calcium. La modification de l'activité de ces canaux ioniques est probablement due à une interaction directe avec les protéines Gi et Go du récepteur CB1 (Wilson et Nicoll, 2002) mais peut également faire intervenir, au moins pour les canaux potassiques, des seconds messagers (Robbe *et al.*, 2001, Azad *et al.*, 2003). L'activation des récepteurs CB1 entraîne également des modifications de cascades de signalisation intracellulaire. Les protéines Gi/o du récepteur induisent une inhibition de l'adénylate cyclase et ainsi une diminution de la concentration d'AMPc (Howlett *et al.*, 2002) aboutissant à une diminution de l'activité de la PKA. Par ailleurs, l'activation des récepteurs CB1 a des effets stimulants sur d'autres kinases telles que les MAPK et FAK (focal adhesion kinase) (Derkinderen *et al.*, 1996, Derkinderen *et al.*, 2003). *Via* la modulation de l'activité de ces kinases qui elles-mêmes régulent de nombreux facteurs de transcription tels que CREB (cAMP response element-binding), EGR1 (early growth response gene 1), c-Fos et c-Jun (Hoffman *et al.*, 2003), l'activation du récepteur CB1 module la transcription de gènes et a ainsi des effets à plus longs termes. Enfin, l'activation des récepteurs CB1 peut également stimuler la PI-3 kinase et la protéine kinase B (Howlett, 2002) impliquées dans la régulation du métabolisme énergétique et de la prolifération cellulaire.

d) Pharmacologie des récepteurs aux cannabinoïdes

Plusieurs agonistes non spécifiques ont été synthétisés (Lambert et Fowler, 2005), notamment des analogues structuraux du Δ^9 -THC tels que l'HU210 et le nabilone. Des antagonistes spécifiques des récepteurs CB1 ont été synthétisés (AM251, AM281, LY320135) avec parmi eux le SR141716A ou rimonabant (Rinaldi-Carmona *et al.*, 1994) (**Figure 18**).

2. Effets du blocage des récepteurs CB1 par du rimonabant sur l'homéostasie énergétique

Comme précisé précédemment le récepteur impliqué dans les effets des endocannabinoïdes sur la balance énergétique semble être CB1, CB2 ayant un rôle immunomodulateur. Les premiers résultats révélant l'impact des cannabinoïdes sur l'homéostasie énergétique et sur la régulation du poids corporel ont été obtenus par des études réalisées sur des fumeurs chroniques de marijuana dans des conditions contrôlées cliniquement. La consommation de

marijuana entraîne une augmentation de l'appétit, de la prise alimentaire et du poids (Greenberg *et al.*, 1976). Alors que la prise alimentaire redevenait normale au cours du protocole, le poids continuait à augmenter. Ces résultats laissent penser à l'existence d'effets indépendants de l'augmentation de la prise alimentaire sur la prise de poids. Ainsi une action périphérique des cannabinoïdes sur le métabolisme énergétique a été postulée. Des expériences de traitement avec un antagoniste des récepteurs CB1 (rimonabant) chez des rongeurs ont supporté ce postulat. En effet, le rimonabant induit une diminution de la prise alimentaire précoce et transitoire associée à une perte de poids qui elle est maintenue (**Tableau 4**). Des résultats similaires ont été obtenus avec un autre antagoniste des récepteurs CB1 (AM-251) chez des souris avec un régime induisant l'obésité (Hildebrandt *et al.*, 2003). Ces différentes données sont en faveur d'un effet indépendant de la prise alimentaire sur le métabolisme énergétique périphérique. Ainsi le système endocannabinoïde *via* CB1 est impliqué physiologiquement dans la régulation de l'homéostasie énergétique en régulant d'une part la prise alimentaire et d'autre part le métabolisme énergétique au niveau périphérique. Il est désormais bien admis que le blocage des récepteurs CB1 par du rimonabant entraîne une augmentation de la dépense énergétique totale chez des rats de poids normal (Kunz *et al.*, 2008), chez des souris *ob/ob* (Liu *et al.*, 2005) et chez des rats alimentés avec un régime riche en gras et en carbohydrates (Herling *et al.*, 2008a). De même la dépense énergétique est augmentée chez des rats non-obèses traités avec un autre antagoniste CB1, l'AVE1625 (Herling *et al.*, 2007) ainsi que chez des sujets humains obèses traités avec du taranabant qui est également un antagoniste CB1 (Addy *et al.*, 2008). Par ailleurs, les études cliniques concernant l'action du rimonabant ont montré qu'il n'induit pas seulement une perte poids, mais améliore également différents paramètres associés au syndrome métabolique tels que le profil lipidique et la sensibilité à l'insuline (Després *et al.*, 2005, Van Gaal *et al.*, 2005, Pi-Sunyer *et al.*, 2006, Scheen *et al.*, 2006, Hollander, 2007). De même chez la souris avec un régime riche en gras, le rimonabant améliore les paramètres biochimiques et lipidiques sanguins tels que les concentrations en leptine, insuline, glucose, triglycérides et LDL-cholestérol (Poirier *et al.*, 2005). Les effets du blocage des récepteurs CB1 par le rimonabant sur la prise alimentaire, le poids et autres paramètres associés au syndrome métabolique reposent entre autres sur le fait que le système endocannabinoïde est hyperactivé dans les organes impliqués dans le maintien de l'homéostasie énergétique lors du développement de l'obésité (Engeli, 2008, Di Marzo, 2008). En effet, les concentrations sanguines d'anandamide et de 2-AG sont augmentées chez des femmes obèses (Engeli *et al.*, 2005, Monteleone *et al.*, 2005). Le rimonabant *via* le blocage des récepteurs CB1 semble ainsi contrecarrer les effets

de l'hyperactivation du système endocannabinoïde observée dans le développement de l'obésité en agissant d'une part au niveau central principalement en régulant la prise alimentaire et d'autre part au niveau périphérique en régulant le métabolisme énergétique dans différents organes clés.

a) Effets du rimonabant sur la prise alimentaire

L'activation des récepteurs CB1 par des agonistes stimule la prise alimentaire même chez les animaux en état de satiété (Williams *et al.*, 1998, Williams et Kirkham, 1999, Hao *et al.*, 2000). En revanche, le blocage des récepteurs CB1 par le rimonabant atténue les effets stimulants des agonistes CB1 sur la prise alimentaire et diminue fortement la consommation de nourriture palatable chez les animaux nourris *ad libitum* et de nourriture normale chez les animaux en restriction calorique (Simiand *et al.*, 1998, Colombo *et al.*, 1998, Rowland *et al.*, 2001, Williams et Kirkham, 2002).

Au niveau central, les endocannabinoïdes stimulent la prise alimentaire selon deux mécanismes :

- Les endocannabinoïdes agissent sur la motivation à trouver de la nourriture et à s'alimenter, notamment en interagissant avec la voie mésolimbique (Cota *et al.*, 2003a). En effet, la voie dopaminergique mésolimbique est impliquée, entre autres, dans la motivation et dans les activités hédoniques en renforçant positivement les comportements apportant du plaisir. Les neurones dopaminergiques impliqués ne possèdent cependant pas de récepteurs CB1, mais sont inhibés par des neurones GABAergiques qui eux en possèdent (Fride, 2002). De ce fait, les endocannabinoïdes vont provoquer une levée de l'inhibition des neurones GABAergiques et par conséquent activer les neurones dopaminergiques.

- Suite à un jeûne de courte durée, les endocannabinoïdes régulent de façon transitoire l'expression ou l'action de médiateurs orexigènes et anorexigènes, conduisant ainsi à une stimulation de la prise alimentaire (Cota *et al.*, 2003a). Les effets centraux des endocannabinoïdes ont en partie été mis en évidence par l'utilisation de souris dont le gène codant pour le récepteur CB1 a été invalidé (Cota *et al.*, 2003b). Des expériences d'hybridation *in situ* ont mis en évidence, dans différentes zones de l'hypothalamus de souris contrôles, une colocalisation des ARNm de CB1 avec les ARNm de la CRH (corticotropin-releasing hormone), du CART (cocaïne-amphétamine-regulated transcript), de la pre-pro-orexine et de la MCH (melanin-concentrating hormone). Les souris CB1^{-/-} surexpriment l'ARNm de la CRH (inhibiteur de la prise alimentaire) dans le noyau paraventriculaire,

suggérant ainsi que les effets centraux des endocannabinoïdes peuvent être en partie relayés par la CRH. A l'opposé, ces souris CB1^{-/-} sous-expriment l'ARNm de CART (neuropeptide anorexigène) dans le noyau dorsomédian et dans l'aire hypothalamique latérale. Les auteurs ont émis l'hypothèse que cette diminution d'expression de CART pouvait être liée à la diminution de la concentration de leptine plasmatique qui est un régulateur positif de l'expression hypothalamique de CART. Chez des souris CART^{-/-}, le rimonabant ne diminue pas la prise alimentaire, illustrant ainsi une influence directe des endocannabinoïdes sur l'expression et/ou la fonction du neuropeptide CART (Di Marzo et Matias, 2005). En revanche, le niveau d'expression de l'ARNm du neuropeptide Y (NPY) n'est pas altéré chez les souris CB1^{-/-}, suggérant que l'effet des endocannabinoïdes sur la prise alimentaire est indépendant du NPY.

Outre son action sur les neuropeptides centraux, la voie endocannabinoïde semble moduler la prise alimentaire en interagissant avec le nerf vague qui connecte le tractus gastro-intestinal aux noyaux du tronc cérébral impliqués dans le contrôle de la satiété. Ainsi, un jeûne de courte durée chez le rat stimule la synthèse d'anandamide dans le duodénum qui pourrait agir sur les fibres capsaicin-sensibles du nerf vague et réguler la satiété *via* la cholecystokinine (Kunos et Pacher, 2004).

b) Effets du rimonabant au niveau du tissu adipeux

L'effet du rimonabant sur le tissu adipeux se manifeste selon deux mécanismes. Premièrement, le rimonabant induit une diminution de l'effet des endocannabinoïdes, sécrétés localement par les adipocytes, sur la lipogenèse et le stockage de triglycérides. Deuxièmement, le rimonabant induit une augmentation de la libération de l'adiponectine dont la sécrétion est inhibée par les endocannabinoïdes.

• Hyperactivation du système endocannabinoïde dans le tissu adipeux et obésité :

L'expression de plusieurs facteurs impliqués dans le métabolisme est altérée dans les tissus adipeux brun et blanc de souris nourries avec un régime induisant une obésité et ces altérations ne sont pas observées lorsque les récepteurs CB1 sont bloqués soit génétiquement soit pharmacologiquement (Jbilo *et al.*, 2005). Ces observations suggèrent une hyperactivation de la signalisation CB1 dans le tissu adipeux en cas d'obésité. En effet, le niveau d'endocannabinoïdes et/ou des récepteurs CB1 est augmenté dans le tissu adipeux de rongeurs obèses (Bensaid *et al.*, 2003, Matias *et al.*, 2006). Par ailleurs, des préadipocytes

murins (3T3-F442A) traités avec de fortes concentrations en insuline se différencient en adipocytes hypertrophiés et présentent des concentrations augmentées de récepteurs CB1, de 2-AG mais pas de l'anandamide comparés à ceux des préadipocytes (Matias *et al.*, 2006). De même, des adipocytes isolés de tissu adipeux épидидymal de souris obèses présentent des concentrations augmentées de 2-AG mais pas d'anandamide (Matias *et al.*, 2006).

• **Rimonabant et lipogenèse adipocytaire :**

Le système endocannabinoïde participe à la lipogenèse et au stockage de triglycérides dans le tissu adipeux selon plusieurs mécanismes et ces effets sont contrecarrés par le blocage des récepteurs CB1. En effet, des souris dont le gène codant pour CB1 est inactivé présentent une quantité de masse grasse plus faible et une quantité de masse maigre plus élevée que des souris sauvages (Cota *et al.*, 2003b). Par ailleurs, le traitement par du rimonabant de souris nourries avec un régime riche en gras entraîne une diminution de plus de 50 % de la masse du tissu adipeux ainsi qu'une diminution de la taille des adipocytes (Jbilo *et al.*, 2005). Une autre étude sur des rates Wistar nourries avec un régime riche en gras et en carbohydrates et traitées avec du rimonabant a montré une diminution de la masse grasse par rapport à des rates, avec le même régime, non traitées mais également par rapport à des rates appariées aux rates traitées pour la prise alimentaire, suggérant ainsi un effet indépendant de la diminution de la prise alimentaire (Herling *et al.*, 2008b). Différents mécanismes ont été mis en évidence pour expliquer l'activation de la lipogenèse et du stockage de triglycérides dans le tissu adipeux par les endocannabinoïdes. Le traitement d'adipocytes isolés de souris C57BL/6N avec un agoniste des récepteurs CB1, le WIN-55,212, induit une augmentation de l'activité de la LPL et cet effet est annulé par un traitement concomitant avec du rimonabant (Cota *et al.*, 2003b). Cette observation suggère que le blocage des récepteurs CB1 par du rimonabant peut limiter l'activité de la LPL et ainsi diminuer l'hydrolyse des triglycérides et l'entrée d'acides gras dans l'adipocyte. Par ailleurs, le système endocannabinoïde stimule le captage du glucose, basal et stimulé par l'insuline, augmentant ainsi l'entrée du substrat pour la lipogenèse *de novo* dans l'adipocyte (Gasperi *et al.*, 2007, Pagano *et al.*, 2007) et cet effet est annulé par le rimonabant (Pagano *et al.*, 2007). Le système endocannabinoïde semble ainsi impliqué dans la lipogenèse adipocytaire, ce qui est appuyé par le fait que l'expression de l'ARNm de CB1 corrèle positivement avec celle de l'ARNm de SREBP-1c (Blüher *et al.*, 2006). De même, la stimulation des récepteurs CB1 dans les adipocytes entraîne l'inhibition de l'activité de l'AMPK (Kola *et al.*, 2005). L'augmentation des acides gras libres sanguins observée lors du

blocage des récepteurs CB1 chez des rats pourrait également illustrer une augmentation de la lipolyse adipocytaire (Herling *et al.*, 2007, Herling *et al.*, 2008b). Dans le tissu adipeux blanc de souris alimentées avec un régime riche en gras, un traitement par du rimonabant induit l'expression d'ARNm de gènes impliqués dans l'oxydation des acides gras et la fonction mitochondriale tels que la carnitine acyltransférase, la CPT II, l'acetyl-CoA hydratase, la sous-unité IVa de la cytochrome *c* oxydase et l'ANT (Jbilo *et al.*, 2005). Dans le tissu adipeux brun des souris de la même étude, le rimonabant entraîne une augmentation de l'expression d'ARNm de gènes codant pour des complexes de la chaîne respiratoire incluant les complexes I, III et l'ATP synthase. Dans le tissu adipeux brun de rats traités avec du rimonabant l'expression de la protéine UCP1 est augmentée (Verty *et al.*, 2009). Par ailleurs, le rimonabant entraîne une augmentation de la biogenèse mitochondriale dans le tissu adipeux blanc, en induisant l'expression de la NO synthase endothéliale (Tedesco *et al.*, 2008).

• **Rimonabant et production d'adiponectine :**

La stimulation des récepteurs CB1 par l'agoniste pharmacologique HU210 ou par les endocannabinoïdes sécrétés par les adipocytes entraîne une diminution de l'expression de l'ARNm de l'adiponectine dans des adipocytes murins 3T3-F442A et dans le tissu adipeux de rats Zucker alors que le blocage des récepteurs CB1 par du rimonabant induit une augmentation de l'expression et de la sécrétion d'adiponectine (Bensaid *et al.*, 2003, Matias *et al.*, 2006, Gary-bobo *et al.*, 2006). L'augmentation de la production d'adiponectine par le rimonabant pourrait contribuer à l'amélioration de la sensibilité à l'insuline observée avec un traitement par du rimonabant.

c) *Effets du rimonabant au niveau du muscle*

Un traitement chronique de souris *ob/ob* avec du rimonabant entraîne une amélioration de l'entrée du glucose dans le muscle soleus isolé (Liu *et al.*, 2005). Par ailleurs, la faible expression du récepteur CB1 en condition physiologique dans le muscle soleus de souris augmente quand les souris sont alimentées avec un régime riche en gras (Pagotto *et al.*, 2006). Quoi qu'il en soit, il reste à déterminer si l'effet du rimonabant sur le muscle est un effet direct ou un effet indirect médié par l'adiponectine. Une étude sur des cultures primaires de myotubes issus de patients obèses ou non, a montré que le traitement par un antagoniste des récepteurs CB1 (AM251) induisait une augmentation de l'expression de l'AMPK α 1 mais

également une diminution de l'expression de la PDK4 suggérant ainsi une augmentation de l'oxydation du glucose (Cavuoto *et al.*, 2007a).

d) Effets du rimonabant au niveau du foie

Un régime riche en gras chez des souris entraîne une hyperactivation du système endocannabinoïde illustrée par une augmentation de la concentration d'anandamide due à une diminution de l'activité de la FAAH responsable de sa dégradation ainsi que par l'augmentation de l'expression du récepteur CB1 (Osei-Hyiaman *et al.*, 2005). L'activation *in vivo* des récepteurs CB1 avec l'agoniste HU210 chez des souris induit l'augmentation de l'expression de gènes codant pour des facteurs impliqués dans la lipogenèse tels que SREBP-1c, ACC1 et FAS (Osei-Hyiaman *et al.*, 2005). Dans cette même étude, l'augmentation de l'expression de ces gènes, n'est pas retrouvée chez des souris dont le gène codant pour CB1 a été inactivé, suggérant ainsi que l'effet observé est dépendant des récepteurs CB1. La synthèse d'acides gras mesurée *in vivo* chez la souris sauvage (CB1+/+) et *in vitro* dans des hépatocytes isolés est stimulée par un agoniste des récepteurs CB1 (HU210) et cet effet est annulé par un traitement avec du rimonabant (Osei-Hyiaman *et al.*, 2005). Chez les souris CB1-/-, cet effet n'est pas retrouvé, illustrant également un effet médié par le récepteur CB1. Par ailleurs, les souris sauvages (CB1+/+) alimentées avec un régime riche en gras développent une stéatose hépatique, ce qui n'est pas le cas pour les souris CB1-/- (Osei-Hyiaman *et al.*, 2005). De même le blocage des récepteurs CB1 par du rimonabant diminue la stéatose hépatique chez des rats Zucker obèses (Gary-Bobo *et al.*, 2007). Récemment Osei-Hyiaman *et al.* (2008), ont montré que le traitement de souris avec un agoniste des récepteurs CB1 (HU210) entraîne une diminution de l'activité de la CPT I et que cet effet est contrecarré par du rimonabant. Le rimonabant, en inhibant la lipogenèse et en activant l'oxydation des acides dans le foie, participe à la diminution de l'accumulation de triglycérides hépatiques associée à un régime riche en gras.

Le blocage des récepteurs CB1 par ses actions multiples, centrales et périphériques, sur différents organes, permet non seulement une diminution du poids mais également une amélioration du profil lipidique et de la sensibilité à l'insuline (**Figure 19**).

VII. *Le resvératrol comme traitement des NAFLD*

Le resvératrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) est un polyphénol de la classe des stilbènes (**Figure 20**) initialement isolé à partir de racines de vétrate blanc (*Veratrum grandiflorum*) puis à partir de racines de *Polygonium cuspidatum*, une plante utilisée dans la médecine chinoise et japonaise traditionnelle (Takaoka, 1940, Nomomura *et al.*, 1963). En outre, le resvératrol est présent dans certains fruits tels que le raisin, les mûres et les cacahuètes. Initialement caractérisé comme une phytoalexine (composant toxique produit par les plantes en réponse à une infection ou à d'autres stress tels qu'une privation de nutriments), le resvératrol n'attirait que peu d'intérêt, jusqu'au moment où il fut postulé qu'il pouvait être la clé du "paradoxe français" défini par les effets cardioprotecteurs du vin rouge (Sieman et Creasy, 1992, Kopp, 1998). Depuis de nombreuses études ont mis en évidence que le resvératrol pouvait prévenir ou ralentir la progression d'une large variété de pathologies telles que le cancer (Jang *et al.*, 1997), les maladies cardiovasculaires (Bradamante *et al.*, 2004), les ischémies cérébrales (Wang *et al.*, 2002, Sinha *et al.*, 2002) et pouvait également améliorer la résistance au stress et augmenter la durée de vie de nombreux organismes, de la levure aux vertébrés (Howitz *et al.*, 2003, Valenzano *et al.*, 2006). Chez la souris, le resvératrol prévient la prise de poids et améliore la sensibilité à l'insuline dans le contexte d'un régime riche en gras (Baur *et al.*, 2006, Lagouge *et al.*, 2006). Les mécanismes par lesquels le resvératrol exerce ces effets bénéfiques ne sont pas encore complètement identifiés. Hormis son activité antioxydante intrinsèque (Tadolini *et al.*, 2000, López-Vélez *et al.*, 2003), le resvératrol régule l'activité de différentes enzymes, incluant la sirtuine SIRT1 dont il est activateur allostérique (**Tableau 5**).

1. Les sirtuines

La restriction calorique permet d'allonger la durée de vie et de diminuer l'incidence de pathologies associées au vieillissement telles les maladies cardiovasculaires, le diabète et le cancer dans des modèles animaux (Masoro, 2000, Bordone et Guarente, 2005). Même si l'effet bénéfique de la restriction calorique chez les mammifères est bien connu, les mécanismes moléculaires impliqués ne sont pas complètement élucidés (Koubova et Guarente, 2003). Cependant, une famille de protéines très conservées, les sirtuines, semblent être d'importants médiateurs des effets bénéfiques de la restriction calorique. Le premier membre de la famille des sirtuines mis en évidence chez *Saccharomyces cerevisiae* est la protéine Sir2 (silent information regulator 2), une histone déacétylase dépendante du NAD⁺

(Imai *et al.*, 2000, Landry *et al.*, 2000, Smith *et al.*, 2000). Les sirtuines déacétylases catalysent une réaction couplant la déacétylation d'une lysine à l'hydrolyse du NAD⁺. Le fait que le fonctionnement des sirtuines soit dépendant du NAD⁺ suggère que cette activité enzymatique est directement liée au statut énergétique cellulaire (Anderson *et al.*, 2003, Bitterman *et al.*, 2002, Lin SJ *et al.*, 2000, Lin SJ *et al.*, 2002, Lin *et al.*, 2004). Chez *S. cerevisiae*, il existe quatre sirtuines (Hst1-Hst4 : homologues of Sir two 1-4) en plus de Sir2, alors que chez la souris et l'homme sept sirtuines ont été identifiées (SIRT1-7) (**Tableau 6**). Même si, la sirtuine la plus étudiée est SIRT1, de plus en plus d'études montrent l'importance des autres sirtuines dans la régulation de l'homéostasie énergétique, notamment les sirtuines 3 et 4 localisées dans la mitochondrie.

a) SIRT1 et métabolisme

SIRT1 a été montrée comme jouant un rôle régulateur important dans l'homéostasie glucidique et lipidique. Dans le tissu adipeux, SIRT1 inhibe l'adipogenèse à partir des pré-adipocytes et diminue le stockage de triglycérides dans les cellules différenciées, en inhibant la transcription de PPAR γ (Picard *et al.*, 2004). En effet, SIRT1 en se liant à NCoR (nuclear receptor corepressor) et à SMRT (silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptor) forme un complexe SIRT1/NCoR/SMRT qui réprime la transcription de PPAR γ en se fixant sur les régions régulatrices transcriptionnelles (Picard *et al.*, 2004). Dans les cellules β pancréatiques, SIRT1 est un régulateur positif de la sécrétion d'insuline en augmentant la synthèse d'ATP *via* la répression du gène codant pour UCP2 (Moynihan *et al.*, 2005, Bordone *et al.*, 2006). Dans le foie, SIRT1 régule la néoglucogenèse en activant PGC1 α et FOXO1, tous deux impliqués dans la régulation de la transcription de gènes codant pour des enzymes clés de la néoglucogenèse (Rodgers *et al.*, 2005, Frescas *et al.*, 2005). L'inactivation spécifiquement hépatique du gène codant pour SIRT1 entraîne une hypoglycémie, une diminution de la production hépatique de glucose, une diminution du cholestérol sanguin et une augmentation des acides gras libres hépatiques et ces changements sont corrélés à une diminution de l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la néoglucogenèse, l'oxydation des acides gras et la dégradation du cholestérol (Rodgers et Puigserver, 2007).

b) SIRT3 et métabolisme

Initialement, SIRT3 a été identifiée au niveau de la mitochondrie, puis il a été démontré l'existence d'une forme de SIRT3 nucléaire qui est transloquée dans la mitochondrie en situation de stress cellulaire (Onyango *et al.*, 2002, Schwer *et al.*, 2002, Scher *et al.*, 2007). Chez la souris, la restriction calorique induit une augmentation de l'expression de SIRT3 dans les tissus adipeux brun et blanc (Shi *et al.*, 2005). L'exposition au froid induit également l'expression de SIRT3 dans le tissu adipeux brun (Shi *et al.*, 2005). L'expression constitutive de SIRT3 dans des adipocytes bruns (HIB1B) entraîne l'augmentation de l'expression de PGC1 α et d'UCP1 ainsi qu'une augmentation de la consommation d'oxygène mitochondriale associée à une diminution du potentiel de membrane mitochondrial (Shi *et al.*, 2005). Ces données suggèrent que SIRT3 est impliquée dans la régulation de la fonction mitochondriale et par conséquent de la thermogénèse adaptative dans le tissu adipeux brun. Récemment, une hyperacétylation des protéines mitochondriales a été mise en évidence chez des souris dont le gène codant pour SIRT3 a été inactivé (Lombard *et al.*, 2007). De manière surprenante, les souris SIRT3 $^{-/-}$ de l'étude précédente malgré l'hyperacétylation des protéines mitochondriales ne présentent pas de défauts métaboliques majeurs. Dans le foie de souris SIRT3 $^{-/-}$, l'acétylation du complexe I de la chaîne respiratoire est augmentée et associée à une diminution de la consommation d'oxygène mitochondriale avec des substrats du complexe I (glutamate + malate) suggérant ainsi que SIRT3 pourrait être impliquée dans la régulation du fonctionnement mitochondrial *via* la déacétylation du complexe I (Ahn BH *et al.*, 2008).

c) SIRT4 et métabolisme

SIRT4 est dépourvue d'activité déacétylase mais présente une activité mono-ADP-ribosyltransférase (Haigis *et al.*, 2006, Ahuja *et al.*, 2007). SIRT4 inhibe l'activité enzymatique de la glutamate déshydrogénase (GDH) par une ADP-rybosylation (Haigis *et al.*, 2006). La GDH est impliquée dans la conversion du glutamate en α -kétoglutarate, un intermédiaire du cycle de Krebs. Dans les cellules β pancréatiques, le cycle de Krebs permet de connecter le statut nutritionnel à la sécrétion d'insuline. En effet, le glucose et les acides aminés entraînent une augmentation du flux du cycle de Krebs et ainsi une augmentation de la production d'ATP par la chaîne respiratoire mitochondriale. L'augmentation du rapport ATP/ADP permet l'ouverture des canaux potassiques dépendants de l'ATP, qui eux-mêmes une fois activés vont permettre l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants, aboutissant ainsi à la libération d'insuline par exocytose. L'inhibition de SIRT4 par un ARNi

dans des cellules productrices d'insuline (INS-1E) est associée à une augmentation de la production d'insuline alors que la surexpression de SIRT4 inhibe la production d'insuline (Ahuja *et al.*, 2007). De même, des souris dont le gène codant pour SIRT4 a été inactivé, présentent une diminution du taux d'ADP-rybosylation de la GDH associée à une augmentation de son activité ainsi qu'une augmentation de la sécrétion d'insuline stimulée par les acides aminés (Haigis *et al.*, 2006). Cet effet de SIRT4 sur la sécrétion d'insuline semble opposé à celui de SIRT1 qui augmente la sécrétion d'insuline. En fait, l'activité de SIRT4 est diminuée dans les cellules β pancréatiques au cours de la restriction calorique, et des îlots pancréatiques isolés de souris en restriction calorique, présentent une augmentation de la sécrétion d'insuline stimulée par les acides aminés (Haigis *et al.*, 2006).

SIRT4 est exprimée de manière ubiquitaire et a probablement d'autres rôles dans d'autres organes que le pancréas. Dans le foie, la GDH participe à la régulation de la néoglucogenèse et est activée en situation de restriction calorique (Hagopian *et al.*, 2003). Cette augmentation de l'activité de la GDH au cours de la restriction calorique peut être due à une diminution de l'expression de SIRT4. Par ailleurs, SIRT4 interagit avec d'autres protéines mitochondriales, l'ANT2, l'ANT3 et l'IDE (insulin-degrading enzyme), mais la conséquence biologique de ces interactions reste à déterminer (Ahuja *et al.*, 2007).

d) Sirtuines et régulation des acétyl-CoA synthétases

Chez les mammifères, l'acétate provient de sources exogènes (fermentation bactérienne dans l'intestin et source alimentaire telle que le vinaigre) et endogènes (métabolisme de l'éthanol, conversion de l'acétyl-CoA par l'acétyl-CoA hydrolase, hydrolyse de l'acétylcholine par les acétylcholinestérases, déacétylation de lysine par les déacétylases) (Buckley et Williamson, 1977, Wolfe, 2005). L'acétate peut être converti en acétyl-CoA par des acétyl-CoA synthétases (AceCS) dans le cytoplasme (AceCS1) ou dans la mitochondrie (AceCS2). L'acétyl-CoA formé peut être utilisé pour la synthèse des acides gras et du cholestérol ou peut entrer dans le cycle de Krebs. Chez *Salmonella enterica*, l'activité catalytique des AceCS est régulée par acétylation. En effet, l'homologue bactérien de Sir2 chez la levure, CobB, déacétyle et ainsi active AceCS (Tsang et Escalante-Semerena, 1998, Starai *et al.*, 2002, Starai et Escalante-Semerena, 2004). Le mode de régulation des AceCS découvert chez la bactérie semble être conservé chez les mammifères (Schwer *et al.*, 2006, Hallows *et al.*, 2006). En effet, il a été mis en évidence que AceCS1 est activée par déacétylation par SIRT1 et AceCS2 par SIRT3 (Schwer *et al.*, 2006, Hallows *et al.*, 2006).

L'expression d'AceCS1 est ubiquitaire mais est plus élevée dans les reins, les ovaires, les testicules et le foie, organes dans lesquels elle est induite par SREBP (Luong *et al.*, 2000, Ikeda *et al.*, 2001). L'activité de l'AceCS1 augmente en parallèle de la concentration d'insuline en réponse à un régime riche en carbohydrates visant à induire la synthèse d'acides gras (Sone *et al.*, 2002). L'augmentation du niveau de SIRT1 durant le jeûne et la restriction calorique peut conduire à l'activation par déacétylation de l'AceCS1 et ainsi fournir de l'acétyl-CoA pour la synthèse des acides gras. En effet, la surexpression de SIRT1 induit une augmentation de la synthèse des acides gras à partir de l'acétate (Hallows *et al.*, 2006). Le fait que l'expression de l'AceCS1 est diminuée dans le foie durant le jeûne (Sone *et al.*, 2002), peut expliquer pourquoi dans ces conditions, la synthèse d'acides gras est diminuée dans le foie.

L'AceCS2 est exprimée dans le cœur, les reins et les muscles squelettiques mais pas dans le foie. Etant donné que les mitochondries hépatiques sont un lieu de production d'acétate *via* la cétogenèse, si l'AceCS2 était exprimée, elle générerait un cycle futile dans lequel l'acétate serait retransformé en acétyl-CoA à défaut d'être exporté vers les tissus comme source énergétique. La surexpression de l'AceCS2 entraîne une augmentation de l'oxydation illustrée par une génération de CO₂ (Fujino *et al.*, 2001, Hallows *et al.*, 2006). L'AceCS2 permet ainsi la formation d'acétyl-CoA qui va entrer dans le cycle de Krebs afin de fournir des coenzymes réduits à la chaîne respiratoire mitochondriale. Dans des conditions de restriction calorique et de cétogenèse, l'acétyl-CoA généré par la dégradation des acides gras dans le foie est utilisé afin de produire des corps cétoniques exportés vers les tissus extra-hépatiques. L'expression de l'AceCS2 est induite dans les tissus extra-hépatiques dans des conditions de cétogenèse et son activité est potentiellement stimulée par SIRT3 dans ces mêmes conditions, afin de permettre la transformation d'acétate en acétyl-CoA (Fujino *et al.*, 2001).

2. Resvératrol et stéatose hépatique

La restriction calorique associée à l'activité physique semble être l'option la plus efficace afin de traiter le syndrome métabolique et la stéatose hépatique pouvant lui être associée. Cependant la restriction calorique est difficile à mettre en place et à maintenir chez les patients présentant ces pathologies. Le resvératrol ayant une action mimant la restriction calorique, semble être un traitement pertinent de la stéatose hépatique (Ingram *et al.*, 2006, Pearson *et al.*, 2008). En effet, le resvératrol entraîne une diminution de l'accumulation de lipides dans le foie que ce soit dans des modèles animaux ou cellulaires de stéatose hépatique (Zang *et al.*, 2006, Baur *et al.*, 2006, Shang *et al.*, 2008, Bujanda *et al.*, 2008, Ahn J *et al.*,

2008, Hou *et al.*, 2008, Wang *et al.*, 2009). L'action bénéfique du resvératrol sur la stéatose hépatique se manifeste par une diminution de la lipogenèse hépatique. En effet, le resvératrol annule l'augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la lipogenèse (SREBP-1c, FAS, ACC), induite dans des modèles animaux ou cellulaires de stéatose hépatique (Ahn J *et al.*, 2008, Shang *et al.*, 2008, Wang *et al.*, 2009). En outre, une étude récente a mis en évidence que le resvératrol induisait une diminution de la synthèse des acides gras *in vitro* dans des hépatocytes de rats isolés (Gnoni et Paglialonga, 2009). Chez des souris soumises à un régime riche en gras, la surexpression de SIRT1 entraîne une diminution de la stéatose hépatique ainsi qu'une diminution de l'expression de SREBP-1c (Pfluger *et al.*, 2008), suggérant ainsi que les effets du resvératrol sur la lipogenèse seraient dépendants de SIRT1. En effet, l'inhibition de la lipogenèse par le resvératrol est médiée par SIRT1 qui conduit à l'activation de l'AMPK *via* l'AMPK kinase, LKB1 (Hou *et al.*, 2008).

3. Resvératrol et fonction mitochondriale

Un des mécanismes par lesquels le resvératrol diminuerait la stéatose hépatique pourrait passer par une augmentation de la fonction mitochondriale afin d'augmenter la consommation de substrats énergétiques notamment des acides gras. Une première étude a mis en évidence que le resvératrol induit une diminution de l'acétylation de PGC1 α associée à une augmentation du nombre de mitochondries que ce soit dans le foie de souris alimentées avec un régime riche en gras (évalué par microscopie électronique) ou dans les cellules HeLa (évalué avec la sonde fluorescente Mitotracker) (Baur *et al.*, 2006). Une seconde étude a mis en évidence une augmentation de la quantité d'ADNmt dans le muscle et le tissu adipeux brun de souris alimentées avec un régime riche en gras et traitées avec du resvératrol (Lagouge *et al.*, 2006). La quantité d'ADNmt dans le foie de ces souris ne varie pas malgré une augmentation de l'expression de PGC1 α . Dans le muscle gastrocnémien de ces souris traitées avec du resvératrol, l'ARNm et la protéine de PGC1 α sont augmentés ainsi que les ARNm de NRF1 et TFAM. Par ailleurs, cette étude a mis en évidence une diminution de l'acétylation de PGC1 α dans le muscle médiée par SIRT1. Le resvératrol *via* SIRT1 semble ainsi augmenter la biogenèse mitochondriale.

MATERIEL ET METHODES

A – TRAVAUX SUR MODELES ANIMAUX

I. Animaux et modèles

Les expérimentations animales ont été réalisées selon les recommandations de la convention européenne sur la protection des animaux vertébrés utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques. Les animaux ont été hébergés à l'animalerie du centre hospitalier universitaire d'Angers dans des pièces contrôlées en température ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) avec un cycle jour/nuit de 12:12 h.

1. Rats Zucker

Les rats mâles de la souche Zucker obèses (*fa/fa*) et contrôles (*fa/+*) ont été fournis par Charles Rivers (L'Arbresle, France). Les animaux ont eu un libre accès à l'eau et à la nourriture standard (U-A-R A04; Epinay-sur-Orge, France), dont la composition est détaillée dans le **Tableau 7**. Pour cette étude, les rats ont été sacrifiés à l'âge de 11 semaines. La nuit précédant le jour d'expérimentation, la nourriture a été retirée de la cage. Les rats ont été anesthésiés par inhalation d'isoflurane et du sang a été prélevé en intracardiaque. Après sacrifice par décapitation, le foie a été prélevé et pesé. Une partie a été congelée à -80°C et une autre placée dans du tampon d'isolement froid (*cf partie A-II-2*).

2. Rats nourris avec un régime riche en gras pendant différentes durées

Les rats mâles de la souche Sprague-Dawley sont issus de l'élevage de l'animalerie du centre hospitalier universitaire d'Angers. A l'âge de 2 mois, des rats ont été mis sous régime riche en gras (UPAE, Jouy-en-Josas) à base de 35 % de saindoux (**Tableau 7**). Les animaux ont eu un libre accès à l'eau et à la nourriture. Les rats ont été sacrifiés après 0 (contrôles), 2, 4, ou 8 semaines de régime riche en gras. La nuit précédant le jour d'expérimentation, la nourriture a été retirée de la cage. Les rats ont été anesthésiés par inhalation d'isoflurane et du sang a été prélevé en intracardiaque. Après sacrifice par décapitation, le foie a été prélevé et pesé. Une partie a été congelée à -80°C et une autre placée dans du tampon d'isolement froid (*cf partie A-II-2*). Le tissu adipeux épидидymaire ou fat pad a également été prélevé et pesé.

3. Rats nourris avec un régime riche en gras et traités avec du rimonabant

Des rats mâles de la souche Sprague-Dawley âgés de 2 mois ont été alimentés avec un régime riche en gras (**Tableau 7**) pendant 13 semaines. Pendant les 3 dernières semaines de régime riche en gras, les rats ont été divisés en 3 groupes :

- un groupe "rimonabant", dans lequel les rats ont été traités avec du rimonabant [*N*-piperidino-5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-méthylpyrazole-3-carboxamide] (Sanofi-Synthelabo, Montpellier, France). L'administration du rimonabant a été faite par voie orale, à raison de 10 mg/kg/jour dilué dans une solution à 0,1 % de Tween 80 (Sigma Aldrich, Lyon, France) de manière à obtenir un volume final de 1 ml. Le traitement a été réalisé juste avant le début de la phase "nuit" de l'animalerie. Une solution de rimonabant a été préparée tous les jours juste avant le traitement.

- un groupe "pair-fed", dans lequel chaque rat a reçu la même quantité de nourriture que le rat traité avec du rimonabant lui correspondant ainsi que le diluant (1 ml). Le fait que les rats aient consommé la totalité de la nourriture a été vérifié chaque jour.

- un groupe "témoin", dans lequel les rats ont seulement reçu le diluant (1 ml).

Durant la période de traitement le poids et la prise alimentaire ont été mesurés quotidiennement. La nuit précédant le jour d'expérimentation, la nourriture a été retirée de la cage. Les rats ont été anesthésiés par inhalation d'isoflurane et du sang a été prélevé en intracardiaque. Après sacrifice par décapitation, le foie a été prélevé et pesé. Une partie a été congelée à -80°C et une autre placée dans du tampon d'isolement froid (*cf partie A-II-2*). Le tissu adipeux épидидymaire ou fat pad a également été prélevé et pesé.

II. Isolement des mitochondries de foie

1. Principe

La procédure d'isolement des mitochondries repose sur la technique de fractionnement cellulaire par centrifugation différentielle adaptée de la méthode de Krähenbühl *et al.* (1994).

2. Réactifs

Tampon d'isolement :

	Masse molaire (g/mol)	Concentration finale (mM)	Masse (g) qsp 1 L d'eau distillée
Saccharose	342,3	100	34,23
KCl	74,55	50	3,73
Tris base	121,14	50	6,06
EGTA	380,4	5	1,90

Le pH est ajusté à 7,4 avec de l'HCl 5 M et le tampon est conservé à 4°C pendant 3 mois.

3. Protocole

Après prélèvement, le morceau de foie dédié à l'isolement des mitochondries est pesé et placé dans du tampon d'isolement à 4°C. Toutes les étapes sont ensuite réalisées dans une chambre froide à 4°C. Le foie est finement haché à l'aide de ciseaux puis rincé trois fois avec du tampon d'isolement (8 volumes). La préparation est ensuite homogénéisée au Potter (7 allers-retours, 1000 tours/min) dans du tampon d'isolement (10 ml/g de tissu). L'homogénat obtenu est centrifugé à 600 g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est filtré sur une couche de gaze et centrifugé à 7000 g pendant 10 min à 4°C. Le culot est ensuite repris dans 10 volumes de tampon d'isolement et la suspension est centrifugée à 3500 g pendant 10 min à 4°C. Le culot est repris dans un minimum de tampon d'isolement (0,25 ml par gramme de tissu) et conservé dans la glace.

III. Dosage protéique

1. Principe

La concentration en protéines de la suspension mitochondriale est dosée selon une méthode colorimétrique utilisant l'acide bicinchoninique (BC Assay kit, Interchim, Montluçon,

France). Ce dosage consiste en la réduction des ions Cu^{2+} en Cu^+ par les liaisons peptidiques des protéines. L'acide bicinchoninique chélate les ions Cu^+ avec une très forte spécificité aboutissant à la formation d'un complexe soluble coloré en violet. La réduction des ions Cu^{2+} en Cu^+ par les protéines peut être ainsi mesurée par lecture de l'absorbance à 562 nm. La concentration en protéines de l'échantillon peut alors être calculée à l'aide d'une gamme étalon obtenue avec des concentrations connues de BSA (0,25 et 0,50 mg/ml).

2. Protocole

Les échantillons sont dilués dans du tampon d'isolement à deux concentrations différentes (1/50 à 1/125). Une gamme de BSA (0,25 et 0,50 mg/ml) est réalisée dans du tampon d'isolement à partir de la solution stock de 2 mg/ml. Une solution de travail est préparée à partir du réactif A (49 volumes) contenant l'acide bicinchoninique et du réactif B (1 volume) contenant du sulfate de cuivre. Pour chaque échantillon, points de gamme et blanc (tampon d'isolement), 50 μl sont ajoutés dans 1 ml de solution de travail. Après une incubation de 30 minutes à 37°C, l'absorbance est mesurée à 562 nm avec un spectrophotomètre (Thermo Scientific, Perbio, Brebières, France).

IV. Mesure de la consommation d'oxygène mitochondriale

1. Principe

La consommation d'oxygène de mitochondries isolées est mesurée par polarographie sur l'oxygraphe *Oxytherm* (Hansatech instruments, Cergy Pontoise, France) composé d'une chambre de mesure thermostatée (37°C) et d'une électrode sensible à l'oxygène (électrode de Clark) reliée à un ordinateur permettant ainsi de visualiser la concentration d'oxygène (nmol/ml) en fonction du temps (minutes).

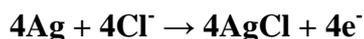
a) Principe de l'électrode de Clark

L'électrode de Clark est composée d'une cathode en platine polarisée à -0,6 V et d'une anode en argent reliées par un électrolyte (KCl 3 M) et isolées de la cuve de mesure par une membrane de téflon perméable à l'oxygène. Dans ces conditions, les molécules d'oxygène

présentes dans la cuve de mesure diffusent à travers la membrane et sont réduites à la cathode selon la réaction suivante :



La réaction d'oxydation qui se produit de manière concomitante au niveau de l'anode est :



L'équation bilan de la réaction est alors :



Le courant ainsi généré est proportionnel à la concentration d'oxygène dissous dans le milieu.

b) Principe des mesures de consommation d'oxygène

La consommation d'oxygène mitochondriale est déterminée en utilisant différentes combinaisons de substrats et d'inhibiteurs de la chaîne respiratoire :

- **Pyruvate + malate** : Le pyruvate, une fois entré dans la mitochondrie, est transformé en acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase (formation d'un NADH). L'acétyl CoA peut alors entrer dans le cycle de Krebs et entraîner la formation de NADH. L'utilisation d'une forte concentration de malate permet l'inhibition de la succinate déshydrogénase et donc la formation de FADH₂. L'utilisation de pyruvate + malate comme substrats, permet alors de mesurer la consommation d'oxygène uniquement liée à l'entrée des électrons *via* le complexe I (NADH).

- **Succinate + roténone** : La roténone inhibe le complexe I évitant ainsi le flux reverse d'électrons vers le complexe I et le succinate fourni des électrons au complexe II.

- **Palmitoyl-l-carnitine + malate** : Le palmitoyl-l-carnitine peut entrer dans la mitochondrie sans subir la régulation de la CPT I. Une fois dans la matrice le palmitoyl-l-carnitine peut entrer dans le cycle de β-oxydation et fournir ainsi du NADH (complexe I) et du FADH₂ (ETF : electron transfer flavoprotein) à la chaîne respiratoire. L'acétyl-CoA issu de la β-oxydation peut alors entrer dans le cycle de Krebs et entraîner la formation de NADH. L'utilisation de palmitoyl-l-carnitine + malate comme substrats permet alors de mesurer la

consommation d'oxygène liée à la β -oxydation mais sans prendre en compte la régulation exercée par la CPT I sur l'entrée des acides gras.

• **Palmitoyl-CoA + carnitine + malate** : Pour rentrer dans la mitochondrie, le palmitoyl-CoA doit passer par la CPT I. L'utilisation de ce substrat permet donc de mesurer la consommation d'oxygène liée à la β -oxydation en prenant en compte la régulation exercée par la CPT I sur l'entrée des acides gras.

• **TMPD + ascorbate + myxothiazole** : Le myxothiazole inhibe le complexe III. Le TMPD (*N,N,N',N'*-tetraméthyl-*p*-phénylènediamine) est un transporteur d'électrons artificiel qui permet de transmettre les électrons fournis par l'ascorbate au cytochrome *c*. L'utilisation de TMPD + ascorbate + myxothiazole comme substrats permet d'évaluer la consommation d'oxygène uniquement due au complexe IV.

La consommation d'oxygène mitochondriale est également déterminée à différents états respiratoires pour un même substrat. Les états respiratoires définis par Chance et Williams (1956) selon l'ordre d'addition des différents réactifs, sont les suivants :

- Etat 1 : mitochondries seules
- Etat 2 : ajout des substrats
- Etat 3 : ajout d'ADP en quantité limitée
- Etat 4 : la totalité de l'ADP a été convertie en ATP
- Etat 5 : anoxie

L'état 2 est fonctionnellement identique à l'état 4 (en absence d'activité ATPasique), et le dernier terme est classiquement utilisé pour les deux (Nicholls et Ferguson, 1992). L'état 4 peut également être obtenu en ajoutant de l'oligomycine qui inhibe l'ATP synthase. Un autre état respiratoire peut être déterminé, l'état découplé obtenu par l'ajout d'un protonophore tel que le FCCP (carbonyl cyanide 4-(trifluorométhoxy)phénylhydrazone). Le FCCP permet le retour des protons dans la matrice sans passer par l'ATP synthase. Cet état découplé permet ainsi d'évaluer la capacité maximale de la chaîne respiratoire (sans limitation par l'ATP synthase). Un exemple de mesure de consommation d'oxygène est présenté dans la **Figure 21**. Le rapport de contrôle respiratoire (RCR : respiratory control ratio) est obtenu en divisant la consommation d'oxygène à l'état 3 par la consommation d'oxygène à l'état 4 (ou 2 ou 4-oligomycine). Le RCR est un reflet du couplage de la phosphorylation oxydative.

2. Réactifs

Les réactifs utilisés proviennent de chez Sigma Aldrich (Lyon, France). Une fois préparés les réactifs sont aliquotés de manière à n'utiliser qu'un seul aliquot par jour d'expérimentation.

Tampon de respiration :

	Masse molaire (g/mol)	Concentration finale (mM)	Masse (g) qsp 1 L d'eau distillée
KCl	74,55	120	8,95
KH ₂ PO ₄	136,09	5	0,68
HEPES	238,3	3	0,71
EGTA	380,4	1	0,38
MgCl ₂	203,3	2	0,41
BSA	-	0,3 %	3

Le pH est ajusté à 7,4 avec du KOH 5 M et le tampon est conservé à -20°C pendant 6 mois.

Malate (0,5 M) : 670,5 mg/10 ml eau distillée. Le pH est ajusté à 7,4 avec du KOH 5 M. La solution est conservée à -20°C pendant 3 mois.

Pyruvate (0,5 M) : 550 mg/10 ml eau distillée. Le pH est ajusté à 7,4 avec du KOH 5 M. La solution est conservée à -20°C pendant 3 mois.

Roténone (2,5 mM) : 9,86 mg/10 ml éthanol/DMSO (volume/volume). La solution est conservée à -20°C pendant 3 mois.

Succinate (0,5 M) : 590,5 mg/10 ml eau distillée. Le pH est ajusté à 7,4 avec du KOH 5 M. La solution est conservée à -20°C pendant 3 mois.

Palmitoyl-l-carnitine (4 mM) : 17,44 mg/10 ml éthanol. La solution est conservée à -20°C pendant 3 mois.

Carnitine (100 mM) : 98,83 mg/5 ml eau distillée. La solution est conservée à 4°C pendant 1 mois.

Palmitoyl-CoA (4 mM) : 40,24 mg/10 ml éthanol 70 %. La solution est conservée à -20°C pendant 3 mois.

Myxothiazole (5 mM) : 2,44 mg/1 ml éthanol. La solution est conservée à -20°C pendant 3 mois.

Ascorbate (0,5 M) : 49,5 mg/500 µl eau distillée. La solution est préparée extemporanément.

TMPD (100 mM) : 8,21 mg/500 µl éthanol. La solution est préparée extemporanément.

ADP (30 mM) : 15,04 mg/1ml eau distillée. La solution est préparée extemporanément.

Oligomycine (1 mg/ml éthanol) : La solution est conservée à -20°C pendant 1 mois.

FCCP (0,8 mM) : Une solution de 8 mM est préparée en dissolvant 2 mg de FCCP dans 1 ml d'éthanol. La solution de 8 mM est diluée au 1/10^e et conservée à -20°C pendant 1 mois.

Cytochrome c (320 µM) : 19,8 mg/5 ml eau distillée. La solution est conservée à -20°C pendant 1 mois.

3. Protocole

Avant la première mesure, l'oxygraphe est calibré à la température de 37°C à partir de deux points :

- 100 % d'oxygène, obtenu par l'équilibration de 2 ml de tampon de respiration à la pression atmosphérique.
- 0 % d'oxygène, obtenu par l'ajout de dithionite de sodium, un agent réducteur qui consomme l'oxygène du milieu.

Après avoir abondamment rincé la cuve de mesure avec de l'eau distillée, sont injectés dans l'ordre (sous agitation constante et à 37°C) :

- le milieu de respiration (2 ml desquels on a soustrait le volume de mitochondries isolées)
 - 0,5 mg/ml de mitochondries isolées
 - les substrats et inhibiteurs adéquats (*Tableau 8*)
 - 20 µl d'ADP (soit 300 µM)
 - 4 µl d'oligomycine (soit 2 µg/ml)
 - 6 µl de FCCP (soit 2,4 µM)

L'ajout du réactif suivant se fait quand la pente obtenue est suffisante pour être quantifiée (minimum 1 minute). Entre chaque mesure la cuve de mesure est rincée 3 fois à l'eau distillée, 2 fois à l'éthanol 70% et 3 fois à l'eau distillée. L'intégrité des mitochondries est évaluée en ajoutant 50 µl de cytochrome *c* (320 µM) après l'injection d'ADP. Si la consommation d'oxygène liée à l'injection du cytochrome *c* est supérieure à celle de l'ADP cela signifie que le cytochrome *c* est entré librement dans l'espace intermembranaire et donc que la membrane externe est endommagée. Une augmentation supérieure à 15 % entraîne l'exclusion des résultats.

4. Expression des résultats

La vitesse de consommation d'oxygène est déterminée en calculant la valeur des pentes dans leur partie la plus linéaire. Les résultats en nmol/min/ml sont convertis en natomes/min/mg protéines.

V. Détermination du rapport ATP/O

1. Principe

Le rapport ATP/O représente le rapport de la synthèse d'ATP en fonction de la consommation d'oxygène mesurées simultanément. Il permet d'apprécier l'efficacité de la phosphorylation oxydative. Ce rapport est déterminé à l'aide du "système hexokinase" basé sur une régénération de l'ADP (Fontaine *et al.*, 1996), permettant ainsi d'obtenir un état 3 stable. L'intensité de l'état 3 peut être modulée par des concentrations croissantes d'hexokinase aboutissant à l'obtention d'une cinétique de la synthèse d'ATP en fonction de la consommation d'oxygène comprise entre l'état 4 (absence de synthèse d'ATP) et l'état 3 (synthèse d'ATP maximale). La réaction catalysée par l'hexokinase (HK) est la suivante :



L'ATP synthétisé est mesuré indirectement en évaluant la production de glucose-6-phosphate durant la réaction. La glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) permet la formation de NADPH à partir du glucose-6-phosphate :



La quantité de NADPH formé lors de cette réaction peut alors être mesurée au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 340 nm et est directement proportionnelle à la quantité d'ATP synthétisé.

2. Réactifs

Les réactifs utilisés proviennent de chez Sigma Aldrich (Lyon, France) excepté pour l'ATP (Roche, Meylan, France). Une fois préparés les réactifs sont aliquotés de manière à n'utiliser qu'un seul aliquot par jour d'expérimentation.

Tampon respiration : *cf partie A-IV-2*

Glucose (0,5 M) : 90 mg/1 ml eau distillée. La solution est préparée extemporanément.

Roténone (2,5 mM) : 9,86 mg/10 ml éthanol/DMSO (volume/volume). La solution est conservée à -20°C pendant 3 mois.

Succinate (0,5 M) : 590,5 mg/10 ml eau distillée. Le pH est ajusté à 7,4 avec du KOH 5 M. La solution est conservée à -20°C pendant 3 mois.

ATP (8,4 mM) : 5,08 mg/1 ml eau distillée. La solution est préparée extemporanément.

Hexokinase (5 U/ml) : Un flacon de 500 U est repris dans 5 ml d'eau distillée et la solution obtenue est conservée en aliquots à -20°C pendant 6 mois. Le jour de l'expérimentation, la solution d'hexokinase à 100 U/ml est diluée au 1/20°.

G6PDH (125 U/ml) : Un flacon de 500 U est repris dans 2 ml d'eau distillée et la solution obtenue est conservée en aliquots à -20°C pendant 6 mois. Le jour de l'expérimentation, la solution de G6PDH à 250 U/ml est diluée au 1/2.

NADP⁺ (7 mM) : 5,5 mg/1 ml eau distillée. La solution est préparée extemporanément.

3. Protocole

a) Mesure de la consommation d'oxygène

Dans la cuve de mesure sont injectés dans l'ordre (sous agitation constante et à 37°C) :

• le milieu de respiration (2 ml desquels on a soustrait le volume de mitochondries isolées)

- 80 µl de glucose (soit 20 mM)
- 4 µl de roténone (soit 5 µM)
- 20 µl de succinate (soit 5 mM)
- 0,5 mg/ml de mitochondries isolées
- 30 µl d'ATP (soit 125 µM)
- 4, 13, 25 ou 70 µl d'hexokinase (soit de 10 à 175 mU/ml)

Lorsque la consommation d'oxygène est stable (2 minutes après l'injection d'hexokinase), trois prélèvements de 200 µl sont réalisés dans la cuve de mesure à 30 secondes d'intervalle. Ces prélèvements sont immédiatement ajoutés dans une solution d'acide perchlorique (6 %) et centrifugés à 8000 g pendant 3 minutes et à 4°C. Le surnageant est neutralisé avec du KOH 5 M et congelé à -80°C jusqu'au dosage de l'ATP.

b) Dosage de l'ATP

Dans un tube à hémolyse, sont mélangés :

- 830 µl de tampon de respiration
- 70 µl de NADP⁺ (soit 0,5 mM)
- 100 µl de surnageant

La densité optique est préalablement mesurée à 340 nm et sera soustraite de la valeur finale. La réaction enzymatique est initiée par l'ajout de 2 µl de G6PDH (soit 0,25 U/ml). Après incubation à 37°C pendant 1 heure, la densité optique est à nouveau mesurée à 340 nm.

4. Expression des résultats

La vitesse de consommation d'oxygène est déterminée en calculant la valeur des pentes dans leur partie la plus linéaire. Les résultats en nmol/min/ml sont convertis en natomes/min/mg protéines. Afin de s'affranchir de la respiration liée à une activité ATPasique, la

consommation d'oxygène liée à l'ajout d'ATP est soustraite de la valeur obtenue après ajout de l'HK :

$$\text{valeur réelle} = \text{pente HK} - (\text{pente après ATP} - \text{pente avant ATP})$$

La quantité d'ATP synthétisé est déterminée en soustrayant les valeurs de DO avant et après l'ajout de G6PDH et en utilisant le coefficient d'extinction molaire du NADPH (soit $6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) dans la loi de Beer-Lambert. La valeur de synthèse d'ATP est finalement exprimée en nmoles ATP/min/mg protéines. Pour chaque concentration d'hexokinase une valeur de consommation d'oxygène et une valeur de synthèse d'ATP sont obtenues permettant ainsi la construction de la droite représentant la cinétique du rapport ATP/O. Comme pour la consommation d'oxygène, la synthèse d'ATP liée à la formation d'ADP par une activité ATPasique est soustraite de la valeur obtenue (en soustrayant la valeur correspondant à la mesure sans hexokinase).

VI. Mesure du potentiel de membrane mitochondrial

1. Principe

La mesure du potentiel de membrane mitochondrial est réalisée en parallèle de la mesure de la consommation d'oxygène selon la méthode de Brand (1995). Son principe repose sur l'équilibration de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale d'une sonde moléculaire chargée positivement, le triphenylmethylphosphonium (TPMP⁺). Le TPMP⁺, étant une molécule lipophile, va diffuser passivement dans la matrice en fonction du potentiel électrique jusqu'à atteindre un équilibre comme décrit par l'équation de Nernst :

$$\Delta\Psi = 2,3 (RT/F) \log ([\text{TPMP}^+]_{\text{int}}/[\text{TPMP}^+]_{\text{ext}})$$

L'accumulation du TPMP⁺ dans la matrice est mesurée indirectement en déterminant sa concentration extramitochondriale à l'aide d'une électrode sensible au TPMP⁺. La force protomotrice (Δp) représente l'addition du potentiel de membrane ($\Delta\Psi$: différence de charge électrique de part et d'autre de la membrane interne) et du gradient de protons ($\Delta p\text{H}$: différence de concentration en protons de part et d'autre de la membrane interne) :

$$\Delta p = \Delta\Psi - 2,3 RT\Delta p\text{H}$$

L'ajout de nigéricine, catalyseur de l'antiport K^+/H^+ , permet de dissiper le ΔpH et de le transformer en potentiel électrique, rendant ainsi la force protonotrice directement proportionnelle au potentiel de membrane.

2. Réactifs

Les réactifs utilisés proviennent de chez Sigma Aldrich (Lyon, France) excepté pour l'ATP (Roche, Meylan, France) et pour le TPMP⁺ (Merck, Darmstadt, Allemagne). Une fois préparés les réactifs sont aliquotés de manière à n'utiliser qu'un seul aliquot par jour d'expérimentation.

Tampon respiration : cf partie A-IV-2

Nigéricine (80 µg/ml éthanol) : La solution est conservée à -20°C pendant 3 mois.

TPMP⁺ (10 mM) : 178,6 mg/50 ml eau distillée. La solution est conservée à température ambiante pendant 3 mois.

TPMP⁺ (0,5 mM) : La solution de 10 mM fraîchement préparée est diluée au 1/20^e et conservée à -20°C pendant 3 mois.

Malonate (0,5 M) : 520,5 mg/10 ml tampon de respiration. Le pH est ajusté à 7,4 avec du KOH 5 M. La solution est conservée à -20°C pendant 3 mois.

Malonate (0,1 M) : La solution de 0,5 M est diluée au 1/5^e et conservée à -20°C pendant 3 mois.

Roténone (2,5 mM) : 9,86 mg/10 ml éthanol/DMSO (volume/volume). La solution est conservée à -20°C pendant 3 mois.

Succinate (0,5 M) : 590,5 mg/10 ml eau distillée. Le pH est ajusté à 7,4 avec du KOH 5 M. La solution est conservée à -20°C pendant 3 mois.

Oligomycine (1 mg/ml éthanol) : La solution est conservée à -20°C pendant 1 mois.

Glucose (0,5 M) : 90 mg/1 ml eau distillée. La solution est préparée extemporanément.

ATP (8,4 mM) : 5,08 mg/1 ml eau distillée. La solution est préparée extemporanément.

Hexokinase (5 U/ml) : Un flacon de 500 U est repris dans 5 ml d'eau distillée et la solution obtenue est conservée en aliquots à -20°C pendant 6 mois. Le jour de l'expérimentation, la solution d'hexokinase à 100 U/ml est diluée au 1/20^e dans de l'eau distillée.

FCCP (0,8 mM) : Une solution de 8 mM est préparée en dissolvant 2 mg de FCCP dans 1 ml d'éthanol. La solution de 8 mM est diluée au 1/10^e et conservée à -20°C pendant 1 mois.

3. Protocole

La mesure de consommation d'oxygène est réalisée sur un oxygraphe Rank Brothers (Cambridge, Angleterre) relié à une table traçante. De la même manière que pour l'oxygraphe Hansatech, l'électrode est calibrée afin d'obtenir les valeurs de 100 % et de 0 % d'oxygène. Une électrode sensible au TPMP⁺ (fournie par Martin D. Brand) est elle aussi reliée à la table traçante. Cette électrode contient une solution de TPMP⁺ à 10 mM et est conservée dans du tampon de respiration contenant 2 µM de TPMP⁺.

a) Détermination de la relation entre la consommation d'oxygène et le potentiel de membrane en condition non-phosphorylante

Dans la cuve de mesure sont injectés dans l'ordre (sous agitation constante et à 37°C) :

- le milieu de respiration (2 ml desquels on a soustrait le volume de mitochondries isolées)
- 2 µl de nigéricine (soit 80 ng/ml)
- 4 µl de roténone (soit 5 µM)
- 2 µl d'oligomycine (soit 1 µg/ml)
- 0,5 mg/ml de mitochondries isolées

Après avoir été rincée à l'eau distillée, l'électrode sensible au TPMP⁺ est immergée dans la cuve de mesure et est équilibrée par 4 additions successives de 2 µl de TPMP⁺ à 0,5 mM (soit 4 x 0,5 µM). La mesure démarre par l'addition de 20 µl de succinate (soit 5 mM). La consommation d'oxygène est inhibée progressivement par l'ajout de concentrations croissantes et non-saturantes de malonate (de 0,1 mM à 5 mM, **Figure 22**). Le potentiel électrique est finalement dissipé par l'ajout de 6 µl de FCCP (soit 2,4 µM) afin de déterminer la ligne de base du potentiel.

b) Détermination de la relation entre la consommation d'oxygène et le potentiel de membrane en condition phosphorylante

Dans la cuve de mesure sont injectés dans l'ordre (sous agitation constante et à 37°C) :

• le milieu de respiration (2 ml desquels on a soustrait le volume de mitochondries isolées)

- 2 µl de nigéricine (soit 80 ng/ml)
- 4 µl de roténone (soit 5 µM)
- 80 µl de glucose (soit 20 mM)
- 0,5 mg/ml de mitochondries isolées

Après avoir été rincée à l'eau distillée, l'électrode sensible au TPMP⁺ est immergée dans la cuve de mesure et est équilibrée par 4 additions successives de 2 µl de TPMP⁺ à 0,5 mM (soit 4 x 0,5 µM). La mesure démarre par l'addition de 20 µl de succinate (soit 5 mM) suivie de l'ajout de 30 µl d'ATP (soit 125 µM). La consommation d'oxygène est stimulée progressivement par l'ajout de concentrations croissantes et non-saturantes d'hexokinase (4 µl, 9 µl, 12 µl puis 45 µl d'hexokinase à 5 U/ml soit de 10 à 175 mU/ml). Le potentiel électrique est finalement dissipé par l'ajout de 6 µl de FCCP (soit 2,4 µM) afin de déterminer la ligne de base du potentiel.

4. Expression des résultats

La vitesse de consommation d'oxygène est déterminée en calculant la valeur des pentes en mm/min dans leur partie la plus linéaire. La valeur en mm/min est ensuite convertie en natomes/min/mg protéines en utilisant la différence en mm entre le 100 % et le 0 % d'oxygène qui correspond à 406 natomes/ml (saturation de l'oxygène dans du tampon de respiration à 37°C et à la pression atmosphérique moyenne de 1013 hPa).

Les déviations du tracé de l'électrode sensible au TPMP⁺ sont mesurées par rapport à la ligne de base (**Figure 22**). Les concentrations en TPMP⁺ correspondantes sont déterminées à l'aide d'une droite de calibration construite en mesurant les déviations du tracé par rapport à la ligne de base obtenues suite à l'ajout des 4 doses de 0,5 µM de TPMP⁺ et en appliquant l'équation :

$$\text{Déviation (mm)} = f(\log[\text{TPMP}^+])$$

Cette droite de calibration permet d'obtenir les valeurs de concentrations en TPMP⁺ extramitochondrial ([TPMP⁺]_{ext}). Les valeurs de potentiel de membrane en volts sont obtenues en utilisant l'équation de Nernst :

$$\Delta\Psi = 2,3 (RT/F) \log ([TPMP^+]_{int}/[TPMP^+]_{ext})$$

La concentration en TPMP⁺ intramitochondrial est :

$$[TPMP^+]_{int} = ([TPMP^+]_{totale} - [TPMP^+]_{ext}) \times Bf / [mitochondries]$$

Avec : • [TPMP⁺]_{total} = 4 x 0,5 μM = 2 μM, qui correspond à la concentration totale de TPMP⁺ ajouté dans la cuve de mesure.

- Bf (Binding factor) qui correspond à un facteur de correction prenant en compte la fraction de TPMP⁺ liée aux membranes et aux protéines. Pour le foie, Bf est égale à 0,42 (μl/mg protéines)⁻¹ selon Rolfe *et al.* (1994).

- [mitochondries] qui correspond à la concentration en mitochondrie isolée exprimée en mg/μl.

Finalement on a l'équation :

$$\Delta\Psi = 2,3 (RT/F) \log (([TPMP^+]_{totale} - [TPMP^+]_{ext}) \times Bf / [TPMP^+]_{ext} \times [mitochondries])$$

Avec : • R = constante des gaz parfaits = 8,314472 J/mol/K

- T = température en kelvin = 273 + t(°C) K

- F = constante de Faraday = 96500 C/mol

Avec les valeurs de potentiel de membrane (mV) et les valeurs de consommation d'oxygène (natomes/min/mg protéines) pour chaque concentration de malonate ou d'hexokinase, une courbe cinétique peut alors être réalisée en condition non-phosphorylante et en condition phosphorylante respectivement.

VII. Dosage des activités enzymatiques mitochondriales

Les dosages des activités enzymatiques des complexes I, II, III et IV et de la citrate synthase sont réalisés sur mitochondries isolées selon les adaptations de la méthode de Malgat *et al.* (1999) et en accord avec les techniques de consensus AFM (Association Française contre les Myopathies). Le principe des dosages des complexes de la chaîne respiratoire repose sur le transfert d'électrons d'un donneur (substrat) à un accepteur. La mesure par spectrophotométrie de la vitesse d'apparition de l'accepteur réduit ou de disparition du donneur oxydé permet de quantifier l'activité enzymatique associée.

Les réactifs utilisés proviennent de chez Sigma Aldrich (Lyon, France) excepté pour l'ATP, le NADH, la LDH et la PK (Roche, Meylan, France), pour le décylubiquinone (Tebu-bio, La Perray-en-Yvelines, France) et pour le cytochrome *c* oxydé (Acros Organics, Halluin, France). Une fois préparés les réactifs sont aliquotés de manière à n'utiliser qu'un seul aliquot par jour d'expérimentation.

Pour ces dosages, les mitochondries isolées sont diluées dans un tampon spécifique de manière à obtenir une concentration de 1 mg/ml. Chaque dosage est réalisé en duplicate.

Tampon de dilution des mitochondries :

	Masse molaire (g/mol)	Concentration finale (mM)	Masse (g) qsp 100 ml d'eau distillée
Saccharose	342,3	280	9,58
Tris base	121,14	10	0,121

Le pH est ajusté à 7,4 avec de l'HCl 5 M et le tampon est conservé à -20°C pendant 6 mois.

1. NADH ubiquinone oxydoréductase (complexe I)

a) Principe

La réaction enzymatique catalysée par le complexe I est la suivante :



Le principe du dosage consiste à mesurer l'oxydation du NADH, dont l'absorbance est mesurée à 340 nm, en présence d'un analogue de l'ubiquinone, le décylubiquinone. Lors de la mesure spectrophotométrique, la diminution de l'absorbance à 340 nm est alors proportionnelle à l'activité du complexe I. Ce dosage est réalisé en présence et en absence de roténone (inhibiteur spécifique du complexe I), afin d'obtenir l'activité d'oxydation du NADH spécifique du complexe I.

b) Réactifs

Tampon KH_2PO_4 (100 mM), pH 7,5 : 1,36 g/100 ml eau distillée. Le pH est ajusté à 7,5 avec du KOH 5 M. La solution est conservée à -20°C pendant 6 mois.

BSA (50 mg/ml eau distillée) : La solution est conservée à -20°C pendant 6 mois.

Décylubiquinone (25 mM) : 10 mg/1,25 ml DMSO. La solution est conservée à -20°C pendant 3 mois.

Roténone (2,5 mM) : 9,86 mg/10 ml éthanol/DMSO (volume/volume). La solution est conservée à -20°C pendant 3 mois.

NADH (10 mM) : 7,1 mg/1 ml eau distillée. La solution est préparée extemporanément dans un tube en verre et protégée de la lumière.

c) Protocole

Dans un tube en verre, sont ajoutés :

- 390 μl d'eau distillée
- 500 μl de tampon KH_2PO_4 (soit 50 mM)
- 75 μl de BSA (soit 3,75 mg/ml)
- 4 μl de décylubiquinone (soit 100 μM)
- +/- 4 μl de roténone (soit 10 μM)
- 20 μl de mitochondries isolées (soit 20 $\mu\text{g/ml}$)

Ce mélange réactionnel est incubé à 37°C pendant 2 minutes. La réaction est ensuite initiée par l'ajout de 10 μl de NADH (soit 100 μM). L'évolution de l'absorbance à 340 nm est suivie au spectrophotomètre (Beckman DU 640B, Beckman Coulter, Roissy CDG, France), thermostaté à 37°C , pendant 2 minutes.

d) Expression des résultats

Les variations d'absorbance sont mesurées, en fonction du temps, sur la partie linéaire de la cinétique. L'activité spécifique (nmol/min/mg de protéines) du complexe I est calculée en utilisant la formule suivante :

$$AS = \frac{\Delta DO_{(-R)} - \Delta DO_{(+R)}}{l \times \epsilon_{NADH} \times Sn_{NADH}} \times \frac{10^3}{q_{mito}}$$

$\Delta DO_{(-R)}$: variation de DO par minute sans roténone

$\Delta DO_{(+R)}$: variation de DO par minute avec roténone

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit 1

ϵ_{NADH} : coefficient d'extinction molaire du NADH à 340 nm, en $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, soit 6,22

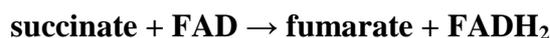
Sn_{NADH} : nombre stœchiométrique du NADH dans l'équation de la réaction, soit 1

q_{mito} : quantité de mitochondries ajoutée dans le milieu réactionnel en mg, soit 0,020

2. Succinate ubiquinone oxydoréductase (complexe II)

a) Principe

Le complexe II catalyse deux réactions enzymatiques successives :



Le dosage du complexe II fait intervenir un composé chimique de couleur bleue, le dichlorophenolindophenol (DCPIP), qui absorbe la lumière à 600 nm. Lorsque le DCPIP est réduit par l'ubiquinol, il perd sa couleur bleue et n'absorbe plus la lumière. Lors de la mesure spectrophotométrique, la diminution de l'absorbance à 600 nm est alors proportionnelle à l'activité du complexe II. Dans ce dosage l'ubiquinone est remplacé par un analogue, le décylobiquinone.

b) Réactifs

Tampon KH_2PO_4 (100 mM), pH 7,5 : 1,36 g/100 ml eau distillée. Le pH est ajusté à 7,5 avec du KOH 5 M. La solution est conservée à -20°C pendant 6 mois.

BSA (50 mg/ml eau distillée) : La solution est conservée à -20°C pendant 6 mois.

Succinate (200 mM) : 236,2 mg/10 ml eau distillée. Le pH est ajusté à 7,4 avec du KOH 5 M. La solution est conservée à -20°C pendant 3 mois.

KCN (10 mM) : 6,5 mg/10 ml eau distillée. La solution est conservée à -20°C pendant 1 mois.

Roténone (2,5 mM) : 9,86 mg/10 ml éthanol/DMSO (volume/volume). La solution est conservée à -20°C pendant 3 mois.

Antimycine A (1 mg/ml éthanol) : La solution est conservée à -20°C pendant 1 mois.

DCPIP (0,51 mM) : 1,48 mg/10 ml eau distillée. La solution est préparée extemporanément et incubée à 37°C .

Décylubiquinone (25 mM) : 10 mg/1,25 ml DMSO. La solution est conservée à -20°C pendant 3 mois.

c) Protocole

Dans un tube en verre, sont ajoutés :

- 500 μl de tampon KH_2PO_4 (soit 50 mM)
- 50 μl de BSA (soit 2,5 mg/ml)
- 150 μl de succinate (soit 30 mM)
- 100 μl de KCN (soit 1 mM)
- 5 μl d'antimycine A (soit 5 $\mu\text{g/ml}$)
- 2 μl de roténone (soit 5 μM)
- 195 μl de DCPIP (soit 100 μM)
- 5 μl de mitochondries isolées (soit 5 $\mu\text{g/ml}$)

Ce mélange réactionnel est incubé à 37°C pendant 2 minutes. La réaction est ensuite initiée par l'ajout de 2 μl de décylubiquinone (soit 50 μM). L'évolution de l'absorbance à 600 nm est suivie au spectrophotomètre, thermostaté à 37°C , pendant 2 minutes.

d) Expression des résultats

Les variations d'absorbance sont mesurées, en fonction du temps, sur la partie linéaire de la cinétique. L'activité spécifique (nmol/min/mg de protéines) du complexe II est calculée en utilisant la formule suivante :

$$AS = \frac{\Delta DO}{l \times \epsilon_{DCPIP} \times Sn_{DCPIP}} \times \frac{10^3}{q_{mito}}$$

ΔDO : variation de DO par minute

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit 1

ϵ_{DCPIP} : coefficient d'extinction molaire du DCPIP à 600 nm, en $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, soit 19,1

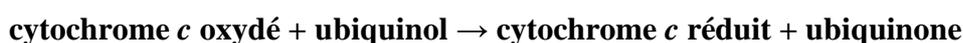
Sn_{DCPIP} : nombre stœchiométrique du DCPIP dans l'équation de la réaction, soit 1

q_{mito} : quantité de mitochondries ajoutée dans le milieu réactionnel en mg, soit 0,005

3. Ubiquinol cytochrome *c* oxydoréductase (complexe III)

a) Principe

La réaction enzymatique catalysée par le complexe III est la suivante :



Le principe du dosage repose sur la mesure de la réduction du cytochrome *c* qui une fois réduit absorbe la lumière à 550 nm. L'augmentation de l'absorbance à 550 nm est alors proportionnelle à l'activité du complexe III. Dans ce dosage l'ubiquinol est remplacé par un analogue, le décylubiquinol. Ce dosage est réalisé en présence et en absence d'antimycine A (inhibiteur spécifique du complexe III), afin d'obtenir l'activité de réduction du cytochrome *c* spécifique du complexe III.

b) Réactifs

Tampon KH_2PO_4 (200 mM), pH 7,5 : 2,72 g/100 ml eau distillée. Le pH est ajusté à 7,5 avec du KOH 5 M. La solution est conservée à -20°C pendant 6 mois.

BSA (50 mg/ml eau distillée) : La solution est conservée à -20°C pendant 6 mois.

EDTA (1 mM) : 29,2 mg/10 ml eau distillée. Le pH est ajusté à 7,5 avec du NaOH 5 M. La solution est conservée à -20°C pendant 6 mois.

KCN (10 mM) : 6,5 mg/10 ml eau distillée. La solution est conservée à -20°C pendant 1 mois.

Cytochrome c oxydé (1 mM) : 12,38 mg/1 ml eau distillée. La solution est préparée extemporanément.

Antimycine A (1 mg/ml éthanol) : La solution est conservée à -20°C pendant 1 mois.

Décylubiquinol (25 mM) : 20 mg de décylubiquinone sont dissous dans 4,772 ml d'éthanol absolu afin d'obtenir une concentration de 13 mM. Le spectre du décylubiquinone oxydé est réalisé en diluant 10 µl de décylubiquinone dans 1 ml d'éthanol et en lisant l'absorbance entre 250 et 350 nm. Un pic à 275 nm doit apparaître avec une absorbance proche de 2,6. A partir de l'étape suivante, toutes les étapes doivent être réalisées à l'abri de la lumière. La solution de décylubiquinone est réduite par quelques cristaux de borohydrure de sodium puis 30 µl d'acide chlorhydrique fumant (à 37 %) sont ajoutés. Lorsque la solution est totalement décolorée, elle est centrifugée pendant 15 minutes à 4000 rpm. Le spectre du décylubiquinone réduit (décylubiquinol) est réalisé en diluant 10 µl de décylubiquinone dans 1 ml d'éthanol et en lisant l'absorbance entre 250 et 350 nm. Un pic à 285 nm doit alors apparaître avec une absorbance proche de 0,7. Le surnageant est réparti dans deux tubes en verre et dans chacun sont ajoutés 2,5 ml de tampon KH₂PO₄ 100 mM/sorbitol 250 mM pH 7,4 et 1,5 ml de cyclohexane. Après agitation, les deux solutions sont regroupées dans un même tube et centrifugées pendant 10 minutes à 1000 g. La phase supérieure (organique) est recueillie dans un tube, préalablement pesé, et est conservée à l'obscurité. L'extraction de la phase inférieure est répétée deux fois par ajout de 1,5 ml de cyclohexane et centrifugation à 1000 g pendant 10 minutes. Les phases organiques sont regroupées et évaporées sous azote. Le tube contenant l'extrait sec est pesé sur une balance de précision puis repris dans 2 ml de cyclohexane et aliquoté par 50 µl dans des microvials. Les microvials sont alors mis à évaporer sous azote puis bouchés rapidement et conservés à l'obscurité à -80°C. La masse de décylubiquinol contenu dans chaque microvial est déterminée, en soustrayant le poids du tube contenant l'extrait sec et le poids de ce même tube vide. Le décylubiquinol ainsi préparé peut être conservé pendant 3 mois. Le jour de la manipulation, un microvial est repris dans de l'éthanol absolu de manière à obtenir une concentration de 25 mM.

c) *Protocole*

Dans un tube en verre, sont ajoutés :

- 220 µl d'eau distillée
- 500 µl de tampon KH₂PO₄ (soit 100 mM)
- 20 µl de BSA (soit 1 mg/ml)
- 50 µl d'EDTA (soit 50 µM)
- 100 µl de KCN (soit 1 mM)
- 100 µl de cytochrome *c* oxydé (soit 100 µM)
- +/- 5 µl d'antimycine A (soit 5 µg/ml)
- 5 µl de mitochondries isolées (soit 5 µg/ml)

Ce mélange réactionnel est incubé à 37°C pendant 30 secondes. La réaction est ensuite initiée par l'ajout de 4 µl de décylubiquinol (soit 100 µM). L'évolution de l'absorbance à 550 nm est suivie au spectrophotomètre, thermostaté à 37°C, pendant 1 minute.

d) *Expression des résultats*

Les variations d'absorbance sont mesurées, en fonction du temps, sur la partie linéaire de la cinétique. L'activité spécifique (nmol/min/mg de protéines) du complexe III est calculée en utilisant la formule suivante :

$$AS = \frac{\Delta DO_{(-A)} - \Delta DO_{(+A)}}{l \times \epsilon_{\text{cyt } c} \times Sn_{\text{cyt } c}} \times \frac{10^3}{q_{\text{mito}}}$$

$\Delta DO_{(-A)}$: variation de DO par minute sans antimycine A

$\Delta DO_{(+A)}$: variation de DO par minute avec antimycine A

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit 1

$\epsilon_{\text{cyt } c}$: coefficient d'extinction molaire du cytochrome *c* réduit à 550 nm, en mM⁻¹.cm⁻¹, soit 18,5

$Sn_{\text{cyt } c}$: nombre stœchiométrique du cytochrome *c* dans l'équation de la réaction, soit 1

q_{mito} : quantité de mitochondries ajoutée dans le milieu réactionnel en mg, soit 0,005

4. Cytochrome *c* oxydase (complexe IV)

a) Principe

La réaction enzymatique catalysée par le complexe IV est la suivante :



Le principe du dosage repose sur la mesure de l'oxydation du cytochrome *c*. Le cytochrome *c* réduit absorbant la lumière à 550 nm, la diminution de l'absorbance à 550 nm est alors proportionnelle à l'activité du complexe IV.

b) Réactifs

Tampon KH₂PO₄ (50 mM), pH 7 : 680 mg/100 ml eau distillée. Le pH est ajusté à 7 avec du KOH 5 M. La solution est conservée à -20°C pendant 6 mois.

Cytochrome *c* (1 mM) : 12,38 mg/1 ml eau distillée. La solution est préparée extemporanément.

Cytochrome *c* réduit (80 µM) :

La solution de cytochrome *c* réduit est préparée extemporanément, de la manière suivante :

- Diluer 800 µl de la solution de cytochrome *c* (1 mM) dans 9,2 ml de tampon KH₂PO₄ (50 mM, pH 7).

- Oxyder 1 ml de cette solution en y ajoutant 5 mg de ferricyanure de potassium ("0 % réduit") et réduire 1 ml de cette solution en y ajoutant 5 mg de dithionite de sodium ("100 % réduit")

- Lire la DO de ces deux solutions à 550 et 560 nm. Le rapport 550/560 nm doit être proche de 1,16 pour le "0 % réduit" et compris entre 7 et 10 pour le "100 % réduit". Afin d'obtenir une réduction comprise entre 92 et 97 %, une fourchette de DO à 550 nm est calculée selon la formule suivante :

- 92 % réduction : $((\text{DO}_{550\text{nm red}} - \text{DO}_{550\text{nm ox}}) \times 0,92) + \text{DO}_{550\text{nm ox}}$

- 97 % réduction : $((\text{DO}_{550\text{nm red}} - \text{DO}_{550\text{nm ox}}) \times 0,97) + \text{DO}_{550\text{nm ox}}$

- Ajouter, par fraction de 20 µl, le cytochrome *c* réduit ("100 % réduit") aux 8 ml de cytochrome *c* initiaux et lire la DO à 550 nm. Cette opération est répétée jusqu'à l'obtention d'une DO comprise dans la fourchette déterminée préalablement.

c) *Protocole*

Dans un tube à hémolyse, 998 μl de cytochrome *c* réduit sont incubés à 37°C pendant 3 minutes. La réaction est ensuite initiée par l'ajout de 2 μl de mitochondries isolées (soit 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$). L'évolution de l'absorbance à 550 nm est suivie au spectrophotomètre, thermostaté à 37°C, pendant 1 minute.

d) *Expression des résultats*

Les variations d'absorbance sont mesurées, en fonction du temps, sur la partie linéaire de la cinétique. L'activité spécifique (nmol/min/mg de protéines) du complexe IV est calculée en utilisant la formule suivante :

$$AS = \frac{\Delta DO}{l \times \epsilon_{\text{cyt } c} \times S_{\text{cyt } c}} \times \frac{10^3}{q_{\text{mito}}}$$

ΔDO : variation de DO par minute

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit 1

$\epsilon_{\text{cyt } c}$: coefficient d'extinction molaire du cytochrome *c* réduit à 550 nm, en $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, soit 18,5

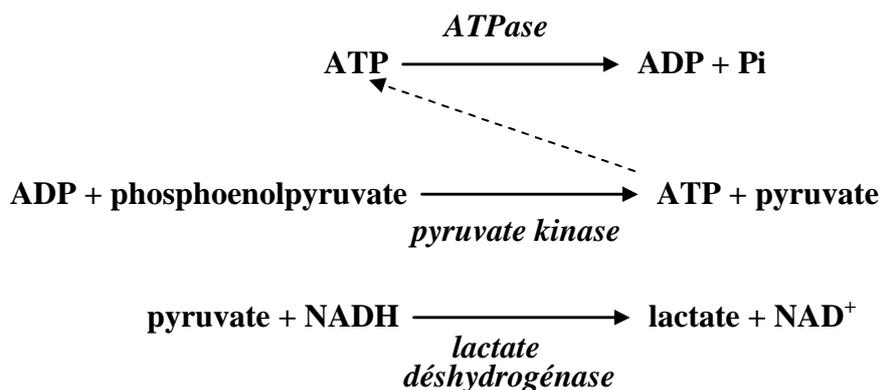
$S_{\text{cyt } c}$: nombre stœchiométrique du cytochrome *c* dans l'équation de la réaction, soit 1

q_{mito} : quantité de mitochondries ajoutée dans le milieu réactionnel en mg, soit 0,002

5. ATP synthase

a) *Principe*

Le dosage de l'activité de l'ATP synthase est réalisé selon une méthode adaptée de Rustin *et al.* (1994). L'ATP synthase catalyse la synthèse de l'ATP à partir de l'ADP + Pi. Cette réaction est réversible, aussi le principe de ce dosage consiste à mesurer l'activité ATPasique, en mesurant la formation d'ADP à partir d'ATP, en utilisant le système enzymatique suivant :



L'absorbance du NADH est mesurée à 340 nm. La diminution de l'absorbance à 340 nm est alors proportionnelle à l'activité de l'ATPase. Ce dosage est réalisé en présence et en absence d'oligomycine afin d'obtenir l'activité spécifique de l'ATPase. Dans les conditions de ce dosage (présence de FCCP et pH basique), l'activité de l'ATPase est directement proportionnelle à celle de l'ATP synthase.

b) Réactifs

Tampon G1 :

	Masse molaire (g/mol)	Concentration finale (mM)	Masse (mg) qsp 50 ml d'eau distillée
MgCl ₂	203,3	5	50,82
KCl	74,55	10	37,27
PEP	267,2	2	26,72
ATP	605,2	0,5	15,13
Tris base	121,14	50	302,85
BSA	-	5 mg/ml	250

Le pH est ajusté à 8 avec de l'HCl 5 M et le tampon est conservé à 4°C pendant 3 jours.

NADH (10 mM) : 7,1 mg/1 ml eau distillée. La solution est préparée extemporanément dans un tube en verre et protégée de la lumière.

Oligomycine (1 mg/ml éthanol) : La solution est conservée à -20°C pendant 1 mois.

FCCP (10 mM) : 2,5 mg/1 ml d'éthanol. La solution est conservée à -20°C pendant 1 mois.

Antimycine A (2,5 mg/ml éthanol) : La solution est conservée à -20°C pendant 1 mois.

Lactate déshydrogénase (LDH) : La LDH est fournie sous forme de solution à 5000 U/ml.

Pyruvate kinase (PK) : La PK est fournie sous forme de solution à 5000 U/ml.

Tampon G2 :

Dans 5 ml de tampon G1, sont ajoutés :

- 1,5 µl de FCCP (soit 3 µM)
- 1 µl d'antimycine A (soit 0,5 µg/ml)
- 20 µl de LDH (soit 20 U/ml)
- 20 µl de PK (soit 20 U/ml)

Le tampon G2 est préparé extemporanément.

c) Protocole

La solution de mitochondries isolées à 1 mg/ml est diluée au 1/10^e en ajoutant 100 µl dans 900 µl d'eau distillée dans un tube Kimble. La solution à 100 µg/ml obtenue est alors soumise à un cycle de sonication de 6 x 5 secondes avec 30 secondes de repos entre chaque sonication.

La sonication est réalisée dans la glace.

Dans un tube en verre, sont ajoutés :

- 670 µl d'eau distillée
- 200 µl de tampon G2
- +/- 10 µl d'oligomycine (soit 10 µg/ml)
- 100 µl de la solution de mitochondries soniquée (soit 10 µg/ml)

Ce mélange réactionnel est incubé à 37°C pendant 3 minutes. La réaction est ensuite initiée par l'ajout de 30 µl de NADH (soit 300 µM). L'évolution de l'absorbance à 340 nm est suivie au spectrophotomètre, thermostaté à 37°C, pendant 90 secondes.

d) Expression des résultats

Les variations d'absorbance sont mesurées, en fonction du temps, sur la partie linéaire de la cinétique. L'activité spécifique (nmol/min/mg de protéines) de l'ATP synthase est calculée en utilisant la formule suivante :

$$AS = \frac{\Delta DO_{(-O)} - \Delta DO_{(+O)}}{l \times \epsilon_{NADH} \times Sn_{NADH}} \times \frac{10^3}{q_{mito}}$$

$\Delta DO_{(-O)}$: variation de DO par minute sans oligomycine

$\Delta DO_{(+O)}$: variation de DO par minute avec oligomycine

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit 1

ϵ_{NADH} : coefficient d'extinction molaire du NADH à 340 nm, en $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, soit 6,22

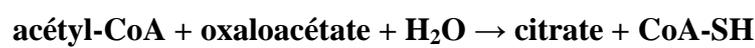
Sn_{NADH} : nombre stœchiométrique du NADH dans l'équation de la réaction, soit 1

q_{mito} : quantité de mitochondries ajoutée dans le milieu réactionnel en mg, soit 0,010

6. Citrate synthase

a) Principe

La citrate synthase, première enzyme du cycle de Krebs, catalyse la réaction suivante :



Le dosage fait intervenir l'acide 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoïque) ou DTNB. Le DTNB réagit avec les groupements thiols (-SH) du CoA-SH pour former du trinitrobenzène (TNB) selon la réaction suivante :



Le TNB est un composé jaune qui absorbe la lumière à 412 nm. L'augmentation de l'absorbance à 412 nm est donc proportionnelle à l'activité de la citrate synthase.

b) Réactifs

Tampon Tris (1 M) : 12,11 g/100 ml eau distillée. Le pH est ajusté à 8,1 avec de l'HCl 5 M. La solution est conservée à -20°C pendant 6 mois.

DTNB (1 mM) : 1,98 mg/5 ml tampon Tris (1M). La solution est préparée extemporanément et protégée de la lumière.

Oxaloacétate (10 mM) : 6,6 mg/5 ml eau distillée. La solution est préparée extemporanément.

Acétyl-CoA (10 mM) : 10 mg/1,2 ml eau distillée. La solution est conservée à -20°C pendant 1 mois.

Triton X 100 (10 %) : Le triton X 100 est dilué au 1/10^e dans de l'eau distillée. La solution est conservée à -20°C pendant 6 mois.

c) Protocole

Dans un tube en plastique, sont ajoutés :

- 750 µl d'eau distillée
- 150 µl de DTNB (soit 150 µM)
- 50 µl d'oxaloacétate (soit 500 µM)
- 30 µl d'acétyl-CoA (soit 300 µM)
- 10 µl de triton X 100 (soit 0,1 %)

Ce mélange réactionnel est incubé à 37°C pendant 2 minutes. La réaction est ensuite initiée par l'ajout de 10 µl de mitochondries isolées (soit 10 µg/ml). L'évolution de l'absorbance à 412 nm est suivie au spectrophotomètre, thermostaté à 37°C, pendant 90 secondes.

d) Expression des résultats

Les variations d'absorbance sont mesurées, en fonction du temps, sur la partie linéaire de la cinétique. L'activité spécifique (nmol/min/mg de protéines) de la citrate synthase est calculée en utilisant la formule suivante :

$$AS = \frac{\Delta DO}{l \times \epsilon_{TNB} \times Sn_{TNB}} \times \frac{10^3}{q_{mito}}$$

ΔDO : variation de DO par minute

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit 1

ϵ_{TNB} : coefficient d'extinction molaire du TNB à 412 nm, en mM⁻¹.cm⁻¹, soit 13,6

Sn_{TNB} : nombre stœchiométrique du TNB dans l'équation de la réaction, soit 1

q_{mito} : quantité de mitochondries ajoutée dans le milieu réactionnel en mg, soit 0,010

VIII. Analyse de l'expression des ARNm dans le foie

1. Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux sont extraits à partir de 50 à 100 mg de foie en utilisant du TRIzol (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). La quantité d'ARN obtenus après extraction est déterminée en mesurant l'absorbance à 260 nm et la pureté de ces ARN est évaluée en utilisant le rapport des absorbances mesurées à 260 et 280 nm.

2. Reverse transcription

a) Principe

La reverse transcription (RT) consiste à synthétiser de l'ADN à partir d'une matrice d'ARN en utilisant l'enzyme rétrovirale, reverse transcriptase.

b) Réactifs

Les réactifs utilisés proviennent de chez Invitrogen (Cergy Pontoise, France) excepté pour les amorces hexamères et les oligo dT (Promega, Charbonnières, France) et pour la ribonuléase H (NEB, Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France).

c) Protocole

Les ARN sont dilués dans de l'eau DEPC afin d'obtenir 1 µg d'ARN dans un volume de 11,5 µl auxquels sont ajoutés 0,5 µl d'oligo dT (0,5 µg/µl) et 0,5 µl d'amorces hexamères (0,5 µg/µl). Le mélange est ensuite chauffé à 65°C pendant 5 minutes et placé dans la glace.

Un mélange des réactifs nécessaires à la réaction (Mix RT) est préparé :

	Volume (µl) pour 1 tube
First-Strand Buffer 5X	4
Dithiothreitol (0,1 M)	2
dNTP (10 mM)	1
Reverse transcriptase Superscript II à 100 U	0,5

Ce mélange (7,5 µl) est ajouté à chaque tube et une goutte d'huile est placée en surface. Les tubes sont incubés à 25°C pendant 10 minutes, puis à 42°C pendant 60 minutes et enfin à 70°C pendant 15 minutes. La solution d'ADN obtenue est ensuite diluée au 1/10^e (18 µl dans 162 µl d'eau DEPC). Les échantillons sont ensuite complétés avec 1 µl de ribonucléase H (5000 U/ml) et incubés à 37°C pendant 20 minutes. Les échantillons sont conservés à -80°C sous forme d'une dilution finale au 1/60^e.

3. PCR quantitative en temps réel

a) *Principe*

Cette technique, selon le même principe qu'une PCR classique, permet l'amplification mais également la quantification de la séquence de l'ADN cible *via* l'utilisation d'un fluorochrome, le SYBR Green, ayant la propriété de se lier à l'ADN double brin et de n'être fluorescent que sous sa forme liée. Au début de l'amplification, le mélange réactionnel contient l'ADN dénaturé, les amorces et le fluorochrome non lié. Pendant l'étape d'élongation, le nombre de SYBR Green liés à l'ADN synthétisé augmente entraînant ainsi une augmentation de la fluorescence, qui est mesurée à la fin de chaque cycle en utilisant un spectrofluorimètre à la longueur d'onde de 521 nm. Une courbe représentant la fluorescence en fonction du nombre de cycles est ainsi obtenue.

b) *Protocole*

- **Préparation des standards** : Afin de pouvoir analyser de manière quantitative l'amplification du gène d'intérêt, une gamme d'un nombre de copies connu d'amplicons du gène cible est établie en réalisant une PCR classique. Après purification et quantification par lecture de la densité optique à 260 nm de l'ADN amplifié, le nombre de copies est calculé selon la notion qu'1 µg d'ADN de 1000 paires de bases correspond à $9,4 \times 10^{11}$ copies. Les échantillons sont ensuite dilués afin d'obtenir une gamme.

- **PCR quantitative** : Un mélange des réactifs nécessaires à la réaction (Mix qPCR) est préparé :

	Volume (μ l) pour 1 tube
Eau DEPC	4
Amorce sens (15 μ M)	0,5
Amorce anti-sens (15 μ M)	0,5
Absolute qPCR Mix*	10

* Thermo Fisher Scientific, Saint-Herblain, France

Dans chaque tube, sont ajoutés 15 μ l du Mix qPCR et 5 μ l soit de l'échantillon issu de la RT PCR (dilué au 1/60^e), soit d'eau DEPC (blanc), soit de standard. Les tubes sont ensuite placés dans le rotor de l'appareil Corbett Rotor-Gene 6200 (Qiagen, Courtaboeuf, France). Le programme consiste en plusieurs cycles de PCR avec une température d'hybridation correspondant au T_m des amorces. A la suite du dernier cycle de PCR, la température est rapidement élevée à 95°C afin de dénaturer l'ADN double brin, puis elle est abaissée à la température de fusion, provoquant ainsi la reformation d'ADN double brin. Quand la température augmente, l'ADN double brin se dissocie, induisant la libération du SYBR Green dans le milieu et une diminution progressive de la fluorescence. Lorsque 50 % de l'ADN double brin est dissocié, la fluorescence chute brutalement : cette température correspond à la température de fusion du produit synthétisé. A partir de là, une courbe représentant la fluorescence en fonction de la température est réalisée. Cette courbe permet de vérifier la spécificité de la réaction de PCR. En effet, si l'ADN des différents échantillons est dénaturé en même temps, cela signifie que seul l'ADN cible a été amplifié.

Une courbe de la fluorescence mesurée à la fin de chaque cycle en fonction du nombre de cycles est réalisée et permet en utilisant la gamme de déterminer le nombre de copies du gène cible. Le nombre de copies de chaque gène d'intérêt est exprimé en fonction du nombre de copies d'un gène de référence connu pour avoir une expression constante, ici l'HPRT (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase).

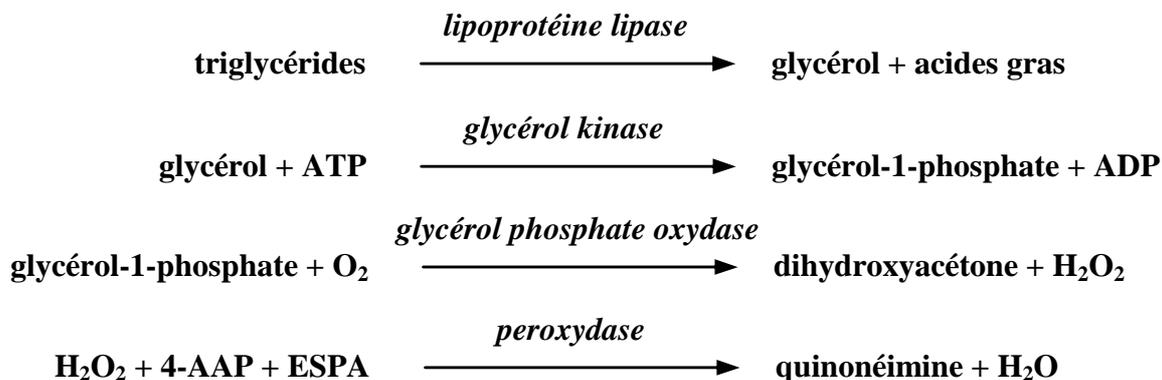
IX. Dosage de la quantité d'ADN mitochondrial

L'ADN total est extrait à partir de 50 mg de foie en utilisant le kit "EZ1 DNA" et l'extracteur "BioRobot EZ1 DSP" (Qiagen, Courtaboeuf, France). La quantité d'ADN est déterminée en réalisant une PCR quantitative en temps réel sur l'appareil "Chromo4" (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) pour un gène situé sur l'ADNmt, ND1 codant pour la sous unité 1 de la NADH déshydrogénase (amorce sens 5'- GGA CCT AAG CCC AAT AAC GA-3', amorce anti-sens 5'-GCT TCA TTG GCT ACA CCT TG-3') et un gène situé sur l'ADN nucléaire, la β -globine (amorce sens 5'-CTT CTG GCT ATG TTT CCC TT-3', amorce anti-sens 5'-GTT CTC AGG ATC CAC ATG CA-3'). Les résultats sont exprimés sous forme du ratio ND1/ β -globine.

X. Dosage des triglycérides hépatiques

1. Principe

Les triglycérides hépatiques sont extraits selon la méthode décrite par Xu et *al.* (2006). Les triglycérides sont dosés par une méthode enzymatique, selon les réactions suivantes :



Le principe du dosage repose sur le dosage du glycérol issu de l'hydrolyse des triglycérides par la lipoprotéine lipase. Le glycérol est ensuite phosphorylé par la glycérol kinase pour former du glycérol-1-phosphate qui va ensuite être oxydé par la glycérol phosphate oxydase pour aboutir à la formation de peroxyde d'hydrogène. La peroxydase catalyse le couplage entre le peroxyde d'hydrogène, la 4-aminoantipyrine (4-AAP) et le sodium N-ethyl-N-(3-sulfopropyl)m-anisidine (ESPA) pour aboutir à la formation d'un colorant, la quinonéimine

qui absorbe la lumière à 540 nm. L'augmentation d'absorbance à 540 est donc directement proportionnelle à la concentration de glycérol.

2. Réactifs

Les réactifs utilisés proviennent de chez Sigma Aldrich (Lyon, France).

Glycerol standart solution : solution contenant du glycérol à 0,26 mg/ml.

Free glycerol reagent : Un flacon est repris dans 40 ml d'eau distillée. La solution est conservée à 4°C pendant 2 mois. Cette solution contient 0,75 mM d'ATP, 3,75 mM de magnésium, 0,188 mM de 4-AAP, 2,11 mM de ESPA, 1,25 U/ml de glycérol kinase, 2,5 U/ml de glycérol phosphate oxydase et 2,5 U/ml de peroxydase.

Triglycéride reagent : Un flacon est repris dans 10 ml d'eau distillée. La solution est conservée à 4°C pendant 2 mois. Cette solution contient 250 U/ml de lipoprotéine lipase.

3. Protocole

Un morceau de foie d'environ 100 mg est pesé puis placé dans 1 ml d'éthanol. La préparation est ensuite homogénéisée au Potter (7 allers-retours, 1000 tours/min). L'homogénat est vortexé pendant 2 minutes et centrifugé à 15000 g pendant 10 minutes. Le dosage est ensuite effectué sur le surnageant.

Pour le dosage, 10 µl d'eau (blanc), de standard ou d'échantillon sont ajoutés dans 800 µl de free glycerol reagent et incubés à 37°C pendant 5 minutes. L'absorbance initiale (AI) est ensuite mesurée à 540 nm. La solution est récupérée et mélangée avec 200 µl de triglyceride reagent. Le mélange est incubé à 37°C pendant 5 min. L'absorbance finale (AF) est mesurée à 540 nm.

4. Expression des résultats

La concentration en triglycérides en mg/g de foie est calculée selon la formule :

$$[\text{TG}] = [\text{standard}] \times \frac{\text{AF}_{\text{échantillon}} - (\text{AI}_{\text{échantillon}} \times \text{F})}{\text{AF}_{\text{standard}} - (\text{AI}_{\text{blanc}} \times \text{F})} \times f_{\text{dilution}} \times \frac{\text{V}_{\text{homogénat}}}{\text{q}_{\text{foie}}}$$

[standard] : concentration du standard en mg/ml, soit 0,26

AI : absorbance initiale, correspondant au glycérol présent avant hydrolyse des triglycérides

AF : absorbance finale, correspondant au glycérol présent après hydrolyse des triglycérides

F : permet de rapporter l'AI mesurée dans 0,8 ml à l'AF mesurée dans 1ml. $F = 0,81/1,01 = 0,8$

f_{dilution} : facteur de dilution de l'échantillon dans le milieu réactionnel, soit 100

$\text{V}_{\text{homogénat}}$: volume de l'homogénat en ml

q_{foie} : quantité de foie en g

XI. Dosages sanguins

Après prélèvement, le sang est centrifugé à 3000 g pendant 8 minutes. Le sérum est récupéré et congelé à -80°C. Tous les dosages sont réalisés sur les sérums, excepté pour la glycémie.

1. Glycémie

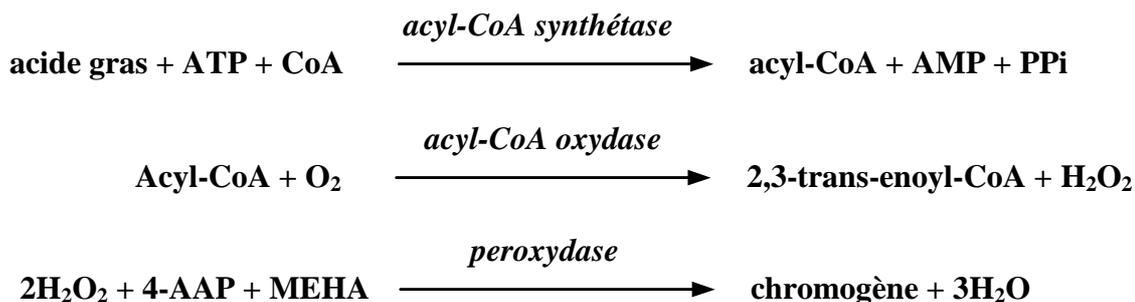
La glycémie est mesurée immédiatement sur le sang prélevé avec un glucomètre et exprimée en g/l.

2. Insuline, leptine, adiponectine

L'insuline, la leptine et l'adiponectine sont dosées par ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) avec des kits LINCO (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France).

3. Acides gras libres

Les acides gras libres (AGL) sont dosés avec un kit (Wako Unipath, Dardilly, France) et l'analyseur automatique Cobas Mira (Roche, Meylan, France), selon les réactions enzymatiques suivantes :



4-AAP : 4-amino-antipyrine et MEHA : 3-méthyl-N-éthyl-N-(β-hydroxyéthyl)-aniline.

4. β-hydroxybutyrate

La concentration en β-hydroxybutyrate est dosée avec l'analyseur automatique Cobas Mira (Roche, Meylan, France) en mesurant la formation de NADH selon la réaction enzymatique suivante :



5. Triglycérides

Les triglycérides sont dosés selon le même principe que les triglycérides hépatiques en utilisant un test enzymatique et l'analyseur automatique Modular (Roche, Meylan, France).

XII. Expression des résultats et analyse statistique

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± SEM (standard error of the mean). Pour les comparaisons entre deux groupes, un test t de student a été utilisé. Pour les comparaisons entre plus de deux groupes, un test d'analyse de variance (ANOVA) suivi d'un test de Fisher ont été réalisés. Les différences sont considérées comme significatives lorsque *P* est inférieur à 0,05. Les tests statistiques ont été réalisés en utilisant le logiciel Stat View (SAS Institute, Cary, NC, USA).

B – TRAVAUX SUR MODELE CELLULAIRE

I. Modèle : cellules HepG2 traitées avec du resvératrol

1. La lignée HepG2 et son entretien

La lignée HepG2 (ATCC HB8065) a été obtenue à partir d'un hépatocarcinome humain. Elle est cultivée en milieu DMEM (Institut de biotechnologies Jacques Boy, Reims, France) supplémenté avec 10 % de serum de veau fœtal ou SVF (Institut de biotechnologies Jacques Boy, Reims, France), 1 % de glutamine (Gibco, Invitrogen, Paisley, Angleterre), 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 0,25 µg/ml (Institut de biotechnologies Jacques Boy, Reims, France). Les cellules sont cultivées dans des flasks de 75 cm² et entreposées dans une étuve à 37°C contenant 5 % de CO₂. A confluence, les cellules subissent une trypsination. Le tapis cellulaire est préalablement rincé avec 8 ml de PBS 1X (Eurobio, Les Ulis, France) et 2 ml de trypsine 1X (Gibco, Invitrogen, Paisley, Angleterre) sont ajoutés dans la flask. Les cellules sont ainsi incubées à 37°C pendant 8 minutes. La réaction est arrêtée par l'ajout de 8 ml de milieu contenant du SVF. Les cellules sont homogénéisées et repiquées au minimum au 1/10^e dans une nouvelle flask.

2. Traitement des cellules HepG2 avec du resvératrol

Une solution de resvératrol (Sigma Aldrich, Lyon, France) à 50 mM est préparée dans du DMSO, aliquotée et conservée à -20°C. Vingt quatre heures avant confluence le milieu de culture est changé et 20 µl de resvératrol pour 20 ml de milieu sont ajoutés, soit une concentration finale de 50 µM. Les cellules témoins reçoivent 20 µl de DMSO pour 20 ml de milieu.

II. Mesure de la consommation d'oxygène cellulaire sur cellules entières non perméabilisées

1. Principe

La consommation d'oxygène cellulaire est mesurée par polarographie sur l'oxygraphe *Oxytherm*. Le principe de l'électrode de Clark est présenté dans la partie *A-IV-1-a*.

La consommation d'oxygène peut-être déterminée à différents états respiratoires :

- **routine** : La respiration de routine reflète la consommation d'oxygène basale des cellules avec les substrats présents dans le milieu de culture.
- **oligomycine** : La respiration après l'ajout d'oligomycine (inhibiteur de l'ATP synthase) représente la consommation d'oxygène en condition non-phosphorylante et est principalement due à la compensation de la fuite de protons.
- **FCCP** : Le FCCP permet de dissiper le gradient de protons. La consommation d'oxygène est alors contrôlée par le système d'oxydation et reflète ainsi la capacité maximale de fonctionnement de la chaîne respiratoire.

La mesure de ces différents états respiratoires permet également de calculer des rapports de contrôle respiratoire (RCR) :

- Le **RCR** correspond au quotient de la capacité respiratoire maximale (FCCP) et de la respiration en condition non-phosphorylante (oligomycine) et représente ainsi la part de la capacité maximale de la chaîne respiratoire nécessaire à la compensation de la fuite de protons.

$$\mathbf{RCR = FCCP / oligomycine}$$

- Le **RCRp** ou RCR phosphorylant est obtenu en soustrayant la respiration oligomycine à la respiration de routine et en divisant par la respiration FCCP. Le RCRp représente la part de la capacité de la chaîne respiratoire utilisée pour synthétiser de l'ATP.

$$\mathbf{RCRp = (routine - oligomycine) / FCCP}$$

- L'**UCR** (uncoupling control ratio) correspond au quotient de la respiration FCCP et de la respiration de routine et représente ainsi la réserve de capacité respiratoire de la chaîne.

$$\mathbf{UCR = FCCP / routine}$$

2. Réactifs

Les réactifs utilisés (oligomycine, FCCP, myxothiazole) proviennent de chez Sigma Aldrich (Lyon, France).

DMEM + 5 % SVF + 1 % glutamine :

- 94 ml DMEM
- 5 ml SVF
- 1 ml glutamine

DMEM + 1 % glutamine :

- 99 ml DMEM
- 1 ml glutamine

Oligomycine (6 mg/ml éthanol) : La solution est conservée à -20°C pendant 1 mois.

FCCP (200 µM) : Une solution de 2 mM est préparée en dissolvant 1 mg de FCCP dans 2 ml d'éthanol. La solution de 2 mM est diluée au 1/10^e et conservée à -20°C pendant 1 mois.

Myxothiazole (5 mM) : 2,44 mg/1 ml d'éthanol. La solution est conservée à -20°C pendant 3 mois.

3. Protocole

a) Préparation des cellules

Le tapis cellulaire est préalablement rincé avec 8 ml de PBS 1X et 2 ml de trypsine 1X sont ajoutés dans la flask. Les cellules sont ainsi incubées à 37°C pendant 8 min. La réaction est arrêtée par l'ajout de 8 ml de DMEM + 5 % SVF + 1 % glutamine. Un comptage cellulaire est réalisé sur cellule de Mallassez à partir de la suspension cellulaire diluée au 1/10^e dans du PBS 1X (100 µl + 900 µl respectivement). La suspension cellulaire est centrifugée à 900 rpm pendant 5 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est repris dans 8 ml de DMEM + 1 % glutamine. Un volume correspondant à 10 millions de cellules est prélevé et centrifugé à 900 rpm pendant 5 minutes. La suspension cellulaire restante est aliquotée sous forme de culots secs de 5 millions de cellules qui sont congelés à -80°C. Après centrifugation des cellules destinées à l'oxygraphie, le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 1 ml de DMEM + 1 % glutamine.

b) Mesure de la consommation d'oxygène

Avant la première mesure, l'oxygraphe est calibré (*cf partie A-IV-3*) avec du DMEM + 1 % glutamine pour obtenir le 100 % d'oxygène.

La suspension cellulaire préalablement obtenue est placée dans la cuve. La respiration de routine est mesurée jusqu'à l'obtention d'une pente régulière (environ 3 minutes). L'oligomycine (1 µl à 6 mg/ml) est alors ajoutée dans la cuve de mesure. Après l'obtention d'une pente régulière, 1 µl d'oligomycine est à nouveau ajouté afin de s'assurer que la première dose était bien en concentration saturante. Une titration avec du FCCP (5 x 1 µl à 200 µM) est ensuite réalisée afin de déterminer la concentration optimale en FCCP nécessaire à la stimulation maximale de la chaîne respiratoire. En effet au-delà d'une certaine concentration, le FCCP devient toxique pour les cellules et inhibe ainsi la respiration. Enfin, 2 µl de myxothiazole (5 mM) sont ajoutés. Le myxothiazole en tant qu'inhibiteur du complexe III va inhiber entièrement la respiration mitochondriale. La respiration résiduelle n'est donc pas d'origine mitochondriale et sera retranchée aux valeurs obtenues précédemment. A la fin de chaque mesure, 800 µl de la suspension cellulaire contenue dans la cuve de mesure sont prélevés et congelés à -20°C. Un exemple de mesure de consommation d'oxygène sur cellules entières non perméabilisées est présenté dans la **Figure 23**.

c) Dosage protéique

La suspension cellulaire décongelée est centrifugée à 1500 rpm pendant 5 minutes. Une fois le surnageant éliminé, le culot cellulaire est repris dans 800 µl de NaCl puis dilué au ¼ dans du NaCl. Le dosage des protéines est décrit dans la partie A-III.

4. Expression des résultats

La vitesse de consommation d'oxygène est déterminée en calculant la valeur des pentes dans leur partie la plus linéaire. Les résultats en nmol/min/ml sont convertis en nmol/min/mg de protéines.

III. Mesure du potentiel de membrane mitochondrial

1. Principe

Le potentiel de membrane mitochondrial est mesuré en utilisant une sonde fluorescente, le DiOC₆(3) (3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide). Ce fluorochrome est un cation lipophile sensible au voltage qui s'accumule sélectivement dans les mitochondries lorsqu'il est utilisé à faible concentration. La fluorescence des cellules est mesurée par cytométrie en flux et les cellules mortes sont exclues par marquage à l'iodure de propidium. La fluorescence obtenue est proportionnelle au potentiel de membrane mitochondrial : plus ce dernier est élevé, plus la sonde s'accumule dans la mitochondrie. Le KCl présent dans le tampon permet de dépolariser la membrane plasmique et ainsi d'accentuer la spécificité du fluorochrome pour la mitochondrie. Pour une même condition expérimentale, quatre tubes différents sont préparés. Le tube avec les cellules seules sans DiOC₆(3) permet d'évaluer l'autofluorescence des cellules. Les cellules incubées avec uniquement le DiOC₆(3) permettent de mesurer le potentiel en condition phosphorylante. L'ajout d'oligomycine permet d'inhiber l'ATP synthase et ainsi de mesurer le potentiel de membrane mitochondrial nécessaire à la compensation de la fuite de protons. L'ajout de mClCCP (carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone) permet la dissipation du potentiel de membrane et la valeur de potentiel de membrane obtenue reflète ainsi l'incorporation non spécifique du fluorochrome dans d'autres compartiments cellulaires.

2. Réactifs

Les réactifs utilisés (oligomycine, mClCCP, iodure de propidium) proviennent de chez Sigma Aldrich (Lyon, France) et de chez Invitrogen (Cergy Pontoise, France) pour le DiOC₆(3).

Tampon PBS + 5 % SVF + 50 mM KCl

- 95 ml PBS 1X
- 5 ml SVF
- 372,8 mg KCl

DiOC₆(3) (80 nM) : Une solution à 800 μ M est préparée (4,580 mg/10 ml éthanol) et conservée à l'abri de la lumière à -20°C pendant 6 mois. Extemporaneément, la solution à 800 μ M est diluée au 1/100^e puis à nouveau au 1/100^e dans du tampon PBS + 5 % SVF + 50 mM KCl.

Oligomycine (10 µg/ml éthanol) : Une solution à 5 mg/ml éthanol est préparée et conservée à -20°C pendant 1 mois. Extemporément, la solution à 5 mg/ml est diluée au 1/500^e dans du tampon PBS + 5 % SVF + 50 mM KCl.

mClCCP (200 µM) : Une solution à 20 mM est préparée (4 mg/1ml éthanol) et est conservée à -20°C pendant 1 mois. Extemporément, la solution à 20 mM est diluée au 1/100^e dans du tampon PBS + 5 % SVF + 50 mM KCl.

Iodure de propidium (50 µg/ml) : Une solution à 1 mg/ml PBS 1X est préparée puis diluée au 1/20^e dans du PBS 1X. La solution est conservée à 4°C pendant 6 mois.

3. Protocole

Après trypsination et comptage des cellules, un volume de la suspension cellulaire correspondant à ½ million de cellules est distribué dans des tubes ependorf, à raison de 4 tubes par condition expérimentale. Les tubes sont ensuite centrifugés à 1500 rpm pendant 2 minutes. Une fois le surnageant retiré, le culot est repris avec les réactifs suivants selon le tube :

	Cellules seules	Cellules + DiOC ₆ (3)	Cellules + DiOC ₆ (3) + oligomycine	Cellules + DiOC ₆ (3) + mClCCP
Tampon PBS + 5 % SVF + 50 mM KCl	500 µl	375 µl	125 µl	350 µl
DiOC ₆ (3) (80 nM)		125 µl	125 µl	125 µl
Oligomycine (10 µg/ml)			250 µl	
mClCCP (200 µM)				25 µl

Après une incubation à 37°C pendant 30 minutes, 450 µl de tampon PBS + 5 % SVF + 50 mM KCl sont ajoutés dans les tubes qui sont ensuite centrifugés à 1500 rpm pendant 2 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 500 µl de tampon PBS + 5 %

SVF + 50 mM KCl. La suspension cellulaire est transférée dans des tubes adaptés au cytomètre de flux et 25 μ l d'iodure de propidium à 50 μ g/ml sont ajoutés dans tous les tubes excepté les tubes destinés à évaluer l'autofluorescence des cellules (cellules seules). Les tubes sont conservés à l'obscurité jusqu'à la mesure de cytométrie de flux, effectuée le plus rapidement possible. L'aiguille reliée au cytomètre de flux (FACScan, Becton-Dickinson, Le Pont-De-Claix, France) est placée dans le tube et permet l'aspiration de la suspension cellulaire qui va traverser une source d'excitation lumineuse et ainsi diffracter la lumière selon plusieurs axes. La lumière diffractée selon un angle inférieur à 12° est proportionnelle à la taille de la cellule (FSC : forward scatter) et celle diffractée selon un angle de 90° est un reflet du contenu cytoplasmique de la cellule (SSC : side scatter). Ces signaux optiques sont alors intégrés par le logiciel d'analyse (Cell Quest Software). La sonde DiOC₆(3) est excitée à une longueur d'onde de 488 nm et sa fluorescence est mesurée à 511 nm. La fluorescence de l'iodure de propidium est mesurée à 610 nm.

4. Expression des résultats

Un graphique de SSC en fonction de FSC peut être tracé dans lequel chaque point représente une cellule (**Figure 24**). De même un graphique représentant la fluorescence de l'iodure de propidium en fonction de la taille des cellules est construit afin de prendre en compte uniquement les cellules vivantes. Un histogramme du nombre de cellules en fonction de la fluorescence du DiOC₆(3) permet de calculer la moyenne de fluorescence de la population cellulaire. La fluorescence obtenue en présence de DiOC₆(3) + mCICCP est retranchée à celle mesurée en présence du DiOC₆(3) seul et à celle mesurée en présence de DiOC₆(3) + oligomycine. Les résultats obtenus sont alors un reflet du potentiel de membrane mitochondrial en condition phosphorylante (DiOC₆(3) seul) et en condition non-phosphorylante (DiOC₆(3) + oligomycine). En condition non-phosphorylante, le gradient de protons est essentiellement utilisé pour compenser la fuite de protons, le potentiel de membrane mitochondrial est donc supérieur à celui obtenu en condition phosphorylante. La fluorescence en présence d'oligomycine doit donc être supérieure à celle en présence de DiOC₆(3) seul.

IV. Dosage des activités enzymatiques mitochondriales et de la LDH

Le principe du dosage des activités enzymatiques des complexes de la chaîne respiratoire est décrit dans la partie A-VII.

Les réactifs utilisés proviennent de chez Sigma Aldrich (Lyon, France) excepté pour l'ATP, le NADH, la LDH et la PK (Roche, Meylan, France), pour le décylubiquinone (Tebu-bio, La Perray-en-Yvelines, France) et pour le cytochrome *c* oxydé (Acros Organics, Halluin, France). Une fois préparés les réactifs sont aliquotés de manière à n'utiliser qu'un seul aliquot par jour d'expérimentation.

Les dosages sont réalisés à partir de culots secs de cellules conservés à -80°C. Une fois décongelé, le culot est repris avec 50 µl de tampon A par million de cellules. Chaque dosage est réalisé en duplicate.

Tampon A :

	Masse molaire (g/mol)	Concentration finale	Masse qsp 100 ml d'eau distillée
Saccharose	342,3	250 mM	8,56 g
Tris base	121,14	20 mM	242,28 mg
EDTA	372,24	2 mM	74,45 mg
BSA	-	1 mg/ml	100 mg

Le pH est ajusté à 7,2 avec de l'HCl 5 M et le tampon est conservé à -20°C pendant 6 mois.

1. NADH ubiquinone oxydoréductase (complexe I)

a) Principe

La technique de mesure de l'activité du complexe I sur cellules est adaptée de celle décrite par Kuznetsov et Gnaiger (Mitochondrial Physiology Network 8.15, 2003). La réaction enzymatique catalysée par le complexe I est présentée dans la partie A-VII-1-a.

Le dosage du complexe I fait intervenir un composé chimique de couleur bleue, le dichlorophenolindophenol (DCPIP), qui absorbe la lumière à 600 nm. Le DCPIP accepte les électrons de l'ubiquinol formé permettant ainsi de recycler ce dernier afin d'éviter son accumulation qui entraîne l'inhibition de l'activité du complexe I. Lorsque le DCPIP est réduit par l'ubiquinol, il perd sa couleur bleue et n'absorbe plus la lumière. Lors de la mesure spectrophotométrique, la diminution de l'absorbance à 600 nm est alors proportionnelle à l'activité du complexe I. Ce dosage est réalisé en présence et en absence de roténone (inhibiteur spécifique du complexe I), afin d'obtenir l'activité de réduction de l'ubiquinone spécifique du complexe I.

b) Réactifs

Tampon KH_2PO_4 (100 mM), pH 7,4 : 1,36 g/100 ml eau distillée. Le pH est ajusté à 7,4 avec du KOH 5 M. La solution est conservée à -20°C pendant 6 mois.

BSA (50 mg/ml eau distillée) : La solution est conservée à -20°C pendant 6 mois.

KCN (500 mM) : 325 mg/10 ml eau distillée. La solution est conservée à -20°C pendant 1 mois.

Azide de sodium (1 M) : 65 mg/1 ml eau distillée. La solution est conservée à -20°C pendant 6 mois.

DCPIP (5 mM) : 14,51 mg/10 ml eau distillée. La solution est préparée extemporanément et incubée à 37°C .

Ubiquinone-1 (2,5 mM) : Une solution de 39,9 mM est préparée en dissolvant 10 mg d'ubiquinone dans 1 ml d'éthanol. Cette solution mère est conservée à -20°C pendant 1 mois à l'abri de la lumière. La solution à 2,5 mM est préparée extemporanément en diluant 100 μl de la solution mère dans 1,498 μl d'éthanol.

NADH (15 mM) : 10,64 mg/1 ml eau distillée. La solution est préparée extemporanément dans un tube en verre et protégée de la lumière.

Roténone (2,5 mM) : 9,86 mg/10 ml éthanol/DMSO (volume/volume). La solution est conservée à -20°C pendant 3 mois.

c) *Protocole*

Le tube contenant les cellules reprises dans le tampon A est immergé dans de l'azote liquide pendant 3 minutes. La suspension cellulaire est ensuite rapidement décongelée à 37°C puis centrifugée à 16000 g pendant 30 secondes. Une fois le surnageant éliminé, le culot est repris avec 50 µl de tampon A par million de cellules. Cette suspension cellulaire est diluée au 1/5^e dans du tampon A et soumise à un cycle de sonication de 6 x 5 secondes avec 30 secondes d'intervalle entre chaque sonication. La sonication est réalisée dans la glace.

Dans un tube en verre, sont ajoutés :

- 25 µl d'eau distillée
- 815 µl de tampon KH₂PO₄ (soit 81,5 mM)
- 20 µl de BSA (soit 1 mg/ml)
- 2 µl de KCN (soit 1 mM)
- 2 µl d'azide de sodium (soit 2 mM)
- 15 µl de DCPIP (soit 75 µM)
- 40 µl d'ubiquinone-1 (soit 100 µM)

Ce mélange réactionnel est incubé à 37°C pendant 5 minutes, puis 125 µl de la suspension cellulaire (soit 0,5 million de cellules) sont ajoutés. La réaction est ensuite initiée par l'ajout de 20 µl de NADH (soit 300 µM). L'évolution de l'absorbance à 600 nm est suivie au spectrophotomètre, thermostaté à 37°C, pendant 40 secondes. Sans arrêter la lecture, 4 µl de roténone (soit 10 µM) sont ajoutés en agitant dans les cuves. L'évolution de l'absorbance est à nouveau suivie pendant 40 secondes.

d) *Expression des résultats*

Les variations d'absorbance sont mesurées, en fonction du temps, sur la partie linéaire de la cinétique. L'activité spécifique (nmol/min/million de cellules) du complexe I est calculée en utilisant la formule suivante :

$$AS = \frac{\Delta DO_{(-R)} - \Delta DO_{(+R)}}{l \times \epsilon_{DCPIP} \times S_{n_{DCPIP}}} \times \frac{10^3}{q_{cellules}}$$

$\Delta DO_{(-R)}$: variation de DO par minute sans roténone

$\Delta DO_{(+R)}$: variation de DO par minute avec roténone

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit 1

ϵ_{DCPIP} : coefficient d'extinction molaire du DCPIP à 600 nm, en $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, soit 19,1

S_{DCPIP} : nombre stœchiométrique du DCPIP dans l'équation de la réaction, soit 1

q_{cellules} : quantité de cellules ajoutée dans le milieu réactionnel en million, soit 0,5

Les résultats en nmol/min/million de cellules sont ensuite convertis en nmol/min/mg de protéines suite au dosage de protéines.

2. Succinate ubiquinone oxydoréductase (complexe II)

a) Principe

La technique de mesure de l'activité du complexe II sur cellules est adaptée de celle décrite par James *et al.* (1996). Les réactions enzymatiques catalysées par le complexe II sont présentées dans la partie A-VII-2-a.

Le dosage du complexe II fait intervenir le DCPIP, qui absorbe la lumière à 600 nm. Lorsque le DCPIP est réduit par l'ubiquinol, il perd sa couleur bleue et n'absorbe plus la lumière. Lors de la mesure spectrophotométrique, la diminution de l'absorbance à 600 nm est alors proportionnelle à l'activité du complexe II. Ce dosage est réalisé en présence et en absence de thénoltrifluoroacétone (inhibiteur spécifique du complexe II), afin d'obtenir l'activité de réduction de l'ubiquinone spécifique du complexe II.

b) Réactifs

Tampon KH_2PO_4 (100 mM), pH 7,5 : 1,36 g/100 ml eau distillée. Le pH est ajusté à 7,5 avec du KOH 5 M. La solution est conservée à -20°C pendant 6 mois.

EDTA (20 mM) : 584 mg/10 ml eau distillée. Le pH est ajusté à 7,5 avec du NaOH 5 M. La solution est conservée à -20°C pendant 6 mois.

BSA (50 mg/ml eau distillée) : La solution est conservée à -20°C pendant 6 mois.

Succinate (500 mM) : 590,45 mg/10 ml eau distillée. Le pH est ajusté à 7,4 avec du KOH 5 M. La solution est conservée à -20°C pendant 3 mois.

KCN (10 mM) : 6,5 mg/10 ml eau distillée. La solution est conservée à -20°C pendant 1 mois.

Roténone (2,5 mM) : 9,86 mg/10 ml éthanol/DMSO (volume/volume). La solution est conservée à -20°C pendant 3 mois.

Antimycine A (1 mg/ml éthanol) : La solution est conservée à -20°C pendant 1 mois.

DCPIP (5 mM) : 14,51 mg/10 ml eau distillée. La solution est préparée extemporanément et incubée à 37°C.

Triton X 100 (10 %) : Le triton X 100 est dilué au 1/10^e dans de l'eau distillée. La solution est conservée à -20°C pendant 6 mois.

Ubiquinone-1 (2,5 mM) : Une solution de 39,9 mM est préparée en dissolvant 10 mg d'ubiquinone dans 1 ml d'éthanol. Cette solution mère est conservée à -20°C pendant 1 mois à l'abri de la lumière. La solution à 2,5 mM est préparée extemporanément en diluant 100 µl de la solution mère dans 1,498 µl d'éthanol.

Thénoltrifluoroacétone (40 mM) : 8,89 mg/1 ml éthanol. La solution est conservée à -20°C pendant 3 mois.

c) Protocole

Le tube contenant les cellules reprises dans le tampon A est immergé dans de l'azote liquide pendant 3 minutes. La suspension cellulaire est ensuite rapidement décongelée à 37°C puis centrifugée à 16000 g pendant 30 secondes. Une fois le surnageant éliminé, le culot est repris avec 50 µl de tampon A par million de cellules.

Dans un tube en verre, sont ajoutés :

- 160 µl d'eau distillée
- 500 µl de tampon KH₂PO₄ (soit 50 mM)
- 5 µl d'EDTA (soit 100 µM)
- 20 µl de BSA (soit 1 mg/ml)
- 40 µl de succinate (soit 20 mM)
- 200 µl de KCN (soit 2 mM)
- 4 µl de roténone (soit 10 µM)
- 4 µl d'antimycine A (soit 4 µg/ml)
- 16 µl de DCPIP (soit 80 µM)
- 2 µl de triton X 100 (soit 0,02 %)

Ce mélange réactionnel est incubé à 37°C pendant 2 minutes, puis 25 µl de la suspension cellulaire (soit 0,5 million de cellules) sont ajoutés. La réaction est ensuite initiée par l'ajout de 20 µl d'ubiquinone-1 (soit 50 µM). L'évolution de l'absorbance à 600 nm est suivie au

spectrophotomètre, thermostaté à 37°C, pendant 40 secondes. Sans arrêter la lecture, 5 µl de thénoltrifluoroacétone (soit 200 µM) sont ajoutés en agitant dans les cuves. L'évolution de l'absorbance est à nouveau suivie pendant 40 secondes.

d) Expression des résultats

Les variations d'absorbance sont mesurées, en fonction du temps, sur la partie linéaire de la cinétique. L'activité spécifique (nmol/min/million de cellules) du complexe II est calculée en utilisant la formule suivante :

$$AS = \frac{\Delta DO_{(-T)} - \Delta DO_{(+T)}}{l \times \epsilon_{DCPIP} \times Sn_{DCPIP}} \times \frac{10^3}{q_{cellules}}$$

$\Delta DO_{(-T)}$: variation de DO par minute sans thénoltrifluoroacétone

$\Delta DO_{(+T)}$: variation de DO par minute avec thénoltrifluoroacétone

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit 1

ϵ_{DCPIP} : coefficient d'extinction molaire du DCPIP à 600 nm, en $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, soit 19,1

Sn_{DCPIP} : nombre stœchiométrique du DCPIP dans l'équation de la réaction, soit 1

$q_{cellules}$: quantité de cellules ajoutée dans le milieu réactionnel en million, soit 0,5

Les résultats en nmol/min/million de cellules sont ensuite convertis en nmol/min/mg de protéines suite au dosage de protéines.

3. Ubiquinol cytochrome c oxydoréductase (complexe III)

a) Principe

La réaction enzymatique catalysée par le complexe III et le principe du dosage sont présentés dans la partie A-VII-3-a.

b) Réactifs

Tampon KH_2PO_4 (20 mM), pH 7,8 : 272 mg/100 ml eau distillée. Le pH est ajusté à 7,8 avec du KOH 5 M. La solution est conservée à -20°C pendant 6 mois.

BSA (50 mg/ml eau distillée) : La solution est conservée à -20°C pendant 6 mois.

EDTA (20 mM) : 584 mg/10 ml eau distillée. Le pH est ajusté à 7,5 avec du NaOH 5 M. La solution est conservée à -20°C pendant 6 mois.

KCN (10 mM) : 6,5 mg/10 ml eau distillée. La solution est conservée à -20°C pendant 1 mois.

Cytochrome *c* oxydé (1 mM) : 12,38 mg/1 ml eau distillée. La solution est préparée extemporanément.

Antimycine A (1 mg/ml éthanol) : La solution est conservée à -20°C pendant 1 mois.

Décylubiquinol (25 mM) : cf partie A-VII-3-b

c) Protocole

Le tube contenant les cellules reprises dans le tampon A est immergé dans de l'azote liquide pendant 3 minutes. La suspension cellulaire est ensuite rapidement décongelée à 37°C puis centrifugée à 16000 g pendant 30 secondes. Une fois le surnageant éliminé, le culot est repris avec 50 µl de tampon A par million de cellules.

Dans un tube en verre, sont ajoutés :

- 309 µl d'eau distillée
- 500 µl de tampon KH₂PO₄ (soit 10 mM)
- 20 µl de BSA (soit 1 mg/ml)
- 100 µl d'EDTA (soit 2 mM)
- 24 µl de KCN (soit 240 µM)
- 40 µl de cytochrome *c* oxydé (soit 40 µM)
- +/- 4 µl d'antimycine A (soit 4 µg/ml)

Ce mélange réactionnel est incubé à 37°C pendant 2 minutes, puis 5 µl de la suspension cellulaire (soit 0,1 million de cellules) sont ajoutés. La réaction est ensuite initiée par l'ajout de 2 µl de décylubiquinol (soit 50 µM). L'évolution de l'absorbance à 550 nm est suivie au spectrophotomètre, thermostaté à 37°C, pendant 1 minute.

d) Expression des résultats

Les variations d'absorbance sont mesurées, en fonction du temps, sur la partie linéaire de la cinétique. L'activité spécifique (nmol/min/million de cellules) du complexe III est calculée en utilisant la formule suivante :

$$AS = \frac{\Delta DO_{(-A)} - \Delta DO_{(+A)}}{l \times \epsilon_{\text{cyt } c} \times Sn_{\text{cyt } c}} \times \frac{10^3}{q_{\text{cellules}}}$$

$\Delta DO_{(-A)}$: variation de DO par minute sans antimycine A

$\Delta DO_{(+A)}$: variation de DO par minute avec antimycine A

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit 1

$\epsilon_{\text{cyt } c}$: coefficient d'extinction molaire du cytochrome c réduit à 550 nm, en $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, soit 18,5

$Sn_{\text{cyt } c}$: nombre stœchiométrique du cytochrome c dans l'équation de la réaction, soit 1

q_{cellules} : quantité de cellules ajoutée dans le milieu réactionnel en million, soit 0,1

Les résultats en nmol/min/million de cellules sont ensuite convertis en nmol/min/mg de protéines suite au dosage de protéines.

4. Cytochrome c oxydase (complexe IV)

a) Principe

La réaction enzymatique catalysée par le complexe IV et le principe du dosage sont présentés dans la partie A-VII-4-a.

b) Réactifs

Tampon KH_2PO_4 (100 mM), pH 6,5 : 1,36 g/100 ml eau distillée. Le pH est ajusté à 6,5 avec du KOH 5 M. La solution est conservée à -20°C pendant 6 mois.

BSA (50 mg/ml eau distillée) : La solution est conservée à -20°C pendant 6 mois.

Laurylmaltoside (125 mM) : 63,83 mg/1 ml eau distillée. La solution est conservée à -20°C pendant 1 mois.

Cytochrome c (1 mM) : 12,38 mg/1 ml tampon KH_2PO_4 (100 mM, pH 6,5). La solution est préparée extemporanément.

Cytochrome c réduit (50 μM) : La solution de cytochrome c réduit est préparée extemporanément en diluant 500 μl de la solution de cytochrome c (1 mM) dans 9,5 ml de tampon KH_2PO_4 (100 mM, pH 6,5). La réduction du cytochrome c est décrite dans la partie A-VII-4-b.

c) Protocole

Ce dosage est réalisé directement sur les cellules reprises dans le tampon A.

Dans un tube à hémolyse, sont ajoutés :

- 455 µl d'eau distillée
- 200 µl de tampon KH₂PO₄ (soit 20 mM)
- 20 µl de BSA (soit 1 mg/ml)
- 300 µl de cytochrome *c* réduit (soit 15 µM)

Ce mélange réactionnel est incubé à 37°C pendant 3 minutes, puis 5 µl de la suspension cellulaire (soit 0,1 million de cellules) sont ajoutés. La réaction est ensuite initiée par l'ajout de 20 µl de laurylmaltoside (soit 2,5 mM). L'évolution de l'absorbance à 550 nm est suivie au spectrophotomètre, thermostaté à 37°C, pendant 90 secondes.

d) Expression des résultats

Les variations d'absorbance sont mesurées, en fonction du temps, sur la partie linéaire de la cinétique. L'activité spécifique (nmol/min/million de cellules) du complexe IV est calculée en utilisant la formule suivante :

$$AS = \frac{\Delta DO}{l \times \epsilon_{\text{cyt } c} \times Sn_{\text{cyt } c}} \times \frac{10^3}{q_{\text{cellules}}}$$

ΔDO : variation de DO par minute

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit 1

$\epsilon_{\text{cyt } c}$: coefficient d'extinction molaire du cytochrome *c* réduit à 550 nm, en mM⁻¹.cm⁻¹, soit 18,5

$Sn_{\text{cyt } c}$: nombre stœchiométrique du cytochrome *c* dans l'équation de la réaction, soit 1

q_{cellules} : quantité de cellules ajoutée dans le milieu réactionnel en million, soit 0,1

Les résultats en nmol/min/million de cellules sont ensuite convertis en nmol/min/mg de protéines suite au dosage de protéines.

5. ATP synthase

a) Principe

La réaction enzymatique catalysée par l'ATP synthase et le principe du dosage sont présentés dans la partie A-VII-5-a.

b) Réactifs

Tampon G1 : cf partie A-VII-5-b

NADH (2 mM) : 1,42 mg/1 ml eau distillée. La solution est préparée extemporanément dans un tube en verre et protégée de la lumière.

Oligomycine (1 mg/ml éthanol) : La solution est conservée à -20°C pendant 1 mois.

FCCP (10 mM) : 2,5 mg/1 ml d'éthanol. La solution est conservée à -20°C pendant 1 mois.

Antimycine A (2,5 mg/ml éthanol) : La solution est conservée à -20°C pendant 1 mois.

Lactate déshydrogénase (LDH) : La LDH est fournie sous forme de solution à 5000 U/ml.

Pyruvate kinase (PK) : La PK est fournie sous forme de solution à 5000 U/ml.

Tampon G2 : cf partie A-VII-5-b

c) Protocole

Le tube contenant les cellules reprises dans le tampon A est immergé dans de l'azote liquide pendant 3 minutes. La suspension cellulaire est ensuite rapidement décongelée à 37°C puis centrifugée à 16000 g pendant 30 secondes. Une fois le surnageant éliminé, le culot est repris avec 50 µl de tampon A par million de cellules. Cette suspension cellulaire est diluée au 1/5^e dans du tampon A et soumise à un cycle de sonication de 6 x 5 secondes avec 30 secondes d'intervalle entre chaque sonication. La sonication est réalisée dans la glace.

Dans un tube en verre, sont ajoutés :

- 645 µl d'eau distillée
- 200 µl de tampon G2
- +/- 10 µl d'oligomycine (soit 10 µg/ml)

Ce mélange réactionnel est incubé à 37°C pendant 3 minutes, puis 125 µl de la suspension cellulaire (soit 0,5 million de cellules) sont ajoutés. La réaction est ensuite initiée par l'ajout

de 30 µl de NADH (soit 60 µM). L'évolution de l'absorbance à 340 nm est suivie au spectrophotomètre, thermostaté à 37°C, pendant 90 secondes.

d) Expression des résultats

Les variations d'absorbance sont mesurées, en fonction du temps, sur la partie linéaire de la cinétique. L'activité spécifique (nmol/min/million de cellules) de l'ATP synthase est calculée en utilisant la formule suivante :

$$AS = \frac{\Delta DO_{(-O)} - \Delta DO_{(+O)}}{l \times \epsilon_{NADH} \times S n_{NADH}} \times \frac{10^3}{q_{cellules}}$$

$\Delta DO_{(-O)}$: variation de DO par minute sans oligomycine

$\Delta DO_{(+O)}$: variation de DO par minute avec oligomycine

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit 1

ϵ_{NADH} : coefficient d'extinction molaire du NADH à 340 nm, en $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, soit 6,22

$S n_{NADH}$: nombre stœchiométrique du NADH dans l'équation de la réaction, soit 1

$q_{cellules}$: quantité de cellules ajoutée dans le milieu réactionnel en million, soit 0,5

Les résultats en nmol/min/million de cellules sont ensuite convertis en nmol/min/mg de protéines suite au dosage de protéines.

6. Citrate synthase

a) Principe

La réaction enzymatique catalysée par la citrate synthase et le principe du dosage sont présentés dans la partie A-VII-6-a.

b) Réactifs

Tampon Tris (1 M) : 12,11 g/100 ml eau distillée. Le pH est ajusté à 8,1 avec de l'HCl 5 M. La solution est conservée à -20°C pendant 6 mois.

DTNB (1 mM) : 1,98 mg/5 ml tampon Tris (1M). La solution est préparée extemporanément et protégée de la lumière.

Oxaloacétate (10 mM) : 6,6 mg/5 ml eau distillée. La solution est préparée extemporanément.

Acétyl-CoA (10 mM) : 10 mg/1,2 ml eau distillée. La solution est conservée à -20°C pendant 1 mois.

Triton X 100 (10 %) : Le triton X 100 est dilué au 1/10^e dans de l'eau distillée. La solution est conservée à -20°C pendant 6 mois.

c) Protocole

Ce dosage est réalisé directement sur les cellules reprises dans le tampon A.

Dans un tube à hémolyse, sont ajoutés :

- 755 µl d'eau distillée
- 150 µl de DTNB (soit 150 µM)
- 50 µl d'oxaloacétate (soit 500 µM)
- 30 µl d'acétyl-CoA (soit 300 µM)
- 10 µl de triton X 100 (soit 0,1 %)

Ce mélange réactionnel est incubé à 37°C pendant 2 minutes. La réaction est ensuite initiée par l'ajout de 5 µl de la suspension cellulaire (soit 0,1 million de cellules). L'évolution de l'absorbance à 412 nm est suivie au spectrophotomètre, thermostaté à 37°C, pendant 1 minute.

d) Expression des résultats

Les variations d'absorbance sont mesurées, en fonction du temps, sur la partie linéaire de la cinétique. L'activité spécifique (nmol/min/million de cellules) de la citrate synthase est calculée en utilisant la formule suivante :

$$AS = \frac{\Delta DO}{l \times \epsilon_{TNB} \times S_{n_{TNB}}} \times \frac{10^3}{q_{cellules}}$$

ΔDO : variation de DO par minute

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit 1

ϵ_{TNB} : coefficient d'extinction molaire du TNB à 412 nm, en $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, soit 13,6

$S_{n_{TNB}}$: nombre stœchiométrique du TNB dans l'équation de la réaction, soit 1

$q_{cellules}$: quantité de cellules ajoutée dans le milieu réactionnel en million, soit 0,1

Les résultats en nmol/min/million de cellules sont ensuite convertis en nmol/min/mg de protéines suite au dosage de protéines.

7. Lactate déshydrogénase

a) Principe

Le dosage de l'activité de la lactate déshydrogénase est réalisé selon la méthode décrite par Hutter *et al.* (2004). La lactate déshydrogénase catalyse la réaction suivante :



Le principe du dosage consiste à mesurer l'oxydation du NADH dont l'absorbance est mesurée à 340 nm. Lors de la mesure spectrophotométrique, la diminution de l'absorbance à 340 nm est alors proportionnelle à l'activité de la lactate déshydrogénase.

b) Réactifs

Tampon Tris (100 mM) : 1,211 g/100 ml eau distillée. Le pH est ajusté à 7,1 avec de l'HCl 5 M. La solution est conservée à -20°C pendant 6 mois.

NADH (15 mM) : 10,64 mg/1 ml eau distillée. La solution est préparée extemporanément dans un tube en verre et protégée de la lumière.

Pyruvate (1 M) : 110 mg/1 ml eau distillée. La solution est préparée extemporanément.

Triton X 100 (10 %) : Le triton X 100 est dilué au 1/10^e dans de l'eau distillée. La solution est conservée à -20°C pendant 6 mois.

c) Protocole

Ce dosage est réalisé directement sur les cellules reprises dans le tampon A.

Dans un tube à hémolyse, sont ajoutés :

- 940 µl de tampon tris (soit 94 mM)
- 10 µl de pyruvate (soit 10 mM)
- 25 µl de triton X 100 (soit 0,25 %)

Ce mélange réactionnel est incubé à 37°C pendant 5 minutes, puis 5 µl de la suspension cellulaire (soit 0,1 million de cellules) sont ajoutés. La réaction est ensuite initiée par l'ajout

de 20 μl de NADH (soit 300 μM). L'évolution de l'absorbance à 340 nm est suivie au spectrophotomètre, thermostaté à 37°C, pendant 100 secondes.

d) Expression des résultats

Les variations d'absorbance sont mesurées, en fonction du temps, sur la partie linéaire de la cinétique. L'activité spécifique (nmol/min/million de cellules) de la lactate déshydrogénase est calculée en utilisant la formule suivante :

$$AS = \frac{\Delta DO}{l \times \epsilon_{\text{NADH}} \times S_{\text{n NADH}}} \times \frac{10^3}{q_{\text{cellules}}}$$

ΔDO : variation de DO par minute

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit 1

ϵ_{NADH} : coefficient d'extinction molaire du NADH à 340 nm, en $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, soit 6,22

$S_{\text{n NADH}}$: nombre stœchiométrique du NADH dans l'équation de la réaction, soit 1

q_{cellules} : quantité de cellules ajoutée dans le milieu réactionnel en million, soit 0,1

Les résultats en nmol/min/million de cellules sont ensuite convertis en nmol/min/mg de protéines suite au dosage de protéines.

V. Dosage de la quantité d'ADN mitochondrial

L'ADN total est extrait à partir d'un culot sec de 4 millions de cellules en utilisant le kit "EZ1 DNA" et l'extracteur "BioRobot EZ1 DSP" (Qiagen, Courtaboeuf, France). La quantité d'ADN est déterminée en réalisant une PCR quantitative en temps réel sur l'appareil "Chromo4" (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) pour un gène situé sur l'ADNmt, ND1 codant pour la sous unité 1 de la NADH déshydrogénase (amorce sens 5'-CTT TGC GTA GTT GTA TAT AGC C-3', amorce anti-sens 5'-CGC ATA AAA CTT AAA ACT TTA CAG-3') et un gène situé sur l'ADN nucléaire, la β -globine (amorce sens 5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3', amorce anti-sens 5'-ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC-3'). Les résultats sont exprimés sous forme du ratio ND1/ β -globine.

RESULTATS ET DISCUSSION

ARTICLE 1

Fatty liver and insulin resistance in obese Zucker rats: no role for mitochondrial dysfunction.

Mélissa Flamment, Matthieu Arvier, Yves Gallois, Gilles Simard, Yves Malthièry, Patrick

Ritz, Pierre-Henri Ducluzeau.

Biochimie, 2008, 90(9): 1407-13.

Introduction de l'article 1 :

L'implication de la mitochondrie dans le développement des NAFLD est relativement bien admise concernant le développement de la stéatohépatite (Begrliche *et al.*, 2006). Cependant la fonction mitochondriale dans des conditions de stéatose hépatique simple n'est que peu étudiée. L'accumulation ectopique de lipides dans le foie est due principalement à l'arrivée massive des acides gras libres issus de la lipolyse adipocytaire et à l'augmentation de la lipogénèse hépatique (Donnelly *et al.*, 2005). Par ailleurs, la mitochondrie pourrait être impliquée dans le développement de cette stéatose. En effet, des altérations de la fonction mitochondriale pourraient contribuer à l'accumulation de lipides intracellulaires selon plusieurs mécanismes :

- soit par une augmentation de l'efficacité de la phosphorylation oxydative qui entraînerait une diminution de l'oxydation des substrats énergétiques associée à une synthèse d'ATP équivalente

- soit par une diminution des capacités oxydatives sans variation de l'efficacité de la phosphorylation oxydative

- soit par une diminution de la quantité de mitochondries.

Afin d'évaluer ces hypothèses, nous avons utilisé un modèle de rat génétiquement obèse par une inactivation du gène codant pour le récepteur de la leptine, le rat Zucker (Zucker et Zucker, 1961). Le rat Zucker obèse présente les différentes caractéristiques du syndrome métabolique et est couramment utilisé comme modèle d'étude pour la stéatose hépatique (Leonard *et al.*, 2005). Il a été mis en évidence que ce modèle de rat ne présentait pas de fibrose en conséquence de l'absence du signal leptine, adipokine qui interviendrait dans le processus fibrogénique (Ikejima *et al.*, 2001, Ikejima *et al.*, 2002, Leclercq *et al.*, 2002, Ikejima *et al.*, 2007).

Dans ce modèle de stéatose hépatique nous avons étudié le fonctionnement de la chaîne respiratoire sur des mitochondries isolées. Nous avons mesuré le potentiel de membrane en fonction de la consommation d'oxygène à l'état 3 et à l'état 4. Afin d'évaluer l'efficacité de la phosphorylation oxydative nous avons réalisé une cinétique de la synthèse d'ATP en fonction de la consommation d'oxygène. Enfin, de manière à évaluer la quantité de mitochondries ainsi que les capacités oxydatives, nous avons mesuré les activités enzymatiques de la citrate synthase et de la cytochrome *c* oxydase.

Research paper

Fatty liver and insulin resistance in obese Zucker rats: No role for mitochondrial dysfunction

Mélissa Flamment^{a,*}, Matthieu Arvier^a, Yves Gallois^{b,c}, Gilles Simard^{a,b,c},
Yves Malthiery^{a,b,c}, Patrick Ritz^{a,b,d}, Pierre-Henri Ducluzeau^{a,b,d}

^a INSERM, U694, CHU Angers, 4 rue Larrey, F-49033 Angers, France

^b Univ Angers, F-49035 Angers, France

^c CHU Angers, Département de Biochimie et Génétique, F-49033 Angers, France

^d CHU Angers, Département d'Endocrinologie-Diabète-Nutrition, F-49033 Angers, France

Received 4 March 2008; accepted 5 May 2008

Available online 15 May 2008

Abstract

The relationship between insulin resistance and mitochondrial function is of increasing interest. Studies looking for such interactions are usually made in muscle and only a few studies have been done in liver, which is known to be a crucial partner in whole body insulin action. Recent studies have revealed a similar mechanism to that of muscle for fat-induced insulin resistance in liver. However, the exact mechanism of lipid metabolites accumulation in liver leading to insulin resistance is far from being elucidated. One of the hypothetical mechanisms for liver steatosis development is an impairment of mitochondrial function. We examined mitochondrial function in fatty liver and insulin resistance state using isolated mitochondria from obese Zucker rats. We determined the relationship between ATP synthesis and oxygen consumption as well as the relationship between mitochondrial membrane potential and oxygen consumption. In order to evaluate the quantity of mitochondria and the oxidative capacity we measured citrate synthase and cytochrome *c* oxidase activities. Results showed that despite significant fatty liver and hyperinsulinemia, isolated liver mitochondria from obese Zucker rats display no difference in oxygen consumption, ATP synthesis, and membrane potential compared with lean Zucker rats. There was no difference in citrate synthase and cytochrome *c* oxidase activities between obese and lean Zucker rats in isolated mitochondria as well as in liver homogenate, indicating a similar relative amount of hepatic mitochondria and a similar oxidative capacity. Adiponectin, which is involved in bioenergetic homeostasis, was increased two-fold in obese Zucker rats despite insulin resistance. In conclusion, isolated liver mitochondria from lean and obese insulin-resistant Zucker rats showed strictly the same mitochondrial function. It remains to be elucidated whether adiponectin increase is involved in these results.

© 2008 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Mitochondria; Fatty liver; Insulin resistance; Oxidative phosphorylation; Zucker rat

1. Introduction

Mechanisms leading to insulin resistance, involving fat accumulation and metabolic abnormalities are not clearly understood. The relationship between insulin resistance and mitochondrial function is increasingly of interest [1]. Recent

evidences indicate that insulin resistance in skeletal muscle could be due to reduced mitochondrial oxidative capacity [2–7]. In fact, insulin resistance is also closely associated with alterations of hepatic metabolism, an organ which plays a central role in whole body insulin sensitivity. The cellular mechanisms responsible for causing hepatic insulin resistance remain controversial, with several hypotheses attributing causality to visceral fat [8], adipokines [9,10], endoplasmic reticulum stress [11], and inflammation [12]. An alternative hypothesis is that the development of hepatic steatosis per se leads to hepatic insulin resistance. Indeed, recent studies

Abbreviations: COX, cytochrome *c* oxidase; CS, citrate synthase; ANT, adenine nucleotide translocator; TG, triglyceride.

* Corresponding author. Tel: +33 241 73 59 65; fax: +33 241 35 40 17.

E-mail address: mflamment@yahoo.fr (M. Flamment).

have revealed a similar mechanism to that of muscle for fat-induced insulin resistance in liver, where accumulation of intracellular lipid metabolites activates a serine kinase cascade involving PKC ϵ , leading to a decrease of insulin receptor kinase activity resulting in impaired insulin action [13,14]. However, the exact mechanism of lipid metabolites accumulation in liver leading to insulin resistance is far from being elucidated. One of the hypothetical mechanisms for liver steatosis development is an impairment of mitochondrial function.

ATP is synthesized in mitochondria through oxidative phosphorylation, which couples substrate oxidation by the respiratory chain to ADP phosphorylation by F1-F0 ATP synthase [15]. However, it has long been known that oxidative phosphorylation coupling is not a perfect chemical reaction and a fraction of the proton gradient is dissipated by proton leak across the inner membrane [16]. Alterations in mitochondrial oxidative capacities might contribute to a diminished ability to oxidize fatty acid, and so might promote intracellular fat accumulation. This ectopic fat accumulation could be due to: (i) an increase of oxidative phosphorylation efficiency, and so in this case for the same quantity of synthesized ATP there are less consumed energetic substrates; (ii) a decrease of oxidative capacities without variations in efficiency; (iii) a decrease in the quantity of mitochondria.

In this study we decided to look at hepatic mitochondrial function, in particular oxidative phosphorylation efficiency, in fatty liver and insulin resistance state with using isolated mitochondria from the livers of lean and obese Zucker rats. These rats, which lack functional leptin receptor exhibit hyperphagia, hyperinsulinemia, and hyperlipidemia [17] and are commonly used in studies of insulin resistance [18]. Studies relating to proton leak in Zucker rats lead to divergent results. Ramsey et al. [19] showed that liver mitochondria from obese Zucker rats exhibit less proton leak than their lean littermates. Brookes et al. [20] carried out a similar study in which there was no difference in proton leak in isolated liver mitochondria between obese and lean Zucker rats. However, as previously discussed by Brookes et al. [20], in the study of Ramsey et al. [19] there is no bovine serum albumin in the experimental medium and the proton leak curve of obese Zucker rats appears aberrant in shape. Recently a decrease has been shown in state 3 (phosphorylating state) respiration in liver mitochondria from obese Zucker rats which is associated with a decrease in the content of adenine nucleotide translocator (ANT) [21]. Nevertheless in these studies we have no information about ATP synthesis nor, therefore, about oxidative phosphorylation efficiency.

The aim of this study was to examine whether obese Zucker rats, used as a fatty liver and insulin resistance model, exhibit differences in liver mitochondria function. We determined the relationship between membrane potential and oxygen consumption in non-phosphorylating (state 4) and phosphorylating (state 3) isolated mitochondria. In order to actually evaluate oxidative phosphorylation efficiency we determined the kinetic of the relationship between ATP synthesis and oxygen consumption in isolated liver mitochondria which really corresponds to the physiological variations in oxidative phosphorylation. To

investigate mitochondrial content and oxidative capacity we determined citrate synthase and cytochrome *c* oxidase activities.

2. Materials and methods

2.1. Animals

The present investigation was performed in accordance with the guiding principles in the care and use of animals. Ten male obese (*fal/fa*) Zucker rats and ten male lean (*fa/+*) Zucker rats were purchased from Charles River (L'Arbresle, France). Animals were caged individually in a temperature-controlled room (22 °C) with a dark/light cycle of 12:12 h. They were provided with water ad libitum and a standard diet (U-A-R A04; SAFE, Epinay-sur-Orge, France) composed of (% total weight) 16% protein, 3% fat, 60% carbohydrate and 21% water, fiber, vitamins and minerals. All rats were fasted during the night before being killed. Eleven-week-old rats were anesthetized by inhalation of isoflurane and blood was collected from the heart. Immediately after blood collection, the liver was rapidly removed and weighed.

2.2. Liver mitochondria preparation

Liver mitochondria were isolated using a modification of the differential centrifugation procedure of Krahenbuhl et al. [22] with all steps carried out at 4 °C. Liver was homogenized in an isolation medium containing 100 mM sucrose, 50 mM KCl, 5 mM EGTA and 50 mM Tris–base, pH 7.4 (10 ml/g tissue) followed by centrifugation at 600 \times g for 10 min. The supernatant was filtered through cheesecloth and centrifuged at 7000 \times g for 10 min. The pellet was resuspended in the isolation medium (10 ml/g tissue) and centrifuged at 3500 \times g for 10 min. The resulting pellet was resuspended in a minute volume of isolation medium. Protein concentration was determined using the bicinchoninic acid assay kit (Interchim, Montluçon, France) with bovine serum albumin as standard.

2.3. Mitochondrial respiration and membrane potential

Oxygen consumption and membrane potential were measured simultaneously using electrodes sensitive to oxygen and to the potential-dependent probe triphenylmethylphosphonium (TPMP⁺). Mitochondria (0.5 mg protein/ml) were incubated in a respiratory reaction medium containing 120 mM KCl, 5 mM KH₂PO₄, 1 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 3 mM HEPES and 0.3% bovine serum albumin (w/v), pH 7.4, and supplemented with 5 μ M rotenone and 80 ng/ml nigericin. The TPMP electrode was calibrated by sequential 0.5 μ M additions up to 2 μ M TPMP, then 5 mM succinate was added to start the reaction. After each run, 2 μ M of carbonyl cyanide-*p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) was added to dissipate the membrane potential and release all TPMP back into the medium for baseline correction. Membrane potentials were calculated as previously described by Brand [23], assuming a TPMP binding correction of 0.42 (μ l/mg of protein)⁻¹ [24].

The relationships between oxygen consumption and membrane potential were established by carrying out titrations in non-phosphorylating (state 4) and phosphorylating (state 3) states. In the non-phosphorylating state, respiration and membrane potential were progressively inhibited through successive steady states induced by additions of malonate (up to 5 mM) in the presence of oligomycin (1 µg/ml). In the phosphorylating state, respiration and membrane potential were recorded in the respiratory reaction medium supplemented with 20 mM glucose and 125 µM ATP with increasing concentrations of hexokinase ranging from 10 to 175 mU/ml, in the absence of oligomycin.

2.4. Mitochondrial ATP synthesis

Mitochondria (0.5 mg/ml) were incubated in the respiratory reaction medium supplemented with 5 µM rotenone, 5 mM succinate, 20 mM glucose and 125 µM ATP. The rate of oxidative phosphorylation flux was modulated by different concentrations of hexokinase (10–175 mU/ml) and ATP production was monitored by glucose-6-phosphate formation, as previously described [25]. For each steady state, oxygen consumption was recorded for 2 min, thereafter aliquots were taken from the respiratory reaction medium and immediately put in perchloric acid (6%), centrifuged (8000 × *g*, 3 min) and the supernatant was removed and neutralized to pH 7 using KOH (5 M). NADP⁺ (0.5 mM) and glucose 6-phosphate dehydrogenase (0.25 U) were then added and ATP production was monitored from NADPH content by spectrophotometry at 340 nm.

2.5. Mitochondrial enzyme activities

The activities of citrate synthase (CS) and cytochrome *c* oxidase (COX) were measured spectrophotometrically at 37 °C in liver homogenate and in isolated mitochondria via an adaptation of the method described by Malgat et al. [26]. The activity of CS was measured in a reaction medium consisting of 0.1 mM 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (regenerated with Tris buffer, 1 M, pH 8.1), 1 mM oxaloacetic acid, 0.3 mM acetyl CoA and Triton X-100 (4%). After 3 min of incubation, the reaction was initiated by adding the homogenate (30 µg protein) or isolated mitochondria (10 µg protein) and the change in optical density at 412 nm was recorded for 3 min. The activity of COX was measured by monitoring the oxidation of reduced cytochrome *c* at 550 nm. An 80 µM solution of reduced cytochrome *c* (92–97% reduced using dithionite) in 50 mM KH₂PO₄, was preincubated for 5 min. The reaction was initiated by adding the homogenate (30 µg protein) or isolated mitochondria (5 µg protein) and the change in optical density at 550 nm was recorded for 1.5 min.

2.6. Liver triglyceride content

Liver triglyceride (TG) content was determined using the method described by Xu et al. [27]. Briefly, 100 mg of liver tissue was homogenized in 1 ml of ethanol followed by

centrifugation at 15,000 × *g* for 10 min. TG were measured with a Sigma kit.

2.7. Serum parameters

Glucose concentrations were measured with a glucometer. Serum insulin and leptin concentrations were measured using enzyme-linked immunosorbent assay kits (Linco Research, St Charles, MO). Serum adiponectin concentrations were measured using a radioimmunoassay kit (Linco Research, St Charles, MO). Serum β-hydroxybutyrate concentrations were measured by an enzymatic spectrophotometric method adapted on a Cobas Mira automatic analyzer (Roche) using 3-hydroxybutyrate dehydrogenase to catalyze the conversion of 3-hydroxybutyrate to acetoacetate, in presence of NAD⁺ and at pH 9.5. The concentration of β-hydroxybutyrate was calculated from the NADH produced.

2.8. Statistical analysis

Results are expressed as mean ± SEM. The statistical significance of observed variations was assessed using unpaired Student's *t*-test. A *P* value < 0.05 was considered significant in all cases. All analyses were performed using Statview 5.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA).

3. Results

3.1. Obesity, fatty liver and insulin resistance state

Results concerning body weight, liver mass, triglyceride content and serum parameters are shown in Table 1. Body weight of obese Zucker rats was significantly higher (+14%, *P* < 0.05) than that of lean Zucker rats. Liver relative weight of obese Zucker rats was significantly higher (+17%, *P* < 0.05) than that of lean Zucker rats. Liver triglyceride content was significantly higher (+43%, *P* < 0.0001). Fasting serum glucose, insulin, leptin and adiponectin concentrations of obese Zucker rats were significantly higher than those of lean Zucker rats. Serum β-hydroxybutyrate concentration was not significantly different between lean and obese Zucker rats.

Table 1
Body weight, liver mass, liver triglyceride content and serum parameters

	Lean	Obese
Body weight (g)	273 ± 8	316 ± 13*
Liver mass (% weight)	3.25 ± 0.17	3.93 ± 0.08*
Liver TG (mg/g liver)	45.3 ± 4.2	105.9 ± 9.9 [†]
Glucose (g/l)	1.1 ± 0.09	2.05 ± 0.3*
Insulin (µU/ml)	12.05 ± 1.7	186.6 ± 24.2 [†]
Leptin (ng/ml)	1.33 ± 0.18	42.1 ± 2.9 [†]
Adiponectin (µg/ml)	1.76 ± 0.07	2.92 ± 0.17 [†]
β-Hydroxybutyrate (µmol/l)	905.5 ± 124.8	722.56 ± 175.8

Results are expressed as mean ± SEM. **P* < 0.05; [†]*P* < 0.0001 compared with lean Zucker rats.

3.2. Relationship between membrane potential and oxygen consumption

To evaluate proton leak, membrane potential and oxygen consumption in state 4 respiration was determined by additions of malonate, an inhibitor of complex II, in the presence of oligomycin (Fig. 1). By inhibiting complex V (ATP synthase), oligomycin blocks phosphorylation of ADP in ATP (non-phosphorylating conditions). Under these conditions, the proton motive force is only consumed by the proton leak. There was strictly no difference in oxygen consumption and membrane potential in state 4 between obese and lean Zucker rats.

To evaluate the capacity of the respiratory chain to generate and maintain a potential, in state 3 respiration, we measured oxygen consumption and membrane potential with increasing concentration of hexokinase, in the absence of oligomycin (Fig. 2). There was no difference in oxygen consumption and membrane potential in state 3 between obese and lean Zucker rats.

3.3. Oxidative phosphorylation efficiency

To quantify the oxidative phosphorylation rate and so directly evaluate the mitochondrial energy efficiency, we measured oxygen consumption and ATP synthesis with increasing concentration of hexokinase (Fig. 3). There was no difference in oxygen consumption and ATP synthesis between obese and lean Zucker rats.

3.4. Mitochondrial enzyme activities

Measurement of the enzymatic activities of citrate synthase (CS) and cytochrome *c* oxidase (COX) in isolated mitochondria and liver homogenate allows us to determine the quantity of

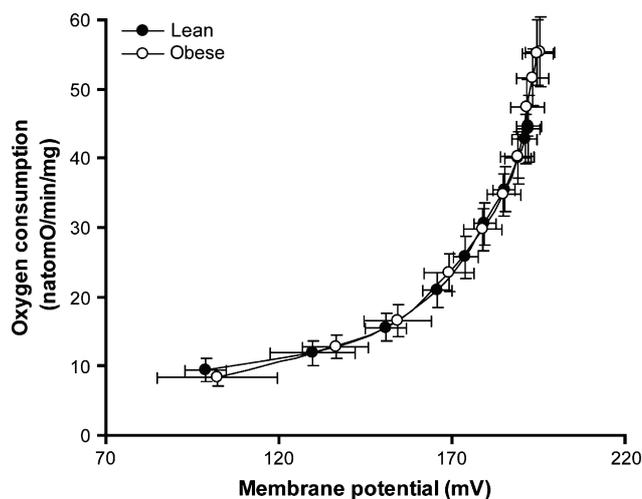


Fig. 1. Relationship between membrane potential and oxygen consumption in state 4 respiration. Oxygen consumption and membrane potential were progressively inhibited through successive steady states induced by additions of malonate (up to 5 mM) in the presence of oligomycin (1 μ g/ml) in liver mitochondria of lean (\bullet) and obese (\circ) Zucker rats. Results are expressed as mean \pm SEM.

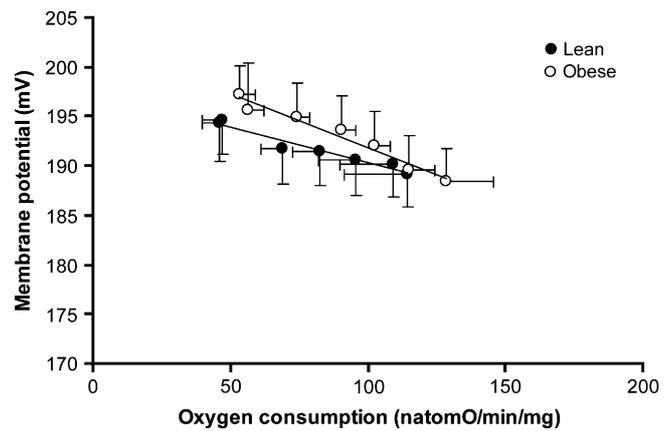


Fig. 2. Relationship between membrane potential and oxygen consumption in state 3 respiration. Oxygen consumption was modulated by subsaturating ADP concentrations generated by hexokinase (10–175 mU/ml) in liver mitochondria of lean (\bullet) and obese (\circ) Zucker rats. Results are expressed as mean \pm SEM.

mitochondria in liver and to evaluate the oxidative capacity of mitochondria. As shown in Table 2, there was no difference in CS and COX activities between obese and lean Zucker rats in isolated mitochondria and in liver homogenate.

4. Discussion

Factors underlying the development of insulin resistance have not been fully elucidated, however the relationship between insulin resistance and mitochondrial function is increasingly of interest [1]. Most studies are performed on skeletal muscle and show that insulin resistance in skeletal muscle could be due to reduced mitochondrial oxidative capacity [2–7]. Only a few studies have been done on liver, which is known to be a crucial partner in whole body insulin action. Recent studies have revealed a similar mechanism to that of muscle for fat-induced insulin resistance in liver [13,14]. However, the exact mechanism of lipid metabolites accumulation

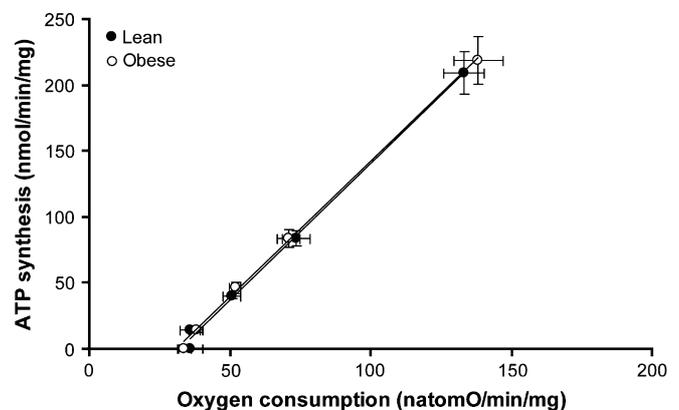


Fig. 3. Relationship between ATP synthesis and oxygen consumption. Oxygen consumption was modulated by subsaturating ADP concentrations generated by hexokinase (10–175 mU/ml) in liver mitochondria of lean (\bullet) and obese (\circ) Zucker rats. Results are expressed as mean \pm SEM. Linear regression equations are $y = 2.07x - 67.12$ ($R^2 = 0.996$) for lean and $y = 2.06x - 64.28$ ($R^2 = 0.998$) for obese Zucker rats.

Table 2
Mitochondrial enzyme activities

		Lean	Obese
Citrate synthase	Homogenate	192.2 ± 8.5	177 ± 4.4
	Mitochondria	331.4 ± 25.4	362.7 ± 21.3
Cytochrome <i>c</i> oxidase	Homogenate	336.1 ± 30.2	358.2 ± 18.2
	Mitochondria	2044.6 ± 111.9	2139.2 ± 129.6

CS and COX activities in liver homogenate and isolated mitochondria are expressed in nmol/min per mg protein. Results are expressed as mean ± SEM.

in liver leading to insulin resistance is far from being elucidated. One of the hypothetical mechanisms for liver steatosis development is an impairment of mitochondrial function. In the current study we studied oxidative phosphorylation efficiency using isolated mitochondria from the livers of Zucker rats, a fatty liver and insulin resistance model. We determined relationships between membrane potential and oxygen consumption in non-phosphorylating (state 4) and phosphorylating (state 3) isolated mitochondria and the relationship between ATP synthesis and oxygen consumption in isolated liver mitochondria. To investigate mitochondrial content and oxidative capacity we determined citrate synthase and cytochrome *c* oxidase activities.

In order to evaluate basal proton leak within mitochondria we determined the relationship between membrane potential and oxygen consumption in non-phosphorylating (state 4 oligomycin) conditions (Fig. 1). Oligomycin is an inhibitor of complex V and so blocks the phosphorylation of ADP in ATP. Under these conditions, the protonmotive force is only consumed by the proton leak. Oxygen uptake is thus proportional to the intensity of the proton leak and to the capacity of the respiratory chain to generate and maintain membrane potential [28]. There was no difference in oxygen consumption and membrane potential in state 4 between obese and lean Zucker rats. These results are in agreement with those of Brookes et al. [20], who observed a similar proton leak in obese and lean Zucker rats. To evaluate the capacity of the respiratory chain to generate and maintain a potential, in state 3 respiration, we measured oxygen consumption and membrane potential with increasing concentrations of hexokinase, in the absence of oligomycin (Fig. 2). There was no difference in oxygen consumption and membrane potential in state 3 between obese and lean Zucker rats. To quantify the oxidative phosphorylation rate and so directly evaluate the mitochondrial energy efficiency, we measured oxygen consumption and ATP synthesis with increasing concentrations of hexokinase in order to obtain a kinetic which really corresponds to the physiological variations in oxidative phosphorylation (Fig. 3). There was no difference in oxygen consumption and ATP synthesis between obese and lean Zucker rats, indicating an identical mitochondrial energy efficiency. The slopes of the curves represent the ATP/O ratio, which in our study are 2.07 for lean rats and 2.06 for obese rats. These values are close to those found in the literature [29]. This result is also in agreement with our earlier finding that there was no difference in mitochondrial state 3 oxygen consumption between our two rats groups (Fig. 2). Our results are not in accordance with the recent study which showed that in liver mitochondria from obese Zucker rats there is

a decrease in state 3 respiration which is associated with a decrease in ANT content and an increase in state 4 oligomycin respiration with succinate as the respiratory substrate [21]. It appears difficult to compare their results with ours, because we did not use the same experimental design. In particular, they measured oxygen consumption and membrane potential at 25 °C compared to 37 °C for our measurements. However mitochondrial energetics at sub-physiological temperatures are different than at normal body temperature [30]. For example, the contribution of slip redox to resting respiration could be dependent on the experimentation temperature [31]. This last mechanism could participate in the increase in state 4 oligomycin respiration in obese Zucker rats obtained by Teodoro et al. [21] which is not observed in our study. To explain the discrepancy in results concerning state 3, we can speculate that this is due to the difference in experimental procedure used to obtain state 3 respiration. In their study, state 3 respiration rate was stimulated by saturating ADP concentration. In this case, newly synthesized ATP accumulated in the medium, with a subsequent increase in the ATP/ADP ratio, which is well known to slow down oxidative phosphorylation, in part via ANT inhibition [32], due to competition between ATP and ADP for ANT binding and subsequent translocation across the mitochondrial membrane [33,34]. Given the fact that in their study, obese Zucker rats exhibited a decrease in ANT content, ATP accumulation could be responsible for a stronger inhibition of oxidative phosphorylation in obese than in lean Zucker rats. Indeed, it has been shown that ANT exerts a high flux control on respiration in liver mitochondria, and that control strength of ANT on respiration is more pronounced when the extramitochondrial ATP/ADP ratio increases [35]. In our study we used the “hexokinase system” which allows a regeneration of ADP from ATP and so prevents ATP accumulation and maintains ADP concentration and the corresponding respiration at a constant physiological rate.

The measure of the enzymatic activities of citrate synthase (CS) and cytochrome *c* oxidase (COX) on isolated mitochondria and homogenate from liver allows us to determine the quantity of mitochondria in liver and to evaluate the oxidative capacity of mitochondria. It has been shown that in the muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents there is a decrease in mitochondrial density [2,7] which could explain the reduced muscle mitochondrial ATP production. In the current study there was no difference in CS and COX activities between obese and lean Zucker rats in isolated mitochondria as well as in liver homogenate, indicating a similar relative amount of hepatic mitochondria and a similar oxidative capacity. The absence of variation of CS and COX activities is in agreement with the result obtained by Wardlaw and Kaplan [36] carried out on Zucker rats. The absence of mitochondrial dysfunction especially for the β -oxidation pathway was confirmed by the fact that serum β -hydroxybutyrate which is an indicator of liver β -oxidation capacity, was not altered in obese compared to lean Zucker rats.

In our study, liver mitochondrial function seemed to be unaffected in obese Zucker rats despite fatty liver and insulin resistance. Effectively, rats in this study displayed liver triglyceride accumulation and hyperglycemia associated with strong

hyperinsulinemia arguing for increased hepatic glucose production and liver insulin resistance. Serum leptin concentrations showed a dramatic increase in obese Zucker rats compared to their lean littermates, which could not be fully explained by the increased fat mass noted in obese rats. Indeed, strong hyperleptinemia observed in obese Zucker rats is, at least in part, a consequence of the homozygote mutation of their leptin receptor gene. Indeed, the white adipose tissue of *falfa* rats overexpresses the *ob* gene, thus inducing massive synthesis of leptin [37]. Only the increase in serum adiponectin concentration in obese Zucker rats seems to be inconsistent with the generally accepted association of high adiponectin with insulin sensitivity. Adiponectin is an adipokine that plays a central role in glucose and lipid metabolism [38]. Low adiponectin levels are found in obesity and type 2 diabetes [39–41], and reduced adiponectin levels have also been correlated to increased risk of developing obesity and type 2 diabetes [42,43]. Surprisingly, we showed that in obese Zucker rats adiponectin levels are increased. This result is in accordance with many studies on Zucker rats that have observed a higher adiponectin level in obese than in lean Zucker rats [44–46]. This increased adiponectin level could be an adaptative phenomenon that exists in obese Zucker rats, which lack leptin signal. It has been reported that adiponectin regulates mitochondrial bioenergetics in muscle by increasing mitochondrial biogenesis as well as fatty acid oxidation [47]. In hepatocytes adiponectin, via AMP-activated kinase (AMPK), could increase the entry of fatty acid into mitochondria and so increase their oxidation [48]. We could speculate that this paradoxical increase of adiponectin in obese Zucker rats could counteract the mitochondrial abnormalities expected in these animals, and that fatty liver and insulin resistance appear, in this particular model, via an independent pathway of mitochondrial dysfunction.

5. Conclusion

In conclusion we showed that there was no difference in oxygen consumption, ATP synthesis, and membrane potential (state 4 and 3 respiration) between lean and obese Zucker rats, used as a fatty liver and insulin resistance model. Taken together, these results showed that isolated mitochondria of both rats were equally efficient for coupling respiration to phosphorylation. We showed also that there was no difference in CS and COX activities between our two groups of rats indicating a similar quantity of mitochondria and a similar oxidative capacity. So it appears that in the livers of obese Zucker rats, isolated mitochondria do not exhibit any mitochondrial dysfunction despite fatty liver and insulin resistance. The question of the impact of the adapted increased adiponectin level on mitochondrial function remains to be elucidated.

Acknowledgements

Mélicha Flamment was supported by a grant from “Conseil Régional Pays de la Loire/Inserm”. The authors thank Jennifer Deschamps and Maud Poirier for animal care.

References

- [1] B.B. Lowell, G.I. Shulman, Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes, *Science* 307 (2005) 384–387.
- [2] D.E. Kelley, J. He, E.V. Menshikova, V.B. Ritov, Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes, *Diabetes* 51 (2002) 2944–2950.
- [3] K.F. Petersen, D. Befroy, S. Dufour, J. Dziura, C. Ariyan, D.L. Rothman, L. DiPietro, G.W. Cline, G.I. Shulman, Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance, *Science* 300 (2003) 1140–1142.
- [4] K.F. Petersen, S. Dufour, D. Befroy, R. Garcia, G.I. Shulman, Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes, *N. Engl. J. Med.* 350 (2004) 664–671.
- [5] M.E. Patti, A.J. Butte, S. Crunkhorn, K. Cusi, R. Berria, S. Kashyap, Y. Miyazaki, I. Kohane, M. Costello, R. Saccone, E.J. Landaker, A.B. Goldfine, E. Mun, R. DeFronzo, J. Finlayson, C.R. Kahn, L.J. Mandarino, Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (2003) 8466–8471.
- [6] V.K. Mootha, C.M. Lindgren, K.F. Eriksson, A. Subramanian, S. Sihag, J. Lehhar, P. Puigserver, E. Carlsson, M. Ridderstrale, E. Laurila, N. Houstis, M.J. Daly, N. Patterson, J.P. Mesirov, T.R. Golub, P. Tamayo, B. Spiegelman, E.S. Lander, J.N. Hirschhorn, D. Altshuler, L.C. Groop, PGC1- α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes, *Nat. Genet.* 34 (2003) 267–273.
- [7] K. Morino, K.F. Petersen, S. Dufour, D. Befroy, J. Frattini, N. Shatzkes, S. Neschen, M.F. White, S. Bilz, S. Sono, M. Pypaert, G.I. Shulman, Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents, *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 3587–3593.
- [8] M. Kabir, K.J. Catalano, S. Ananthnarayan, S.P. Kim, G.W. Van Citters, M.K. Dea, R.N. Bergman, Molecular evidence supporting the portal theory: a causative link between visceral adiposity and hepatic insulin resistance, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 288 (2005) E454–E461.
- [9] T. Kadowaki, T. Yamauchi, N. Kubota, K. Hara, K. Ueki, K. Tobe, Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome, *J. Clin. Invest.* 116 (2006) 1784–1792.
- [10] R.R. Banerjee, S.M. Rangwala, J.S. Shapiro, A.S. Rich, B. Rhoades, Y. Qi, J. Wang, M.W. Rajala, A. Poci, P.E. Scherer, C.M. Steppan, R.S. Ahima, S. Obici, L. Rossetti, M.A. Lazar, Regulation of fasted blood glucose by resistin, *Science* 303 (2004) 1195–1198.
- [11] U. Ozcan, E. Yilmaz, L. Ozcan, M. Furuhashi, E. Vaillancourt, R.O. Smith, C.Z. Görgün, G.S. Hotamisligil, Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes, *Science* 313 (2006) 1137–1140.
- [12] S.E. Shoelson, J. Lee, A.B. Goldfine, Inflammation and insulin resistance, *J. Clin. Invest.* 116 (2006) 1793–1801.
- [13] V.T. Samuel, Z.X. Liu, X. Qu, B.D. Elder, S. Bilz, D. Befroy, A.J. Romanelli, G.I. Shulman, Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 32345–32353.
- [14] V.T. Samuel, Z.X. Liu, A. Wang, S.A. Beddow, J.G. Geisler, M. Kahn, X.M. Zhang, B.P. Monia, S. Bhanot, G.I. Shulman, Inhibition of protein kinase C ϵ prevents hepatic insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease, *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 739–745.
- [15] P. Mitchell, J. Moyle, Proton translocation coupled to ATP hydrolysis in rat liver mitochondria, *Eur. J. Biochem.* 4 (1968) 530–539.
- [16] J.A. Stuart, S. Cadenas, M.B. Jekabsons, D. Rousset, M.D. Brand, Mitochondrial proton leak and the uncoupling protein 1 homologues, *Biochim. Biophys. Acta.* 1504 (2001) 144–158.
- [17] L.M. Zucker, T.F. Zucker, Fatty, a new mutation in the rat, *J. Hered.* 52 (1961) 275–278.
- [18] J. Terretaz, B. Jeanrenaud, In vivo hepatic and peripheral insulin resistance in genetically obese (*fa/fa*) rats, *Endocrinology* 112 (1983) 1346–1351.

- [19] J.J. Ramsey, D.E. Johnson, K.L. Hossner, K.A. Johnson, Metabolic rate, organ mass, and mitochondrial proton leak variations in lean and obese rats, *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 113 (1996) 461–466.
- [20] P.S. Brookes, J.A. Buckingham, A.M. Tenreiro, A.J. Hulbert, M.D. Brand, 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 (1998) 325–334.
- [21] J. Teodoro, A.P. Rolo, P.J. Oliveira, C.M. Palmeira, Decreased ANT content in Zucker fatty rats: relevance for altered hepatic mitochondrial bioenergetics in steatosis, *FEBS Lett.* 580 (2006) 2153–2157.
- [22] S. Krahenbuhl, C. Talos, S. Fischer, J. Reichen, Toxicity of bile acids on the electron transport chain of isolated rat liver mitochondria, *Hepatology* 19 (1994) 471–479.
- [23] M.D. Brand, Measurement of mitochondrial protonmotive force, in: G.C. Brown, C.E. Cooper (Eds.), *Bioenergetics, A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, 1995, pp. 39–62.
- [24] D.F. Rolfe, A.J. Hulbert, M.D. Brand, Characteristics of mitochondrial proton leak and control of oxidative phosphorylation in the major oxygen-consuming tissues of the rat, *Biochim. Biophys. Acta.* 1188 (1994) 405–416.
- [25] V. Nogueira, M.A. Piquet, A. Devin, C. Fiore, E. Fontaine, G. Brandolin, M. Rigoulet, X.M. Leverve, Mitochondrial adaptation to in vivo polyunsaturated fatty acid deficiency: increase in phosphorylation efficiency, *J. Bioenerg. Biomembr.* 33 (2001) 53–61.
- [26] M. Malgat, G. Durrieu, J.P. Mazat, Enzymatic and polarographic measurements of the respiratory chain complexes, in: P. Lestienne (Ed.), *Mitochondrial Diseases*, Springer Verlag, Paris, 1999, pp. 357–377.
- [27] H. Xu, D. Wilcox, P. Nguyen, M. Voorbach, T. Suhar, S.J. Morgan, W.F. An, L. Ge, J. Green, Z. Wu, R.E. Gimeno, R. Reilly, P.B. Jacobson, C.A. Collins, K. Landschulz, T. Surowy, Hepatic knock-down of mitochondrial GPAT1 in ob/ob mice improves metabolic profile, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349 (2006) 439–448.
- [28] R.P. Hafner, M.D. Brand, Effect of protonmotive force on the relative proton stoichiometries of the mitochondrial proton pumps, *Biochem. J.* 275 (1991) 75–80.
- [29] P.C. Hinkle, P/O ratios of mitochondrial oxidative phosphorylation, *Biochim. Biophys. Acta.* 1706 (2005) 1–11.
- [30] S. Dufour, N. Rousse, P. Canioni, P. Diolez, Top-down control analysis of temperature effect on oxidative phosphorylation, *Biochem. J.* 314 (1996) 743–751.
- [31] M. Canton, S. Luvisetto, I. Schmehl, G.F. Azzone, The nature of mitochondrial respiration and discrimination between membrane and pump properties, *Biochem. J.* 310 (1995) 477–481.
- [32] W.E. Jacobus, R.W. Moreadith, K.M. Vandegaer, Mitochondrial respiratory control. Evidence against the regulation of respiration by extramitochondrial phosphorylation potentials or by [ATP]/[ADP] ratios, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 2397–2402.
- [33] R. Bohnsack, Control of energy transformation of mitochondria. Analysis by a quantitative model, *Biochim. Biophys. Acta.* 634 (1981) 203–218.
- [34] R.S. Balaban, Regulation of oxidative phosphorylation in the mammalian cell, *Am. J. Physiol.* 258 (1990) C377–C389.
- [35] L.I. Ivanovene, V.I. Borutaite, V. Iu. Zhilinskene, A.I. Toleikis, A.K. Prashkiavichius, Participation of the adenine nucleotide translocator in the regulation of pyruvate oxidation in heart mitochondria, *Biull. Eksp. Biol. Med.* 105 (1988) 540–542.
- [36] G.M. Wardlaw, M.L. Kaplan, Oxygen consumption and oxidative capacity of hepatocytes from young male obese and nonobese Zucker rats, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 183 (1986) 199–206.
- [37] S.C. Chua Jr., W.K. Chung, X.S. Wu-Peng, Y. Zhang, S.M. Liu, L. Tartaglia, R.L. Leibel, Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor, *Science* 271 (1996) 994–996.
- [38] A.H. Berg, T.P. Combs, P.E. Scherer, ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism, *Trends Endocrinol. Metab.* 13 (2002) 84–89.
- [39] E. Hu, P. Liang, B.M. Spiegelman, AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 10697–10703.
- [40] Y. Arita, S. Kihara, N. Ouchi, M. Takahashi, K. Maeda, J. Miyagawa, K. Hotta, I. Shimomura, T. Nakamura, K. Miyaoka, H. Kuriyama, M. Nishida, S. Yamashita, K. Okubo, K. Matsubara, M. Muraguchi, Y. Ohmoto, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257 (1999) 79–83.
- [41] K. Hotta, T. Funahashi, Y. Arita, M. Takahashi, M. Matsuda, Y. Okamoto, H. Iwahashi, H. Kuriyama, N. Ouchi, K. Maeda, M. Nishida, S. Kihara, N. Sakai, T. Nakajima, K. Hasegawa, M. Muraguchi, Y. Ohmoto, T. Nakamura, S. Yamashita, T. Hanafusa, Y. Matsuzawa, Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20 (2000) 1595–1599.
- [42] R.S. Lindsay, T. Funahashi, R.L. Hanson, Y. Matsuzawa, S. Tanaka, P.A. Tataranni, W.C. Knowler, J. Krakoff, Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population, *Lancet* 360 (2002) 57–58.
- [43] J. Spranger, A. Kroke, M. Möhlig, M.M. Bergmann, M. Ristow, H. Boeing, A.F. Pfeiffer, Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus, *Lancet* 361 (2003) 226–228.
- [44] F. Oana, H. Takeda, K. Hayakawa, A. Matsuzawa, S. Akahane, M. Isaji, M. Akahane, Physiological difference between obese (fa/fa) Zucker rats and lean Zucker rats concerning adiponectin, *Metabolism* 54 (2005) 995–1001.
- [45] S. de Assis, M. Wang, S. Goel, A. Foxworth, W. Helferich, L. Hilakivi-Clarke, Excessive weight gain during pregnancy increases carcinogen-induced mammary tumorigenesis in Sprague–Dawley and lean and obese Zucker rats, *J. Nutr.* 136 (2006) 998–1004.
- [46] C. Doyon, R.G. Denis, E.D. Baraboi, P. Samson, J. Lalonde, Y. Deshaies, D. Richard, Effects of rimonabant (SR141716) on fasting-induced hypothalamic–pituitary–adrenal axis and neuronal activation in lean and obese Zucker rats, *Diabetes* 55 (2006) 3403–3410.
- [47] A.E. Civitarese, B. Ukropcova, S. Carling, M. Hulver, R.A. DeFronzo, L. Mandarino, E. Ravussin, S.R. Smith, Role of adiponectin in human skeletal muscle bioenergetics, *Cell Metab.* 4 (2006) 75–87.
- [48] T. Yamauchi, J. Kamon, Y. Minokoshi, Y. Ito, H. Waki, S. Uchida, S. Yamashita, M. Noda, S. Kita, K. Ueki, K. Eto, Y. Akanuma, P. Froguel, F. Foufelle, P. Ferre, D. Carling, S. Kimura, R. Nagai, B.B. Kahn, T. Kadowaki, Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase, *Nat. Med.* 8 (2002) 128812–128895.

Discussion de l'article 1 :

Les résultats obtenus dans cette étude montrent une absence d'altération de la phosphorylation oxydative dans ce modèle animal de stéatose hépatique, que ce soit au niveau de la fuite de protons, de l'efficacité de la phosphorylation oxydative (cinétique ATP/O) ou au niveau des capacités oxydatives en elles-mêmes. De même, la quantité de mitochondries hépatiques ne semble pas modifiée chez le rat Zucker obèse au vu des activités enzymatiques de la citrate synthase qu'elles aient été mesurées sur de l'homogénat de foie ou sur mitochondries isolées. Le système de la phosphorylation oxydative semble ainsi préservé dans le foie stéatosique et par conséquent ne participe pas à l'accumulation excessive de lipides.

La fuite de protons avait déjà été évaluée chez le rat Zucker dans deux études qui aboutissaient à des résultats différents. Ramsey *et al.* (1996), ont mis en évidence que la fuite de protons des mitochondries hépatiques des rats Zucker obèses était diminuée en comparaison de celle observée chez les rats Zucker non-obèses. Brookes *et al.* (1998), ayant réalisé une étude similaire ont montré une fuite de protons équivalente chez les rats Zucker obèses et non-obèses. Dans leur étude, Brookes *et al.*, expliquent la différence de fuite de protons observée par Ramsey *et al.*, par l'absence de BSA dans leur milieu de respiration qui permet de chélater les acides gras et ainsi de s'affranchir de la fuite de protons inductible. Tout comme Brookes *et al.*, nous avons utilisé de la BSA dans notre milieu de respiration de manière à évaluer uniquement la fuite de protons basale et nous obtenons les mêmes résultats. Il semble ainsi que la fuite de protons basale ne soit pas modifiée chez le rat Zucker obèse.

L'apport de notre étude réside dans la réalisation d'une cinétique de la synthèse d'ATP en fonction de la consommation d'oxygène qui permet d'évaluer l'efficacité de la phosphorylation oxydative dans des conditions plus physiologiques. L'efficacité de la phosphorylation oxydative n'est pas modifiée chez le rat Zucker obèse de même que la consommation d'oxygène à l'état 3 et la synthèse d'ATP analysées séparément. Cependant, une étude a montré que la consommation d'oxygène à l'état 3 était diminuée dans des mitochondries isolées à partir de foie de rats Zucker obèses et associée à une diminution de la quantité de la protéine ANT (Teodoro *et al.*, 2006). Par ailleurs, dans cette même étude, la consommation d'oxygène à l'état 4 avec du succinate comme substrat était augmentée suggérant ainsi une augmentation de la fuite de protons. Cependant, il est difficile de comparer nos résultats avec ceux obtenus dans cette étude du fait de conditions expérimentales différentes. En effet, leurs mesures de consommation d'oxygène et de potentiel de membrane ont été effectuées à 25°C

alors que les nôtres ont été effectuées à 37°C. Le fonctionnement mitochondrial à des températures non-physiologiques n'est pas le même qu'à 37°C (Dufour *et al.*, 1996). La contribution du "slip-redox" à la consommation d'oxygène basale est dépendant de la température d'expérimentation (Canton *et al.*, 1995), pouvant ainsi expliquer l'augmentation de la consommation d'oxygène à l'état 4 observée par Teodoro *et al.* (2006).

Par ailleurs, l'état 3 de consommation d'oxygène de leur étude a été obtenu *via* une concentration saturante d'ADP. Dans ce cas, l'ATP nouvellement synthétisé s'accumule dans le milieu entraînant ainsi une augmentation du rapport ATP/ADP qui en retour va inhiber la phosphorylation oxydative en partie *via* l'inhibition de l'ANT (Jacobus *et al.*, 1982). En effet, ATP et ADP entrent en compétition pour se lier à l'ANT afin de franchir la membrane mitochondriale (Bohnsack, 1981, Balaban, 1990). Etant donné que dans l'étude de Teodoro *et al.*, une diminution de la quantité d'ANT est observée chez le rat Zucker obèse, l'accumulation d'ATP à l'état 3 peut être responsable d'une plus forte inhibition de la phosphorylation oxydative. Dans notre étude nous utilisons le "système hexokinase" afin d'obtenir l'état 3 permettant ainsi une régénération d'ADP à partir de l'ATP formé et par conséquent limitant l'accumulation d'ATP. Au vu de nos résultats, la phosphorylation oxydative évaluée en prenant en compte uniquement la chaîne respiratoire et l'ATP synthase n'est pas altérée chez le rat Zucker obèse. Néanmoins, les résultats de l'étude de Teodoro *et al.*, semblent indiquer que dans ce modèle, la phosphorylation oxydative pourrait être perturbée par une diminution de la quantité de l'ANT. Quoi qu'il en soit, nous avons mesuré la concentration en β -hydroxybutyrate dans le serum afin d'évaluer de manière indirecte la β -oxydation hépatique et ce paramètre ne varie pas entre les rats Zucker obèses ou non-obèses. Par conséquent, qu'il y ait ou non une altération dans le fonctionnement de la chaîne respiratoire, celle-ci n'a pas de répercussion sur la voie de la β -oxydation hépatique et donc sur l'accumulation de lipides dans le foie.

Evidemment, le modèle de stéatose hépatique, rat Zucker, par son origine génétique a des limites et n'est pas le plus pertinent physiologiquement. Un des paramètres mettant en évidence la différence entre ce modèle et les patients avec un syndrome métabolique réside dans le fait que la concentration sérique en adiponectine est augmentée dans ce modèle (Oana *et al.*, 2005, de Assis *et al.*, 2006, Doyon *et al.*, 2006). La concentration d'adiponectine est diminuée dans le cas de l'obésité et du diabète de type 2 (Hu *et al.*, 1996, Arita *et al.*, 1999, Hotta *et al.*, 2000) et est corrélé négativement aux risques de développement de l'obésité et du diabète de type 2 (Lindsay *et al.*, 2002, Spranger *et al.*, 2003). L'augmentation paradoxale de l'adiponectine dans ce modèle souligne la nécessité d'utiliser un modèle animal possédant les

caractéristiques et les mécanismes à l'origine du développement de l'obésité et du syndrome métabolique plus proches de ceux observés chez l'humain.

ARTICLE 2

Regulation of hepatic mitochondrial metabolism in response to a different time of high fat diet in rats

Mélissa Flamment, Naïg Gueguen, Céline Wetterwald, Jennifer Rieusset, Hubert Vidal, Gilles Simard, Yves Malthièry, Pierre-Henri Ducluzeau.

Soumis à Diabetologia.

Introduction de l'article 2 :

Le développement de l'obésité et du syndrome métabolique implique, dans des proportions variables selon les individus, des facteurs biologiques, notamment génétiques, comportementaux et environnementaux. La cause principale environnementale de l'obésité est une augmentation de l'ingestion d'aliments, en particulier ceux riches en gras, associée à un mode de vie sédentaire. Afin d'étudier la pathophysiologie de l'obésité et des complications qui lui sont associées comme la stéatose hépatique, il est indispensable d'utiliser un modèle animal se rapprochant au mieux des caractéristiques de cette pathologie et ayant développé une obésité selon des mécanismes similaires à ceux observés chez l'humain. Concernant l'étude de l'implication de la mitochondrie dans le développement des NAFLD associées au syndrome métabolique, les modèles animaux utilisés sont variés. Hormis, les modèles d'obésité génétique tels que les rats Zucker et les souris *ob/ob*, un modèle couramment utilisé est le rat alimenté avec un régime carencé en choline et en méthionine. L'absence de méthionine dans l'alimentation entraîne une diminution de la synthèse du glutathion et diminue les défenses anti-oxydantes. La choline est nécessaire à la synthèse de la phosphatidylcholine contenue entre autres dans les VLDL. Par conséquent une déficience en choline entraîne un défaut de sécrétion des VLDL et ainsi une accumulation de lipides dans le foie. D'une part le mécanisme de développement de la stéatose dans ce modèle n'est pas le plus proche de celui observé dans le cas du syndrome métabolique. D'autre part ce modèle présente une stéatohépatite associée à une fibrose et par conséquent est un modèle plus pertinent pour l'étude des mécanismes à l'origine de la transition stéatose/stéatohépatite. En utilisant ce modèle, les différentes études de la fonction mitochondriale ont mis en évidence une altération de la fonction mitochondriale associée à une augmentation du stress oxydant pouvant ainsi créer un cercle vicieux dans lequel la production accrue de ROS entraîne une dysfonction mitochondriale conduisant à la formation de plus de ROS (**Tableau 9**).

Le modèle animal qui nous a paru le plus proche de la pathogénèse du syndrome métabolique et de la stéatose hépatique est le rat nourri avec un régime modérément riche en gras (35 %). De manière à pouvoir évaluer la chronologie des modifications éventuelles au niveau de la fonction mitochondriale et du métabolisme lipidique en général, les rats ont été sacrifiés à différents temps de régime (2, 4 et 8 semaines). Dans ce modèle nous avons évalué la fonction mitochondriale hépatique en mesurant la consommation d'oxygène avec différents substrats respiratoires, la synthèse d'ATP en fonction de la consommation d'oxygène et les activités

enzymatiques des différents complexes de la chaîne respiratoire. Par ailleurs, la biogenèse mitochondriale a été évaluée en dosant la quantité d'ADNmt ainsi que l'expression des gènes clés impliqués dans cette voie. Enfin, nous avons mesuré l'expression de différents gènes clés dans le métabolisme lipidique, au niveau de la lipogenèse et de l'oxydation des acides gras.

Regulation of hepatic mitochondrial metabolism in response to a different time of high fat diet in rats

Mélissa Flamment^{a*}, Naïg Gueguen^{a,b}, Céline Wetterwald^b, Jennifer Rieusset^c, Hubert Vidal^c, Gilles Simard^{a,b,d}, Yves Malthiery^{a,b,d}, Pierre-Henri Ducluzeau^{a,d,e}

^aINSERM, U694, Angers, France

^bCHU Angers, Département de Biochimie et Génétique, Angers, France

^cINSERM 870, INRA 1235, Université Lyon 1, Hospices Civils de Lyon, France

^dUniv Angers, Angers, France

^eCHU Angers, Département d'Endocrinologie-Diabète-Nutrition, Angers, France.

***Corresponding author : Mélissa Flamment**

Address : INSERM U694, CHU Angers, 4 rue Larrey, Angers, F-49033 France

Tel : +33 241 73 59 65

Fax : +33 241 35 40 17

E-mail : mflamment@yahoo.fr

Word count: Main text: 2987, Abstract: 236

Abstract

Aims: Mitochondrial dysfunctions play a critical role in non-alcoholic steatohepatitis progression but are poorly studied during steatosis initiation. We aimed to determine the sequence of liver mitochondrial regulations during the first weeks of a moderate high fat diet in rats.

Methods: Sprague-Dawley rats fed a high fat diet during 2, 4 and 8 weeks. Mitochondrial oxygen consumption, respiratory complex activity, oxidative phosphorylation efficiency were assessed on liver isolated mitochondria. Gene expression related to liver metabolism and mitochondrial function were also determined.

Results: At 2 and 4 weeks of high fat diet there was a development of fatty liver illustrated by an increase of the hepatic triglyceride content and an increase of the expression of mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase (mtGPAT) and peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ). Fatty liver development was associated with an orientation of the metabolism to the oxidation of fatty acid illustrated by the increase of pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4) expression at 2 weeks and the increase of serum β -hydroxybutyrate concentration at 4 weeks but without alteration of mitochondria respiratory chain activity. At 8 weeks, oxygen consumption with palmitoyl-l-carnitine as respiratory substrate was decreased. Moreover, ATP synthase activity and ATP synthesis were increased leading to an increase of ATP/O. However, mitochondrial density seems to be not affected.

Conclusions: This model of gradual high fat diet until 8 weeks showed that hepatic metabolism and especially mitochondria can adapt to face the increase of fatty acid availability.

Keywords: High fat diet, Fatty liver, Lipid metabolism, Mitochondria, Oxidative phosphorylation

Abbreviations: HFD, high fat diet; RCR, respiratory control ratio; CS, citrate synthase; TG, triglyceride; mtDNA, mitochondrial DNA; HPRT, hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase; PGC1 α and β , peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α and β ; TFAM, mitochondrial transcription factor A; NRF1, nuclear respiratory factor 1; ERR α , estrogen-related receptor α ; SCD1, stearoyl-coenzyme A desaturase 1; mtGPAT, mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase; PPAR α and γ , peroxisome proliferator-activated receptor α and γ ; CPT1, carnitine palmitoyltransferase 1; PDK4, pyruvate dehydrogenase kinase 4.

Introduction

Obesity and risk factors associated like type 2 diabetes, cardiovascular diseases and liver diseases have become a major health problem not only in industrialized but also in developing countries [1-2]. The development of obesity responds to a complex multi-determinism involving biological factors, partly genetic, behavioral and environmental factors and being involved in varying proportions in each individual. The major environmental cause of obesity is an increase of food intake especially rich in fat combined with a decrease of energy expenditure associated with a sedentary lifestyle [3]. High fat diet (HFD) represents a challenge for the different tissues implied in energetic homeostasis which must maintain whole body energy equilibrium. The liver is a key organ in energetic homeostasis as well as in glucose and lipids metabolism and represents 20% of basal metabolic rate [4]. Mitochondrion represents the hub of metabolism by producing energy for cellular process but also is the end point of the degradation of energetic metabolites (glucose, fatty acids and protein). Now it is well recognized that mitochondrial dysfunction appears in the context of obesity and could contribute to the onset of insulin resistance in muscle [5] and nonalcoholic steatohepatitis [6].

However animal studies in liver have been mainly conducted on genetic animal models [7] or with a diet deficient in choline and methionine [8] and thus are quite different from common non-alcoholic fatty liver disease human physiopathology. Studies using HFD rodent models are more physiologic but are usually performed in endpoint condition [9-10] and failed to describe the sequence of events leading to metabolism alterations and mitochondrial dysfunction. Indeed, body and especially liver is constantly adapting to the changes inherent at environmental variation such as post-prandial state or fasting state in order to maintain energy homeostasis. However when an environmental stress (e.g., diet rich in fat) appears and persists, regulation mechanism fails to maintain energy homeostasis.

The aim of the present study was to describe the effects of a moderate excess fat delivery on liver metabolism and especially mitochondrial function using a chronological approach of HFD in rats. By functional and transcriptional methods, we aimed to determine mitochondrial regulations setting up and the sequence of the different early steps associated with fatty liver development.

Materials and methods

Animals

The present investigation was performed in accordance with the guiding principles in care and use of animals. Male Sprague Dawley rats were caged individually in a temperature-controlled room ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) with a dark/light cycle of 12:12h. They were provided with water ad libitum and a standard diet (U-A-R A04; SAFE, Epinay-sur-Orge, France) composed of (% total weight) 16% protein, 3% fat, 60% carbohydrate and 21% water, fiber, vitamins and minerals. At 2 months old, the control group (without high fat diet) was sacrificed and others groups were placed on a high fat diet (UPAE, Jouy-en-Josas) composed of (% total weight) 22 % protein, 35% fat (lard), 28% carbohydrate and 15% water, fiber, vitamins and minerals, during 2, 4 or 8 weeks. All rats were fasted during the night before being killed.

Mitochondrial respiration

Liver mitochondria were isolated as previously described [7]. Oxygen was measured with a Clark oxygen electrode in a glass cell 2 ml in volume, thermostatically controlled at 37°C . Liver mitochondria (0.5 mg protein/ml) were incubated in a respiratory reaction medium, consisting of 120 mM KCl, 5 mM KH_2PO_4 , 1 mM EGTA, 2 mM MgCl_2 , 3 mM hepes and 0.3% bovine serum albumin (w/v). Substrate concentrations were 5 mM pyruvate + 2.5 mM malate, or 40 μM palmitoyl-l-carnitine + 2.5 mM malate, or 5 mM succinate + 5 μM rotenone. The active state of respiration (state 3) was initiated by the addition of 300 μM ADP. The basal non-phosphorylating respiration rate (state 4) was measured before addition of ADP. Respiratory control ratio (RCR) was calculated by dividing state 3 by state 4 respiration rates.

Mitochondrial ATP synthesis

Mitochondria (0.5 mg/ml) were incubated in the respiratory reaction medium supplemented with 5 μ M rotenone, 5 mM succinate, 20 mM glucose and 125 μ M ATP. The state 3 of respiration was initiated by the addition of 175 mU/ml of hexokinase and ATP production was monitored by glucose-6-phosphate formation, as previously described [11]. Oxygen consumption was recorded for 2 min, thereafter aliquots were taken from the respiratory reaction medium and immediately placed in perchloric acid (6%), centrifuged (8000 g, 3 min) and the supernatant was removed and neutralized to pH 7. NADP⁺ (0.5 mM) and glucose 6-phosphate dehydrogenase (0.25 U) were then added and ATP production was monitored spectrophotometrically from NADPH content at 340 nm.

Mitochondrial enzyme activities

The activities of citrate synthase (CS), complex I, II, III and IV were measured spectrophotometrically at 37°C in isolated mitochondria via an adaptation of the method described by Malgat et al. [12]. CS activity was measured by monitoring the change in optical density of 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) at 412 nm. NADH ubiquinone reductase (complex I) was determined by monitoring the oxidation of NADH at 340 nm. Succinate ubiquinone reductase (complex II) was measured by following the reduction of 2,6-dichlorophenolindophenol at 600 nm. Ubiquinone cytochrome c reductase (complex III) was determined by monitoring the reduction of cytochrome c at 550 nm. Cytochrome c oxidase (complex IV) activity was measured by monitoring the oxidation of reduced cytochrome c at 550 nm. ATP synthase activity was measured by a coupled assay using lactate dehydrogenase and pyruvate kinase [13]. The assay was performed at 340 nm following the decrease in absorbance resulting from NADH reduction.

Liver triglyceride content and serum parameters

Liver triglyceride (TG) content was determined using the method described by Xu et al. [14]. Briefly, 100 mg of liver tissue was homogenized in 1 ml of ethanol followed by a centrifugation at 15,000 g for 10 min. TG were measured with a Sigma kit. Glucose concentrations were measured with a glucometer. Serum insulin concentrations were measured using enzyme-linked immunosorbent assay kits (Linco Research, St Charles, MO). Serum free fatty acid and β -hydroxybutyrate concentrations were measured using enzymatic assay kits on a Cobas Mira automatic analyzer (Roche).

Mitochondrial DNA quantification

Total DNA was extracted from liver using EZ1 DNA Tissue kit and BioRobot EZ1 DSP (Qiagen). The content of mitochondrial DNA (mtDNA) was calculated using real time quantitative PCR by measuring the threshold cycle ratio (Δ Ct) of a mitochondrial encoded gene (ND1) versus a nuclear encoded gene (β -Globin).

Real time quantitative RT-PCR analysis

Total RNA was extracted with the Trizol Reagent (Invitrogen). The level of target mRNAs was measured by RT followed by real-time PCR using a LightCycler (Roche). A standard curve was systematically generated with six different amounts of purified target cDNA and each assay was performed in duplicate. We measured hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) mRNA as a reference gene so that the results are expressed as a ratio referred to the expression of HPRT. Primer sequence and RT-qPCR conditions are available upon requested.

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SEM. The statistical significance of observed variations was assessed using one-way ANOVA and differences between means were subsequently tested by Fisher Post-hoc test. A *P* value < 0.05 was considered significant in all cases. All analyses were performed using Statview 5.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA).

Results

Body weight and different biochemical parameters

Results showed significant effect of time of diet on body weight (Table 1). Weight increased after each periods of HFD. Relative fat mass (epididymal fat pad) increased also with time of HFD but remained stable between 4 and 8 weeks of HFD. Insulin concentration significantly increased at 2, 4 and 8 weeks of HFD compared to control. Glycemia significantly increased at 4 and 8 weeks of HFD compared to control and 2 weeks of HFD. NEFA concentration remained the same in all periods of HFD. Serum β -hydroxybutyrate used as an indicator of liver β -oxidation increased at 4 weeks compared to the three other groups. Liver steatosis, assessed by measuring liver triglyceride content, increased dramatically at 2 weeks and 4 weeks of HFD compared to control but decreased significantly at 8 weeks compared to 2 weeks of HFD (Figure 1).

Mitochondrial oxygen consumption and ATP synthesis

To determine the effect of HFD on liver mitochondrial respiratory activity, we measured oxygen consumption with various substrates in states 3 and 4 (Table 2). Results showed there was no difference in mitochondrial respiration using pyruvate + malate (complex I) or Succinate + rotenone (complex II) as substrates in state 3 and 4 between the four groups. Mitochondrial respiration using palmitoyl-l-carnitine + malate as substrate (oxygen consumption associated with β -oxidation) significantly decreased at 8 weeks of HFD in state 3 but not in state 4. Corresponding RCR thus decreased at 8 weeks of HFD. We also measured ATP synthesis in the same time of oxygen consumption (ATP/O) with Succinate + rotenone as substrate in order to assess oxidative phosphorylation efficiency (Figure 2). ATP/O significantly increased at 8 weeks of HFD compared to control and 2 weeks of HFD due to an increase of ATP synthesis.

Mitochondrial enzyme activities

Citrate synthase activity significantly decreased at 4 and 8 weeks of HFD compared to control (Table 3). The activities of complex I, II, III and IV remained the same in all periods of HFD. ATP synthase activity significantly increased at 2, 4 and 8 weeks compared to control.

mtDNA content and gene expression

To assess mitochondrial content, we measured mtDNA content (Figure 3). mtDNA content remained the same whatever the week of HFD.

In order to evaluate the expression of key genes involved in metabolism, we performed real-time quantitative RT-PCR (Figure 4). We measured gene expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 (PGC1) α and β , mitochondrial transcription factor A (TFAM), nuclear respiratory factor 1 (NRF1) and estrogen-related receptor α (ERR α) which are key genes in mitochondrial biogenesis and function (Figure 4A). TFAM expression was significantly higher at 2 and 4 weeks of HFD compared to control and 8 weeks of HFD. PGC1 α expression significantly decreased at 8 weeks of HFD compared to control and decreased but not significantly at 2 and 4 weeks of HFD compared to control ($P=0.0955$ and $P=0.0673$ respectively). However, ANOVA for PGC1 α expression was not significant ($P=0.0768$). ERR α expression decreased significantly at 4 weeks compared to 2 weeks of HFD and decreased at 8 weeks compared to control but not significantly ($P=0.0654$). NRF1 and PGC1 β expression remained the same in all periods of HFD.

We also measured stearoyl-coenzyme A desaturase 1 (SCD1), mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase (mtGPAT) and peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) expressions in order to evaluate fatty acid and triglycerides synthesis (Figure 4B). SCD1 expression remained the same in all periods of HFD. mtGPAT expression was

significantly higher at 2 and 4 weeks of HFD compared to control and 8 weeks of HFD. PPAR γ expression increased significantly at 4 and 8 weeks compared to control and increased at 2 weeks but not significantly ($P=0.0672$).

In order to evaluate fatty acid oxidation, we measured carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1), peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) and pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4) expressions (Figure 4C). CPT1 and PPAR α expressions remained the same in all periods of HFD. PDK4 expression increased at 2 weeks compared to the three other groups.

Discussion

Although significant progress in understanding the pathogenesis of liver lipid accumulation has been achieved in years, the mitochondrial adaptations during this process remain to be characterized. In the current study we aimed to investigate liver metabolism by specifically studying mitochondrial function in a model of rats with different times of moderate HFD in order to decipher a schema of early metabolism adaptations setting up to maintain energy homeostasis.

At 2 weeks of HFD, it seems there were no deleterious consequences of the increase of fatty acid supply on liver metabolism. The main and not surprising event at this state was the increase of fatty acid storage into triglycerides which was illustrated in the major part by the increase of liver triglyceride content and in another part by the increase of the expression of mtGPAT which is implied in the first and most likely rate-limiting step of TG synthesis [15]. There was also an increase of the expression of PPAR γ . In addition to the major role as a key factor in adipogenesis, increasing evidence has demonstrated that PPAR γ plays a key role in the development of fatty liver [16]. Several murine models of obesity and diabetes [17-19] including model of HFD [20], which develop fatty liver, have an increase level of PPAR γ expression in liver. Interestingly, the expression of PDK4 which is an important regulation point between glycolysis and fatty acid oxidation [21] was increased at 2 weeks. When PDK4 is activated, it inhibits pyruvate dehydrogenase complex, thus the principal source of acetyl CoA becomes fatty acid oxidation. Therefore at 2 weeks of HFD we showed an orientation of the metabolism in order to use the fatty acid excess. At mitochondrial level there was an increase of the ATP synthase activity. Mitochondrial function in liver is regulated by ATP synthesis and not by the entry of the respiratory substrates into the respiratory chain unlike muscle [22]. We can hypothesize that the increase of ATP synthase activity represents an

adaptation of the mitochondria in order to allow the oxidation of more substrates and/or to supply more ATP in the case of an increase of energy needs (e.g. Triglycerides synthesis).

At 4 weeks of HFD, there was not only storage of triglycerides but also an increase of fatty acid oxidation. Indeed, with a serum indicator of liver β -oxidation, β -hydroxybutyrate, we showed that β -oxidation increased at 4 weeks compared to the other groups. This increase of fatty acid oxidation seems to be due to an increase of fatty acid entry in the β -oxidation without alteration of this pathway or of the mitochondrial respiratory chain. This observation was therefore a direct consequence of the increase of fatty acid availability. At 4 weeks the increase of PDK4 was not maintained. PDK4 expression is regulated by PGC1 α and ERR α [23], and so the decrease of PGC1 α and ERR α expression observed at 4 and 8 weeks of HFD could explain the decrease of PDK4 expression at the same periods of diet.

At 8 weeks of HFD we observed an inversion of the first regulation set up. Indeed, the level of β -hydroxybutyrate decreased to be identical to the control group and on the other hand, the decrease of respiration with palmitoyl-l-carnitine at 8 weeks of HFD at state 3, showed there was a decrease of β -oxidation pathway. The fact that respiration with Succinate + rotenone as substrate was not altered, indicated normal oxidation of FADH₂ by complex II, suggests that the decrease of respiration is due to an impaired β -oxidation and not a matter with mitochondrial respiratory chain. This last result was confirmed by the constant activities of complex I, II, III and IV in all periods of HFD. ATP/O increased at 8 weeks of HFD due to an increase of ATP synthesis with same oxygen consumption. We can hypothesize that this increase of oxidative phosphorylation efficiency was a consequence of the decrease of β -oxidation in order to maintain ATP synthesis to meet the needs of the cell despite the decrease of β -oxidation substrate availability for respiratory chain. This increase of efficiency associated with the pressure exerted by the high substrates availability could lead to an increase of ROS production and thus have a consequence on the mitochondrial respiratory

chain integrity [24-25]. In other side the decrease at 8 weeks of mtGPAT expression compared to 2 and 4 weeks could illustrate a decrease of TG synthesis and explain the decrease of liver TG at 8 weeks compared to 2 weeks of HFD. Thus the association of the decrease of fatty acid oxidation and the decrease of TG synthesis could lead to an accumulation of intracellular lipid metabolites which could be deleterious for the cell.

In addition, we assessed mitochondrial biogenesis with the measure of the expression of key genes and with the measure of mtDNA content. PGC1 α expression decreased at 8 weeks of HFD and decrease at 2 and 4 weeks but not significantly, but we did not observe significant changes in a downstream target of PGC1 α , NRF1. Recent evidence shows that ERR α and PGC1 α interact to regulate mitochondrial gene expression, thus implicating this nuclear receptor as an important modulator of mitochondrial function [26-27]. Moreover ERR α expression is regulated by PGC1 α [28]. We showed that ERR α expression was decrease at 4 and 8 weeks of HFD compared to 2 weeks of HFD in parallel of the decrease of PGC1 α expression. Another downstream target of PGC1 α is TFAM, which is key transcriptional activator that translocates to the mitochondria and activates mitochondrial DNA replication and transcription. Surprisingly, we showed that TFAM expression was increased at 2 and 4 weeks of HFD. However, although there was variation of expression of PGC1 α , ERR α and TFAM, there were any consequences on the mtDNA content and thus on the mitochondrial density which seems to be the same in all periods of HFD.

In conclusion, in the first time of HFD (2-4 weeks), there was an increase of fatty acid oxidation and an increase of triglycerides synthesis in order either use excess of fatty acid or to produce energy or to store it in triglycerides. However this first regulation set up to face excess fat delivery do not continued and there is a shift which leads to a decrease of fatty acid oxidation and triglyceride synthesis. It should be pointed out that there is no alteration of mitochondrial respiratory chain itself illustrated that until 8 weeks mitochondria can preserve

its functionality despite fatty acid overload. Thus this model of gradual high fat diet until 8 weeks allowed us to show that hepatic metabolism and especially mitochondria can adapt to face the increase of fatty acid availability.

Acknowledgements

MF was supported by a grant from "Conseil Régional Pays de la Loire / Inserm". The authors thank Jerome Roux, Pierre Legras, Dominique Gilbert and Laurent Buffet for animal care.

References

- [1] Hedley AA, Ogden CL, Johnson CL, Carroll MD, Curtin LR, Flegal KM (2004). Prevalence of overweight and obesity among US children, adolescents, and adults, 1999-2002. *JAMA* 291: 2847-2850.
- [2] Prentice AM (2006). The emerging epidemic of obesity in developing countries. *Int J Epidemiol* 35: 93-99.
- [3] World Health Organization (2000). Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser* 894: i-xii, 1-253.
- [4] Rolfe DF, Brown GC (1997). Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev* 77: 731-758.
- [5] Morino K, Petersen KF, Shulman GI (2006). Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction. *Diabetes* 55: S9-S15.
- [6] Fromenty B, Robin MA, Igoudjil A, Mansouri A, Pessayre D (2004). The ins and outs of mitochondrial dysfunction in NASH. *Diabetes Metab* 30: 121-138.
- [7] Flamment M, Arvier M, Gallois Y et al. (2008). Fatty liver and insulin resistance in obese Zucker rats: No role for mitochondrial dysfunction. *Biochimie* 90: 1407-1413.
- [8] Serviddio G, Bellanti F, Tamborra R et al. (2008). Alterations of hepatic ATP homeostasis and respiratory chain during development of non-alcoholic steatohepatitis in a rodent model. *Eur J Clin Invest* 38: 245-252.
- [9] Crescenzo R, Bianco F, Falcone I, Prisco M, Liverini G, Iossa S (2008). Alterations in hepatic mitochondrial compartment in a model of obesity and insulin resistance. *Obesity (Silver Spring)* 16: 958-964.

- [10] Ciapaite J, Bakker SJ, Van Eikenhorst G et al. (2007). Functioning of oxidative phosphorylation in liver mitochondria of high-fat diet fed rats. *Biochim Biophys Acta* 1772: 307-316.
- [11] Nogueira V, Piquet MA, Devin A et al. (2001). Mitochondrial adaptation to in vivo polyunsaturated fatty acid deficiency: increase in phosphorylation efficiency. *J Bioenerg Biomembr* 33: 53-61.
- [12] Malgat M, Durrieu G, Mazat JP (1999). Enzymatic and polarographic measurements of the respiratory chain complexes. In: Lestienne P (editor) *Mitochondrial Diseases*. Springer Verlag, Paris, pp 357-377.
- [13] Rustin P, Chretien D, Bourgeron T et al. (1994). Biochemical and molecular investigations in respiratory chain efficiencies. *Clin Chim Acta* 228: 35-51.
- [14] Xu H, Wilcox D, Nguyen P et al. (2006). Hepatic knockdown of mitochondrial GPAT1 in ob/ob mice improves metabolic profile. *Biochem Biophys Res Commun* 349: 439-448.
- [15] Sul HS, Wang D (1998). Nutritional and hormonal regulation of enzymes in fat synthesis: studies of fatty acid synthase and mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase gene transcription. *Annu Rev Nutr* 18: 331-51.
- [16] Gavrilova O, Haluzik M, Matsusue K et al. (2003). Liver peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass. *J Biol Chem* 278: 34268-34276.
- [17] Memon RA, Tecott LH, Nonogaki K et al. (2000). Up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR-alpha) and PPAR-gamma messenger ribonucleic acid expression in the liver in murine obesity: troglitazone induces expression of PPAR-gamma-responsive adipose tissue-specific genes in the liver of obese diabetic mice. *Endocrinology* 141: 4021-4031.

- [18] Rahimian R, Masih-Khan E, Lo M, van Breemen C, McManus BM, Dubé GP (2001). Hepatic over-expression of peroxisome proliferator activated receptor gamma2 in the ob/ob mouse model of non-insulin dependent diabetes mellitus. *Mol Cell Biochem* 224: 29-37.
- [19] Bedoucha M, Atzpodien E, Boelsterli UA (2001). Diabetic KKAY mice exhibit increased hepatic PPARgamma1 gene expression and develop hepatic steatosis upon chronic treatment with antidiabetic thiazolidinediones. *J Hepatol* 35: 17-23.
- [20] Inoue M, Ohtake T, Motomura W et al. (2005). Increased expression of PPARgamma in high fat diet-induced liver steatosis in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 336: 215-222.
- [21] Sugden MC (2003). PDK4: A factor in fatness? *Obes Res* 11:167-169.
- [22] Rossignol R, Letellier T, Malgat M, Rocher C, Mazat JP (2000). Tissue variation in the control of oxidative phosphorylation: implication for mitochondrial diseases. *Biochem J* 347: 45-53.
- [23] Zhang Y, Ma K, Sadana P et al. (2006). Estrogen-related receptors stimulate pyruvate dehydrogenase kinase isoform 4 gene expression. *J Biol Chem* 281: 39897-39906.
- [24] Fromenty B, Pessayre D (1995). Inhibition of mitochondrial beta-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. *Pharmacol Ther* 67: 101-154.
- [25] García-Ruiz C, Colell A, Morales A, Kaplowitz N, Fernández-Checa JC (1995). Role of oxidative stress generated from the mitochondrial electron transport chain and mitochondrial glutathione status in loss of mitochondrial function and activation of transcription factor nuclear factor-kappa B: studies with isolated mitochondria and rat hepatocytes. *Mol Pharmacol* 48: 825-834.

- [26] Schreiber SN, Emter R, Hock MB et al. (2004). The estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) functions in PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha)-induced mitochondrial biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 6472-6477.
- [27] Mootha VK, Handschin C, Arlow D et al. (2004). Erralpha and Gabpa/b specify PGC-1alpha-dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 6570-6575.
- [28] Schreiber SN, Knutti D, Brogli K, Uhlmann T, Kralli A (2003). The transcriptional coactivator PGC-1 regulates the expression and activity of the orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha (ERRalpha). *J Biol Chem* 278: 9013-9018.

TABLE 1

Body mass, fat mass and various serum parameters

Weeks of high fat diet	Control	2	4	8	<i>P</i>
Body mass (g)	289 ± 28 ^a	465 ± 16 ^b	534 ± 15 ^c	589 ± 18 ^d	<0.0001
Epididymal fat pad (g/100g)	0.47 ± 0.04 ^a	1.0 ± 0.08 ^b	1.34 ± 0.14 ^c	1.26 ± 0.12 ^c	<0.0001
Glycemia (g/l)	1.06 ± 0.06 ^a	1.08 ± 0.10 ^a	1.33 ± 0.10 ^b	1.33 ± 0.05 ^b	0.0378
Insulin (ng/ml)	0.53 ± 0.07 ^a	0.96 ± 0.10 ^b	0.82 ± 0.18 ^b	0.90 ± 0.07 ^b	0.0337
NEFA (μmol/l)	762.5 ± 44.3	866.2 ± 196.3	555.8 ± 39.5	726.2 ± 135.6	0.3720
B-hydroxybutyrate (μmol/l)	651.8 ± 54.7 ^a	751.5 ± 80.7 ^a	1097.0 ± 78.5 ^b	770.2 ± 75.8 ^a	0.0021

NEFA, non-esterified fatty acid. Values are mean ± SEM. *P* values are from one-way ANOVA.

(n=6 except for insulin n=4-6).

a<b<c<d significantly different between each group: *P*<0.05 with Fischer post hoc test

TABLE 2

Mitochondrial respiratory activity

Weeks of high fat diet		Control	2	4	8	<i>P</i>
Pyruvate + malate	State 3	15.15 ± 1.0	17.94 ± 2.35	15.88 ± 1.86	14.31 ± 1.21	0.4878
	State 4	4.77 ± 0.82	4.66 ± 0.68	3.82 ± 0.58	4.76 ± 0.49	0.6787
	RCR	3.49 ± 0.42	4.46 ± 0.94	4.94 ± 1.17	3.18 ± 0.46	0.3841
Palmitoyl-l-carnitine + malate	State 3	104.43 ± 6.69 ^b	107.20 ± 8.82 ^b	116.26 ± 8.46 ^b	66.79 ± 17.99 ^a	0.0292
	State 4	23.67 ± 1.72	21.26 ± 1.24	22.92 ± 1.72	26.95 ± 5.07	0.5686
	RCR	4.45 ± 0.24 ^b	5.05 ± 0.32 ^b	5.24 ± 0.55 ^b	2.38 ± 0.48 ^a	0.0003
Succinate + rotenone	State 3	159.47 ± 14.30	165.91 ± 14.56	183.03 ± 26.76	162.27 ± 11.09	0.7853
	State 4	25.56 ± 1.98	29.15 ± 1.91	28.79 ± 2.82	34.31 ± 6.76	0.4810
	RCR	6.22 ± 0.23	5.67 ± 0.23	6.38 ± 0.69	5.32 ± 0.70	0.4577

Values are expressed in natomO/min/mg protein. Values are mean ± SEM. *P* values are from one-way ANOVA (n=6).

a<b<c<d significantly different between each group: *P*<0.05 with Fischer post hoc test

TABLE 3

Mitochondrial enzyme activities

Weeks of high fat diet	Control	2	4	8	<i>P</i>
Citrate synthase	333.3 ± 11.6 ^b	313.9 ± 13.4 ^{ab}	294.1 ± 9.6 ^a	294.8 ± 7.9 ^a	0.0214
Complex I	0.25 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.31 ± 0.04	0.34 ± 0.07	0.3717
Complex II	1.55 ± 0.07	1.40 ± 0.07	1.44 ± 0.09	1.61 ± 0.09	0.2724
Complex III	3.66 ± 0.18	3.21 ± 0.26	3.80 ± 0.31	3.75 ± 0.28	0.3732
Complex IV	8.53 ± 0.36	8.95 ± 0.39	8.42 ± 0.41	8.61 ± 0.31	0.7641
ATP synthase	1.38 ± 0.12 ^a	1.70 ± 0.08 ^b	1.77 ± 0.09 ^b	1.66 ± 0.08 ^b	0.0391

CS activities are expressed in nmoles/min/mg protein. Other results are the ratio of enzyme activity and CS activity.

Values are mean ± SEM. *P* values are from one-way ANOVA (n=8).

a<b<c<d significantly different between each group: *P*<0.05 with Fisher post hoc test

Figure legends

Figure 1: Liver triglycerides content

Liver triglycerides are expressed as mg/g liver measured on rats control and with HFD during 2, 4 and 8 weeks (n=6). Results are expressed as mean \pm SEM. *P* for ANOVA is <0.0001. **P*<0.05 versus control and [†]*P*<0.05 versus 2 weeks of HFD with Fisher post hoc test.

Figure 2: ATP synthesis/oxygen consumption ratio

ATP synthesis and oxygen consumption were measured at the same time with succinate + rotenone as respiratory substrate with hexokinase system in liver isolated mitochondria from rats control and with 2, 4 and 8 weeks of HFD (n=5-6). Results are expressed as mean \pm SEM. *P* for ANOVA is 0.0541. **P*<0.05 versus control and 2 weeks of HFD.

Figure 3: mtDNA content

mtDNA copy number was calculated as the ratio of ND1 to β -globin DNA level determined by real-time PCR in liver of rats control and with HFD during 2, 4 and 8 weeks (n=6). Results are expressed as mean \pm SEM. *P* for ANOVA is 0.8502.

Figure 4: Gene expression

Total RNA was extracted from liver of rats control and with 2, 4 and 8 weeks of HFD (n=5-6). Samples were analyzed by quantitative RT-PCR, and all PCR reactions were normalized for HPRT expression. The ratio of mean expression in control liver was used as 100%. (A) Mitochondrial biogenesis and function-related genes expression, (B) Fatty acid and triglyceride synthesis-related genes expression, (C) Fatty acid oxidation-related genes expression.

Results are expressed as mean \pm SEM. * P <0.05 versus control, † P <0.05 versus control and HFD 8 weeks, ‡ P <0.05 versus HFD 2 weeks, ^a P =0.0955, ^b P =0.0673, ^c P =0.0654 and ^d P =0.0672 versus control.

Figure 1

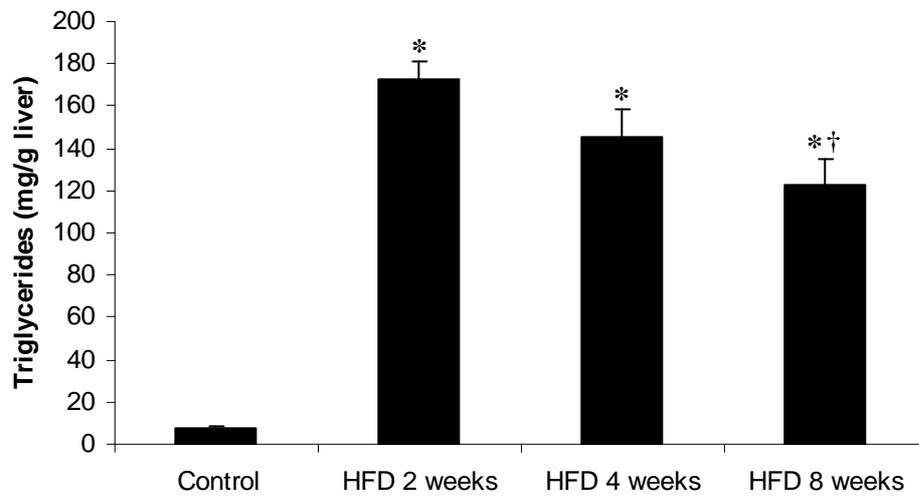


Figure 2

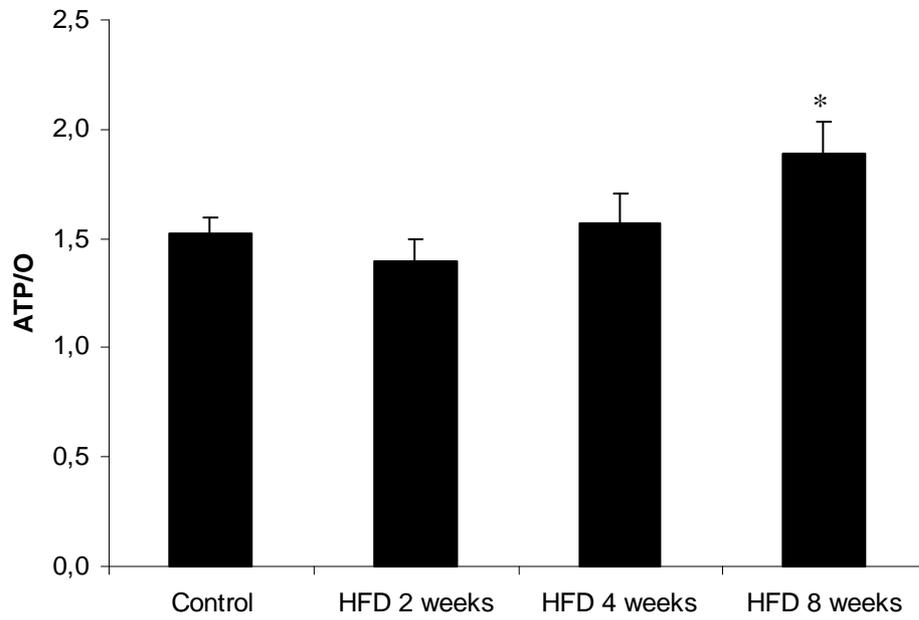


Figure 3

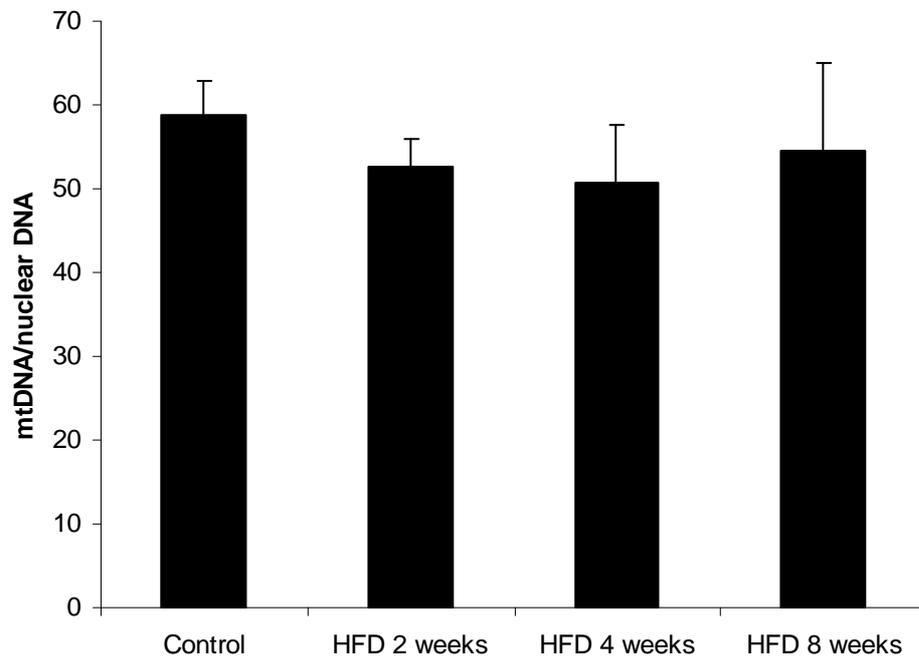
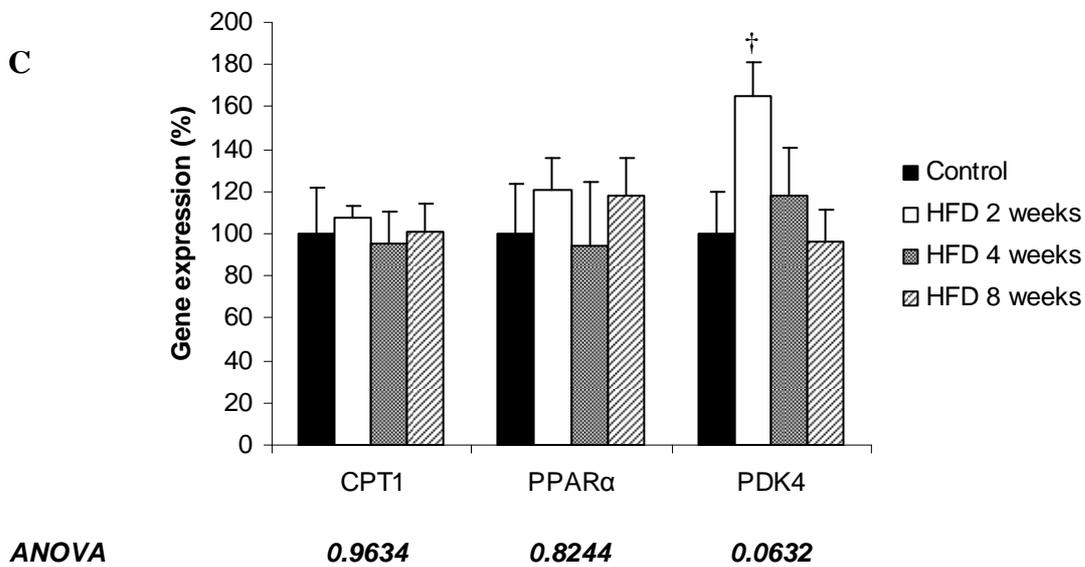
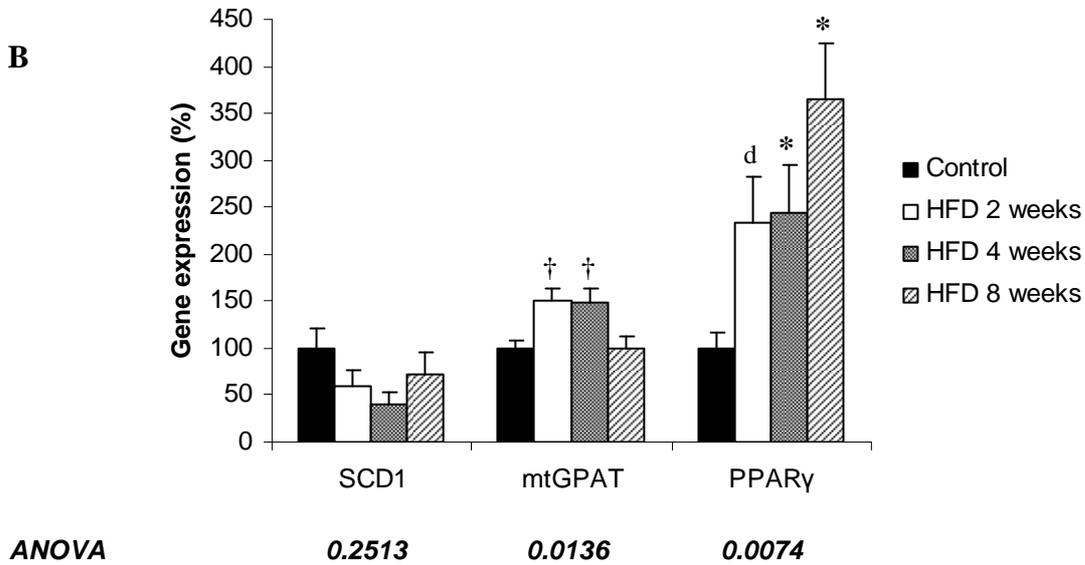
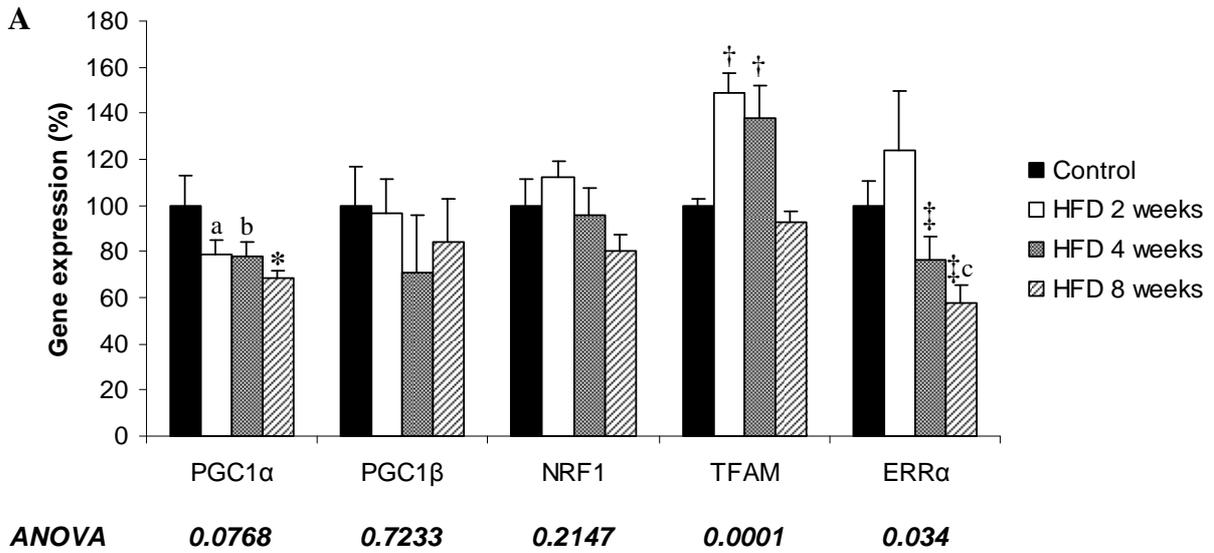


Figure 4



Discussion de l'article 2 :

Avec ce modèle de rats alimentés avec un régime riche en gras pendant différentes durées nous avons pu mettre en évidence l'évolution de la fonction mitochondriale et du métabolisme lipidique au cours du développement de la stéatose.

Après 2 semaines de régime, nous observons une forte augmentation de la quantité de triglycérides dans le foie associée à une augmentation de l'expression des ARNm mtGPAT et PPAR γ . En parallèle, l'expression du gène codant pour PDK4 est augmentée ce qui peut illustrer une orientation du métabolisme vers l'oxydation des acides gras. Au niveau mitochondrial, les consommations d'oxygène avec différents substrats ainsi que les activités enzymatiques des complexes I, II, III et IV ne varient pas par rapport au groupe "control". Seule l'activité de l'ATP synthase est augmentée à partir de 2 semaines de régime et jusqu'à 8 semaines. Dans le foie, la fonction mitochondriale est régulée par la synthèse d'ATP et non pas par l'arrivée des substrats de la chaîne respiratoire contrairement au muscle (Rossignol *et al.*, 2000). Nous pouvons supposer que cette augmentation d'activité de l'ATP synthase représente une adaptation permettant l'oxydation de plus de substrats dans le cas d'une grande disponibilité de substrats.

Après 4 semaines de régime, le contenu en triglycérides hépatiques reste stable. La concentration en β -hydroxybutyrate dans le sérum est augmentée suggérant une augmentation de l'oxydation des acides gras au niveau hépatique. En revanche, l'augmentation de l'expression de PDK4 observée à 2 semaines de régime n'est pas maintenue à 4 semaines. Ce retour au niveau du groupe "control" de l'expression de PDK4 peut s'expliquer par la diminution de l'expression de PGC1 α et ERR α à 4 semaines de régime étant donné que l'expression de PDK4 est régulée par ces deux facteurs (Zhang *et al.*, 2006).

A partir de 8 semaines de régime en gras, nous observons une inversion des premières adaptations mises en place, avec une diminution de l'oxydation des acides gras et une diminution de la synthèse de triglycérides. En effet, la concentration en β -hydroxybutyrate dans le sérum redevient équivalente à celle du groupe "control". En parallèle, la consommation d'oxygène mitochondriale avec du palmitoyl-l-carnitine comme substrat est diminuée. Étant donné que la consommation d'oxygène avec du succinate comme substrat n'est pas affectée, l'oxydation du FADH $_2$ par le complexe II ne semble pas altérée. Cela indique une diminution de la voie de β -oxydation mitochondriale en elle-même. Concernant la synthèse de triglycérides, l'expression de l'ARNm de la mtGPAT redevient équivalente à

celle des rats "control" et est associée à une diminution du contenu en triglycérides hépatiques. A 8 semaines de régime riche en gras, nous observons ainsi une diminution de l'oxydation des acides gras associée à une diminution de la synthèse de triglycérides hépatiques, suggérant une augmentation de l'accumulation d'intermédiaires lipidiques pouvant être délétères pour le fonctionnement cellulaire et participer à l'initiation d'une altération de la voie de signalisation à l'insuline *via* l'activation de sérine/thréonine kinases. Par ailleurs, l'observation d'une diminution de l'oxydation des acides gras et de la synthèse des triglycérides peut simplement être le reflet d'une diminution de l'arrivée des acides gras au niveau du foie consécutive à une diminution de la lipolyse adipocytaire ou à une augmentation du captage des lipides par les autres tissus.

Au niveau de la fonction oxydative mitochondriale, à 8 semaines, nous observons une augmentation du rapport de la synthèse d'ATP sur la consommation d'oxygène (ATP/O) due à une augmentation de la synthèse d'ATP pour une même consommation d'oxygène. Cette augmentation de l'efficacité de la phosphorylation oxydative est probablement la conséquence de la diminution de la β -oxydation et permet le maintien d'une synthèse d'ATP nécessaire au fonctionnement cellulaire et cela malgré la diminution de la disponibilité des coenzymes réduits pour la chaîne respiratoire. Par ailleurs, l'augmentation de l'efficacité de la phosphorylation oxydative pourrait entraîner une augmentation de la production des ROS et ainsi initier le cercle vicieux associé au développement du stress oxydatif observé dans la stéatohépatite (Begrich *et al.*, 2006). Cette hypothèse est soutenue par le fait que l'expression de l'ARNm de la superoxyde dismutase 2 (SOD2) est augmentée à 8 semaines de régime riche en gras (**Figure 25**) illustrant la nécessité pour la cellule de lutter contre une production accrue de ROS.

Parallèlement à l'analyse fonctionnelle mitochondriale, nous avons évalué la biogenèse mitochondriale en mesurant la quantité d'ADNmt ainsi que l'expression de gènes clés régulant cette voie. L'expression de PGC1 α est diminuée à 8 semaines et a tendance à diminuer à 4 et 8 semaines de régime. De manière surprenante, TFAM qui est un gène cible de PGC1 α présente une augmentation de son ARNm à 4 et 8 semaines de régime. Cependant, ces variations d'expression de gènes contrôlant la biogenèse mitochondriale n'ont aucune répercussion sur la quantité d'ADNmt qui reste la même quelque soit la durée du régime riche en gras. Par conséquent, la biogenèse mitochondriale ne semble pas altérée par un régime riche en gras. Par ailleurs, l'activité de la citrate synthase est diminuée à 4 et 8 semaines de régime. L'activité de la citrate synthase peut être utilisée comme marqueur de la quantité de mitochondries quand cette activité est mesurée sur mitochondries isolées et sur homogénat

tissulaire, afin d'établir un rapport des deux activités (activité par mg de protéines mitochondriales *versus* activité par mg de protéines tissulaires). Dans notre étude l'activité de la citrate synthase n'a été mesurée que sur mitochondries isolées. Par conséquent, la diminution d'activité observée illustre soit une diminution de la quantité de protéine soit une diminution de l'activité du cycle de Krebs.

Avec ce modèle de rats nourris avec un régime riche en gras pendant différentes durées, nous avons mis en évidence que dans les premiers temps d'un apport accru en lipides (2 et 4 semaines), le métabolisme hépatique était orienté de manière à utiliser ou à stocker sous forme de triglycérides l'excès d'acides gras. Cette première adaptation est ensuite complètement inversée et nous observons une diminution de l'oxydation des acides gras mais également une diminution du stockage des acides gras sous forme de triglycérides. Concernant la fonction mitochondriale, celle-ci n'est seulement affectée au niveau de la synthèse d'ATP à 8 semaines de régime. La mitochondrie est donc capable de subir une arrivée massive de lipides en conservant un fonctionnement normal au moins jusqu'à 8 semaines de régime.

D'autres études de la fonction mitochondriale ont été réalisées sur des modèles d'alimentation riche en lipides. Ciapaite *et al.* (2007), en utilisant un modèle de rats alimentés avec un régime riche en lipides (25 %) ont mis en évidence une absence d'altération de la fonction mitochondriale que ce soit au niveau fonctionnel (consommation d'oxygène, potentiel de membrane et ADP/O) ou au niveau de la densité mitochondriale hépatique. Iossa *et al.* (2000), en réalisant une étude de la fonction mitochondriale sur homogénat de foie de rats alimentés avec un régime riche en gras (50 %) pendant 15, 30 et 60 jours, ont mis en évidence une diminution de la consommation d'oxygène mitochondriale avec du glutamate + malate comme substrats respiratoires mais une absence de variation de la consommation d'oxygène avec des substrats du complexe II (succinate) et de la β -oxydation (palmitoyl-l-carnitine + malate). Etant donné que dans l'étude précédente, le pourcentage de lipides dans la nourriture est largement supérieur au nôtre (50 % *versus* 35 %) et que les rats étaient jeunes (30 jours), il est difficile de comparer cette étude avec la nôtre, d'autant plus qu'elle a été réalisée sur homogénat de foie plutôt que sur mitochondries isolées. Plus récemment, la même équipe (Crescenzo *et al.*, 2008), a réalisé une étude de la fonction mitochondriale hépatique en utilisant des rats alimentés avec un régime riche en gras (50 %) pendant 7 semaines. Cette étude a mis en évidence une diminution de la consommation d'oxygène à l'état 3 et à l'état 4 avec différents substrats (glutamate + malate, palmitoyl-CoA + carnitine + malate, succinate + roténone) de mitochondries isolées ainsi qu'une diminution de la fuite de protons. Dans leur

étude l'activité de la citrate synthase mesurée sur mitochondries isolées est également diminuée. Cette altération de la fonction mitochondriale est associée à une augmentation du stress oxydatif illustrée par une diminution de l'activité de l'aconitase (enzyme du cycle de Krebs dont l'activité est étroitement régulée par les ROS) et une augmentation de la peroxydation lipidique. Encore plus récemment, Mantena *et al.* (2009), ont étudié la fonction mitochondriale chez des souris C57BL/6 alimentées avec un régime riche en lipides pendant 8 et 16 semaines et chez des souris contrôles recevant la même quantité de nourriture standard d'un point de vue calorique. Cette étude a montré une augmentation de l'hypoxie (mesurée en utilisant du pimonidazole) à 8 semaines mais surtout à 16 semaines. La consommation d'oxygène mitochondriale à l'état 3 (glutamate + malate et succinate) est diminuée à 16 semaines ainsi que le potentiel de membrane. Les activités du complexe I et de la citrate synthase ne sont pas modifiées alors que l'activité du complexe IV est diminuée. Ces altérations de la fonction mitochondriale sont associées à une augmentation de la sensibilité au NO ainsi qu'à l'augmentation de protéines mitochondriales nitrosylées. Enfin, une étude de Chan *et al.* (2008), de la réponse transcriptionnelle hépatique de souris C57BL/6 soumises à une alimentation riche en lipides pendant 2, 4 et 10 semaines, a mis en évidence une augmentation de l'expression des gènes codant pour des protéines impliquées dans l'oxydation des acides gras et une diminution de l'expression des gènes lipogéniques dans les premiers temps de régime. Ce profil d'expression est ensuite inversé à 10 semaines de régime riche en lipides. L'ensemble de ces études met en évidence différents résultats soulignant ainsi la nécessité de prolonger l'investigation de la fonction mitochondriale dans le développement de la stéatose.

Notre étude présente plusieurs limites, notamment par l'absence de rats "control" pour chaque période de régime. Nous avons choisi de ne réaliser qu'un seul groupe "control" en partant du principe que les rats utilisés étaient de jeunes adultes considérés comme matures et ainsi en dehors de leur période de croissance ou d'une période de vieillissement qui sont deux phénomènes physiologiques pouvant influencer le métabolisme et la fonction mitochondriale. Par ailleurs, le fait de se baser exclusivement sur l'expression des ARNm des facteurs étudiés représente uniquement un profil d'expression et ne donne pas d'information sur la présence des protéines ou sur leur activité. Par conséquent pour renforcer cette étude il faudrait au moins mesurer l'expression protéique des différents facteurs étudiés en particulier pour clarifier l'évolution de la biogenèse mitochondriale au cours de la stéatose.

De par ses limites et les données obtenues, cette étude donne lieu à de nombreuses perspectives. Il apparaît nécessaire de réaliser des temps plus longs de régime et d'évaluer la

stéatose mais aussi l'inflammation et le stress oxydatif afin de discriminer les mécanismes inhérents au premier hit et ceux inhérents au second hit et ainsi mieux cerner l'implication de la mitochondrie dans la pathogénèse des NAFLD. Par ailleurs, l'évaluation de la sensibilité à l'insuline notamment hépatique avec la mesure de la production de glucose, l'analyse de la voie de signalisation insulinémique ainsi que les concentrations en intermédiaires lipidiques hépatiques tels que le diacylglycérol et les acyl-CoA à longues chaînes, permettrait de relier les modifications de la fonction mitochondriale au développement de l'insulinorésistance. Enfin, au vu de l'importance présumée du stress du RE dans le développement de la stéatose et de l'insulinorésistance hépatiques, il semble intéressant d'étudier la relation fonctionnelle entre la mitochondrie et le RE dans ce contexte. En effet, une étude récente (Lim *et al.*, 2009), a mis en évidence un lien entre la fonction mitochondriale, le stress du RE et l'insulinorésistance. Des cellules sk-HepI ont été traitées avec de l'oligomycine afin d'induire une dysfonction mitochondriale se manifestant par une chute du potentiel de membrane mitochondrial associée à une déplétion en ATP cellulaire. La dysfonction mitochondriale induite par de l'oligomycine entraîne une insulinorésistance (diminution de la phosphorylation sur tyrosines d'IRS1 et diminution de la phosphorylation d'Akt) et une augmentation de la néoglucogénèse illustrée d'une part par l'augmentation de l'expression protéique de la PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase), de la glucose-6-phosphatase, de PGC1 α et une diminution de la phosphorylation de FOXO1 et d'autre part par l'augmentation de la production de glucose par les cellules. Cette induction de la néoglucogénèse est associée à une augmentation du stress du RE illustrée par l'augmentation de l'expression de facteurs impliqués dans la réponse à ce stress tels que GRP78, CHOP (C/EBP homologous protein) et une augmentation de la phosphorylation d'eIF2 (eukaryotic initiation factor 2). *Via* l'utilisation d'un chélateur de calcium (BAPTA-AM) mais également d'inhibiteurs du flux calcique mitochondrial (ruthénium red) et du RE (ryanodine), les auteurs ont mis en évidence que le stress du RE est médié par une augmentation de la libération de calcium par la mitochondrie suite au traitement par de l'oligomycine et que l'augmentation de la néoglucogénèse est médiée par le calcium libéré par la mitochondrie et par le RE. Ces effets dépendants du calcium sont médiés par la p38-MAPK (utilisation d'un inhibiteur et d'un adénovirus dominant négatif) qui entraîne d'une part l'activation de la néoglucogénèse *via* les facteurs de transcription C/EBP α (CCAAT/enhancer-binding protein α) et ATF2 et d'autre part le stress du RE. En outre, la dysfonction mitochondriale induite par de l'oligomycine entraîne l'activation de la JNK *via* le calcium, qui va augmenter l'expression de la PEPCK en inhibant la signalisation insulinémique et en régulant l'activité de FOXO1. L'utilisation d'une

chaperone chimique (PBA : 4-phenyl butyric acid) qui diminue le stress du RE, réduit l'activation de la p38-MAPK ainsi que la surexpression de PEPCK illustrant ainsi que le stress du RE renforce les altérations induites par la dysfonction mitochondriale. Force est de constater à la lumière de ces résultats que la mitochondrie et le réticulum endoplasmique, de par leur relation physique et fonctionnelle, participent ensemble au développement de l'insulinorésistance hépatique.

ARTICLE 3

Effects of the cannabinoid CB1 antagonist, rimonabant, on hepatic mitochondrial function in rats fed a high fat diet

Mélissa Flamment, Naïg Gueguen, Céline Wetterwald, Gilles Simard, Yves Malthièry, Pierre-Henri Ducluzeau.

Soumis à American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism.

Introduction de l'article 3 :

Le rimonabant, antagoniste des récepteurs aux endocannabinoïdes CB1, induit une diminution de la prise alimentaire et une perte de poids dans différents modèles animaux (Colombo *et al.*, 1998, Ravinet Trillou *et al.*, 2003, Vickers *et al.*, 2003, Poirier *et al.*, 2005). Par ailleurs, des études cliniques avec des patients obèses ont montré que le rimonabant n'induit pas seulement une perte de poids mais également une diminution des différents paramètres associés au syndrome métabolique tels que la dyslipidémie et l'insulinorésistance (Després *et al.*, 2005, Van Gaal *et al.*, 2005, Pi-Sunyer *et al.*, 2006, Scheen *et al.*, 2006, Hollander *et al.*, 2007). Il semble qu'une part importante des effets métaboliques du rimonabant soit indépendante de la perte de poids (Després *et al.*, 2005, Van Gaal *et al.*, 2005, Scheen *et al.*, 2006). De plus, la réduction de la prise alimentaire induite par le blocage génétique ou pharmacologique des récepteurs CB1 est précoce et transitoire alors que la perte de poids est maintenue et est plus importante que celle attendue suite à la diminution de la prise alimentaire (Colombo *et al.*, 1998, Ravinet Trillou *et al.*, 2003, Bensaid *et al.*, 2003, Poirier *et al.*, 2005, Doyon *et al.*, 2006). Par ailleurs, des études récentes ont mis en évidence que le blocage des récepteurs CB1 par du rimonabant induit une augmentation de la dépense énergétique chez des rats de poids normal (Kunz *et al.*, 2008), chez des souris *ob/ob* (Liu *et al.*, 2005) et chez des rats alimentés avec un régime riche en gras et carbohydrates (Herling *et al.*, 2008a). Les mêmes résultats ont été obtenus avec d'autres antagonistes CB1 tels que l'AVE1625 (Herling *et al.*, 2007) et le taranabant qui induit une augmentation de la dépense énergétique chez des patients obèses (Addy *et al.*, 2008). L'ensemble de ces observations met en évidence que le rimonabant agit au niveau périphérique et pas seulement central.

Les récepteurs CB1 sont exprimés au niveau du foie et participent à la régulation de la lipogenèse (Osei-Hyiaman *et al.*, 2005). L'activation *in vivo* des récepteurs CB1 avec un agoniste chez des souris induit l'augmentation de l'expression de gènes codant pour des facteurs impliqués dans la lipogenèse tels que SREBP-1c, ACC1 et FAS (Osei-Hyiaman *et al.*, 2005). Par ailleurs, la synthèse d'acide gras mesurée *in vivo* chez la souris et *in vitro* dans des hépatocytes isolés est stimulée par un agoniste des récepteurs CB1 et cet effet est annulé par un traitement avec du rimonabant (Osei-Hyiaman *et al.*, 2005). Chez les souris CB1^{-/-}, ces effets ne sont pas retrouvés, illustrant un effet médié par le récepteur CB1. Par ailleurs, les souris sauvages (CB1^{+/+}) alimentées avec un régime riche en gras développent une stéatose hépatique, ce qui n'est pas le cas pour les souris CB1^{-/-} (Osei-Hyiaman *et al.*, 2005). De

même le blocage des récepteurs CB1 par du rimonabant diminue la stéatose hépatique chez des rats Zucker obèses (Gary-Bobo *et al.*, 2007). Récemment Osei-Hyiaman *et al.* (2008), ont montré que le traitement de souris avec un agoniste des récepteurs CB1 (HU210) entraîne une diminution de l'activité de la CPT I et que cet effet est contrecarré par le rimonabant. Le rimonabant, en inhibant la lipogénèse et en activant l'oxydation des acides gras dans le foie, participe à la diminution de l'accumulation de triglycérides hépatiques associée à un régime riche en gras.

Au vu de l'ensemble des résultats concernant l'action du rimonabant au niveau de la dépense énergétique et au niveau de l'accumulation de triglycérides hépatiques, il apparaît que la fonction mitochondriale serait régulée par le rimonabant. Par conséquent, nous avons décidé d'étudier la fonction mitochondriale hépatique chez des rats alimentés avec un régime riche en gras et traités avec du rimonabant. Afin de discriminer les effets de la diminution précoce de la prise alimentaire des effets directs du rimonabant nous avons mis en place un groupe de rats appariés pour la prise alimentaire avec les rats traités.

**Effects of the cannabinoid CB1 antagonist, rimonabant, on hepatic mitochondrial
function in rats fed a high fat diet**

**Mélissa Flamment^{a*}, Naïg Gueguen^{a,b}, Céline Wetterwald^b, Gilles Simard^{a,b,c}, Yves
Malthiery^{a,b,c}, Pierre-Henri Ducluzeau^{a,c,d}**

^aINSERM, U694, Angers, F-49033 France

^bCHU Angers, Département de Biochimie et Génétique, Angers, F-49033 France

^cUniv Angers, Angers, F-49035 France

^dCHU Angers, Département d'Endocrinologie-Diabète-Nutrition, Angers, F-49033 France.

***Corresponding author : Mélissa Flamment**

Address : INSERM U694, CHU Angers, 4 rue Larrey, Angers, F-49033 France

Tel : +33 241 73 59 65

Fax : +33 241 35 40 17

E-mail : mflamment@yahoo.fr

Running head: Rimonabant and hepatic mitochondrial function

Abstract

The aim of this study was to investigate the effect of rimonabant treatment on hepatic mitochondrial function in rats fed a high fat diet. Sprague Dawley rats fed a high fat diet (35% lard) during 13 weeks were treated with rimonabant (10mg/kg/day) during the 3 last weeks and matched with pair-fed controls. Oxygen consumption with various substrates, mitochondrial enzyme activities on isolated liver mitochondria and mitochondrial DNA quantity were determined. Body weight and fat mass were decreased in rats treated with rimonabant compared to pair-fed controls. Moreover, serum adiponectin level was increased with rimonabant. Hepatic triglycerides content was increased while serum triglycerides were decreased. An increase of mitochondrial respiration was observed in rats treated with rimonabant. Especially an increase of mitochondrial respiration with palmitoyl CoA compared to respiration with palmitoyl-l-carnitine stating that the entry of fatty acids into mitochondria via the carnitine palmitoyl transferase I was increased in rats treated with rimonabant. Moreover rimonabant treatment leads to a reduction in the enzymatic activity of the ATP synthase whereas the quantity of mitochondrial DNA and the activity of the citrate synthase were remained unchanged. To summarize, rimonabant treatment leads to an improvement of hepatic mitochondrial function by increasing substrates oxidation and fatty acids entry into mitochondria for the β -oxidation pathway and by increasing proton leak. However this increase of mitochondrial oxidation is regulated by a decrease of ATP synthase activity in order to have only ATP required to the cell function.

Keywords: rimonabant; high fat diet; mitochondria; liver; oxidative phosphorylation

Introduction

The endocannabinoid system appears to be an essential regulator of energy homeostasis and endocrine function (36). This system comprises the cannabinoid receptor (CB1 and CB2), the endogenous ligands (endocannabinoids), and the machinery for their biosynthesis and metabolism (12, 38). Rimonabant (SR-141716), the first selective CB1 antagonist, leads to a decrease of food intake and body weight in various rodent models (40, 41, 49, 50) and recent clinical studies in obese patients have shown that rimonabant has not only reduced body weight but also improved cardiometabolic risk factors such as waist circumference, high-density lipoprotein, triglyceride and glycated hemoglobin (13, 20, 39, 45, 48). An important aspect of rimonabant action is that a large part of its metabolic effects is independent of the body weight reduction (13, 45, 48). Moreover the reduction of food intake induced by CB1 blockade (KO or pharmacologically) is earlier and only transient while reduction of body weight is sustained and higher than that expected from the inhibitory effect on food intake (4, 10, 14, 40, 41). So others pathways than reduction of food intake are implied in the decrease of body weight. Indeed CB1 expression was demonstrated in various peripheral tissues involved in the control of energy homeostasis such as adipose tissue, liver, pancreas and skeletal muscle (4, 7, 11, 25, 32, 33, 36, 42, 46). Peripheral actions of the endocannabinoid system comprise the control of lipogenesis in the adipose tissue (32, 35, 53) and liver (33) as well as the regulation of skeletal muscle oxidative pathways (6).

Moreover, an essential feature of rimonabant action which was recently highlighted by different studies is that CB1 blockade leads to an increase of total energy expenditure in lean rats (28), in ob/ob mice (29) and in rats fed a high fat and high carbohydrate diet (18). The same finding was observed with others CB1 antagonist like AVE1625 which leads to an increase of energy expenditure independent of physical activity and also increased fat

oxidation in non-obese rats (17) or like taranabant which induces an increase of energy expenditure and fat oxidation in obese subjects (1).

Mitochondrial oxidative phosphorylation produces most of the energy in aerobic living system by coupling oxygen consumption with ATP synthesis. In mammals, approximately 90% of oxygen consumption in the standard state is mitochondrial (43). So we can speculate that the increase of energy expenditure with rimonabant treatment may be due to an increase of mitochondrial oxygen consumption especially at the liver level which represents 20% of total body oxygen consumption (43).

The objective of the present study was to determine whether rimonabant effect on energy expenditure involves an increase of liver mitochondrial function. We investigated mitochondrial function at three weeks of rimonabant treatment in order to assess its effect just after the effect on food intake. In order to discriminate the effect of the early reduction of food intake to the inherent effect of rimonabant we used a pair-fed group of rats.

Materials and methods

Animals and treatment

The present investigation was performed in accordance with the guiding principles in care and use of animals. Male Sprague Dawley (n=27) were housed in a temperature-controlled room ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$) with a dark/light cycle of 12:12h. They were provided with water ad libitum and a standard diet (U-A-R A04; SAFE, Epinay-sur-Orge, France) composed of (% total weight) 16% protein, 3% fat, 60% carbohydrate and 21% water, fiber, vitamins and minerals. At 2 months old, all rats were provided with a high fat diet (UPAE, Jouy-en-Josas) composed of (% total weight) 22% protein, 35% fat (lard), 28% carbohydrate and 15% water, fiber, vitamins and minerals, during 13 weeks.

At 10 weeks of high fat diet rats were divided in three groups (n=9 per group) and caged individually for the three last weeks. One group received rimonabant [*N*-piperidino-5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methylpyrazole-3-carboxamide] (Sanofi-Synthelabo, Montpellier, France). Rimonabant (10mg/kg/day) was administered orally in distilled water with 0.1% Tween 80 in a volume of 1 mL, just before the onset of the dark phase. The rimonabant solution was freshly prepared for each day. Due to the fact that rimonabant treatment induces a reduced food intake, pair-fed rats were used to discriminate between the effect of a reduced food intake and the effect of rimonabant itself on the variables measured. Each pair-fed rat received the same quantity of food as consumed by its rimonabant-treated counterpart over the previous day and received 1 mL of vehicle. A check was also made to ensure that the previous ration had been consumed and this was always the case. The third group received only the vehicle, there was the control group. During the treatment period food intake and weight were monitored daily. At the end of the treatment, following an overnight fast, rats were killed by decapitation. Some blood was collected and liver was removed rapidly and some tissue sample was immediately used for respiratory

measurements and the remainder was frozen in liquid N₂ and stored at -80°C for further experiments. Epididymal fat pad was removed and weighted.

Liver mitochondria preparation

Liver mitochondria were isolated by using a modification of the differential centrifugation procedure of Krahenbuhl et al. (27) with all steps carried out at 4°C. Liver was homogenized in an isolation medium containing 100 mM sucrose, 50 mM KCl, 5 mM EGTA and 50 mM Tris-Base, pH 7.4 (10 ml/g tissue) followed by a centrifugation at 600 g for 10 min. The supernatant was filtered through cheesecloth and centrifuged at 7000 g for 10 min. The pellet was resuspended in the isolation medium (10 ml/g tissue) and centrifuged at 3500 g for 10 min. The resulting pellet was resuspended in a minute volume of isolation medium. Protein concentration was determined using the bicinchoninic acid assay kit (Interchim, Montluçon, France) with bovine serum albumin (BSA) as standard.

Mitochondrial respiration

Oxygen was measured with a Clark oxygen electrode in a glass cell 2 ml in volume, thermostatically controlled at 37°C, with constant stirring. Liver isolated mitochondria (0.5 mg protein/ml) were incubated in a respiratory reaction medium, consisting of 120 mM KCl, 5 mM KH₂PO₄, 1 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 3 mM hepes and 0.3% bovine serum albumin (w/v), pH 7.4. Substrate and inhibitor concentrations for the different experiments were 5 mM pyruvate + 2.5 mM malate, or 5 mM succinate + 5 μM rotenone, or 5 μM myxothiazol + 5 mM ascorbate + 0.5 mM TMPD (*N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine), or 40 μM palmitoyl-l-carnitine + 2.5 mM malate, or 40 μM palmitoyl CoA + 1 mM carnitine + 2.5 mM malate. The active state of respiration (state 3) was initiated by the addition of 300 μM ADP. The basal non-phosphorylating respiration rate (state 4) was obtained by addition of 2 μg/ml

oligomycin. Uncoupled state was obtained by the addition of 2.4 μ M FCCP (carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone). Respiratory control ratio (RCR) was calculated by dividing state 3 by state 4 respiration rates.

Mitochondrial enzyme activities

The activities of citrate synthase (CS), complex I, II, III and IV were measured spectrophotometrically at 37°C in isolated mitochondria via an adaptation of the method described by Malgat et al. (30), and in agreement with the Mitochondrial Diseases Group of the Association Française de Myopathie. CS activity was measured by monitoring the change in optical density of 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) at 412 nm. NADH ubiquinone reductase (complex I) was determined by monitoring the oxidation of NADH at 340 nm. Succinate ubiquinone reductase (complex II) was measured by following the reduction of 2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP) at 600 nm. Ubiquinone cytochrome c reductase (complex III) was determined by monitoring the reduction of cytochrome c at 550 nm. Cytochrome c oxidase (complex IV) activity was measured by monitoring the oxidation of reduced cytochrome c at 550 nm.

ATP synthase activity was measured by a coupled assay using lactate dehydrogenase and pyruvate kinase (44). The assay was performed at 340 nm following the decrease in absorbance resulting from NADH reduction. For this assay, isolated mitochondria were sonicated in distilled water.

Mitochondrial DNA quantification

Total DNA was extracted from liver using EZ1 DNA Tissue kit and BioRobot EZ1 DSP (Qiagen). The content of mtDNA was calculated using real time quantitative PCR by measuring the threshold cycle ratio (Δ Ct) of a mitochondrial encoded gene (ND1, forward 5'-

GGA CCT AAG CCC AAT AAC GA-3', reverse 5'-GCT TCA TTG GCT ACA CCT TG-3') versus a nuclear encoded gene (β -Globin, forward 5'-CTT CTG GCT ATG TTT CCC TT-3', reverse 5'-GTT CTC AGG ATC CAC ATG CA-3').

Liver triglyceride content

Liver triglyceride content was determined using the method described by Xu et al. (51). Briefly, 100 mg of liver tissue was homogenized in 1 ml of ethanol followed by a centrifugation at 15,000 g for 10 min. Triglyceride concentrations in the liver homogenate were measured with a Sigma kit.

Serum adiponectin and triglyceride concentrations

Serum adiponectin concentrations were measured using enzyme-linked immunosorbent assay kit (Linco Research, St Charles, MO). Serum triglyceride concentrations were measured using enzymatic assay kit on a Modular[®] automatic analyzer (Roche).

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SEM. The statistical significance of observed variations were assessed using one-way ANOVA and differences between means were subsequently tested by Fisher Post-hoc test. A *P* value < 0.05 was considered significant in all cases. All analyses were performed using Statview 5.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA).

Results

Food intake, weight loss, fat mass, adiponectin concentrations and triglyceride concentrations

Food intake was dramatically decreased with rimonabant from the first day of the treatment (Figure 1a). But thereafter food intake progressively returned at the same level as that of control group at the end of the treatment. Percentage of weight loss was more important in rimonabant-treated rats compared to the control and pair-fed groups during all the treatment (Figure 1b). However, weight of pair-fed rats progressively returned the same level as that of control group at the end of the treatment. Relative fat mass evaluated by the epididymal fat pad mass was decreased significantly with rimonabant treatment compared to control rats ($p=0.0231$ with Fisher post-hoc test) and was decreased but not significantly compared to the pair-fed group ($p=0.0812$ with Fisher post-hoc test) (Figure 2a). Adiponectin concentration was increased with rimonabant treatment but not significantly ($p=0.0419$ versus control and $p=0.0697$ versus pair-fed, with a P value for ANOVA of 0.0832) (Figure 2b). Liver triglyceride content was increased with rimonabant treatment (Figure 3a). Inversely, serum triglyceride concentrations were decreased with rimonabant treatment (Figure 3b).

Mitochondrial oxygen consumption

In order to evaluate mitochondrial function we measured oxygen consumption with different respiratory substrates and at different respiratory states. State 3 represents the phosphorylating state and state 4 represents the non-phosphorylating state in presence of oligomycin. Uncoupled state with FCCP allows to evaluate maximal respiratory chain capacity without the regulation of ATP synthase. With pyruvate/malate as respiratory substrate (complex I), state 3 respiration was significantly increased with rimonabant treatment compared to pair-fed group (Figure 4a). Concerning state 4 and uncoupled state

with pyruvate/malate there was no significant difference between the three groups. Oxygen consumption with succinate/rotenone as respiratory substrate (complex II) was significantly increased at state 3 and uncoupled state in rimonabant-treated rats compared to control and pair-fed groups (Figure 4b). At state 4, there was only an increase of oxygen consumption with rimonabant compared to pair-fed rats. Oxygen consumption with an artificial substrate of the complex IV (ascorbate/TMPD) was increased with rimonabant whatever the respiratory state (Figure 4c). With palmitoyl-l-carnitine as substrate (Figure 5a) there was only an increase of oxygen consumption at state 4 with rimonabant compared with pair-fed group. With palmitoyl CoA as substrate (Figure 5b), state 3 and 4 respirations were significantly increased with rimonabant treatment compared to control and pair-fed groups. Uncoupled state respiration was significantly increased in rimonabant-treated rats compared to pair-fed rats, but the increase compared to control rats is not significant ($p=0.0997$ with Fisher post-hoc test). The ratio of oxygen consumption between palmitoyl CoA and palmitoyl-l-carnitine as respiratory substrates (Figure 5c) allows to evaluate the regulation of the entry of fatty acid into mitochondria via the CPTI. This ratio was increased significantly with rimonabant at state 3 and at FCCP state but not significantly.

RCR values were consistent with those of intact, functional isolated mitochondria (Table 1). RCR with pyruvate/malate as respiratory substrate was increased with rimonabant treatment due to the increase of oxygen consumption at state 3. RCR with other respiratory substrates were unchanged.

Mitochondrial enzyme activities and mtDNA content

Results concerning mitochondrial enzyme activities were presented in Table 2. Citrate synthase, complex I, II, III and IV activities were the same for the three groups. ATP synthase activity was significantly decreased with rimonabant compared to pair-fed and control groups.

To assess mitochondrial content, we measured mtDNA content (Figure 6). mtDNA content remained the same between the three groups.

Discussion

An essential aspect of rimonabant effect is the induction of an early and transient decrease of food intake associated with a sustained reduction of body weight (4, 10, 40, 41). Moreover it seems that a large part of the metabolic effects of rimonabant is independent of the body weight reduction (13, 45, 48). In our study with a rats model of diet induced obesity, we confirm an early and transient reduction of food intake, illustrated a progressive tolerance of the hypophagic effect of rimonabant. Despite this tolerance of hypophagic effect, body weight was decreased compared to the control group as well as to the pair-fed group, illustrating clearly an effect of rimonabant on body weight independently of the food intake decrease. The same result was observed concerning fat mass, which were more decreased in rimonabant treated rats than in pair-fed rats. The majority of studies using pair-fed group in rimonabant treatment showed a food intake's independent effect of rimonabant treatment on body weight and fat mass (16, 18, 19, 29).

Given the fact that energy expenditure is increased with rimonabant treatment (18, 28, 29), an effect on mitochondrial function was highly anticipated. Effectively, oxygen consumption of liver isolated mitochondria was globally increased with rimonabant treated rats compared to pair-fed and control group. The increase of oxygen consumption at state 4 with almost respiratory substrates seems to indicate that proton leak was increased with rimonabant treatment. Indeed, at state 4, oxygen consumption is only due to the maintain of a membrane potential in order to compensate the proton leak. The increase of proton leak leads to more energy being dissipated as heat and so leads to a decrease of oxidative phosphorylation efficiency. Rimonabant treatment by decreasing oxidative phosphorylation efficiency could increase the quantity of energy substrates consumption to have the same quantity of ATP synthesized. The increase of uncoupled state (with FCCP) with rimonabant showed that the maximal oxidative capacity was increased. Oxygen consumption at state 3

was also increased illustrating an increase of the oxidative capacity associated with phosphorylation. Enzymatic activities of the respiratory chain complex were not affected by rimonabant treatment. Therefore, the increase of oxidative capacity observed with rimonabant treatment appears to be functional. Moreover, mitochondrial biogenesis, evaluated by the quantification of mtDNA and the activity of citrate synthase, was not affected by rimonabant treatment. Therefore the increase of hepatic mitochondrial function observed under rimonabant treatment was functional and not due to an increase of mitochondrial mass or number.

Concerning mitochondrial oxygen consumption linked to the β -oxidation, we used palmitoyl-l-carnitine and palmitoyl CoA as respiratory substrates. Respiration supported by palmitoyl CoA reflects the activity of carnitine palmitoyltransferase I and II (CPT I and II), and the mitochondrial β -oxidation pathway, while respiration with palmitoyl-l-carnitine, which bypasses the step catalysed by CPT I, represents an index of fatty acid oxidation per se. Ratio of oxygen consumption with palmitoyl CoA and with palmitoyl-l-carnitine as substrates was increased in rats treated with rimonabant. This result shows that the entry of fatty acid into mitochondria via the CPTI is improved with rimonabant. In a study of Osei-Hyiaman et al. (34), rimonabant induced an increase of the expression of CPTI protein and an increase of CPTI activity. In another condition, ethanol-mediated fatty liver, CB1 blockade induced also an increase of the expression and activity of CPTI (24). Moreover, rimonabant reverses the increase of expression of acetyl CoA carboxylase (ACC) in the case of high fat diet (33). ACC being responsible of the formation of malonyl CoA which is known to inhibit CPTI activity, we can expect that the decrease of ACC expression under CB1 blockade may contribute in the increase of CPTI activity. Therefore the increase of fatty acids entry into mitochondria via CPTI may participate at a large part in the increase of fatty oxidation observed under rimonabant treatment.

ATP synthase enzymatic activity was decreased with rimonabant treatment. Given the fact that substrates oxidation was increased, the decrease of maximal ATP synthase activity could represent an adaptative mechanism in the case of a too high oxidation in order to adjust the ATP production to the cell needs. Therefore the ATP/ADP ratio could be maintained. Indeed an increase of the ATP/ADP ratio is well know to slow down oxidative phosphorylation, in part via ANT inhibition (22), due to the competition between ATP and ADP for ANT binding and subsequent translocation across to the mitochondrial membrane (2, 5).

To summarize, in our study, rimonabant treatment leads to an improvement of hepatic mitochondrial function by increasing substrates oxidation and fatty acids entry into mitochondria for the β -oxidation pathway and by increasing proton leak. However this increase of mitochondrial oxidation seems to be regulated by a decrease of ATP synthase activity in order to have only ATP required to the cell function. The fact that the effect on mitochondrial function was observed only in rimonabant treated rats and not in pair-fed rats seems to indicate that rimonabant effect at mitochondrial level is independent of the early decrease of food intake. In adipose tissue, others studies have showed that rimonabant could act at mitochondrial level. In white adipose tissue of mice with HFD, a treatment with rimonabant induces genes expression of carnitine acetyltransferase, carnitine palmitoyltransferase II and enoyl CoA hydratase indicating an increase of the β -oxidation pathway (23). Moreover, in the same study, rimonabant treatment leads to an induction of the expression of cytochrome *c* oxidase subunit VIa (complex IV) and adenine nucleotide translocator (ANT) illustrating an increase of oxidative phosphorylation in white adipose tissue of mice fed with HFD. In brown adipose tissue of the same mice, rimonabant induces the gene expression of respiratory chain complex, including NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I), ubiquinol cytochrome *c* reductase (complex III), F1F0-ATP

synthase and induces chaperonin 10 expression which modulates mitochondrial biogenesis. A recent study showed that rimonabant treatment increases mitochondrial biogenesis in white adipose tissue by inducing the expression of the endothelial NO synthase (47).

Consecutively at this increase of mitochondrial function, a decrease of hepatic triglycerides content was expected. Surprisingly hepatic triglyceride content was increased in our study. Like discuss previously by Herling et al. (19), the reduction of fat mass by an increase of lipolysis leads to an increase of fatty acids drainage through the portal vein into the liver. At 3 weeks of rimonabant treatment the reduction of fat mass was probably not achieved and the increase of lipolysis was responsive of the increase of hepatic triglycerides content. It can be attempted that a more prolonged treatment would lead to a decrease of hepatic triglycerides content. Moreover, as the serum triglycerides level was decreased, the increase of hepatic triglycerides content could be due to a decrease of very low-density lipoprotein secretion from the liver by rimonabant treatment (8). Moreover, hepatic lipid accumulation could be associated with insulin resistance and at 3 weeks of treatment there was no yet a decrease of serum insulin and glucose level (data not shown).

Mechanisms responsible for rimonabant effects on mitochondrial function remain to be determined. We can not know if this effect is mediated by central or peripheral action. Indeed, hypothalamus, in which role of endocannabinoid system is well described (31) is a central actor implied in the energy homeostasis at the peripheral level through neuronal and hormonal pathways (3). However we can not exclude a direct effect of rimonabant at peripheral level. Indeed, CB1 receptor are expressed at hepatic level and in the case of high fat diet, rimonabant reverse the increase of expression of lipogenic factor like sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP-1c) and its targets fatty acid synthase (FAS) and ACC (33). These lipogenic factors are negatively regulated by cAMP (15, 37) and CB1 receptor is negatively coupled to adenylate cyclase (21), suggesting a possible direct action of

rimonabant via hepatic CB1 receptor. It is highly expected that rimonabant effect on mitochondrial function was mediated by coordinate regulation between central and peripheral mechanisms. At the peripheral level, a hypothesis could be made on the role of adiponectin. Indeed, rimonabant treatment leads to an increase of adiponectin expression in adipose tissue of obese Zucker rats and also in cultured adipose cells (4) and in our study serum adiponectin level was increased with rimonabant. In muscle, adiponectin regulates mitochondrial bioenergetics by increasing mitochondrial biogenesis as well as fatty acid oxidation (9). In hepatocytes, adiponectin, via AMP-activated protein kinase (AMPK), increases the entry of fatty acid into mitochondria and so increases their oxidation (52). AMPK activation leads to the inhibition of lipogenesis and activation of fatty acid oxidation by phosphorylating and thus inhibiting ACC. Interestingly, cannabinoids were found to inhibit AMPK in the liver and adipose tissue via the activation of CB1 (26). Therefore we can speculate that rimonabant effect on hepatic mitochondrial function is mediated at least in part by adiponectin via AMPK.

In conclusion, rimonabant has a beneficial effect on mitochondrial function by facilitating energy substrates oxidation including an increase of the entry of fatty acids into the mitochondria via CPTI. This event could contribute at least in part to the increase of energy expenditure observed with rimonabant treatment. Moreover, this increase of energy substrates oxidation, especially fatty acids, could be involved at longer term in the decrease of liver fat accumulation (33) and therefore participate in the increase of insulin sensitivity seen under rimonabant treatment. It remains to determine the relative contribution of central and peripheral actions of rimonabant on hepatic mitochondrial function and at the peripheral level whether rimonabant has a direct action via hepatic CB1 and/or indirect via the increase of adiponectin level.

Acknowledgements

Mélissa Flamment was supported by a grant from "Conseil Régional Pays de la Loire / Inserm". The authors thank Sanofi-Synthelabo (Montpellier, France) for providing rimonabant. The authors thank Jerome Roux, Pierre Legras, Dominique Gilbert and Laurent Buffet for animal care.

References

1. **Addy C, Wright H, Van Laere K, Gantz I, Erondy N, Musser BJ, Lu K, Yuan J, Sanabria-Bohórquez SM, Stoch A, Stevens C, Fong TM, De Lepeleire I, Cilissen C, Cote J, Rosko K, Gendrano IN 3rd, Nguyen AM, Gumbiner B, Rothenberg P, de Hoon J, Bormans G, Depré M, Eng WS, Ravussin E, Klein S, Blundell J, Herman GA, Burns HD, Hargreaves RJ, Wagner J, Gottesdiener K, Amatruda JM, Heymsfield SB.** The acyclic CB1R inverse agonist taranabant mediates weight loss by increasing energy expenditure and decreasing caloric intake. *Cell Metab* 7: 68-78, 2008.
2. **Balaban RS.** Regulation of oxidative phosphorylation in the mammalian cell. *Am J Physiol* 258: C377-C389, 1990.
3. **Barsh GS, Schwartz MW.** Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration. *Nat Rev Genet* 3: 589-600, 2002.
4. **Bensaid M, Gary-Bobo M, Esclançon A, Maffrand JP, Le Fur G, Oury-Donat F, Soubrié P.** The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 increases Acp30 mRNA expression in adipose tissue of obese fa/fa rats and in cultured adipocyte cells. *Mol Pharmacol* 63: 908-914, 2003.
5. **Bohnensack R.** Control of energy transformation of mitochondria. Analysis by a quantitative model. *Biochim Biophys Acta* 634: 203-218, 1981.
6. **Cavuto P, McAinch AJ, Hatzinikolas G, Cameron-Smith D, Wittert GA.** Effects of cannabinoid receptors on skeletal muscle oxidative pathways. *Mol Cell Endocrinol* 267: 63-69, 2007.
7. **Cavuto P, McAinch AJ, Hatzinikolas G, Janovská A, Game P, Wittert GA.** The expression of receptors for endocannabinoids in human and rodent skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 364: 105-110, 2007.

8. **Chan DC, Watts GF.** Pharmacological regulation of dyslipoproteinaemia in insulin resistant states. *Curr Vasc Pharmacol* 6: 67-77, 2008.
9. **Civitarese AE, Ukropcova B, Carling S, Hulver M, DeFronzo RA, Mandarino L, Ravussin E, Smith SR.** Role of adiponectin in human skeletal muscle bioenergetics. *Cell Metab* 4: 75-87, 2006.
10. **Colombo G, Agabio R, Diaz G, Lobina C, Reali R, Gessa GL.** Appetite suppression and weight loss after the cannabinoid antagonist SR 141716. *Life Sci* 63: PL113-PL117, 1998.
11. **Cota D, Marsicano G, Tschöp M, Grübler Y, Flachskamm C, Schubert M, Auer D, Yassouridis A, Thöne-Reineke C, Ortmann S, Tomassoni F, Cervino C, Nisoli E, Linthorst AC, Pasquali R, Lutz B, Stalla GK, Pagotto U.** The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest* 112: 423-431, 2003.
12. **De Petrocellis L, Cascio MG, Di Marzo V.** The endocannabinoid system: a general view and latest additions. *Br J Pharmacol* 141: 765-774, 2004.
13. **Després JP, Golay A, Sjöström L.** Effects of rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia. *N Engl J Med* 353: 2121-2134, 2005.
14. **Doyon C, Denis RG, Baraboi ED, Samson P, Lalonde J, Deshaies Y, Richard D.** Effects of rimonabant (SR141716) on fasting-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis and neuronal activation in lean and obese Zucker rats. *Diabetes* 55: 3403-3410, 2006.
15. **Foretz M, Pacot C, Dugail I, Lemarchand P, Guichard C, Le Lièvre X, Berthelie-Lubrano C, Spiegelman B, Kim JB, Ferré P, Foufelle F.** ADD1/SREBP-1c is required in the activation of hepatic lipogenic gene expression by glucose. *Mol Cell Biol* 19: 3760-3768, 1999.

16. **Gary-Bobo M, Elachouri G, Gallas JF, Janiak P, Marini P, Ravinet-Trillou C, Chabbert M, Cruccioli N, Pfersdorff C, Roque C, Arnone M, Croci T, Soubrié P, Oury-Donat F, Maffrand JP, Scatton B, Lacheretz F, Le Fur G, Herbert JM, Bensaid M.** Rimonabant reduces obesity-associated hepatic steatosis and features of metabolic syndrome in obese Zucker fa/fa rats. *Hepatology* 46: 122-129, 2007.
17. **Herling AW, Gossel M, Haschke G, Stengelin S, Kuhlmann J, Müller G, Schmoll D, Kramer W.** CB1 receptor antagonist AVE1625 affects primarily metabolic parameters independently of reduced food intake in Wistar rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: E826-E832, 2007.
18. **Herling AW, Kilp S, Elvert R, Haschke G, Kramer W.** Increased energy expenditure contributes more to the body weight-reducing effect of rimonabant than reduced food intake in candy-fed wistar rats. *Endocrinology* 149: 2557-2566, 2008.
19. **Herling AW, Kilp S, Juretschke HP, Neumann-Haefelin C, Gerl M, Kramer W.** Reversal of visceral adiposity in candy-diet fed female Wistar rats by the CB1 receptor antagonist rimonabant. *Int J Obes (Lond)* 32: 1363-1372, 2008.
20. **Hollander P.** Endocannabinoid blockade for improving glycemic control and lipids in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Med* 120: S18-S28, 2007.
21. **Howlett AC.** Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Biochemistry of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol Pharmacol* 27: 429-436, 1985.
22. **Jacobus WE, Moreadith RW, Vandegaer KM.** Mitochondrial respiratory control. Evidence against the regulation of respiration by extramitochondrial phosphorylation potentials or by [ATP]/[ADP] ratios. *J Biol Chem* 257: 2397-2402, 1982.
23. **Jbilo O, Ravinet-Trillou C, Arnone M, Buisson I, Bribes E, Péleraux A, Pénarier G, Soubrié P, Le Fur G, Galiègue S, Casellas P.** The CB1 receptor antagonist

rimonabant reverses the diet-induced obesity phenotype through the regulation of lipolysis and energy balance. *FASEB J* 19: 1567-1569, 2005.

24. **Jeong WI, Osei-Hyiaman D, Park O, Liu J, Bátkai S, Mukhopadhyay P, Horiguchi N, Harvey-White J, Marsicano G, Lutz B, Gao B, Kunos G.** Paracrine activation of hepatic CB1 receptors by stellate cell-derived endocannabinoids mediates alcoholic fatty liver. *Cell Metab* 7: 227-235, 2008.

25. **Juan-Picó P, Fuentes E, Bermúdez-Silva FJ, Javier Díaz-Molina F, Ripoll C, Rodríguez de Fonseca F, Nadal A.** Cannabinoid receptors regulate Ca²⁺ signals and insulin secretion in pancreatic beta-cell. *Cell Calcium* 39: 155-162, 2006.

26. **Kola B, Hubina E, Tucci SA, Kirkham TC, Garcia EA, Mitchell SE, Williams LM, Hawley SA, Hardie DG, Grossman AB, Korbónits M.** Cannabinoids and ghrelin have both central and peripheral metabolic and cardiac effects via AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 280: 25196-25201, 2005.

27. **Krähenbühl S, Talos C, Fischer S, Reichen J.** Toxicity of bile acids on the electron transport chain of isolated rat liver mitochondria. *Hepatology* 19: 471-479, 1994.

28. **Kunz I, Meier MK, Bourson A, Fisseha M, Schilling W.** Effects of rimonabant, a cannabinoid CB1 receptor ligand, on energy expenditure in lean rats. *Int J Obes (Lond)* 32: 863-870, 2008.

29. **Liu YL, Connoley IP, Wilson CA, Stock MJ.** Effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 on oxygen consumption and soleus muscle glucose uptake in Lep(ob)/Lep(ob) mice. *Int J Obes (Lond)* 29: 183-187, 2005.

30. **Malgat M, Durrieu G, Mazat JP.** Enzymatic and polarographic measurements of the respiratory chain complexes. In: *Mitochondrial Diseases*, edited by Lestienne P. Springer Verlag: Paris, 1999, pp 357-377.

31. **Matias I, Di Marzo V.** Endocannabinoids and the control of energy balance. *Trends Endocrinol Metab* 18: 27-37, 2007.
32. **Matias I, Gonthier MP, Orlando P, Martiadis V, De Petrocellis L, Cervino C, Petrosino S, Hoareau L, Festy F, Pasquali R, Roche R, Maj M, Pagotto U, Monteleone P, Di Marzo V.** Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 3171-3180, 2006.
33. **Osei-Hyiaman D, DePetrillo M, Pacher P, Liu J, Radaeva S, Bátkai S, Harvey-White J, Mackie K, Offertáler L, Wang L, Kunos G.** Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest* 115: 1298-1305, 2005.
34. **Osei-Hyiaman D, Liu J, Zhou L, Godlewski G, Harvey-White J, Jeong WI, Bátkai S, Marsicano G, Lutz B, Buettner C, Kunos G.** Hepatic CB1 receptor is required for development of diet-induced steatosis, dyslipidemia, and insulin and leptin resistance in mice. *J Clin Invest* 118: 3160-3169, 2008.
35. **Pagano C, Pilon C, Calcagno A, Urbanet R, Rossato M, Milan G, Bianchi K, Rizzuto R, Bernante P, Federspil G, Vettor R.** The endogenous cannabinoid system stimulates glucose uptake in human fat cells via phosphatidylinositol 3-kinase and calcium-dependent mechanisms. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 4810-4819, 2007.
36. **Pagotto U, Marsicano G, Cota D, Lutz B, Pasquali R.** The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr Rev* 27: 73-100, 2006.
37. **Paulauskis JD, Sul HS.** Hormonal regulation of mouse fatty acid synthase gene transcription in liver. *J Biol Chem* 264: 574-577, 1989.

38. **Piomelli D.** The molecular logic of endocannabinoid signaling. *Nat Rev Neurosci* 4: 873-884, 2003.
39. **Pi-Sunyer FX, Aronne LJ, Heshmati HM, Devin J, Rosenstock J.** Effect of rimonabant, a cannabinoid-1 receptor blocker, on weight and cardiometabolic risk factors in overweight or obese patients: RIO-North America: a randomized controlled trial. *JAMA* 295: 761-775, 2006.
40. **Poirier B, Bidouard JP, Cadrouvele C, Marniquet X, Staels B, O'Connor SE, Janiak P, Herbert JM.** The anti-obesity effect of rimonabant is associated with an improved serum lipid profile. *Diabetes Obes Metab* 7: 65-72, 2005.
41. **Ravinet Trillou C, Arnone M, Delgorge C, Gonalons N, Keane P, Maffrand JP, Soubrie P.** Anti-obesity effect of SR141716, a CB1 receptor antagonist, in diet-induced obese mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284: R345-R353, 2003.
42. **Roche R, Hoareau L, Bes-Houtmann S, Gonthier MP, Laborde C, Baron JF, Haffaf Y, Cesari M, Festy F.** Presence of the cannabinoid receptors, CB1 and CB2, in human omental and subcutaneous adipocytes. *Histochem Cell Biol* 126: 177-187, 2006.
43. **Rolfe DF, Brown GC.** Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev* 77: 731-758, 1997.
44. **Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gérard B, Rötig A, Saudubray JM, Munnich A.** Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta* 228: 35-51, 1994.
45. **Scheen AJ, Finer N, Hollander P, Jensen MD, Van Gaal LF.** Efficacy and tolerability of rimonabant in overweight or obese patients with type 2 diabetes: a randomised controlled study. *Lancet* 368: 1660-7162, 2006.

46. **Spoto B, Fezza F, Parlongo G, Battista N, Sgro' E, Gasperi V, Zoccali C, Maccarrone M.** Human adipose tissue binds and metabolizes the endocannabinoids anandamide and 2-arachidonoylglycerol. *Biochimie* 88: 1889-1897, 2006.
47. **Tedesco L, Valerio A, Cervino C, Cardile A, Pagano C, Vettor R, Pasquali R, Carruba MO, Marsicano G, Lutz B, Pagotto U, Nisoli E.** Cannabinoid type 1 receptor blockade promotes mitochondrial biogenesis through endothelial nitric oxide synthase expression in white adipocytes. *Diabetes* 57: 2028-2036, 2008.
48. **Van Gaal LF, Rissanen AM, Scheen AJ, Ziegler O, Rössner S.** Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. *Lancet* 365: 1389-1397, 2005.
49. **Verty AN, McGregor IS, Mallet PE.** Consumption of high carbohydrate, high fat, and normal chow is equally suppressed by a cannabinoid receptor antagonist in non-deprived rats. *Neurosci Lett* 354: 217-220, 2004.
50. **Vickers SP, Webster LJ, Wyatt A, Dourish CT, Kennett GA.** Preferential effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist, SR 141716, on food intake and body weight gain of obese (fa/fa) compared to lean Zucker rats. *Psychopharmacology (Berl)* 167: 103-111, 2003.
51. **Xu H, Wilcox D, Nguyen P, Voorbach M, Suhar T, Morgan SJ, An WF, Ge L, Green J, Wu Z, Gimeno RE, Reilly R, Jacobson PB, Collins CA, Landschulz K, Surowy T.** Hepatic knockdown of mitochondrial GPAT1 in ob/ob mice improves metabolic profile. *Biochem Biophys Res Commun* 349: 439-448, 2006.
52. **Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T.** Adiponectin stimulates glucose utilization and

fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 8: 1288-1295, 2002.

53. **Yan ZC, Liu DY, Zhang LL, Shen CY, Ma QL, Cao TB, Wang LJ, Nie H, Zidek W, Tepel M, Zhu ZM.** Exercise reduces adipose tissue via cannabinoid receptor type 1 which is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor-delta. *Biochem Biophys Res Commun* 354: 427-433, 2007.

TABLE 1

Respiratory control ratios

	Control	Pair-fed	Rimonabant	P
Pyruvate/malate	1.83 ± 0.12	1.96 ± 0.17	2.51 ± 0.28*	0.056
Succinate/rotenone	10.04 ± 1.46	12.63 ± 2.61	8.88 ± 0.83	NS
Ascorbate/TMPD	1.88 ± 0.11	1.77 ± 0.04	1.82 ± 0.05	NS
Palmitoyl-l-carnitine	4.43 ± 0.27	3.88 ± 0.34	3.88 ± 0.31	NS
Palmitoyl CoA	3.19 ± 0.33	2.80 ± 0.27	3.65 ± 0.45	NS

Values are mean ± SEM. P values are from one-way ANOVA.

* P<0.05 versus control et P=0.065 versus pair-fed

TABLE 2

Mitochondrial enzyme activities

	Control	Pair-fed	Rimonabant	P
Citrate synthase	325.65 ± 12.52	324.59 ± 14.94	342.24 ± 13.64	NS
Complex I	0.50 ± 0.05	0.50 ± 0.04	0.48 ± 0.03	NS
Complex II	1.51 ± 0.07	1.62 ± 0.09	1.56 ± 0.06	NS
Complex III	6.48 ± 0.26	6.87 ± 0.38	5.69 ± 0.39	NS
Complex IV	13.26 ± 0.54	13.78 ± 0.44	12.85 ± 0.45	NS
ATP synthase	1.99 ± 0.09	2.12 ± 0.10	1.64 ± 0.10*	<0.05

Values are mean ± SEM. Citrate synthase activities are expressed in nmol/min per mg protein.

Other results are the ratio of enzyme activity and citrate synthase activity.

P values are from one-way ANOVA.

*P<0.05 versus control and pair-fed

Titles and legends to figures

Figure 1 : Food intake (a) and percentage of weigh loss (b). Results are expressed as mean \pm SEM. *P<0.05 compared with control group and § P<0.05 compared with control and pair-fed groups. a P=0.0608, 0.0642, 0.0885 for day 19, 20, 21 respectively compared with control group. b P=0.0514, 0.06 for day 6, 7 respectively compared with pair-fed group and P<0.05 compared with control group.

Figure 2 : Relative fat mass (a) and serum adiponectin level (b) of control (white), pair-fed (grey) and rimonabant-treated (black) rats. Results are expressed as mean \pm SEM. Concerning fat mass, P value from one-way ANOVA is 0.0613. Concerning serum adiponectin level, P value from one-way ANOVA is 0.0832. *P<0.05 compared with control group. § P=0.0812 for fat mass and P=0,0697 for adiponectin compared with pair-fed group.

Figure 3 : Triglycerides concentration in liver (a) and in serum (b) of control (white), pair-fed (grey) and rimonabant-treated (black) rats. Results are expressed as mean \pm SEM. *P<0.05 compared with other groups.

Figure 4 : Oxygen consumption with malate/pyruvate (a), succinate/rotenone (b) and ascorbate/TMPD (c) as respiratory substrates in isolated liver mitochondria from control (white), pair-fed (grey) and rimonabant-treated (black) rats. Results are expressed as mean \pm SEM. *P<0.05 compared with other groups and § P<0.05 compared with pair-fed group.

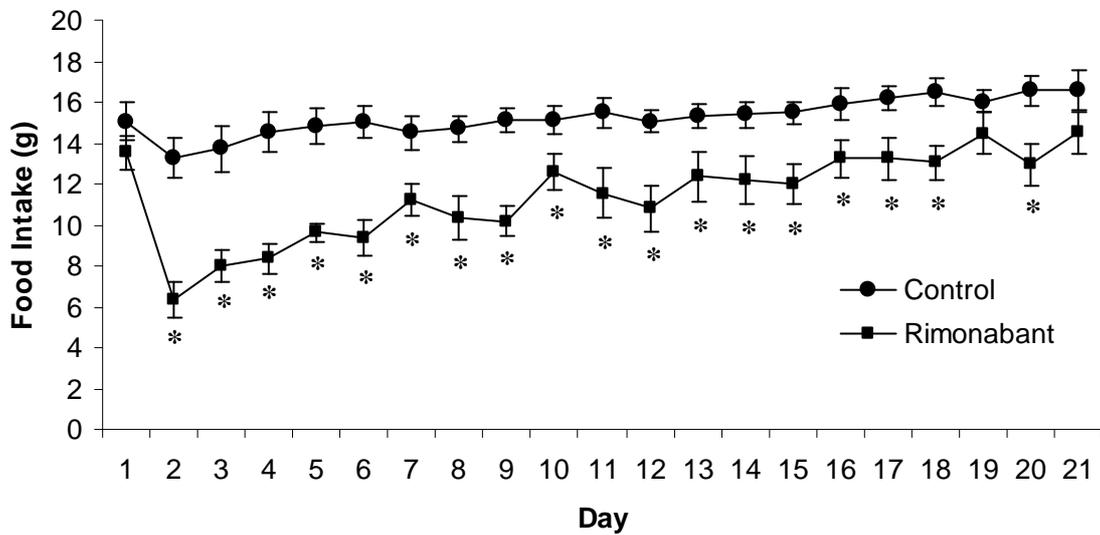
Figure 5 : Oxygen consumption with palmitoyl-l-carnitine (a) palmitoyl CoA (b) and ratio palmitoyl CoA/palmitoyl-l-carnitine as respiratory substrates in isolated liver mitochondria

from control (white), pair-fed (grey) and rimonabant-treated (black) rats. Results are expressed as mean \pm SEM. *P<0.05 compared with other groups and [§]P<0.05 compared with pair-fed group. ^aP=0.0172 compared with pair-fed group with a P value from one-way ANOVA of 0.0536. ^bP=0.0206 compared with control group and P=0.0877 compared with pair-fed group with a P value from one-way ANOVA of 0.0543.

Figure 6 : mtDNA quantity calculated as the ratio of ND1 to β -globin DNA levels determined by real-time PCR in liver of control (white), pair-fed (grey) and rimonabant-treated (black) rats. Results are expressed as mean \pm SEM.

Figure 1

a



b

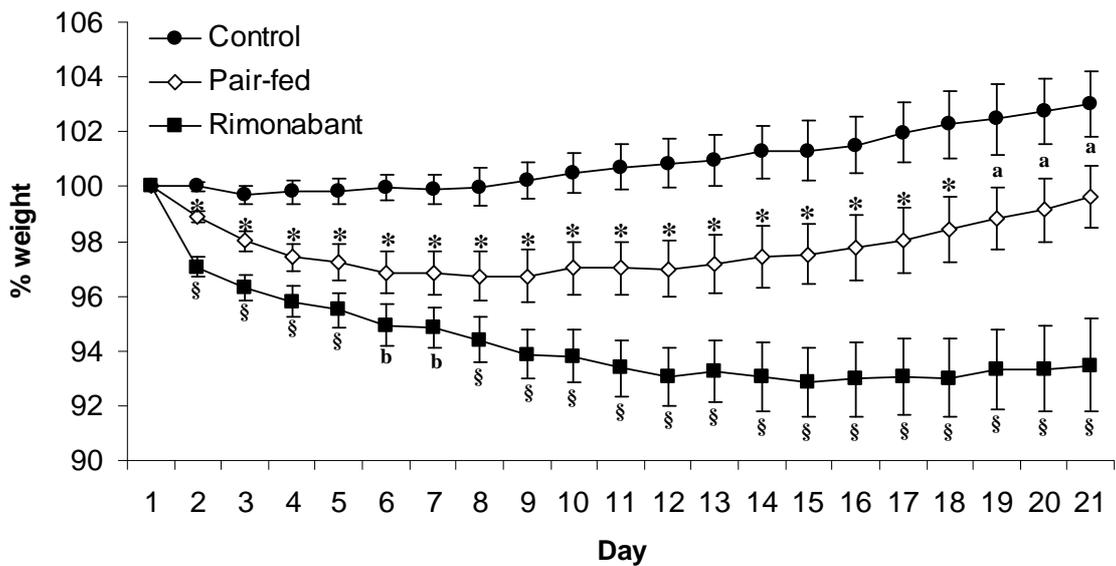
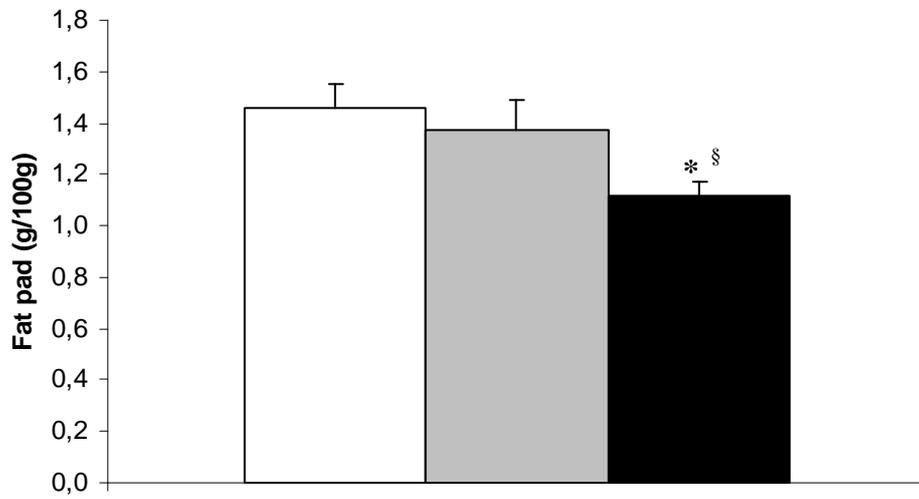


Figure 2

a



b

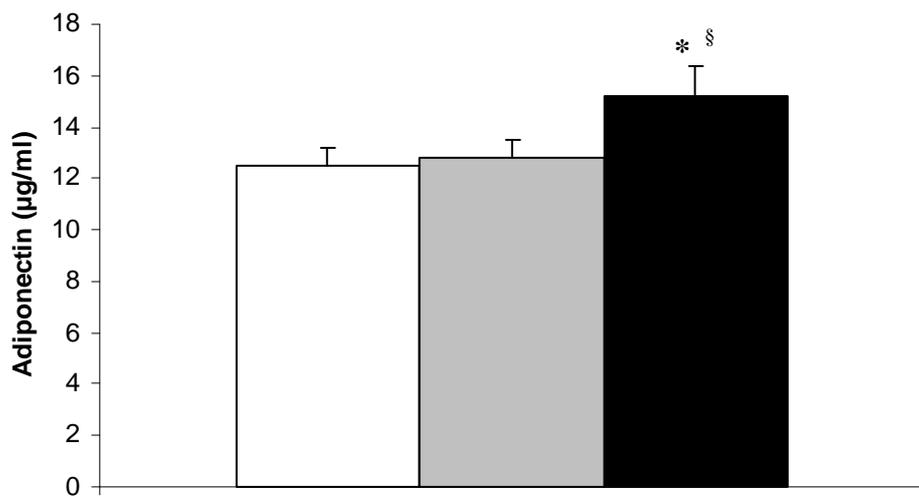
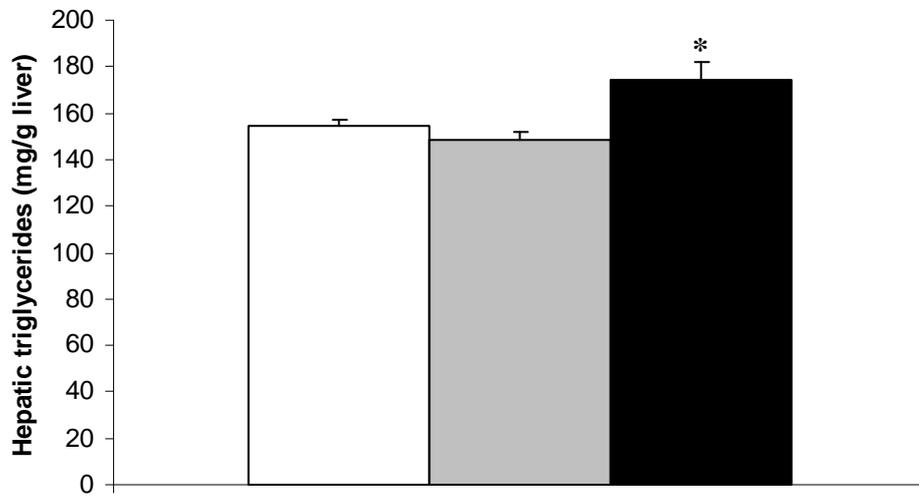


Figure 3

a



b

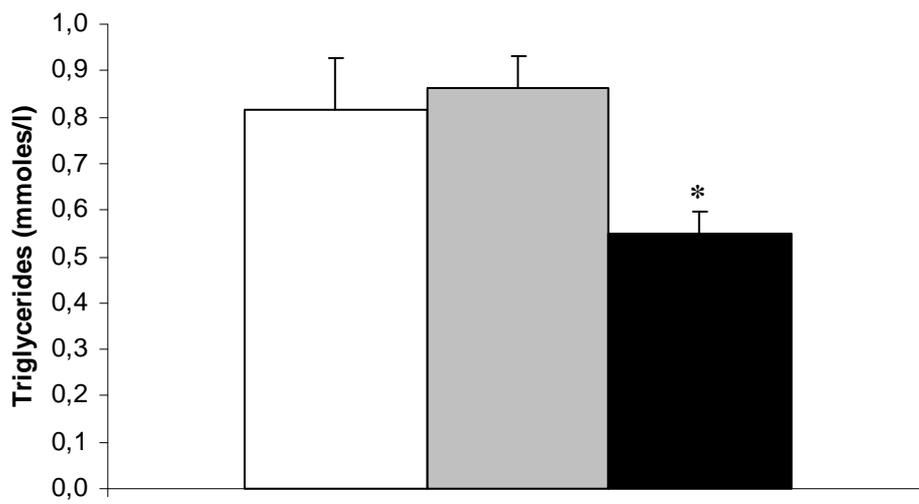


Figure 4

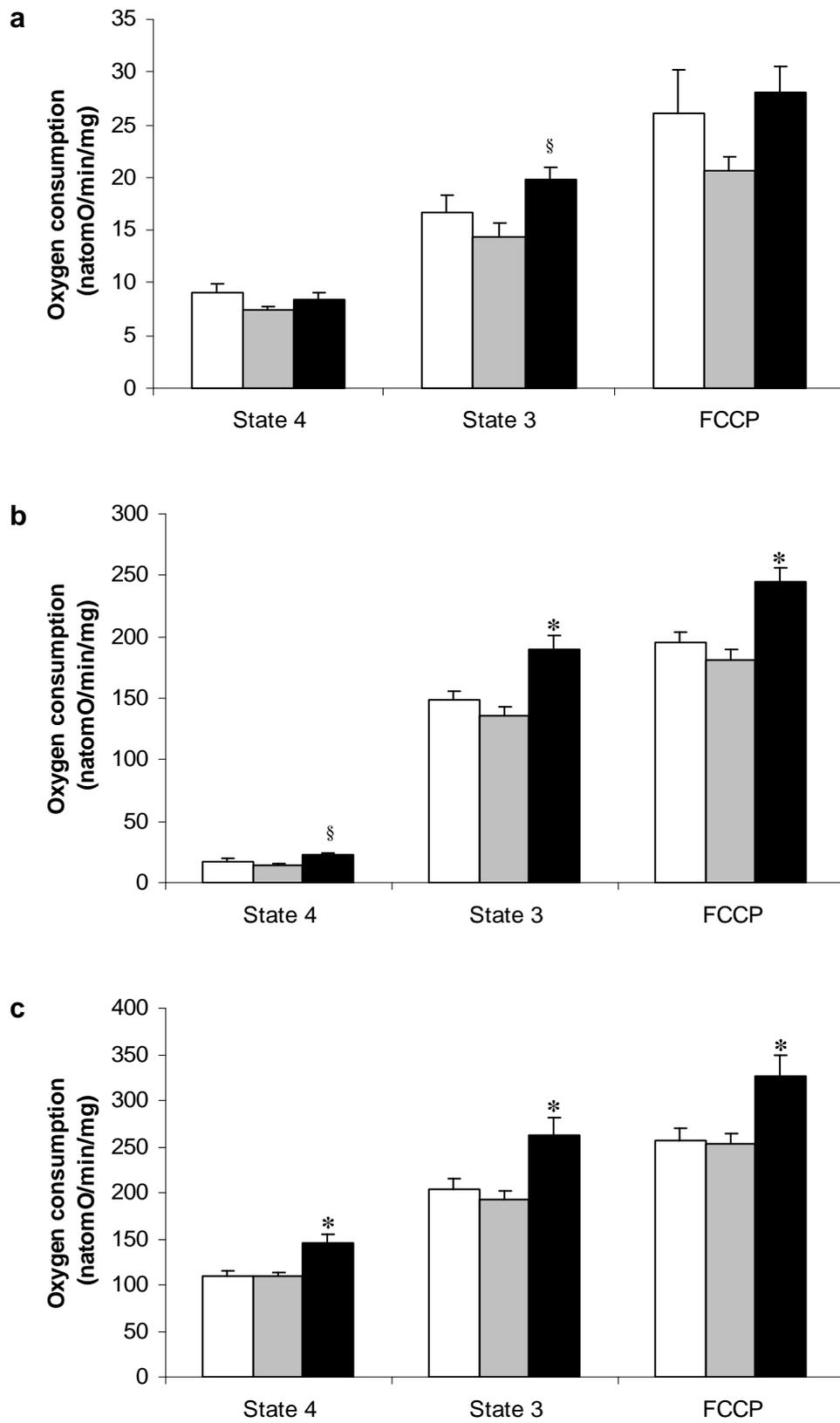


Figure 5

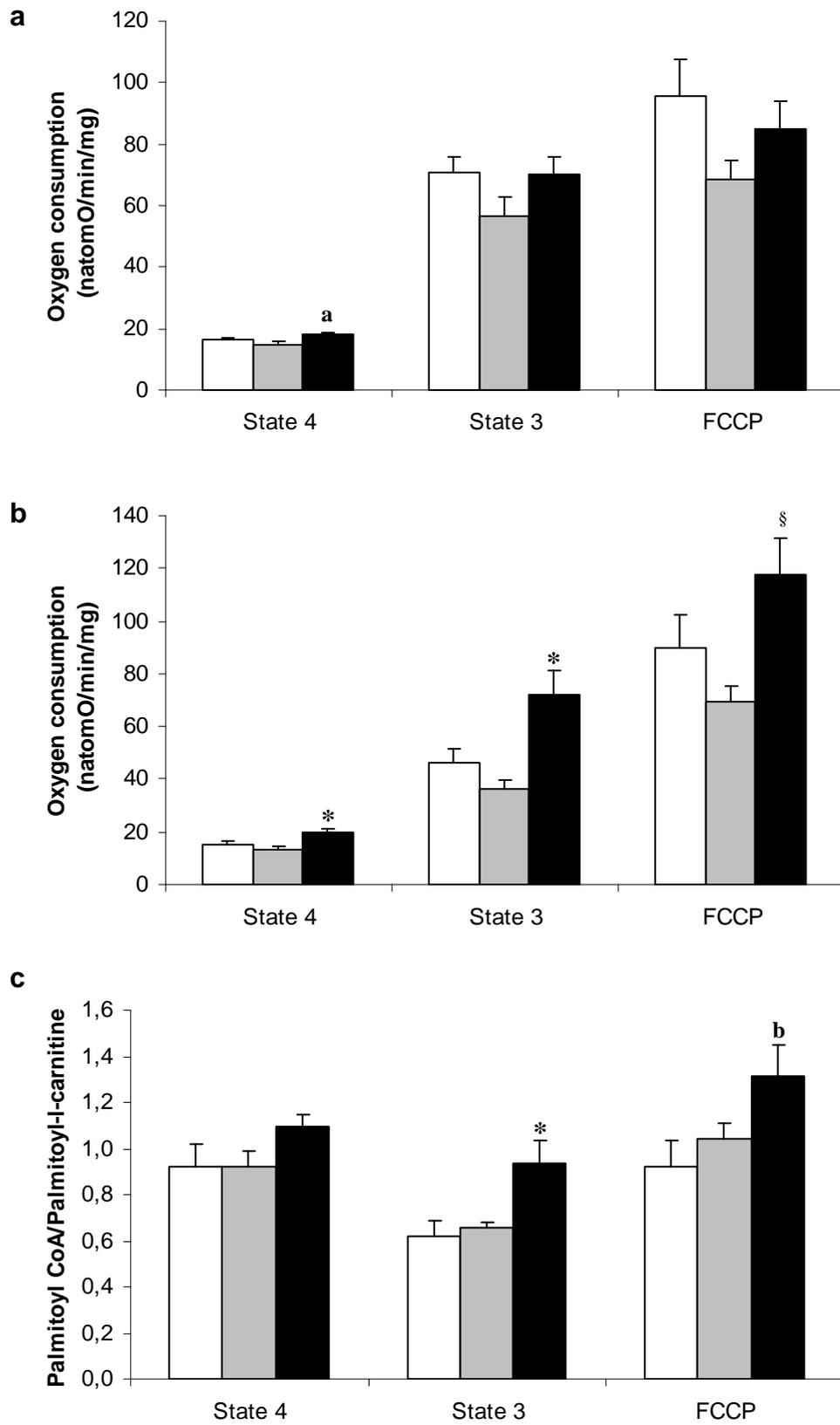
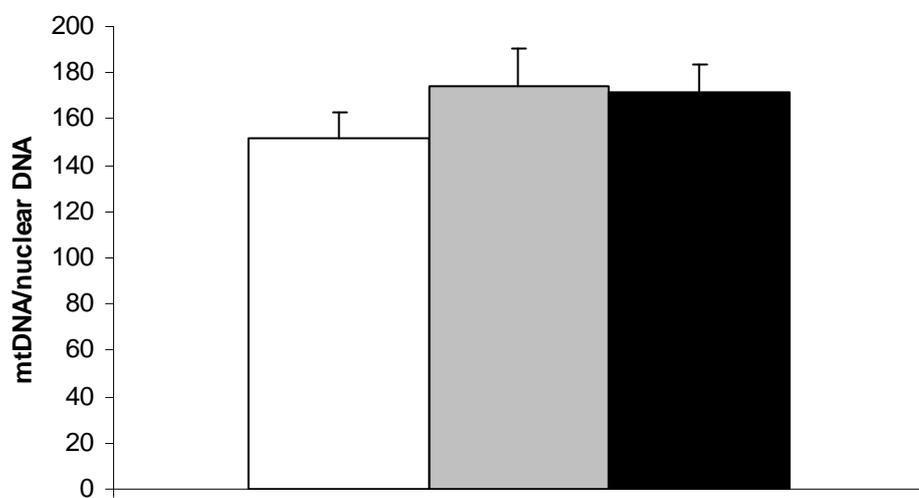


Figure 6



Discussion de l'article 3 :

Dans cette étude, nous avons mis en évidence que le blocage des récepteurs CB1 par du rimonabant induit une augmentation de la consommation d'oxygène mitochondriale avec différents substrats respiratoires. Nous n'observons pas de variation de la quantité d'ADNmt ni des activités enzymatiques des complexes de la chaîne respiratoire (I, II, III et IV), suggérant ainsi que les variations de la fonction mitochondriale sont fonctionnelles. La diminution d'activité de l'ATP synthase observée chez les rats traités avec du rimonabant semble être un mécanisme de prévention afin d'ajuster la production d'ATP aux besoins cellulaires. En effet, l'augmentation de l'oxydation des substrats énergétiques pourrait en retour causer une inhibition de la phosphorylation oxydative *via* l'augmentation du rapport ATP/ADP qui conduirait à une inhibition de l'ANT (Bohnsack, 1981, Jacobus *et al.*, 1982, Balaban, 1990). Par conséquent, la diminution de l'activité de l'ATP synthase permettrait de maintenir un rapport ATP/ADP en faveur de l'oxydation des substrats énergétiques. L'origine de cette diminution de l'activité de l'ATP synthase reste à déterminer. Comme de nombreuses protéines mitochondriales, l'ATP synthase peut être régulée par phosphorylation (Pagliarini et Dixon, 2006). Ainsi la diminution d'activité de l'ATP synthase pourrait être la conséquence d'une régulation de son état de phosphorylation suite à l'inhibition de la voie de signalisation CB1 par le rimonabant.

Par ailleurs, l'augmentation des consommations d'oxygène à l'état 4 pourrait illustrer une augmentation de la fuite de protons. Dans ce cas, cela concernerait une fuite de protons basale étant donné que les mesures de consommation d'oxygène sont réalisées en présence de BSA. L'augmentation de la fuite de protons pourrait être un mécanisme permettant la consommation d'une plus grande quantité de substrats sans modifier la synthèse d'ATP. Mais cette augmentation des consommations d'oxygène à l'état 4 pourrait tout simplement être le reflet d'une plus grande disponibilité des substrats et donc de leur oxydation même dans des conditions basales.

Dans cette étude, nous avons mis en évidence que la β -oxydation mitochondriale hépatique est augmentée par le rimonabant *via* l'augmentation de l'entrée des acides gras dans la mitochondrie. Une étude récente a mis en évidence que la quantité et l'activité de la CPT I sont augmentées par le rimonabant (Osei-Hyiaman *et al.*, 2008). De même, dans le cas d'une stéatose induite par l'alcool, le rimonabant induit une augmentation de l'expression et de l'activité de la CPT I (Jeong *et al.*, 2008).

Etant donné que le rimonabant induit une augmentation de l'oxydation des acides gras hépatiques, une diminution du contenu en triglycérides hépatiques est attendue. Cependant, ce n'est pas le cas dans notre étude où le contenu en triglycérides est même augmenté avec le rimonabant. Néanmoins, nous pouvons supposer qu'à trois semaines de traitement, nous sommes en pleine situation de lipolyse adipocytaire, illustrée par la diminution de masse grasse, entraînant ainsi une augmentation de la concentration en acides gras libres notamment dans la veine porte et un stockage "provisoire" de ces acides gras sous forme de triglycérides hépatiques. Par ailleurs, étant donné que la concentration sérique en triglycérides est quant à elle diminuée, l'augmentation du contenu en triglycérides hépatiques pourrait être due à une diminution de la sécrétion de VLDL induite par le rimonabant (Chan et Watts, 2008). Par ailleurs, la sensibilité à l'insuline évaluée par l'HOMA-IR ne varie pas avec le traitement par du rimonabant (**Figure 26**). Comme pour le contenu en triglycérides hépatiques, la durée du traitement semble trop courte pour avoir un effet bénéfique visible sur la sensibilité à l'insuline.

Les mécanismes par lesquels le rimonabant induit une augmentation de la fonction mitochondriale restent à déterminer. En effet, l'action du rimonabant pourrait avoir une origine centrale et/ou périphérique. D'un point de vue central, l'hypothalamus, dans lequel le rôle du système endocannabinoïde est bien décrit (Matias et Di Marzo, 2007), est un centre clé impliqué dans la régulation de l'homéostasie énergétique au niveau périphérique *via* des voies neuronales et hormonales (Barsh et Schwartz, 2002). Au niveau périphérique le rimonabant pourrait agir de manière directe ou indirecte *via* notamment l'adiponectine. Le récepteur CB1 est couplé à des protéines Gi/o qui induisent une inhibition de l'adénylate cyclase et ainsi une diminution de la concentration d'AMPc (Howlett *et al.*, 2002). Etant donné, que le rimonabant induit une diminution de l'expression des facteurs lipogéniques (SREBP-1c, FAS, ACC) dont l'expression est négativement régulée par l'AMPc (Paulauskis et Sul, 1989, Foretz *et al.*, 1999a), nous pouvons supposer que le rimonabant pourrait agir sur la lipogénèse et l'oxydation des acides gras hépatiques de manière directe *via* la voie de l'AMPc. Par ailleurs, le rimonabant induit une augmentation de l'expression de l'adiponectine dans le tissu adipeux de rats Zucker obèses ainsi que dans des adipocytes en culture (Bensaid *et al.*, 2003). En outre, la concentration sérique d'adiponectine est augmentée dans notre étude chez les rats traités par du rimonabant. L'adiponectine *via* l'AMPK induit une augmentation de l'entrée des acides gras dans la mitochondrie et donc leur oxydation dans des hépatocytes (Yamauchi *et al.*, 2002). Par conséquent, l'action du rimonabant sur l'oxydation des acides gras hépatiques pourrait être médiée par l'adiponectine. Deux études récentes ayant pour

objectif de discriminer les effets directs du rimonabant de ceux médiés par l'adiponectine ont été réalisées sur deux modèles différents. L'étude de Migrenne *et al.* (2009), a mis en évidence, chez des souris dont le gène codant pour l'adiponectine a été inactivé soumises à un régime riche en lipides pendant 7 mois et traitées par du rimonabant pendant le dernier mois, un effet du rimonabant sur la perte de poids indépendant de l'adiponectine mais un effet sur la sensibilité à l'insuline dépendant de l'adiponectine. En utilisant un modèle de souris *ob/ob* dont le gène codant pour l'adiponectine a été inactivé et traitées avec du rimonabant, Watanabe *et al.* (2009), ont mis en évidence que la perte de poids, la diminution d'acides gras libres et de triglycérides sanguins et l'augmentation de la dépense énergétique induites par le rimonabant ne sont pas dépendantes de l'adiponectine. En revanche, les résultats ont montré que la diminution de l'insulinorésistance hépatique, l'activation de l'AMPK, l'augmentation de l'expression de la CPT I et la diminution de la stéatose hépatique induites par le rimonabant sont médiées à la fois par une voie adiponectine-dépendante et par une voie adiponectine-indépendante. Au vu des résultats de ces études, l'investigation concernant la discrimination des effets directs du rimonabant de ceux médiés par l'adiponectine doit se poursuivre notamment en déterminant la voie d'action directe du rimonabant et ainsi pouvoir mieux étudier l'implication différentielle du rimonabant et de l'adiponectine. Concernant les effets mitochondriaux du rimonabant, une étude similaire aux deux précédentes sur des souris dont le gène codant pour l'adiponectine a été inactivé permettrait de mettre en évidence la voie par laquelle la fonction mitochondriale est améliorée en cas de traitement par du rimonabant. Une étude récente, ayant pour objectif de déterminer le rôle de l'adiponectine dans le développement des NAFLD a évalué la fonction mitochondriale chez des souris dont le gène codant pour l'adiponectine a été inactivé (Zhou *et al.*, 2008). L'absence d'adiponectine entraîne une stéatose hépatique associée à une augmentation de l'expression de l'ARNm du TNF α et une augmentation de la concentration en MDA. Par ailleurs, les souris dont le gène codant pour l'adiponectine a été inactivé présentent des altérations morphologiques des mitochondries hépatiques similaires à celles observées en cas de stéatohépatite. Les activités des complexes I, II + III, IV et V de la chaîne respiratoire mesurées sur mitochondries isolées sont diminuées chez les souris dont le gène codant pour l'adiponectine a été inactivé et sont restaurées par l'injection d'un adénovirus recombinant exprimant le gène codant pour l'adiponectine. La biogenèse mitochondriale évaluée par le dosage de l'ADNmt ainsi que l'expression de gènes codant pour des protéines de la chaîne respiratoire (la sous-unité 1 de la NADH déshydrogénase, la sous-unité 1 de la cytochrome *c* oxydase et la sous-unité 6 de l'ATP synthase) sont diminuées chez les souris dont le gène codant pour l'adiponectine a été

inactivé mais le traitement par de l'adiponectine (adénovirus recombinant) n'a aucun effet sur ces paramètres suggérant ainsi une action indépendante d'une augmentation de la biogenèse mitochondriale. L'expression d'UCP2 (ARNm et protéine) est diminuée chez les souris dont le gène codant pour l'adiponectine a été inactivé et est restaurée par l'injection d'un adénovirus recombinant exprimant le gène codant pour l'adiponectine. Ce dernier résultat a été confirmé par le fait que l'effet bénéfique de l'adiponectine sur les activités des complexes I, II + III, IV et V de la chaîne respiratoire est abolit chez des souris dont le gène codant pour UCP2 a été inactivé. Au vu de ces résultats, les effets protecteurs de l'adiponectine sur les altérations hépatiques inhérentes aux NAFLD sont médiés en partie par une augmentation de la fonction mitochondriale *via* un mécanisme impliquant UCP2. Reste à déterminer si les effets observés dans notre étude sont uniquement le résultat de l'augmentation de la production d'adiponectine par le rimonabant ou bien si des mécanismes impliquant la voie de signalisation CB1 participent également à l'amélioration de la fonction mitochondriale hépatique.

Notre étude a permis de mettre en évidence un effet bénéfique du rimonabant sur la fonction mitochondriale hépatique en facilitant l'oxydation des substrats énergétiques notamment en augmentant l'entrée des acides gras dans la mitochondrie. Le fait que les effets observés sur la fonction mitochondriale ne sont pas retrouvés chez les rats appariés pour la prise alimentaire, semble indiquer une action du rimonabant indépendante de la diminution précoce de la prise alimentaire. Cependant, il reste à déterminer si l'action du rimonabant est d'origine centrale et/ou périphérique, et dans le cas d'une action périphérique s'il agit de manière directe et/ou indirecte *via* l'adiponectine.

TRAVAIL PRELIMINAIRE

**Evaluation de la fonction mitochondriale de cellules HepG2
traitées avec du resvératrol**

Objectif :

Le resvératrol induit une diminution de la stéatose hépatique que ce soit dans des modèles animaux ou cellulaires (Zang *et al.*, 2006, Baur *et al.*, 2006, Shang *et al.*, 2008, Bujanda *et al.*, 2008, Ahn J *et al.*, 2008, Hou *et al.*, 2008, Wang *et al.*, 2009). L'action bénéfique du resvératrol sur la stéatose hépatique se caractérise par une diminution de la lipogenèse hépatique *via* une voie SIRT1/LKB1/AMPK (Ahn J *et al.*, 2008, Shang *et al.*, 2008, Wang *et al.*, 2009, Gnoni et Paglialonga, 2009, Hou *et al.*, 2008). Par ailleurs, le resvératrol induit une augmentation de la biogenèse mitochondriale *via* la voie SIRT1/PGC1 α (Baur *et al.*, 2006, Lagouge *et al.*, 2006). Au vu de ces données nous avons décidé d'évaluer la fonction mitochondriale dans un modèle cellulaire hépatique, les cellules HepG2 afin de déterminer si le resvératrol pouvait diminuer la stéatose hépatique en agissant au moins en partie sur la fonction mitochondriale. Dans ce but, nous avons mesuré la consommation d'oxygène mitochondriale, le potentiel de membrane mitochondrial, les activités enzymatiques des complexes de la chaîne respiratoire et la quantité d'ADNmt sur des cellules HepG2 traitées avec du resvératrol pendant 24h.

Résultats et discussion :

• Effet du resvératrol sur la consommation d'oxygène mitochondriale :

Un traitement de 24h avec du resvératrol (50 μ M) induit une augmentation de la consommation d'oxygène mitochondriale dans les cellules HepG2 que ce soit en condition basale, en condition non-phosphorylante et en condition de fonctionnement maximal (FCCP) (**Figure 27**). Le resvératrol entraîne une diminution significative du RCRp (**Figure 28**). En revanche l'UCR et le RCR ne varient pas avec le traitement par du resvératrol. Le RCRp est diminué en raison d'une plus forte augmentation de la consommation d'oxygène avec du FCCP que celle mesurée en condition phosphorylante. Ces résultats illustrent un effet stimulateur du resvératrol sur la consommation d'oxygène mitochondriale et en particulier sur la capacité oxydative maximale (FCCP).

- **Effet du resvératrol sur le potentiel de membrane mitochondrial :**

Le resvératrol n'induit pas de variation du potentiel de membrane en condition phosphorylante (basale) mais a tendance à augmenter le potentiel de membrane mitochondrial en condition non phosphorylante (+ oligomycine) (**Figure 29**). Cette tendance à l'augmentation à l'état non phosphorylant est probablement due à l'augmentation de la consommation d'oxygène globale.

- **Effet du resvératrol sur les activités enzymatiques des complexes de la chaîne respiratoire :**

Afin d'évaluer les capacités glycolytiques et oxydatives, nous avons mesuré les activités enzymatiques de la lactate déshydrogénase (LDH) et de la citrate synthase (CS) respectivement (**Figure 30**). Le resvératrol entraîne une diminution significative de l'activité LDH et non significative de la CS. Néanmoins le rapport LDH/CS a tendance à diminuer avec le traitement par du resvératrol, suggérant ainsi une augmentation de la capacité oxydative par rapport à la capacité glycolytique. Le resvératrol ne modifie pas l'activité des complexes de la chaîne respiratoire, excepté l'activité du complexe I qui augmente ($P = 0,0539$). Cette augmentation de l'activité du complexe I peut expliquer l'augmentation de la capacité oxydative maximale observée avec la mesure de consommation d'oxygène. Récemment, il a été mis en évidence que dans le foie de souris SIRT3^{-/-}, l'acétylation du complexe I de la chaîne respiratoire est augmentée et associée à une diminution de la consommation d'oxygène mitochondriale avec des substrats du complexe I (glutamate + malate) suggérant ainsi que SIRT3 pourrait être impliquée dans la régulation du fonctionnement mitochondriale *via* la déacétylation du complexe I (Ahn BH *et al.*, 2008). En outre, le resvératrol induit une augmentation de l'expression de l'ARNm SIRT3 dans des adipocytes 3T3-L1 (Rayalam *et al.*, 2008). Par conséquent, le resvératrol *via* l'augmentation d'expression de SIRT3 pourrait entraîner une déacétylation du complexe I et ainsi augmenter son activité.

- **Effet du resvératrol sur la quantité d'ADNmt :**

Le resvératrol n'entraîne pas de variation de quantité d'ADNmt (**Figure 31**), illustrant ainsi que les modifications de fonctionnement mitochondrial observées ne sont pas dues à une variation de la biogenèse mitochondriale. Une étude a mis en évidence que le resvératrol induit une diminution de l'acétylation de PGC1 α associée à une augmentation du nombre de mitochondries que ce soit dans le foie de souris alimentées avec un régime riche en gras (évalué par microscopie électronique) ou dans des cellules HeLa (évalué avec la sonde

fluorescente Mitotracker) (Baur *et al.*, 2006). Une autre étude a mis en évidence une augmentation de la quantité d'ADNmt dans le muscle et le tissu adipeux brun de souris alimentées avec un régime riche en gras et traitées avec du resvératrol (Lagouge *et al.*, 2006). Cependant, la quantité d'ADNmt dans le foie de ces souris ne varie pas malgré une augmentation de l'expression de PGC1 α .

Selon ces résultats préliminaires, le resvératrol semble induire une augmentation de la fonction mitochondriale sans variation de la densité mitochondriale mais en augmentant l'activité du complexe I.

Perspectives :

Afin de relier cette augmentation du fonctionnement mitochondrial par le resvératrol à une diminution de la stéatose hépatique, les mêmes expérimentations seront réalisées sur des cellules HepG2 rendues stéatosiques en les cultivant soit dans un milieu additionné de glucose et d'insuline, soit dans un milieu enrichi en acides gras.

Par ailleurs, nous évaluerons l'acétylation du complexe I ainsi que l'expression du gène codant pour SIRT3.

Enfin, afin de déterminer la ou les voies à l'origine de l'augmentation de la fonction mitochondriale, nous utiliserons des inhibiteurs ou des ARNi dirigés contre SIRT1, SIRT3 et l'AMPK.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les mécanismes à l'origine du développement de la stéatose hépatique ne sont pas encore complètement élucidés. Outre l'augmentation de la lipogenèse hépatique désormais bien admise, une altération de la fonction mitochondriale pourrait contribuer à l'accumulation de lipides dans le foie. Par conséquent, nous avons évalué la fonction mitochondriale dans deux modèles animaux de stéatose hépatique ainsi que dans le contexte de deux traitements potentiels de la stéatose, le rimonabant et la resvératrol.

Le **rat Zucker obèse** ne présente aucune altération de la phosphorylation oxydative que ce soit au niveau de la fuite de protons, de l'efficacité de la phosphorylation oxydative (cinétique ATP/O) ou au niveau des capacités oxydatives en elles-mêmes. De même, la quantité de mitochondries hépatiques ne semble pas modifiée chez le rat Zucker obèse au vu des activités enzymatiques de la citrate synthase qu'elles aient été mesurées sur de l'homogénat de foie ou sur mitochondries isolées. Le système de la phosphorylation oxydative semble ainsi préservé dans ce modèle de stéatose hépatique et par conséquent ne participe pas à l'accumulation excessive de lipides.

Avec un modèle plus proche de la physiopathologie de la stéatose hépatique, le **rat alimenté avec un régime riche en gras pendant différentes durées**, nous avons mis en évidence que dans les premiers temps d'un apport accru en lipides (2 et 4 semaines), le métabolisme hépatique est orienté de manière à utiliser ou à stocker sous forme de triglycérides l'excès de lipides. Cette première adaptation est ensuite complètement inversée et nous observons une diminution de l'oxydation des acides gras mais également une diminution du stockage des lipides sous forme de triglycérides. Concernant la fonction mitochondriale, celle-ci est seulement affectée au niveau de la synthèse d'ATP à 8 semaines de régime. La mitochondrie est donc capable de subir une arrivée massive de gras en conservant un fonctionnement normal au moins jusqu'à 8 semaines de régime.

Dans ces deux modèles de stéatose hépatique, le système de phosphorylation oxydative n'est pas ou peu altéré, suggérant que la mitochondrie ne participe pas au développement de la stéatose hépatique au moins du point de vue de la chaîne respiratoire en elle-même.

La seule modification observée est une augmentation de l'efficacité de la phosphorylation oxydative à 8 semaines de régime due à une augmentation de la synthèse d'ATP pour une même consommation d'oxygène. Cette augmentation de l'efficacité de la phosphorylation oxydative pourrait entraîner une augmentation de la production des ROS. Même si nous n'avons pas réalisé d'évaluation complète du stress oxydatif, il semble qu'à partir de 8 semaines de régime riche en gras la cellule hépatique augmente son système de lutte contre les ROS (augmentation de l'ARNm de SOD2), illustrant ainsi une augmentation probable de

la production de ROS. Cette production accrue de ROS pourrait participer à la transition stéatose/stéatohépatite mais également conduire à une altération de la chaîne respiratoire mitochondriale. Par conséquent, l'évaluation de la production de ROS et des conséquences associées dans ce dernier modèle de stéatose hépatique apporterait des informations essentielles à la compréhension de l'évolution de la stéatose hépatique.

Le traitement avec du **rimonabant** de rats alimentés avec un régime en gras, a un effet bénéfique sur la fonction mitochondriale hépatique en augmentant l'oxydation des substrats énergétiques et notamment des acides gras *via* une augmentation de leur entrée dans la mitochondrie. Le fait que les effets du rimonabant sur la fonction mitochondriale ne sont pas observés chez les rats appariés pour la prise alimentaire suggère une action indépendante de la diminution précoce de la prise alimentaire. Il reste à déterminer les mécanismes responsables des effets du rimonabant sur la fonction mitochondriale. Le rimonabant pourrait agir d'une manière directe *via* la signalisation du récepteur CB1 ou indirecte *via* l'adiponectine.

Le traitement par du **resvératrol** de cellules HepG2, entraîne une augmentation de la consommation d'oxygène mitochondriale et une augmentation de l'activité enzymatique du complexe I mais sans modification de la biogenèse mitochondriale. Récemment, il a été mis en évidence que dans le foie de souris SIRT3^{-/-}, l'acétylation du complexe I de la chaîne respiratoire est augmentée et associée à une diminution de la consommation d'oxygène mitochondriale avec des substrats du complexe I suggérant ainsi que SIRT3 pourrait être impliquée dans la régulation du fonctionnement mitochondrial *via* la déacétylation du complexe I (Ahn BH *et al.*, 2008). En outre, le resvératrol induit une augmentation de l'expression de l'ARNm SIRT3 dans des adipocytes 3T3-L1 (Rayalam *et al.*, 2008). Par conséquent, le resvératrol *via* l'augmentation d'expression de SIRT3 pourrait entraîner une déacétylation du complexe I et ainsi augmenter son activité. Ainsi, il paraît intéressant de mesurer l'expression de SIRT3 suite à un traitement avec du resvératrol ainsi que d'évaluer le degré d'acétylation du complexe I. Par ailleurs, le traitement par du resvératrol de cellules HepG2 dont l'expression de SIRT3 aura été inhibée par un ARNi pourrait indiquer si le resvératrol agit sur la fonction mitochondriale *via* SIRT3.

BIBLIOGRAPHIE

A

- Abdelmalek MF**, Angulo P, Jorgensen RA, Sylvestre PB, Lindor KD (2001). Betaine, a promising new agent for patients with nonalcoholic steatohepatitis: results of a pilot study. *Am J Gastroenterol* 96(9): 2711-2717.
- Addy C**, Wright H, Van Laere K, Gantz I, Erondy N, Musser BJ, Lu K, Yuan J, Sanabria-Bohórquez SM, Stoch A, Stevens C, Fong TM, De Lepeleire I, Cilissen C, Cote J, Rosko K, Gendrano IN 3rd, Nguyen AM, Gumbiner B, Rothenberg P, de Hoon J, Bormans G, Depré M, Eng WS, Ravussin E, Klein S, Blundell J, Herman GA, Burns HD, Hargreaves RJ, Wagner J, Gottesdiener K, Amatruda JM, Heymsfield SB (2008). The acyclic CB1R inverse agonist taranabant mediates weight loss by increasing energy expenditure and decreasing caloric intake. *Cell Metab* 7(1): 8-78.
- Adler M, Schaffner F** (1979). Fatty liver hepatitis and cirrhosis in obese patients. *Am J Med* 67(5): 811-816.
- Aguirre V**, Werner ED, Giraud J, Lee YH, Shoelson SE, White MF (2002). Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *J Biol Chem* 277(2): 1531-1537.
- Ahmed MH**, Osman KA, Osman MM (2006). Invasive and non-invasive investigations for tamoxifen-induced non-alcoholic steatohepatitis (NASH): the benefit of computed tomography scan guided liver biopsy. *Pathology* 38(3): 270-271.
- Ahn BH**, Kim HS, Song S, Lee IH, Liu J, Vassilopoulos A, Deng CX, Finkel T (2008). A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(38): 14447-14452.
- Ahn J**, Cho I, Kim S, Kwon D, Ha T (2008). Dietary resveratrol alters lipid metabolism-related gene expression of mice on an atherogenic diet. *J Hepatol* 49(6): 1019-1028.
- Ahuja N**, Schwer B, Carobbio S, Waltregny D, North BJ, Castronovo V, Maechler P, Verdin E (2007). Regulation of insulin secretion by SIRT4, a mitochondrial ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem* 282(46): 33583-33592.
- Anderson RM**, Bitterman KJ, Wood JG, Medvedik O, Sinclair DA (2003). Nicotinamide and PNC1 govern lifespan extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 423(6936): 181-185.
- Angulo P** (2002). Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 346(16): 1221-1231.
- Arita Y**, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara

- K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y (1999). Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257(1): 79-83.
- Assifi MM**, Suchankova G, Constant S, Prentki M, Saha AK, Ruderman NB (2005). AMP-activated protein kinase and coordination of hepatic fatty acid metabolism of starved/carbohydrate-refed rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289(5): E794-E800.
- Atten MJ**, Godoy-Romero E, Attar BM, Milson T, Zopel M, Holian O (2005). Resveratrol regulates cellular PKC alpha and delta to inhibit growth and induce apoptosis in gastric cancer cells. *Invest New Drugs* 23(2): 111-119.
- Azad SC**, Eder M, Marsicano G, Lutz B, Zieglgänsberger W, Rammes G (2003). Activation of the cannabinoid receptor type 1 decreases glutamatergic and GABAergic synaptic transmission in the lateral amygdala of the mouse. *Learn Mem* 10(2): 116-128.
- Azzout-Marniche D**, Bécard D, Guichard C, Foretz M, Ferré P, Foufelle F (2000). Insulin effects on sterol regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) transcriptional activity in rat hepatocytes. *Biochem J* 350 Pt 2: 389-393.

B

- Baker D**, Pryce G, Davies WL, Hiley CR (2006). In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends Pharmacol Sci* 27(1): 1-4.
- Balaban RS** (1990). Regulation of oxidative phosphorylation in the mammalian cell. *Am J Physiol* 258(3 Pt 1): C377-389.
- Balkau B**, Charles MA, Drivsholm T, Borch-Johnsen K, Wareham N, Yudkin JS, Morris R, Zavaroni I, van Dam R, Feskens E, Gabriel R, Diet M, Nilsson P, Hedblad B; European Group For The Study Of Insulin Resistance (EGIR) (2002). Frequency of the WHO metabolic syndrome in European cohorts, and an alternative definition of an insulin resistance syndrome. *Diabetes Metab* 28(5): 364-376.
- Barsh GS**, **Schwartz MW** (2002). Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration. *Nat Rev Genet* 3(8): 589-600.
- Basaranoglu M**, Acbay O, Sonsuz A (1999). A controlled trial of gemfibrozil in the treatment of patients with nonalcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 31(2):384.
- Bastard JP**, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, Capeau J, Feve B (2006). Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw* 17(1): 4-12.

- Baur JA**, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, Sinclair DA (2006). Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 444(7117): 337-342.
- Bécard D**, Hainault I, Azzout-Marniche D, Bertry-Coussot L, Ferré P, Fougère F (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): 2425-2430.
- Bedogni G**, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S (2005). Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. *Hepatology* 42(1): 44-52.
- Bedoucha M**, Atzpodien E, Boelsterli UA (2001). Diabetic KKAY mice exhibit increased hepatic PPARgamma1 gene expression and develop hepatic steatosis upon chronic treatment with antidiabetic thiazolidinediones. *J Hepatol* 35(1): 17-23.
- Begriffe K**, Igoudjil A, Pessayre D, Fromenty B (2006). Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion* 6(1): 1-28.
- Beltramo M**, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A, Piomelli D (1997). Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science* 277(5329): 1094-1097.
- Bensaid M**, Gary-Bobo M, Esclançon A, Maffrand JP, Le Fur G, Oury-Donat F, Soubrié P (2003). The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 increases Acp30 mRNA expression in adipose tissue of obese fa/fa rats and in cultured adipocyte cells. *Mol Pharmacol* 63(4): 908-914.
- Bergeron R**, Ren JM, Cadman KS, Moore IK, Perret P, Pypaert M, Young LH, Semenkovich CF, Shulman GI (2001). Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281(6): E1340-E1346.
- Bitterman KJ**, Anderson RM, Cohen HY, Latorre-Esteves M, Sinclair DA (2002). Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast sir2 and human SIRT1. *J Biol Chem* 277(47): 45099-45107.

- Bizeau ME**, MacLean PS, Johnson GC, Wei Y (2003). Skeletal muscle sterol regulatory element binding protein-1c decreases with food deprivation and increases with feeding in rats. *J Nutr* 133(6): 1787-1792.
- Blüher M**, Engeli S, Klötting N, Berndt J, Fasshauer M, Bátkai S, Pacher P, Schön MR, Jordan J, Stumvoll M (2006). Dysregulation of the peripheral and adipose tissue endocannabinoid system in human abdominal obesity. *Diabetes* 55(11): 3053-3060.
- Bobyleva V**, Bellei M, Paziienza TL, Muscatello U (1997). Effect of cardiolipin on functional properties of isolated rat liver mitochondria. *Biochem Mol Biol Int* 41(3): 469-480.
- Bogenghagen DF** (1996). Interaction of mtTFB and mtRNA polymerase at core promoters for transcription of *Xenopus laevis* mtDNA. *J Biol Chem* 271(20): 12036-12041.
- Bohnensack R** (1981). Control of energy transformation of mitochondria. Analysis by a quantitative model. *Biochim Biophys Acta* 634(1): 203-218.
- Bordone L, Guarente L** (2005). Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(4): 298-305.
- Bordone L**, Motta MC, Picard F, Robinson A, Jhala US, Apfeld J, McDonagh T, Lemieux M, McBurney M, Szilvasi A, Easlson EJ, Lin SJ, Guarente L (2006). Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells. *PLoS Biol* 4(2): e31.
- Boss O**, Samec S, Paoloni-Giacobino A, Rossier C, Dulloo A, Seydoux J, Muzzin P, Giacobino JP (1997). Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett* 408(1): 39-42.
- Bowker-Kinley MM**, Davis WI, Wu P, Harris RA, Popov KM (1998). Evidence for existence of tissue-specific regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem J* 329(Pt 1): 191-196.
- Bradamante S**, Barenghi L, Villa A (2004). Cardiovascular protective effects of resveratrol. *Cardiovasc Drug Rev* 22(3): 169-188.
- Brady LJ**, Brady PS, Romsos DR, Hoppel CL (1985). Elevated hepatic mitochondrial and peroxisomal oxidative capacities in fed and starved adult obese (ob/ob) mice. *Biochem J* 231(2): 439-444.
- Brady PS**, Marine KA, Brady LJ, Ramsay RR (1989). Co-ordinate induction of hepatic mitochondrial and peroxisomal carnitine acyltransferase synthesis by diet and drugs. *Biochem J* 260(1): 93-100.
- Braissant O**, Foufelle F, Scotto C, Dauça M, Wahli W (1996). Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* 137(1): 354-366.

- Brand MD (1995).** Measurement of mitochondrial protonmotive force. In: Brown GC, Cooper CE (Eds.), *Bioenergetics, A Practical Approach*, IRL Press, Oxford. p.39-62.
- Brand MD, Chien LF, Ainscow EK, Rolfe DF, Porter RK (1994).** The causes and functions of mitochondrial proton leak. *Biochim Biophys Acta* 1187(2): 132-139.
- Brand MD, Pakay JL, Ocloo A, Kokoszka J, Wallace DC, Brookes PS, Cornwall EJ (2005).** The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase content. *Biochem J* 392(Pt 2): 353-362.
- Brand MD, Steverding D, Kadenbach B, Stevenson PM, Hafner RP (1992).** The mechanism of the increase in mitochondrial proton permeability induced by thyroid hormones. *Eur J Biochem* 206(3): 775-781.
- Briggs MR, Yokoyama C, Wang X, Brown MS, Goldstein JL (1993).** Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. I. Identification of the protein and delineation of its target nucleotide sequence. *J Biol Chem* 268(19): 14490-14496.
- Brookes PS, Buckingham JA, Tenreiro AM, Hulbert AJ, Brand MD (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): 325-334.
- Brown GC, Lakin-Thomas PL, Brand MD (1990).** Control of respiration and oxidative phosphorylation in isolated rat liver cells. *Eur J Biochem* 192(2): 355-362.
- Brown MS, Goldstein JL (1997).** The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89(3): 331-340.
- Brown MS, Goldstein JL (1999).** A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(20): 11041-11048.
- Browne GJ, Finn SG, Proud CG (2004).** Stimulation of the AMP-activated protein kinase leads to activation of eukaryotic elongation factor 2 kinase and to its phosphorylation at a novel site, serine 398. *J Biol Chem* 279(13): 12220-12231.
- Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, Grundy SM, Hobbs HH (2004).** Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 40(6): 1387-1395.
- Brunt EM (2004).** Nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 24(1): 3-20.

- Brunt EM**, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR (1999). Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 94(9): 2467-2474.
- Buckingham RE** (2005). Thiazolidinediones: Pleiotropic drugs with potent anti-inflammatory properties for tissue protection. *Hepatol Res* 33(2): 167-170.
- Buckley BM, Williamson DH** (1977). Origins of blood acetate in the rat. *Biochem J* 166(3): 539-545.
- Bugianesi E**, Gentilcore E, Manini R, Natale S, Vanni E, Villanova N, David E, Rizzetto M, Marchesini G (2005a). A randomized controlled trial of metformin versus vitamin E or prescriptive diet in nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Gastroenterol* 100(5): 1082-1090.
- Bugianesi E**, McCullough AJ, Marchesini G (2005b). Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology* 42(5): 987-1000.
- Bujanda L**, Hijona E, Larzabal M, Beraza M, Aldazabal P, García-Urkia N, Sarasqueta C, Cosme A, Irastorza B, González A, Arenas JI Jr (2008). Resveratrol inhibits nonalcoholic fatty liver disease in rats. *BMC Gastroenterol* 8: 40.
- Burant CF**, Sreenan S, Hirano K, Tai TA, Lohmiller J, Lukens J, Davidson NO, Ross S, Graves RA (1997). Troglitazone action is independent of adipose tissue. *J Clin Invest* 100(11): 2900-2908.
- Buryanovskyy L**, Fu Y, Boyd M, Ma Y, Hsieh TC, Wu JM, Zhang Z (2004). Crystal structure of quinone reductase 2 in complex with resveratrol. *Biochemistry* 43(36): 11417-11426.

C

- Cadas H**, di Tomaso E, Piomelli D (1997). Occurrence and biosynthesis of endogenous cannabinoid precursor, N-arachidonoyl phosphatidylethanolamine, in rat brain. *J Neurosci* 17(4): 1226-1242.
- Caldwell SH**, Swerdlow RH, Khan EM, Iezzoni JC, Hespeneheide EE, Parks JK, Parker WD Jr (1999). Mitochondrial abnormalities in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 31(3): 430-434.
- Campbell JM**, Hunt TK, Karam JH, Forsham PH (1977). Jejunoileal bypass as a treatment of morbid obesity. *Arch Intern Med* 137(5): 602-610.

- Canton M, Luvisetto S, Schmehl I, Azzone GF (1995).** The nature of mitochondrial respiration and discrimination between membrane and pump properties. *Biochem J* 310 (Pt 2): 477-481.
- Carling D (2004).** The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control. *Trends Biochem Sci* 29(1): 18-24.
- Carling D, Hardie DG (1989).** The substrate and sequence specificity of the AMP-activated protein kinase. Phosphorylation of glycogen synthase and phosphorylase kinase. *Biochim Biophys Acta* 1012(1): 81-86.
- Carling D, Sanders MJ, Woods A (2008).** The regulation of AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Int J Obes (Lond)* 32 Suppl 4: S55-S59.
- Caulfield MP, Brown DA (1992).** Cannabinoid receptor agonists inhibit Ca current in NG108-15 neuroblastoma cells via a pertussis toxin-sensitive mechanism. *Br J Pharmacol* 106(2): 231-232.
- Cavuto P, McAinch AJ, Hatzinikolas G, Cameron-Smith D, Wittert GA (2007a).** Effects of cannabinoid receptors on skeletal muscle oxidative pathways. *Mol Cell Endocrinol* 267(1-2): 63-69.
- Cavuto P, McAinch AJ, Hatzinikolas G, Janovská A, Game P, Wittert GA (2007b).** The expression of receptors for endocannabinoids in human and rodent skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 364(1): 105-110.
- Cha JY, Repa JJ (2007).** The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *J Biol Chem* 282(1): 743-751.
- Chakravarthy MV, Pan Z, Zhu Y, Tordjman K, Schneider JG, Coleman T, Turk J, Semenkovich CF (2005).** "New" hepatic fat activates PPARalpha to maintain glucose, lipid, and cholesterol homeostasis. *Cell Metab* 1(5): 309-322.
- Chalasani N, Gorski JC, Asghar MS, Asghar A, Foresman B, Hall SD, Crabb DW (2003).** Hepatic cytochrome P450 2E1 activity in nondiabetic patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 37(3): 544-550.
- Chan DC, Watts GF (2008).** Pharmacological regulation of dyslipoproteinaemia in insulin resistant states. *Curr Vasc Pharmacol* 6(1): 67-77.
- Chan MY, Zhao Y, Heng CK (2008).** Sequential responses to high-fat and high-calorie feeding in an obese mouse model. *Obesity (Silver Spring)* 16(5): 972-978.
- Chance B, Williams GR (1955).** Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. IV. The respiratory chain. *J Biol Chem* 217(1): 429-438.

- Chance B, Williams GR (1956).** The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem* 17: 65-134.
- Chao L, Marcus-Samuels B, Mason MM, Moitra J, Vinson C, Arioglu E, Gavrilova O, Reitman ML (2000).** Adipose tissue is required for the antidiabetic, but not for the hypolipidemic, effect of thiazolidinediones. *J Clin Invest* 106(10): 1221-1228.
- Charlton M, Sreekumar R, Rasmussen D, Lindor K, Nair KS (2002).** Apolipoprotein synthesis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 35(4): 898-904.
- Chen G, Liang G, Ou J, Goldstein JL, Brown MS (2004).** Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(31): 11245-11250.
- Chen J, Petersen DR, Schenker S, Henderson GI (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): 544-552.
- Chen J, Schenker S, Frosto TA, Henderson GI (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): 336-344.
- Chitturi S, Farrell GC (2001).** Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 21(1): 27-41.
- Christianson TW, Clayton DA (1988).** A tridecamer DNA sequence supports human mitochondrial RNA 3'-end formation in vitro. *Mol Cell Biol* 8(10): 4502-4509.
- Chu K, Miyazaki M, Man WC, Ntambi JM (2006).** Stearoyl-coenzyme A desaturase 1 deficiency protects against hypertriglyceridémie and increases plasma high-density lipoprotein cholesterol induced by liver X receptor activation. *Mol Cell Biol* 26(18): 6786-6798.
- Ciapaite J, Bakker SJ, Van Eikenhorst G, Wagner MJ, Teerlink T, Schalkwijk CG, Fodor M, Ouwens DM, Diamant M, Heine RJ, Westerhoff HV, Krab K (2007).** Functioning of oxidative phosphorylation in liver mitochondria of high-fat diet fed rats. *Biochim Biophys Acta* 1772(3): 307-316.
- Clarke PR, Hardie DG (1990).** Regulation of HMG-CoA reductase: identification of the site phosphorylated by the AMP-activated protein kinase in vitro and in intact rat liver. *EMBO J* 9(8): 2439-2446.
- Clayton DA (1991).** Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. *Annu Rev Cell Biol* 7: 453-478.

- Colombo G**, Agabio R, Diaz G, Lobina C, Reali R, Gessa GL (1998). Appetite suppression and weight loss after the cannabinoid antagonist SR 141716. *Life Sci* 63(8): PL113-117.
- Commerford SR**, Peng L, Dubé JJ, O'Doherty RM (2004). In vivo regulation of SREBP-1c in skeletal muscle: effects of nutritional status, glucose, insulin, and leptin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287(1): R218-227.
- Cook GA, Gamble MS** (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): 2050-2055.
- Cooney GJ**, Thompson AL, Furler SM, Ye J, Kraegen EW (2002). Muscle long-chain acyl CoA esters and insulin resistance. *Ann N Y Acad Sci* 967: 196-207.
- Cortez-Pinto H**, Chatham J, Chacko VP, Arnold C, Rashid A, Diehl AM (1999). Alterations in liver ATP homeostasis in human nonalcoholic steatohepatitis: a pilot study. *JAMA* 282(17): 1659-1664.
- Cota D**, Marsicano G, Lutz B, Vicennati V, Stalla GK, Pasquali R, Pagotto U (2003a). Endogenous cannabinoid system as a modulator of food intake. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27(3): 289-301.
- Cota D**, Marsicano G, Tschöp M, Grübler Y, Flachskamm C, Schubert M, Auer D, Yassouridis A, Thöne-Reineke C, Ortmann S, Tomassoni F, Cervino C, Nisoli E, Linthorst AC, Pasquali R, Lutz B, Stalla GK, Pagotto U (2003b). The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest* 112(3): 423-431.
- Cravatt BF**, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB (1996). Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 384(6604): 83-87.
- Crescenzo R**, Bianco F, Falcone I, Prisco M, Liverini G, Iossa S (2008). Alterations in hepatic mitochondrial compartment in a model of obesity and insulin resistance. *Obesity (Silver Spring)* 16(5): 958-964.
- Crespo J**, Cayón A, Fernández-Gil P, Hernández-Guerra M, Mayorga M, Domínguez-Díez A, Fernández-Escalante JC, Pons-Romero F (2001). Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology* 34(6): 1158-1163.
- Creutzfeldt W**, Frerichs H, Sickinger K (1970). Liver diseases and diabetes mellitus. *Prog Liver Dis* 3: 371-407.

D

- Day CP, James OF (1998).** Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 114(4): 842-845.
- de Almeida IT, Cortez-Pinto H, Fidalgo G, Rodrigues D, Camilo ME (2002).** Plasma total and free fatty acids composition in human non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Nutr* 21(3):219-23.
- de Assis S, Wang M, Goel S, Foxworth A, Helferich W, Hilakivi-Clarke L (2006).** Excessive weight gain during pregnancy increases carcinogen-induced mammary tumorigenesis in Sprague-Dawley and lean and obese Zucker rats. *J Nutr* 136(4): 998-1004.
- de Luca C, Olefsky JM (2008).** Inflammation and insulin resistance. *FEBS Lett* 582(1): 97-105.
- De Petrocellis L, Cascio MG, Di Marzo V (2004).** The endocannabinoid system: a general view and latest additions. *Br J Pharmacol* 141(5): 765-774.
- De Petrocellis L, Melck D, Bisogno T, Milone A, Di Marzo V (1999).** Finding of the endocannabinoid signalling system in Hydra, a very primitive organism: possible role in the feeding response. *Neuroscience* 92(1): 377-387.
- Demeilliers C, Maisonneuve C, Grodet A, Mansouri A, Nguyen R, Tinel M, Lettéron P, Degott C, Feldmann G, Pessayre D, Fromenty B (2002).** Impaired adaptive resynthesis and prolonged depletion of hepatic mitochondrial DNA after repeated alcohol binges in mice. *Gastroenterology* 123(4): 1278-1290.
- Dentin R, Benhamed F, Pégrier JP, Foufelle F, Viollet B, Vaulont S, Girard J, Postic C (2005a).** Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation. *J Clin Invest* 115(10): 2843-2854.
- Dentin R, Benhamed F, Hainault I, Fauveau V, Foufelle F, Dyck JR, Girard J, Postic C (2006).** Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice. *Diabetes* 55(8): 2159-2170.
- Dentin R, Girard J, Postic C (2005b).** Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver. *Biochimie* 2005 87(1): 81-86.
- Dentin R, Pégrier JP, Benhamed F, Foufelle F, Ferré P, Fauveau V, Magnuson MA, Girard J, Postic C (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): 20314-20326.
- Derkinderen P**, Toutant M, Burgaya F, Le Bert M, Siciliano JC, de Franciscis V, Gelman M, Girault JA (1996). Regulation of a neuronal form of focal adhesion kinase by anandamide. *Science* 273(5282): 1719-1722.
- Derkinderen P**, Valjent E, Toutant M, Corvol JC, Enslen H, Ledent C, Trzaskos J, Caboche J, Girault JA (2003). Regulation of extracellular signal-regulated kinase by cannabinoids in hippocampus. *J Neurosci* 23(6): 2371-2382.
- Després JP**, Golay A, Sjöström L; Rimonabant in Obesity-Lipids Study Group (2005). Effects of rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia. *N Engl J Med* 353(20): 2121-2134.
- Devane WA**, Dysarz FA 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 34(5): 605-613.
- Devane WA**, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258(5090): 1946-1949.
- DeWind LT**, **Payne JH** (1976). Intestinal bypass surgery for morbid obesity. Long-term results. *JAMA* 236(20): 2298-2301.
- Di Marzo V** (2008). The endocannabinoid system in obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia* 51(8): 1356-1367.
- Di Marzo V**, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D (1994). Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* 372(6507): 686-691.
- Di Marzo V**, **Matias I** (2005). Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat Neurosci* 8(5): 585-599.
- Díaz-Laviada I**, **Ruiz-Llorente L** (2005). Signal transduction activated by cannabinoid receptors. *Mini Rev Med Chem* 5(7): 619-630.
- Dimroth P**, Kaim G, Matthey U (2000). Crucial role of the membrane potential for ATP synthesis by F(1)F(o) ATP synthases. *J Exp Biol* 203(Pt 1): 51-59.
- Dinh TP**, Carpenter D, Leslie FM, Freund TF, Katona I, Sensi SL, Kathuria S, Piomelli D (2002). Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(16): 10819-10824.

- Diraison F**, Moulin P, Beylot M (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): 478-485.
- Dixon JB**, Bhathal PS, O'Brien PE (2001). Nonalcoholic fatty liver disease: predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese. *Gastroenterology* 121(1): 91-100.
- Donnelly KL**, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ (2005). Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 115(5): 1343-1351.
- Doyon C**, Denis RG, Baraboi ED, Samson P, Lalonde J, Deshaies Y, Richard D (2006). Effects of rimonabant (SR141716) on fasting-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis and neuronal activation in lean and obese Zucker rats. *Diabetes* 55(12): 3403-3410.
- Dresner A**, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S, Cline GW, Slezak LA, Andersen DK, Hundal RS, Rothman DL, Petersen KF, Shulman GI (1999). Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest* 103(2): 253-259.
- Dreyer C**, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G, Wahli W (1992). Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* 68(5): 879-887.
- Du XL**, Edelstein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldberg H, Ziyadeh F, Wu J, Brownlee M (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): 12222-12226.
- Ducluzeau PH**, Perretti N, Laville M, Andreelli F, Vega N, Riou JP, Vidal H (2001). Regulation by insulin of gene expression in human skeletal muscle and adipose tissue. Evidence for specific defects in type 2 diabetes. *Diabetes* 50(5): 1134-11342.
- Dufour JF**, Oneta CM, Gonvers JJ, Bihl F, Cerny A, Cereda JM, Zala JF, Helbling B, Steuerwald M, Zimmermann A; Swiss Association for the Study of the Liver (2006). Randomized placebo-controlled trial of ursodeoxycholic acid with vitamin e in nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 4(12): 1537-1543.
- Dufour S**, Rousse N, Canioni P, Diollez P (1996). Top-down control analysis of temperature effect on oxidative phosphorylation. *Biochem J* 314 (Pt 3): 743-751.

E

- Egawa K**, Nakashima N, Sharma PM, Maegawa H, Nagai Y, Kashiwagi A, Kikkawa R, Olefsky JM (2000). Persistent activation of phosphatidylinositol 3-kinase causes insulin resistance due to accelerated insulin-induced insulin receptor substrate-1 degradation in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology* 141(6): 1930-1935.
- Ekstrand MI**, Falkenberg M, Rantanen A, Park CB, Gaspari M, Hultenby K, Rustin P, Gustafsson CM, Larsson NG (2004). Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals. *Hum Mol Genet* 13(9): 935-944.
- El-Mowafy AM, Alkhalaf M (2003)**. Resveratrol activates adenylyl-cyclase in human breast cancer cells: a novel, estrogen receptor-independent cytostatic mechanism. *Carcinogenesis* 24(5): 869-873.
- El-Mowafy AM, White RE (1999)**. Resveratrol inhibits MAPK activity and nuclear translocation in coronary artery smooth muscle: reversal of endothelin-1 stimulatory effects. *FEBS Lett* 451(1): 63-67.
- Emanuelli B**, Peraldi P, Filloux C, Sawka-Verhelle D, Hilton D, Van Obberghen E (2000). SOCS-3 is an insulin-induced negative regulator of insulin signaling. *J Biol Chem* 275(21): 15985-15991.
- Endo M**, Masaki T, Seike M, Yoshimatsu H (2007). TNF-alpha induces hepatic steatosis in mice by enhancing gene expression of sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c). *Exp Biol Med (Maywood)* 232(5): 614-621.
- Engeli S (2008)**. Dysregulation of the endocannabinoid system in obesity. *J Neuroendocrinol* 20 Suppl 1: 110-115.
- Engeli S**, Böhnke J, Feldpausch M, Gorzelniak K, Janke J, Bátkai S, Pacher P, Harvey-White J, Luft FC, Sharma AM, Jordan J (2005). Activation of the peripheral endocannabinoid system in human obesity. *Diabetes* 54(10): 2838-43.
- Engelking LJ**, Liang G, Hammer RE, Takaishi K, Kuriyama H, Evers BM, Li WP, Horton JD, Goldstein JL, Brown MS (2005). Schoenheimer effect explained-feedback regulation of cholesterol synthesis in mice mediated by Insig proteins. *J Clin Invest* 115(9): 2489-2498.
- Engelking LJ**, Kuriyama H, Hammer RE, Horton JD, Brown MS, Goldstein JL, Liang G (2004). Overexpression of Insig-1 in the livers of transgenic mice inhibits SREBP processing and reduces insulin-stimulated lipogenesis. *J Clin Invest* 113(8): 1168-1175.

- Engelking LJ**, Evers BM, Richardson JA, Goldstein JL, Brown MS, Liang G (2006). Severe facial clefting in Insig-deficient mouse embryos caused by sterol accumulation and reversed by lovastatin. *J Clin Invest* 116(9): 2356-2365.
- Evans MJ, Scarpulla RC (1989)**. Interaction of nuclear factors with multiple sites in the somatic cytochrome c promoter. Characterization of upstream NRF-1, ATF, and intron Sp1 recognition sequences. *J Biol Chem* 264(24): 14361-14368.
- Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (2001)**. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 285(19): 2486-2497.

F

- Fajas L**, Schoonjans K, Gelman L, Kim JB, Najib J, Martin G, Fruchart JC, Briggs M, Spiegelman BM, Auwerx J (1999). Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism. *Mol Cell Biol* 19(8): 5495-5503.
- Falchuk KR**, Fiske SC, Haggitt RC, Federman M, Trey C (1980). Pericentral hepatic fibrosis and intracellular hyalin in diabetes mellitus. *Gastroenterology* 78(3): 535-541.
- Falck-Ytter Y**, Younossi ZM, Marchesini G, McCullough AJ (2001). Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes. *Semin Liver Dis* 21(1): 17-26.
- Falkenberg M**, Gaspari M, Rantanen A, Trifunovic A, Larsson NG, Gustafsson CM (2002). Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. *Nat Genet* 31(3): 289-294.
- Falkenberg M**, Larsson NG, Gustafsson CM (2007). DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *Annu Rev Biochem* 76: 679-699.
- Farrell GC, Larter CZ (2006)**. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 43(2 Suppl 1): S99-S112.
- Ferré P, Foufelle F (2007)**. SREBP-1c transcription factor and lipid homeostasis: clinical perspective. *Horm Res* 68(2): 72-82.

- Fleischmann M, Iynedjian PB (2000).** Regulation of sterol regulatory-element binding protein 1 gene expression in liver: role of insulin and protein kinase B/cAkt. *Biochem J* 349(Pt 1): 13-17.
- Fleury C, Neverova M, Collins S, Raimbault S, Champigny O, Levi-Meyrueis C, Bouillaud F, Seldin MF, Surwit RS, Ricquier D, Warden CH (1997).** Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet* 15(3): 269-272.
- Fontaine EM, Moussa M, Devin A, Garcia J, Ghisolfi J, Rigoulet M, Leverve XM (1996).** Effect of polyunsaturated fatty acids deficiency on oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1276(3): 181-187.
- Fontecave M, Lepoivre M, Elleingand E, Gerez C, Guittet O (1998).** Resveratrol, a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase. *FEBS Lett* 421(3): 277-279.
- Ford ES, Giles WH, Dietz WH (2002).** Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA* 287(3): 356-359.
- Foretz M, Guichard C, Ferré P, Fougelle F (1999a).** Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(22): 12737-12742.
- Foretz M, Pacot C, Dugail I, Lemarchand P, Guichard C, Le Lièpvre X, Berthelie-Lubrano C, Spiegelman B, Kim JB, Ferré P, Fougelle F (1999b).** ADD1/SREBP-1c is required in the activation of hepatic lipogenic gene expression by glucose. *Mol Cell Biol* 19(5): 3760-3768.
- Forman HJ, Azzì A (1999).** Production of reactive oxygen species in mitochondria and age-associated pathophysiology: a reality check. In: Cadenas E, Packer L (Eds), *Understanding the Process of Aging, The Roles of Mitochondria, Free Radicals, and Antioxidants*, Marcel Dekker, Inc., New York, p. 73– 94.
- Fougelle F, Ferré P (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): 377-391.
- Fougelle F, Ferré P (2007).** Unfolded protein response: its role in physiology and physiopathology. *Med Sci (Paris)* 23(3): 291-296.
- Frescas D, Valenti L, Accili D (2005).** Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via Sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenetic genes. *J Biol Chem* 280(21): 20589-20595.

- Fride E (2002).** Endocannabinoids in the central nervous system--an overview. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66(2-3): 221-233.
- Fruchart JC, Staels B, Duriez P (2001).** PPARs, metabolic disease and atherosclerosis. *Pharmacol Res* 44(5): 345-352.
- Fujino T, Kondo J, Ishikawa M, Morikawa K, Yamamoto TT (2001).** Acetyl-CoA synthetase 2, a mitochondrial matrix enzyme involved in the oxidation of acetate. *J Biol Chem* 276(14): 11420-11426.
- Furukawa N, Ongusaha P, Jahng WJ, Araki K, Choi CS, Kim HJ, Lee YH, Kaibuchi K, Kahn BB, Masuzaki H, Kim JK, Lee SW, Kim YB (2005).** Role of Rho-kinase in regulation of insulin action and glucose homeostasis. *Cell Metab* 2(2): 119-129.

G

- Galambos JT, Wills CE (1978).** Relationship between 505 paired liver tests and biopsies in 242 obese patients. *Gastroenterology* 74(6): 1191-1195.
- Gaoni Y, Mechoulam R (1964).** Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Am Chem Soc* 86: 1646-1647.
- García-Ruiz I, Rodríguez-Juan C, Díaz-Sanjuan T, del Hoyo P, Colina F, Muñoz-Yagüe T, Solís-Herruzo JA (2006).** Uric acid and anti-TNF antibody improve mitochondrial dysfunction in ob/ob mice. *Hepatology* 44(3): 581-591.
- Gary-Bobo M, Elachouri G, Gallas JF, Janiak P, Marini P, Ravinet-Trillou C, Chabbert M, Cruccioli N, Pfersdorff C, Roque C, Arnone M, Croci T, Soubrié P, Oury-Donat F, Maffrand JP, Scatton B, Lacheretz F, Le Fur G, Herbert JM, Bensaid M (2007).** Rimonabant reduces obesity-associated hepatic steatosis and features of metabolic syndrome in obese Zucker fa/fa rats. *Hepatology* 46(1): 122-129.
- Gary-Bobo M, Elachouri G, Scatton B, Le Fur G, Oury-Donat F, Bensaid M (2006).** The cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant (SR141716) inhibits cell proliferation and increases markers of adipocyte maturation in cultured mouse 3T3 F442A preadipocytes. *Mol Pharmacol* 69(2): 471-478.
- Gasperi V, Fezza F, Pasquariello N, Bari M, Oddi S, Agrò AF, Maccarrone M (2007).** Endocannabinoids in adipocytes during differentiation and their role in glucose uptake. *Cell Mol Life Sci* 64(2): 219-229.
- Gavrilova O, Haluzik M, Matsusue K, Cutson JJ, Johnson L, Dietz KR, Nicol CJ, Vinson C, Gonzalez FJ, Reitman ML (2003).** Liver peroxisome proliferator-activated receptor

- gamma contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass. *J Biol Chem* 278(36): 34268-34276.
- Gilkerson RW, Selker JM, Capaldi RA (2003).** The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett* 546(2-3): 355-358.
- Girard J, Lafontan M (2008).** Impact of visceral adipose tissue on liver metabolism and insulin resistance. Part II: Visceral adipose tissue production and liver metabolism. *Diabetes Metab* 34(5): 439-445.
- Gnoni GV, Paglialonga G (2009).** Resveratrol inhibits fatty acid and triacylglycerol synthesis in rat hepatocytes. *Eur J Clin Invest* 39(3): 211-218.
- Gómez-Domínguez E, Gisbert JP, Moreno-Monteagudo JA, García-Buey L, Moreno-Otero R (2006).** A pilot study of atorvastatin treatment in dyslipemid, non-alcoholic fatty liver patients. *Aliment Pharmacol Ther* 23(11): 1643-1647.
- Gong JP, Onaivi ES, Ishiguro H, Liu QR, Tagliaferro PA, Brusco A, Uhl GR (2006).** Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res* 1071(1): 10-23.
- Gonzalez FJ (2005).** Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. *Mutat Res* 569(1-2): 101-110.
- Gonzalez-Baró MR, Lewin TM, Coleman RA (2007).** Regulation of Triglyceride Metabolism. II. Function of mitochondrial GPAT1 in the regulation of triacylglycerol biosynthesis and insulin action. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292(5): G1195-1199.
- Goodpaster BH, He J, Watkins S, Kelley DE (2001).** Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes. *J Clin Endocrinol Metab* 86(12): 5755-5761.
- Goparaju SK, Ueda N, Taniguchi K, Yamamoto S (1999).** Enzymes of porcine brain hydrolyzing 2-arachidonoylglycerol, an endogenous ligand of cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 57(4): 417-423.
- Greenberg I, Kuehnle J, Mendelson JH, Bernstein JG (1976).** Effects of marihuana use on body weight and caloric intake in humans. *Psychopharmacology (Berl)* 49(1): 79-84.
- Greenleaf AL, Kelly JL, Lehman IR (1986).** Yeast RPO41 gene product is required for transcription and maintenance of the mitochondrial genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(10): 3391-3394.
- Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, Lee D, Goodyear LJ, Kraegen EW, White MF, Shulman GI (1999).** Free fatty acid-induced insulin resistance is associated

with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* 8(6): 1270-1274.

Groen AK, Sips HJ, Vervoorn RC, Tager JM (1982). Intracellular compartmentation and control of alanine metabolism in rat liver parenchymal cells. *Eur J Biochem* 122(1): 87-93.

Guillet-Deniau I, Mieulet V, Le Lay S, Achouri Y, Carré D, Girard J, Fougère F, Ferré P (2002). Sterol regulatory element binding protein-1c expression and action in rat muscles: insulin-like effects on the control of glycolytic and lipogenic enzymes and UCP3 gene expression. *Diabetes* 51(6): 1722-1728.

Gulick T, Cresci S, Caira T, Moore DD, Kelly DP (1994). The peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(23): 11012-11016.

H

Hagopian K, Ramsey JJ, Weindruch R (2003). Caloric restriction increases gluconeogenic and transaminase enzyme activities in mouse liver. *Exp Gerontol* 38(3): 267-278.

Haigis MC, Mostoslavsky R, Haigis KM, Fahie K, Christodoulou DC, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Karow M, Blander G, Wolberger C, Prolla TA, Weindruch R, Alt FW, Guarente L (2006). SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. *Cell* 126(5): 941-954.

Hallows WC, Lee S, Denu JM (2006). Sirtuins deacetylate and activate mammalian acetyl-CoA synthetases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(27): 10230-10235.

Hamaguchi M, Kojima T, Takeda N, Nakagawa T, Taniguchi H, Fujii K, Omatsu T, Nakajima T, Sarui H, Shimazaki M, Kato T, Okuda J, Ida K (2005). The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Intern Med* 143(10): 722-728.

Hao S, Avraham Y, Mechoulam R, Berry EM (2000). Low dose anandamide affects food intake, cognitive function, neurotransmitter and corticosterone levels in diet-restricted mice. *Eur J Pharmacol* 392(3): 147-156.

Harris RA, Huang B, Wu P (2001). Control of pyruvate dehydrogenase kinase gene expression. *Adv Enzyme Regul* 41: 269-288.

- Harrison SA**, Fincke C, Helinski D, Torgerson S, Hayashi P (2004). A pilot study of orlistat treatment in obese, non-alcoholic steatohepatitis patients. *Aliment Pharmacol Ther* 20(6): 623-628.
- Harrison SA**, Torgerson S, Hayashi P, Ward J, Schenker S (2003). Vitamin E and vitamin C treatment improves fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 98(11): 2485-2490.
- Hasegawa T**, Yoneda M, Nakamura K, Makino I, Terano A (2001). Plasma transforming growth factor-beta1 level and efficacy of alpha-tocopherol in patients with non-alcoholic steatohepatitis: a pilot study. *Aliment Pharmacol Ther* 15(10): 1667-1672.
- Haworth RS**, Avkiran M (2001). Inhibition of protein kinase D by resveratrol. *Biochem Pharmacol* 62(12): 1647-1651.
- Hegarty BD**, Bobard A, Hainault I, Ferré P, Bossard P, Foufelle F (2005). Distinct roles of insulin and liver X receptor in the induction and cleavage of sterol regulatory element-binding protein-1c. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(3): 791-796.
- Hensley K**, Kotake Y, Sang H, Pye QN, Wallis GL, Kolker LM, Tabatabaie T, Stewart CA, Konishi Y, Nakae D, Floyd RA (2000). Dietary choline restriction causes complex I dysfunction and increased H₂O₂ generation in liver mitochondria. *Carcinogenesis* 21(5): 983-989.
- Herkenham M**, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC (1990). Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(5): 1932-1936.
- Herling AW**, Gossel M, Haschke G, Stengelin S, Kuhlmann J, Müller G, Schmoll D, Kramer W (2007). CB1 receptor antagonist AVE1625 affects primarily metabolic parameters independently of reduced food intake in Wistar rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293(3): E826-832.
- Herling AW**, Kilp S, Elvert R, Haschke G, Kramer W (2008a). Increased energy expenditure contributes more to the body weight-reducing effect of rimonabant than reduced food intake in candy-fed wistar rats. *Endocrinology* 149(5): 2557-2566.
- Herling AW**, Kilp S, Juretschke HP, Neumann-Haefelin C, Gerl M, Kramer W (2008b). Reversal of visceral adiposity in candy-diet fed female Wistar rats by the CB1 receptor antagonist rimonabant. *Int J Obes (Lond)* 32(9): 1363-1372.
- Higuchi M**, Proske RJ, Yeh ET (1998). Inhibition of mitochondrial respiratory chain complex I by TNF results in cytochrome c release, membrane permeability transition, and apoptosis. *Oncogene* 17(19): 2515-2524.

- Hildebrandt AL**, Kelly-Sullivan DM, Black SC (2003). Antiobesity effects of chronic cannabinoid CB1 receptor antagonist treatment in diet-induced obese mice. *Eur J Pharmacol* 462(1-3): 125-132.
- Hillard CJ**, Edgemond WS, Jarrahan A, Campbell WB (1997). Accumulation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion. *J Neurochem* 69(2): 631-638.
- Hillard CJ**, Wilkison DM, Edgemond WS, Campbell WB (1995). Characterization of the kinetics and distribution of N-arachidonylethanolamine (anandamide) hydrolysis by rat brain. *Biochim Biophys Acta* 1257(3): 249-256.
- Hirosumi J**, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS (2002). A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420(6913): 333-336.
- Hoffman AF**, Oz M, Caulder T, Lupica CR (2003). Functional tolerance and blockade of long-term depression at synapses in the nucleus accumbens after chronic cannabinoid exposure. *J Neurosci* 23(12): 4815-4820.
- Hollander P** (2007). Endocannabinoid blockade for improving glycemic control and lipids in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Med* 120(2 Suppl 1): S18-32.
- Holness MJ**, Bulmer K, Smith ND, Sugden MC (2003). Investigation of potential mechanisms regulating protein expression of hepatic pyruvate dehydrogenase kinase isoforms 2 and 4 by fatty acids and thyroid hormone. *Biochem J* 369(Pt 3): 687-695.
- Horlander JC**, Kwo PY, Cummings OW, Koukoulis G (2001). Atorvastatin for the treatment of NASH. *Gastroenterology* 120(suppl1): 2767.
- Horman S**, Browne G, Krause U, Patel J, Vertommen D, Bertrand L, Lavoigne A, Hue L, Proud C, Rider M (2002). Activation of AMP-activated protein kinase leads to the phosphorylation of elongation factor 2 and an inhibition of protein synthesis. *Curr Biol* 12(16): 1419-1423.
- Horton JD**, Bashmakov Y, Shimomura I, Shimano H (1998). Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and re-fed mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(11): 5987-5992.
- Horton JD**, Shah NA, Warrington JA, Anderson NN, Park SW, Brown MS, Goldstein JL (2003). Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(21): 12027-12032.

- Hotta K**, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, Nishida M, Kihara S, Sakai N, Nakajima T, Hasegawa K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Hanafusa T, Matsuzawa Y (2000). Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(6): 1595-1599.
- Hou X**, Xu S, Maitland-Toolan KA, Sato K, Jiang B, Ido Y, Lan F, Walsh K, Wierzbicki M, Verbeuren TJ, Cohen RA, Zang M (2008). SIRT1 regulates hepatocyte lipid metabolism through activating AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 283(29): 20015-20026.
- Howitz KT**, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA (2003). Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425(6954): 191-196.
- Howlett AC** (2002). The cannabinoid receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69: 619-631.
- Howlett AC** (2004). Efficacy in CB1 receptor-mediated signal transduction. *Br J Pharmacol* 142(8): 1209-1218.
- Howlett AC**, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 54(2): 161-202.
- Hruszkewycz AM** (1988). Evidence for mitochondrial DNA damage by lipid peroxidation. *Biochem Biophys Res Commun* 153(1): 191-197.
- Hruszkewycz AM**, Bergtold DS (1990). The 8-hydroxyguanine content of isolated mitochondria increases with lipid peroxidation. *Mutat Res* 244(2): 123-128.
- Hsiao TJ**, Chen JC, Wang JD (2004). Insulin resistance and ferritin as major determinants of nonalcoholic fatty liver disease in apparently healthy obese patients. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28(1): 167-172.
- Hu E**, Liang P, Spiegelman BM (1996). AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 271(18): 10697-10703.
- Hua X**, Yokoyama C, Wu J, Briggs MR, Brown MS, Goldstein JL, Wang X (1993). SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(24): 11603-11607.

- Huang B**, Wu P, Bowker-Kinley MM, Harris RA (2002). Regulation of pyruvate dehydrogenase kinase expression by peroxisome proliferator-activated receptor-alpha ligands, glucocorticoids, and insulin. *Diabetes* 51(2): 276-283.
- Huang MA**, Greenson JK, Chao C, Anderson L, Peterman D, Jacobson J, Emick D, Lok AS, Conjeevaram HS (2005). One-year intense nutritional counseling results in histological improvement in patients with non-alcoholic steatohepatitis: a pilot study. *Am J Gastroenterol* 100(5): 1072-1081.
- Hui JM**, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J (2004). Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin? *Hepatology* 40(1): 46-54.
- Hunte C**, Koepke J, Lange C, Rossmanith T, Michel H (2000). Structure at 2.3 Å resolution of the cytochrome bc(1) complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody Fv fragment. *Structure* 8(6): 669-684.
- Huss JM, Kelly DP** (2004). Nuclear receptor signaling and cardiac energetics. *Circ Res* 95(6): 568-578.
- Huss JM**, Kopp RP, Kelly DP (2002). Peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1alpha (PGC-1alpha) coactivates the cardiac-enriched nuclear receptors estrogen-related receptor-alpha and -gamma. Identification of novel leucine-rich interaction motif within PGC-1alpha. *J Biol Chem* 277(43): 40265-40274.
- Hutter E**, Renner K, Pfister G, Stöckl P, Jansen-Dürr P, Gnaiger E (2004). Senescence-associated changes in respiration and oxidative phosphorylation in primary human fibroblasts. *Biochem J* 380(Pt 3): 919-928.

I

- Iizuka K**, Bruick RK, Liang G, Horton JD, Uyeda K (2004). Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(19): 7281-7286.
- Iizuka K**, Miller B, Uyeda K (2006). Deficiency of carbohydrate-activated transcription factor ChREBP prevents obesity and improves plasma glucose control in leptin-deficient (ob/ob) mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291(2): E358-364.
- Ikeda Y**, Yamamoto J, Okamura M, Fujino T, Takahashi S, Takeuchi K, Osborne TF, Yamamoto TT, Ito S, Sakai J (2001). Transcriptional regulation of the murine acetyl-CoA synthetase 1 gene through multiple clustered binding sites for sterol regulatory

- element-binding proteins and a single neighboring site for Sp1. *J Biol Chem* 276(36): 34259-34269.
- Ikejima K**, Honda H, Yoshikawa M, Hirose M, Kitamura T, Takei Y, Sato N (2001). Leptin augments inflammatory and profibrogenic responses in the murine liver induced by hepatotoxic chemicals. *Hepatology* 34(2): 288-297.
- Ikejima K**, Okumura K, Kon K, Takei Y, Sato N (2007). Role of adipocytokines in hepatic fibrogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 22 Suppl 1: S87-92.
- Ikejima K**, Takei Y, Honda H, Hirose M, Yoshikawa M, Zhang YJ, Lang T, Fukuda T, Yamashina S, Kitamura T, Sato N (2002). Leptin receptor-mediated signaling regulates hepatic fibrogenesis and remodeling of extracellular matrix in the rat. *Gastroenterology* 122(5): 1399-1410.
- Imai S**, Armstrong CM, Kaeberlein M, Guarente L (2000). Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 403(6771): 795-800.
- Ingram DK**, Zhu M, Mamczarz J, Zou S, Lane MA, Roth GS, deCabo R (2006). Calorie restriction mimetics: an emerging research field. *Aging Cell* 5(2): 97-108.
- Inoue M**, Ohtake T, Motomura W, Takahashi N, Hosoki Y, Miyoshi S, Suzuki Y, Saito H, Kohgo Y, Okumura T (2005). Increased expression of PPARgamma in high fat diet-induced liver steatosis in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 336(1): 215-222.
- Iossa S**, Lionetti L, Mollica MP, Crescenzo R, Barletta A, Liverini G (2000). Effect of long-term high-fat feeding on energy balance and liver oxidative activity in rats. *Br J Nutr* 84(3): 377-385.
- Ishii S**, Iizuka K, Miller BC, Uyeda K (2004). Carbohydrate response element binding protein directly promotes lipogenic enzyme gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(44): 15597-15602.
- Itani SI**, Ruderman NB, Schmieder F, Boden G (2002). Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I κ B-alpha. *Diabetes* 51(7): 2005-2011.
- Itoh S**, Tsukada Y, Motomura Y, Ichinoe A (1979). Five patients with nonalcoholic diabetic cirrhosis. *Acta Hepatogastroenterol (Stuttg)* 26(2): 90-97.
- Izzo AA**, Fezza F, Capasso R, Bisogno T, Pinto L, Iuvone T, Esposito G, Mascolo N, Di Marzo V, Capasso F (2001). Cannabinoid CB1-receptor mediated regulation of gastrointestinal motility in mice in a model of intestinal inflammation. *Br J Pharmacol* 134(3): 563-570.

J

- Jaburek M**, Varecha M, Gimeno RE, Dembski M, Jezek P, Zhang M, Burn P, Tartaglia LA, Garlid KD (1999). Transport function and regulation of mitochondrial uncoupling proteins 2 and 3. *J Biol Chem* 274(37): 26003-26007.
- Jacobus WE**, Moreadith RW, Vandegaer KM (1982). Mitochondrial respiratory control. Evidence against the regulation of respiration by extramitochondrial phosphorylation potentials or by [ATP]/[ADP] ratios. *J Biol Chem* 257(5): 2397-2402.
- Jäger S**, Handschin C, St-Pierre J, Spiegelman BM (2007). AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(29): 12017-12022.
- Jakobs S** (2006). High resolution imaging of live mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1763(5-6): 561-575.
- James AM**, Wei YH, Pang CY, Murphy MP (1996). Altered mitochondrial function in fibroblasts containing MELAS or MERRF mitochondrial DNA mutations. *Biochem J* 318 (Pt 2): 401-407.
- Jang M**, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275(5297): 218-220.
- Jayatilake GS**, Jayasuriya H, Lee ES, Koonchanok NM, Geahlen RL, Ashendel CL, McLaughlin JL, Chang CJ (1993). Kinase inhibitors from *Polygonum cuspidatum*. *J Nat Prod* 56(10): 1805-1810.
- Jbilo O**, Ravinet-Trillou C, Arnone M, Buisson I, Bribes E, Péleraux A, Pénarier G, Soubrié P, Le Fur G, Galiègue S, Casellas P (2005). The CB1 receptor antagonist rimonabant reverses the diet-induced obesity phenotype through the regulation of lipolysis and energy balance. *FASEB J* 19(11): 1567-1569.
- Jeong WI**, Osei-Hyiaman D, Park O, Liu J, Bátkai S, Mukhopadhyay P, Horiguchi N, Harvey-White J, Marsicano G, Lutz B, Gao B, Kunos G (2008). Paracrine activation of hepatic CB1 receptors by stellate cell-derived endocannabinoids mediates alcoholic fatty liver. *Cell Metab* 7(3): 227-235.
- Ji C** (2008). Dissection of endoplasmic reticulum stress signaling in alcoholic and non-alcoholic liver injury. *J Gastroenterol Hepatol* 23 Suppl 1: S16-24.

- Jin XH**, Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Tonai T, Ueda N (2007). Discovery and characterization of a Ca²⁺-independent phosphatidylethanolamine N-acyltransferase generating the anandamide precursor and its congeners. *J Biol Chem* 282(6): 3614-3623.
- Jöbsis FF, Stainsby WN (1968)**. Oxidation of NADH during contractions of circulated mammalian skeletal muscle. *Respir Physiol* 4(3): 292-300.
- Jorgensen SB**, Nielsen JN, Birk JB, Olsen GS, Viollet B, Andreelli F, Schjerling P, Vaulont S, Hardie DG, Hansen BF, Richter EA, Wojtaszewski JF (2004). The alpha2-5'AMP-activated protein kinase is a site 2 glycogen synthase kinase in skeletal muscle and is responsive to glucose loading. *Diabetes* 53(12): 3074-3081.
- Juan-Picó P**, Fuentes E, Bermúdez-Silva FJ, Javier Díaz-Molina F, Ripoll C, Rodríguez de Fonseca F, Nadal A (2006). Cannabinoid receptors regulate Ca(2+) signals and insulin secretion in pancreatic beta-cell. *Cell Calcium* 39(2): 155-162.

K

- Kabashima T**, Kawaguchi T, Wadzinski BE, Uyeda K (2003). Xylulose 5-phosphate mediates glucose-induced lipogenesis by xylulose 5-phosphate-activated protein phosphatase in rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(9): 5107-5112.
- Kamei Y**, Ohizumi H, Fujitani Y, Nemoto T, Tanaka T, Takahashi N, Kawada T, Miyoshi M, Ezaki O, Kakizuka A (2003). PPARgamma coactivator 1beta/ERR ligand 1 is an ERR protein ligand, whose expression induces a high-energy expenditure and antagonizes obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(21): 12378-12383.
- Kauppinen RA, Nicholls DG (1986)**. Synaptosomal bioenergetics. The role of glycolysis, pyruvate oxidation and responses to hypoglycaemia. *Eur J Biochem* 158(1): 159-165.
- Kawaguchi K**, Sakaida I, Tsuchiya M, Omori K, Takami T, Okita K (2004). Pioglitazone prevents hepatic steatosis, fibrosis, and enzyme-altered lesions in rat liver cirrhosis induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet. *Biochem Biophys Res Commun* 315(1): 187-195.
- Kawaguchi T**, Osatomi K, Yamashita H, Kabashima T, Uyeda K (2002). Mechanism for fatty acid "sparing" effect on glucose-induced transcription: regulation of carbohydrate-responsive element-binding protein by AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 277(6): 3829-3835.

- Kawaguchi T**, Takenoshita M, Kabashima T, Uyeda K (2001). Glucose and cAMP regulate the L-type pyruvate kinase gene by phosphorylation/dephosphorylation of the carbohydrate response element binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(24): 13710-13715.
- Kelly DP, Scarpulla RC (2004)**. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev* 18(4): 357-368.
- Kelly JL, Greenleaf AL, Lehman IR (1986)**. Isolation of the nuclear gene encoding a subunit of the yeast mitochondrial RNA polymerase. *J Biol Chem* 261(22): 10348-10351.
- Kelly JL, Lehman IR (1986)**. Yeast mitochondrial RNA polymerase. Purification and properties of the catalytic subunit. *J Biol Chem* 261(22): 10340-10347.
- Kern WH, Heger AH, Payne JH, DeWind LT (1973)**. Fatty metamorphosis of the liver in morbid obesity. *Arch Pathol* 96(5): 342-346.
- Khuchua Z, Belikova Y, Kuznetsov AV, Gellerich FN, Schild L, Neumann HW, Kunz WS (1994)**. Caffeine and Ca²⁺ stimulate mitochondrial oxidative phosphorylation in saponin-skinned human skeletal muscle fibers due to activation of actomyosin ATPase. *Biochim Biophys Acta* 1188(3): 373-379.
- Kim JB, Sarraf P, Wright M, Yao KM, Mueller E, Solanes G, Lowell BB, Spiegelman BM (1998a)**. Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. *J Clin Invest* 101(1): 1-9.
- Kim JB, Wright HM, Wright M, Spiegelman BM (1998b)**. ADD1/SREBP1 activates PPARgamma through the production of endogenous ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(8): 4333-4337.
- Kim JK, Fillmore JJ, Sunshine MJ, Albrecht B, Higashimori T, Kim DW, Liu ZX, Soos TJ, Cline GW, O'Brien WR, Littman DR, Shulman GI (2004)**. PKC-theta knockout mice are protected from fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 114(6): 823-827.
- Kim SY, Kim HI, Kim TH, Im SS, Park SK, Lee IK, Kim KS, Ahn YH (2004)**. SREBP-1c mediates the insulin-dependent hepatic glucokinase expression. *J Biol Chem* 279(29): 30823-30829.
- Kimura Y, Okuda H, Arichi S (1985)**. Effects of stilbenes on arachidonate metabolism in leukocytes. *Biochim Biophys Acta* 834(2): 275-278.
- Kiyici M, Gulden M, Gurel S, Nak SG, Dolar E, Savci G, Adim SB, Yerci O, Memik F (2003)**. Ursodeoxycholic acid and atorvastatin in the treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *Can J Gastroenterol* 17(12): 713-718.

- Kleiner DE**, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ: Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network (2005). Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 41(6): 1313-1321.
- Kola B**, Hubina E, Tucci SA, Kirkham TC, Garcia EA, Mitchell SE, Williams LM, Hawley SA, Hardie DG, Grossman AB, Korbonits M (2005). Cannabinoids and ghrelin have both central and peripheral metabolic and cardiac effects via AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 280(26): 25196-25201.
- Kopp P** (1998). Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the 'French paradox'? *Eur J Endocrinol* 138(6): 619-620.
- Koretsky AP, Balaban RS** (1987). Changes in pyridine nucleotide levels alter oxygen consumption and extra-mitochondrial phosphates in isolated mitochondria: a ³¹P-NMR and NAD(P)H fluorescence study. *Biochim Biophys Acta* 893(3): 398-408.
- Kotha A**, Sekharam M, Cilenti L, Siddiquee K, Khaled A, Zervos AS, Carter B, Turkson J, Jove R (2006). Resveratrol inhibits Src and Stat3 signaling and induces the apoptosis of malignant cells containing activated Stat3 protein. *Mol Cancer Ther* 5(3):621-629.
- Koubova J, Guarente L** (2003). How does calorie restriction work? *Genes Dev* 17(3): 313-321.
- Krähenbühl S**, Talos C, Fischer S, Reichen J (1994). Toxicity of bile acids on the electron transport chain of isolated rat liver mitochondria. *Hepatology* 19(2): 471-479.
- Kressler D**, Schreiber SN, Knutti D, Kralli A (2002). The PGC-1-related protein PERC is a selective coactivator of estrogen receptor alpha. *J Biol Chem* 277(16): 13918-13925.
- Kristal BS**, Park BK, Yu BP (1996). 4-Hydroxyhexenal is a potent inducer of the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* 271(11): 6033-6038.
- Krssak M**, Falk Petersen K, Dresner A, DiPietro L, Vogel SM, Rothman DL, Roden M, Shulman GI (1999). Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a ¹H NMR spectroscopy study. *Diabetologia* 42(1): 113-116.
- Kruse B**, Narasimhan N, Attardi G (1989). Termination of transcription in human mitochondria: identification and purification of a DNA binding protein factor that promotes termination. *Cell* 58(2): 391-397.
- Kugelmas M**, Hill DB, Vivian B, Marsano L, McClain CJ (2003). Cytokines and NASH: a pilot study of the effects of lifestyle modification and vitamin E. *Hepatology* 38(2): 413-419.

- Kundu JK**, Shin YK, Kim SH, Surh YJ (2006). Resveratrol inhibits phorbol ester-induced expression of COX-2 and activation of NF-kappaB in mouse skin by blocking IkappaB kinase activity. *Carcinogenesis* 27(7): 1465-1474.
- Kunos G, Pacher P (2004)**. Cannabinoids cool the intestine. *Nat Med* 10(7): 678-679.
- Kunz I**, Meier MK, Bourson A, Fisseha M, Schilling W (2008). Effects of rimonabant, a cannabinoid CB1 receptor ligand, on energy expenditure in lean rats. *Int J Obes (Lond)* 32(5): 863-870.
- Kunz WS**, Kuznetsov AV, Gellerich FN (1993). Mitochondrial oxidative phosphorylation in saponin-skinned human muscle fibers is stimulated by caffeine. *FEBS Lett* 323(1-2): 188-190.

L

- Lafontan M, Girard J (2008)**. Impact of visceral adipose tissue on liver metabolism. Part I: heterogeneity of adipose tissue and functional properties of visceral adipose tissue. *Diabetes Metab* 34(4 Pt 1): 317-327.
- Lagouge M**, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P, Auwerx J (2006). Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* 127(6): 1109-1122.
- Lambert DM, Fowler CJ (2005)**. The endocannabinoid system: drug targets, lead compounds, and potential therapeutic applications. *J Med Chem* 48(16): 5059-5087.
- Landry J**, Sutton A, Tafrov ST, Heller RC, Stebbins J, Pillus L, Sternglanz R (2000). The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(11): 5807-5811.
- Lardy HA, Wellman H (1952)**. Oxidative phosphorylations; rôle of inorganic phosphate and acceptor systems in control of metabolic rates. *J Biol Chem* 195(1): 215-224.
- Larsson NG**, Wang J, Wilhelmsson H, Oldfors A, Rustin P, Lewandoski M, Barsh GS, Clayton DA (1998). Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet* 18(3): 231-236.
- Laurent A**, Nicco C, Tran Van Nhieu J, Borderie D, Chéreau C, Conti F, Jaffray P, Soubrane O, Calmus Y, Weill B, Batteux F (2004). Pivotal role of superoxide anion and beneficial effect of antioxidant molecules in murine steatohepatitis. *Hepatology* 39(5): 1277-1285.

- Laurin J**, Lindor KD, Crippin JS, Gossard A, Gores GJ, Ludwig J, Rakela J, McGill DB (1996). Ursodeoxycholic acid or clofibrate in the treatment of non-alcohol-induced steatohepatitis: a pilot study. *Hepatology* 23(6): 1464-1567.
- Leclercq IA**, Farrell GC, Field J, Bell DR, Gonzalez FJ, Robertson GR (2000). CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest* 105(8): 1067-1075.
- Leclercq IA**, Farrell GC, Schriemer R, Robertson GR (2002). Leptin is essential for the hepatic fibrogenic response to chronic liver injury. *J Hepatol* 37(2): 206-213.
- Lee Y**, Wang MY, Kakuma T, Wang ZW, Babcock E, McCorkle K, Higa M, Zhou YT, Unger RH (2001). Liporegulation in diet-induced obesity. The antisteatotic role of hyperleptinemia. *J Biol Chem* 276(8): 5629-5635.
- Lehmann JM**, Kliewer SA, Moore LB, Smith-Oliver TA, Oliver BB, Su JL, Sundseth SS, Winegar DA, Blanchard DE, Spencer TA, Willson TM (1997). Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem* 272(6): 3137-3140.
- Lenaz G**, Bovina C, D'Aurelio M, Fato R, Formiggini G, Genova ML, Giuliano G, Merlo Pich M, Paolucci U, Parenti Castelli G, Ventura B (2002). Role of mitochondria in oxidative stress and aging. *Ann N Y Acad Sci* 959: 199-213.
- Leonard BL**, Watson RN, Loomes KM, Phillips AR, Cooper GJ (2005). Insulin resistance in the Zucker diabetic fatty rat: a metabolic characterisation of obese and lean phenotypes. *Acta Diabetol* 42(4): 162-170.
- Leonarduzzi G**, Scavazza A, Biasi F, Chiarpotto E, Camandola S, Vogel S, Dargel R, Poli G (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): 851-857.
- Letteron P**, Fromenty B, Terris B, Degott C, Pessayre D (1996). Acute and chronic hepatic steatosis lead to in vivo lipid peroxidation in mice. *J Hepatol* 24(2): 200-208.
- Lewis GF**, Carpentier A, Adeli K, Giacca A (2002). Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev* 23(2): 201-229.
- Li J**, DeFea K, Roth RA (1999). Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation by an Akt/phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem* 274(14): 9351-9356.

- Li Z**, Yang S, Lin H, Huang J, Watkins PA, Moser AB, Desimone C, Song XY, Diehl AM (2003). Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 37(2): 343-350.
- Liang G**, Yang J, Horton JD, Hammer RE, Goldstein JL, Brown MS (2002). Diminished hepatic response to fasting/refeeding and liver X receptor agonists in mice with selective deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c. *J Biol Chem* 277(11): 9520-9528.
- Lim JH**, Lee HJ, Ho Jung M, Song J (2009). Coupling mitochondrial dysfunction to endoplasmic reticulum stress response: a molecular mechanism leading to hepatic insulin resistance. *Cell Signal* 21(1): 169-177.
- Lin CS, Klingenberg M** (1980). Isolation of the uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria. *FEBS Lett* 113(2): 299-303.
- Lin HZ**, Yang SQ, Chuckaree C, Kuhajda F, Ronnet G, Diehl AM (2000). Metformin reverses fatty liver disease in obese, leptin-deficient mice. *Nat Med* 6(9): 998-1003.
- Lin J**, Puigserver P, Donovan J, Tarr P, Spiegelman BM (2002). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. *J Biol Chem* 277(3): 1645-1648.
- Lin J**, Yang R, Tarr PT, Wu PH, Handschin C, Li S, Yang W, Pei L, Uldry M, Tontonoz P, Newgard CB, Spiegelman BM (2005). Hyperlipidemic effects of dietary saturated fats mediated through PGC-1beta coactivation of SREBP. *Cell* 120(2): 261-273.
- Lin SJ**, Defossez PA, Guarente L (2000). Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 289(5487): 2126-2128.
- Lin SJ**, Ford E, Haigis M, Liszt G, Guarente L (2004). Calorie restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH. *Genes Dev* 18(1): 12-16.
- Lin SJ**, Kaeberlein M, Andalis AA, Sturtz LA, Defossez PA, Culotta VC, Fink GR, Guarente L (2002). Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature* 418(6895): 344-348.
- Lindor KD**, Kowdley KV, Heathcote EJ, Harrison ME, Jorgensen R, Angulo P, Lymp JF, Burgart L, Colin P (2004). Ursodeoxycholic acid for treatment of nonalcoholic steatohepatitis: results of a randomized trial. *Hepatology* 39(3): 770-778.

- Lindsay RS**, Funahashi T, Hanson RL, Matsuzawa Y, Tanaka S, Tataranni PA, Knowler WC, Krakoff J (2002). Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. *Lancet* 360(9326): 57-58.
- Liu YL**, Connoley IP, Wilson CA, Stock MJ (2005). Effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 on oxygen consumption and soleus muscle glucose uptake in Lep(ob)/Lep(ob) mice. *Int J Obes (Lond)* 29(2): 183-187.
- Lochhead PA**, Salt IP, Walker KS, Hardie DG, Sutherland C (2000). 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PEPCK and glucose-6-phosphatase. *Diabetes* 49(6): 896-903.
- Lombard DB**, Alt FW, Cheng HL, Bunkenborg J, Streeper RS, Mostoslavsky R, Kim J, Yancopoulos G, Valenzuela D, Murphy A, Yang Y, Chen Y, Hirschey MD, Bronson RT, Haigis M, Guarente LP, Farese RV Jr, Weissman S, Verdin E, Schwer B (2007). Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation. *Mol Cell Biol* 27(24): 8807-8814.
- López-Vélez M**, Martínez-Martínez F, Del Valle-Ribes C (2003). The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine. *Crit Rev Food Sci Nutr* 43(3): 233-244.
- Ludwig J**, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ (1980). Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 55(7): 434-438.
- Luong A**, Hannah VC, Brown MS, Goldstein JL (2000). Molecular characterization of human acetyl-CoA synthetase, an enzyme regulated by sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem* 275(34): 26458-26466.
- Lutz B** (2002). Molecular biology of cannabinoid receptors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66(2-3): 123-142.

M

- Ma K**, Zhang Y, Elam MB, Cook GA, Park EA (2005). Cloning of the rat pyruvate dehydrogenase kinase 4 gene promoter: activation of pyruvate dehydrogenase kinase 4 by the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator. *J Biol Chem* 280(33): 29525-29532.
- Ma L**, Robinson LN, Towle HC (2006). ChREBP/Mlx is the principal mediator of glucose-induced gene expression in the liver. *J Biol Chem* 281(39): 28721-28730.
- Mackie K, Hille B** (1992). Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(9): 3825-3829.

- Malgat M**, Durrieu G, Mazat JP (1994). Enzymatic and polarographic measurements of the respiratory chain complexes. In: Lestienne P. (editor). *Mitochondrial Diseases*. Springer Verlag: Paris, 1999, pp 357-377.
- Mantena SK**, Vaughn DP, Andringa KK, Eccleston HB, King AL, Abrams GA, Doeller JE, Kraus DW, Darley-USmar VM, Bailey SM (2009). High fat diet induces dysregulation of hepatic oxygen gradients and mitochondrial function in vivo. *Biochem J* 417(1): 183-193.
- Mao W**, Yu XX, Zhong A, Li W, Brush J, Sherwood SW, Adams SH, Pan G (1999). UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells. *FEBS Lett* 443(3): 326-330.
- Marchesini G**, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Forlani G, Melchionda N (2001a). Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 50(8): 1844-1850.
- Marchesini G**, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Zoli M, Melchionda N (2001b). Metformin in non-alcoholic steatohepatitis. *Lancet* 358(9285): 893-894.
- Marchesini G**, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, Natale S, Vanni E, Villanova N, Melchionda N, Rizzetto M (2003). Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* 37(4): 917-923.
- Marchesini G**, Marzocchi R, Agostini F, Bugianesi E (2005). Nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol* 16(4): 421-427.
- Martin RJ** (1974). In vivo lipogenesis and enzyme levels in adipose and liver tissues from pair-fed genetically obese and lean rats. *Life Sci* 14(8): 1447-1453.
- Masoro EJ** (2000). Caloric restriction and aging: an update. *Exp Gerontol* 35(3): 299-305.
- Masters BS**, Stohl LL, Clayton DA (1987). Yeast mitochondrial RNA polymerase is homologous to those encoded by bacteriophages T3 and T7. *Cell* 51(1): 89-99.
- Matias I, Di Marzo V** (2007). Endocannabinoids and the control of energy balance. *Trends Endocrinol Metab* 18(1): 27-37.
- Matias I**, Gonthier MP, Orlando P, Martiadis V, De Petrocellis L, Cervino C, Petrosino S, Hoareau L, Festy F, Pasquali R, Roche R, Maj M, Pagotto U, Monteleone P, Di Marzo V (2006). Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *J Clin Endocrinol Metab* 91(8): 3171-3180.
- Matsuda M**, Korn BS, Hammer RE, Moon YA, Komuro R, Horton JD, Goldstein JL, Brown MS, Shimomura I (2001). SREBP cleavage-activating protein (SCAP) is required for

- increased lipid synthesis in liver induced by cholesterol deprivation and insulin elevation. *Genes Dev* 15(10): 1206-1216.
- Matsuhashi T**, Liu X, Nishizawa Y, Usukura J, Wozniak M, Wakabayashi T (1996). Mechanism of the formation of megamitochondria in the mouse liver induced by chloramphenicol. *Toxicol Lett* 86(1): 47-54.
- Matsusue K**, Haluzik M, Lambert G, Yim SH, Gavrilova O, Ward JM, Brewer B Jr, Reitman ML, Gonzalez FJ (2003). Liver-specific disruption of PPARgamma in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes. *J Clin Invest* 111(5): 737-747.
- Mattar SG**, Velcu LM, Rabinovitz M, Demetris AJ, Krasinskas AM, Barinas-Mitchell E, Eid GM, Ramanathan R, Taylor DS, Schauer PR (2005). Surgically-induced weight loss significantly improves nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome. *Ann Surg* 242(4): 610-617
- McCulloch V**, Seidel-Rogol BL, Shadel GS (2002). A human mitochondrial transcription factor is related to RNA adenine methyltransferases and binds S-adenosylmethionine. *Mol Cell Biol* 22(4): 1116-1125.
- McPartland J**, Di Marzo V, De Petrocellis L, Mercer A, Glass M (2001). Cannabinoid receptors are absent in insects. *J Comp Neurol* 436(4): 423-429.
- McPartland JM**, Agrawal J, Gleeson D, Heasman K, Glass M (2006). Cannabinoid receptors in invertebrates. *J Evol Biol* 19(2): 366-373.
- Mechoulam R**, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, Pertwee RG, Griffin G, Bayewitch M, Barg J, Vogel Z (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 50(1): 83-90.
- Meirhaeghe A**, Crowley V, Lenaghan C, Lelliott C, Green K, Stewart A, Hart K, Schinner S, Sethi JK, Yeo G, Brand MD, Cortright RN, O'Rahilly S, Montague C, Vidal-Puig AJ (2003). Characterization of the human, mouse and rat PGC1 beta (peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1 beta) gene in vitro and in vivo. *Biochem J* 373(Pt 1): 155-165.
- Memon RA**, Grunfeld C, Moser AH, Feingold KR (1994). Fatty acid synthesis in obese insulin resistant diabetic mice. *Horm Metab Res* 26(2): 85-87.
- Memon RA**, Tecott LH, Nonogaki K, Beigneux A, Moser AH, Grunfeld C, Feingold KR (2000). Up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR-alpha) and PPAR-gamma messenger ribonucleic acid expression in the liver in murine obesity:

- troglitazone induces expression of PPAR-gamma-responsive adipose tissue-specific genes in the liver of obese diabetic mice. *Endocrinology* 141(11): 4021-4031.
- Miele L**, Grieco A, Armuzzi A, Candelli M, Zocco MA, Forgione A, Alfei B, Rapaccini GL, Gasbarrini G, Gasbarrini A (2003). Nonalcoholic-steatohepatitis (NASH) and hepatic mitochondrial beta-oxidation. *J Hepatol* 38(suppl 2): 197.
- Migrenne S**, Lacombe A, Lefèvre AL, Pruniaux MP, Guillot E, Galzin AM, Magnan C (2009). Adiponectin is required to mediate rimonabant-induced improvement of insulin sensitivity but not body weight loss in diet-induced obese mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296(4): R929-935.
- Minokoshi Y**, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Müller C, Carling D, Kahn BB (2002). Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 415(6869): 339-433.
- Mitchell P** (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191:144-148.
- Moeschel K**, Beck A, Weigert C, Lammers R, Kalbacher H, Voelter W, Schleicher ED, Häring HU, Lehmann R (2004). Protein kinase C-zeta-induced phosphorylation of Ser318 in insulin receptor substrate-1 (IRS-1) attenuates the interaction with the insulin receptor and the tyrosine phosphorylation of IRS-1. *J Biol Chem* 279(24): 25157-25163.
- Moldrich G, Wenger T** (2000). Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study. *Peptides* 21(11): 1735-1742.
- Moncion A**, Truong NT, Garrone A, Beaune P, Barouki R, De Waziers I (2002). Identification of a 16-nucleotide sequence that mediates post-transcriptional regulation of rat CYP2E1 by insulin. *J Biol Chem* 277(48): 45904-45910.
- Monteleone P**, Matias I, Martiadis V, De Petrocellis L, Maj M, Di Marzo V (2005). Blood levels of the endocannabinoid anandamide are increased in anorexia nervosa and in binge-eating disorder, but not in bulimia nervosa. *Neuropsychopharmacology* 30(6): 1216-1221.
- Montoya J**, Christianson T, Levens D, Rabinowitz M, Attardi G (1982). Identification of initiation sites for heavy-strand and light-strand transcription in human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(23): 7195-7199.
- Montoya J**, Ojala D, Attardi G (1981). Distinctive features of the 5'-terminal sequences of the human mitochondrial mRNAs. *Nature* 290(5806): 465-470.

- Moon YA**, Shah NA, Mohapatra S, Warrington JA, Horton JD (2001). Identification of a mammalian long chain fatty acyl elongase regulated by sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem* 276(48): 45358-45366.
- Mootha VK**, Handschin C, Arlow D, Xie X, St Pierre J, Sihag S, Yang W, Altshuler D, Puigserver P, Patterson N, Willy PJ, Schulman IG, Heyman RA, Lander ES, Spiegelman BM (2004). Erralpha and Gabpa/b specify PGC-1alpha-dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(17): 6570-6575.
- Moreno-Sánchez R**, Hogue BA, Hansford RG (1990). Influence of NAD-linked dehydrogenase activity on flux through oxidative phosphorylation. *Biochem J* 268(2): 421-428.
- Mothe I, Van Obberghen E** (1996). Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on multiple serine residues, 612, 632, 662, and 731, modulates insulin action. *J Biol Chem* 271(19): 11222-11227.
- Motojima K**, Passilly P, Peters JM, Gonzalez FJ, Latruffe N (1998). Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma activators in a tissue- and inducer-specific manner. *J Biol Chem* 273(27): 16710-16714.
- Moynihan KA**, Grimm AA, Plueger MM, Bernal-Mizrachi E, Ford E, Cras-Méneur C, Permutt MA, Imai S (2005). Increased dosage of mammalian Sir2 in pancreatic beta cells enhances glucose-stimulated insulin secretion in mice. *Cell Metab* 2(2): 105-117.
- Mu J**, Zhuang SY, Kirby MT, Hampson RE, Deadwyler SA (1999). Cannabinoid receptors differentially modulate potassium A and D currents in hippocampal neurons in culture. *J Pharmacol Exp Ther* 291(2): 893-902.
- Munday MR**, Campbell DG, Carling D, Hardie DG (1998). Identification by amino acid sequencing of three major regulatory phosphorylation sites on rat acetyl-CoA carboxylase. *Eur J Biochem* 175(2): 331-338.
- Munro S**, Thomas KL, Abu-Shaar M (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365(6441): 61-65.
- Muoio DM**, Seefeld K, Witters LA, Coleman RA (1999). AMP-activated kinase reciprocally regulates triacylglycerol synthesis and fatty acid oxidation in liver and muscle: evidence that sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase is a novel target. *Biochem J* 338 (Pt 3): 783-791.

Murphy MP (1989). Slip and leak in mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 977(2): 123-141.

Musso G, Gambino R, De Michieli F, Cassader M, Rizzetto M, Durazzo M, Fagà E, Silli B, Pagano G (2003). Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 37(4) :909-916.

N

Nair S, Diehl AM, Wiseman M, Farr GH Jr, Perrillo RP (2004). Metformin in the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a pilot open label trial. *Aliment Pharmacol Ther* 20(1): 23-28.

Nakamuta M, Kohjima M, Morizono S, Kotoh K, Yoshimoto T, Miyagi I, Enjoji M (2005). Evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med* 16(4): 631-635.

Neuschwander-Tetri BA, Brunt EM, Wehmeier KR, Oliver D, Bacon BR (2003). Improved nonalcoholic steatohepatitis after 48 weeks of treatment with the PPAR-gamma ligand rosiglitazone. *Hepatology* 38(4): 1008-1017.

Nicholls DG, Ferguson SJ (1992). In : Bioenergetics, 2nd edition. Academic Press Limited, London. p.82-87.

Nicholls DG, Ferguson SJ (2002). Bioenergetics 3. Academic Press, London. p.287.

Nissen SE, Wolski K (2007). Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med* 356(24): 2457-2471.

Nobili V, Pastore A, Gaeta LM, Tozzi G, Comparcola D, Sartorelli MR, Marcellini M, Bertini E, Piemonte F (2005). Glutathione metabolism and antioxidant enzymes in patients affected by nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Chim Acta* 355(1-2): 105-111.

Nohturfft A, Brown MS, Goldstein JL (1998). Topology of SREBP cleavage-activating protein, a polytopic membrane protein with a sterol-sensing domain. *J Biol Chem* 273(27): 17243-17250.

Nonomura S, Kanagawa H, Makimoto A (1963). Chemical constituents of polygonaceous Plants. I. Studies on the components of Ko-jo-kon (*Polygonium Cuspidatum* Sieb. et Zucc.) *Yakugaku Zasshi* 83: 988-990.

O

- Oana F**, Takeda H, Hayakawa K, Matsuzawa A, Akahane S, Isaji M, Akahane M (2005). Physiological difference between obese (fa/fa) Zucker rats and lean Zucker rats concerning adiponectin. *Metabolism* 54(8): 995-1001.
- Oh SY**, Cho YK, Kang MS, Yoo TW, Park JH, Kim HJ, Park DI, Sohn CI, Jeon WK, Kim BI, Son BH, Shin JH (2006). The association between increased alanine aminotransferase activity and metabolic factors in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism* 55(12): 1604-1609.
- Ojala D**, Montoya J, Attardi G (1981). tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature* 290(5806): 470-474.
- Okamoto Y**, Morishita J, Tsuboi K, Tonai T, Ueda N (2004). Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *J Biol Chem* 279(7): 5298-5305.
- Oliveira CP**, Coelho AM, Barbeiro HV, Lima VM, Soriano F, Ribeiro C, Molan NA, Alves VA, Souza HP, Machado MC, Carrilho FJ (2006). Liver mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of experimental nonalcoholic fatty liver disease. *Braz J Med Biol Res* 39(2): 189-194.
- Onaivi ES**, Leonard CM, Ishiguro H, Zhang PW, Lin Z, Akinshola BE, Uhl GR (2002). Endocannabinoids and cannabinoid receptor genetics. *Prog Neurobiol* 66(5): 307-344.
- Ong JP**, Elariny H, Collantes R, Younoszai A, Chandhoke V, Reines HD, Goodman Z, Younossi ZM (2005). Predictors of nonalcoholic steatohepatitis and advanced fibrosis in morbidly obese patients. *Obes Surg* 15(3): 310-315.
- Onyango P**, Celic I, McCaffery JM, Boeke JD, Feinberg AP (2002). SIRT3, a human SIR2 homologue, is an NAD-dependent deacetylase localized to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(21): 13653-13658.
- Oral EA**, Simha V, Ruiz E, Andewelt A, Premkumar A, Snell P, Wagner AJ, DePaoli AM, Reitman ML, Taylor SI, Gorden P, Garg A (2002). Leptin-replacement therapy for lipodystrophy. *N Engl J Med* 346(8): 570-578.
- Osei-Hyiaman D**, DePetrillo M, Pacher P, Liu J, Radaeva S, Bátkai S, Harvey-White J, Mackie K, Offertáler L, Wang L, Kunos G (2005). Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest* 115(5): 1298-1305.

- Osei-Hyiaman D**, Liu J, Zhou L, Godlewski G, Harvey-White J, Jeong WI, Bátkai S, Marsicano G, Lutz B, Buettner C, Kunos G (2008). Hepatic CB1 receptor is required for development of diet-induced steatosis, dyslipidemia, and insulin and leptin resistance in mice. *J Clin Invest* 118(9): 3160-3169.
- O'Shea D**, Davis SN, Kim RB, Wilkinson GR (1994). Effect of fasting and obesity in humans on the 6-hydroxylation of chlorzoxazone: a putative probe of CYP2E1 activity. *Clin Pharmacol Ther* 56(4): 359-367.
- Ozcan U**, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Görgün C, Glimcher LH, Hotamisligil GS (2004). Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 306(5695): 457-461.

P

- Pagano C**, Pilon C, Calcagno A, Urbanet R, Rossato M, Milan G, Bianchi K, Rizzuto R, Bernante P, Federspil G, Vettor R (2007). The endogenous cannabinoid system stimulates glucose uptake in human fat cells via phosphatidylinositol 3-kinase and calcium-dependent mechanisms. *J Clin Endocrinol Metab* 92(12): 4810-4819.
- Pagliarini DJ, Dixon JE** (2006). Mitochondrial modulation: reversible phosphorylation takes center stage? *Trends Biochem Sci* 31(1): 26-34.
- Pagotto U**, Marsicano G, Cota D, Lutz B, Pasquali R (2006). The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr Rev* 27(1): 73-100.
- Palmer M, Schaffner F** (1990). Effect of weight reduction on hepatic abnormalities in overweight patients. *Gastroenterology* 99(5): 1408-1413.
- Papa S**, Lorusso M, Capitanio N (1994). Mechanistic and phenomenological features of proton pumps in the respiratory chain of mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 26(6): 609-618.
- Park SY**, Kim HJ, Wang S, Higashimori T, Dong J, Kim YJ, Cline G, Li H, Prentki M, Shulman GI, Mitchell GA, Kim JK (2005). Hormone-sensitive lipase knockout mice have increased hepatic insulin sensitivity and are protected from short-term diet-induced insulin resistance in skeletal muscle and heart. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289(1): E30-39.
- Parola M**, Pinzani M, Casini A, Albano E, Poli G, Gentilini A, Gentilini P, Dianzani MU (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): 1044-1050.
- Patel MS, Korotchkina LG (2006).** Regulation of the pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem Soc Trans* 34(Pt 2): 217-222.
- Paterson JM, Morton NM, Fievet C, Kenyon CJ, Holmes MC, Staels B, Seckl JR, Mullins JJ (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): 7088-7093.
- Paulauskis JD, Sul HS (1989).** Hormonal regulation of mouse fatty acid synthase gene transcription in liver. *J Biol Chem* 264(1): 574-577.
- Pearson KJ, Baur JA, Lewis KN, Peshkin L, Price NL, Labinskyy N, Swindell WR, Kamara D, Minor RK, Perez E, Jamieson HA, Zhang Y, Dunn SR, Sharma K, Pleshko N, Woollett A, Csiszar A, Ikeno Y, Le Couteur D, Elliott PJ, Becker KG, Navas P, Ingram DK, Wolf NS, Ungvari Z, Sinclair DA, de Cabo R (2008).** Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. *Cell Metab* 8(2): 157-168.
- Pehowich DJ (1999).** Thyroid hormone status and membrane n-3 fatty acid content influence mitochondrial proton leak. *Biochim Biophys Acta* 1411(1): 192-200.
- Pérez-Carreras M, Del Hoyo P, Martín MA, Rubio JC, Martín A, Castellano G, Colina F, Arenas J, Solis-Herruzo JA (2003).** Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 38(4): 999-1007.
- Perseghin G, Scifo P, De Cobelli F, Pagliato E, Battezzati A, Arcelloni C, Vanzulli A, Testolin G, Pozza G, Del Maschio A, Luzi L (1999).** Intramyocellular triglyceride content is a determinant of in vivo insulin resistance in humans: a 1H-13C nuclear magnetic resonance spectroscopy assessment in offspring of type 2 diabetic parents. *Diabetes* 48(8): 1600-1606.
- Pessayre D, Berson A, Fromenty B, Mansouri A (2001).** Mitochondria in steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 21(1): 57-69.
- Pessayre D, Mansouri A, Haouzi D, Fromenty B (1999).** Hepatotoxicity due to mitochondrial dysfunction. *Cell Biol Toxicol* 15(6): 367-373.
- Petrosillo G, Portincasa P, Grattagliano I, Casanova G, Matera M, Ruggiero FM, Ferri D, Paradies G (2007).** Mitochondrial dysfunction in rat with nonalcoholic fatty liver. Involvement of complex I, reactive oxygen species and cardiolipin. *Biochim Biophys Acta* 1767(10): 1260-1267.

- Pfluger PT**, Herranz D, Velasco-Miguel S, Serrano M, Tschöp MH (2008). Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(28): 9793-9798.
- Picard F**, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado De Oliveira R, Leid M, McBurney MW, Guarente L (2004). Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature* 429(6993): 771-776.
- Pinto L**, Capasso R, Di Carlo G, Izzo AA (2002). Endocannabinoids and the gut. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66(2-3): 333-341.
- Piomelli D** (2003). The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci* 4(11): 873-884.
- Pirola L, Fröjdö S** (2008). Resveratrol: one molecule, many targets. *IUBMB Life* 60(5): 323-332.
- Pi-Sunyer FX**, Aronne LJ, Heshmati HM, Devin J, Rosenstock J; RIO-North America Study Group (2006). Effect of rimonabant, a cannabinoid-1 receptor blocker, on weight and cardiometabolic risk factors in overweight or obese patients: RIO-North America: a randomized controlled trial. *JAMA* 295(7): 761-775.
- Poirier B**, Bidouard JP, Cadrouvele C, Marniquet X, Staels B, O'Connor SE, Janiak P, Herbert JM (2005). The anti-obesity effect of rimonabant is associated with an improved serum lipid profile. *Diabetes Obes Metab* 7(1): 65-72.
- Postic C**, Dentin R, Denechaud PD, Girard J (2007). ChREBP, a transcriptional regulator of glucose and lipid metabolism. *Annu Rev Nutr* 27: 179-192.
- Postic C, Girard J** (2008). Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest* 118(3): 829-838.
- Promrat K**, Lutchman G, Uwaifo GI, Freedman RJ, Soza A, Heller T, Doo E, Ghany M, Premkumar A, Park Y, Liang TJ, Yanovski JA, Kleiner DE, Hoofnagle JH (2004). A pilot study of pioglitazone treatment for nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 39(1): 188-196.

R

- Rahimian R**, Masih-Khan E, Lo M, van Breemen C, McManus BM, Dubé GP (2001). Hepatic over-expression of peroxisome proliferator activated receptor gamma2 in the

- ob/ob mouse model of non-insulin dependent diabetes mellitus. *Mol Cell Biochem* 224(1-2): 29-37.
- Ramsey JJ**, Johnson DE, Hossner KL, Johnson KA (1996). Metabolic rate, organ mass, and mitochondrial proton leak variations in lean and obese rats. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 113(3): 461-466.
- Randle PJ**, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA (1963). The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1(7285): 785-789.
- Ravinet Trillou C**, Arnone M, Delgorge C, Gonalons N, Keane P, Maffrand JP, Soubrie P (2003). Anti-obesity effect of SR141716, a CB1 receptor antagonist, in diet-induced obese mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284(2): R345-353.
- Rayalam S**, Yang JY, Ambati S, Della-Fera MA, Baile CA (2008). Resveratrol induces apoptosis and inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *Phytother Res* 22(10): 1367-1371.
- Raza H**, Prabu SK, Robin MA, Avadhani NG (2004). Elevated mitochondrial cytochrome P450 2E1 and glutathione S-transferase A4-4 in streptozotocin-induced diabetic rats: tissue-specific variations and roles in oxidative stress. *Diabetes* 53(1): 185-194.
- Reaven GM** (1988). Banting lecture 1988: Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37(12): 1595-1607.
- Rigoulet M**, Fraisse L, Ouhabi R, Guérin B, Fontaine E, Leverve X (1990). Flux-dependent increase in the stoichiometry of charge translocation by mitochondrial ATPase/ATP synthase induced by almitrine. *Biochim Biophys Acta* 1018(1):91-97.
- Rigoulet M**, Leverve X, Fontaine E, Ouhabi R, Guérin B (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.
- Rinaldi-Carmona M**, Barth F, Héaulme M, Shire D, Calandra B, Congy C, Martinez S, Maruani J, Néliat G, Caput D, Ferrara P, Soubrié P, Brelière JC, Le Fur G (1994). SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett* 350(2-3): 240-244.
- Robbe D**, Alonso G, Duchamp F, Bockaert J, Manzoni OJ (2001). Localization and mechanisms of action of cannabinoid receptors at the glutamatergic synapses of the mouse nucleus accumbens. *J Neurosci* 21(1): 109-116.
- Robin MA**, Anandatheerthavarada HK, Biswas G, Sepuri NB, Gordon DM, Pain D, Avadhani NG (2002). Bimodal targeting of microsomal CYP2E1 to mitochondria

- through activation of an N-terminal chimeric signal by cAMP-mediated phosphorylation. *J Biol Chem* 277(43): 40583-40593.
- Robin MA**, Anandatheerthavarada HK, Fang JK, Cudic M, Otvos L, Avadhani NG (2001). Mitochondrial targeted cytochrome P450 2E1 (P450 MT5) contains an intact N terminus and requires mitochondrial specific electron transfer proteins for activity. *J Biol Chem* 276(27): 24680-24689.
- Roden M**, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, Shulman GI (1996). Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest* 97(12): 2859-2865.
- Rodgers JT**, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P (2005). Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* 434(7029): 113-118.
- Rodgers JT, Puigserver P** (2007). Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(31): 12861-12866.
- Rodriguez JC**, Gil-Gómez G, Hegardt FG, Haro D (1994). Peroxisome proliferator-activated receptor mediates induction of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene by fatty acids. *J Biol Chem* 269(29): 18767-18772.
- Rolfe DF, Brand MD** (1996). Contribution of mitochondrial proton leak to skeletal muscle respiration and to standard metabolic rate. *Am J Physiol* 271(4 Pt 1): C1380-1389.
- Rolfe DF, Brown GC** (1997). Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev* 77(3): 731-758.
- Rolfe DF**, Hulbert AJ, Brand MD (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): 405-416.
- Romestaing C**, Piquet MA, Letexier D, Rey B, Mourier A, Servais S, Belouze M, Rouleau V, Dautresme M, Ollivier I, Favier R, Rigoulet M, Duchamp C, Sibille B (2008). Mitochondrial adaptations to steatohepatitis induced by a methionine- and choline-deficient diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294(1): E110-119.
- Rosa G**, Manco M, Vega N, Greco AV, Castagneto M, Vidal H, Mingrone G (2003). Decreased muscle acetyl-coenzyme A carboxylase 2 mRNA and insulin resistance in formerly obese subjects. *Obes Res* 11(11): 1306-1312.
- Rosen ED**, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM (1999). PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell* 4(4): 611-617.

- Rossignol R**, Letellier T, Malgat M, Rocher C, Mazat JP (2000). Tissue variation in the control of oxidative phosphorylation: implication for mitochondrial diseases. *Biochem J* 347 Pt 1: 45-53.
- Rowland NE**, Mukherjee M, Robertson K (2001). Effects of the cannabinoid receptor antagonist SR 141716, alone and in combination with dexfenfluramine or naloxone, on food intake in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 159(1): 111-116.
- Ruhl CE, Everhart JE (2004)**. Epidemiology of nonalcoholic fatty liver. *Clin Liver Dis* 8(3): 501-519, vii.
- Russell AP (2004)**. Lipotoxicity: the obese and endurance-trained paradox. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28 Suppl 4: S66-71.
- Rustin P**, Chretien D, Bourgeron T, Gérard B, Rötig A, Saudubray JM, Munnich A (1994). Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta* 228(1): 35-51.
- Ryysy L**, Häkkinen AM, Goto T, Vehkavaara S, Westerbacka J, Halavaara J, Yki-Järvinen H (2000). Hepatic fat content and insulin action on free fatty acids and glucose metabolism rather than insulin absorption are associated with insulin requirements during insulin therapy in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 49(5): 749-758.

S

- Sakai J**, Rawson RB, Espenshade PJ, Cheng D, Seegmiller AC, Goldstein JL, Brown MS (1998). Molecular identification of the sterol-regulated luminal protease that cleaves SREBPs and controls lipid composition of animal cells. *Mol Cell* 2(4): 505-514.
- Samuel VT**, Liu ZX, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, Romanelli AJ, Shulman GI (2004). Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem* 279(31): 32345-32353.
- Samuel VT**, Liu ZX, Wang A, Beddow SA, Geisler JG, Kahn M, Zhang XM, Monia BP, Bhanot S, Shulman GI (2007). Inhibition of protein kinase Cepsilon prevents hepatic insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 117(3): 739-745.
- Sánchez-Alcázar JA**, Schneider E, Martínez MA, Carmona P, Hernández-Muñoz I, Siles E, De La Torre P, Ruiz-Cabello J, García I, Solis-Herruzo JA (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): 13353-13361.

- Sanyal AJ**, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, Luketic VA, Shiffman ML, Clore JN (2001). Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 120(5): 1183-1192.
- Scarpulla RC (2002)**. Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1576(1-2): 1-14.
- Scarpulla RC (2006)**. Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *J Cell Biochem* 97(4): 673-683.
- Scarpulla RC (2008)**. Nuclear control of respiratory chain expression by nuclear respiratory factors and PGC-1-related coactivator. *Ann N Y Acad Sci* 1147: 321-334.
- Schattenberg JM**, Wang Y, Singh R, Rigoli RM, Czaja MJ (2005). Hepatocyte CYP2E1 overexpression and steatohepatitis lead to impaired hepatic insulin signaling. *J Biol Chem* 280(11): 9887-9894.
- Scheen AJ**, Finer N, Hollander P, Jensen MD, Van Gaal LF; RIO-Diabetes Study Group (2006). Efficacy and tolerability of rimonabant in overweight or obese patients with type 2 diabetes: a randomised controlled study. *Lancet* 368(9548): 1660-1672.
- Scher MB**, Vaquero A, Reinberg D (2007). SirT3 is a nuclear NAD⁺-dependent histone deacetylase that translocates to the mitochondria upon cellular stress. *Genes Dev* 21(8): 920-928.
- Schmid PC**, Zuzarte-Augustin ML, Schmid HH (1985). Properties of rat liver N-acylethanolamine amidohydrolase. *J Biol Chem* 260(26): 14145-14149.
- Schmitz-Peiffer C (2000)**. Signalling aspects of insulin resistance in skeletal muscle: mechanisms induced by lipid oversupply. *Cell Signal* 12(9-10): 583-594.
- Schoonjans K**, Watanabe M, Suzuki H, Mahfoudi A, Krey G, Wahli W, Grimaldi P, Staels B, Yamamoto T, Auwerx J (1995). Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter. *J Biol Chem* 270(33): 19269-19276.
- Schreiber SN**, Emter R, Hock MB, Knutti D, Cardenas J, Podvynec M, Oakeley EJ, Kralli A (2004). The estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) functions in PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha)-induced mitochondrial biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(17): 6472-6477.
- Schröder M**, Kaufman RJ (2005). The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* 74: 739-789.

- Schultz JR**, Tu H, Luk A, Repa JJ, Medina JC, Li L, Schwendner S, Wang S, Thoolen M, Mangelsdorf DJ, Lustig KD, Shan B (2000). Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev* 14(22): 2831-2838.
- Schwer B**, Bunkenborg J, Verdin RO, Andersen JS, Verdin E (2006). Reversible lysine acetylation controls the activity of the mitochondrial enzyme acetyl-CoA synthetase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(27): 10224-10229.
- Schwer B**, North BJ, Frye RA, Ott M, Verdin E (2002). The human silent information regulator (Sir)2 homologue hSIRT3 is a mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide-dependent deacetylase. *J Cell Biol* 158(4): 647-657.
- Schwer B, Verdin E** (2008). Conserved metabolic regulatory functions of sirtuins. *Cell Metab* 7(2): 104-112.
- Seki S**, Kitada T, Sakaguchi H (2005). Clinicopathological significance of oxidative cellular damage in non-alcoholic fatty liver diseases. *Hepatol Res* 33(2): 132-134.
- Seki S**, Kitada T, Yamada T, Sakaguchi H, Nakatani K, Wakasa K (2002). In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver diseases. *J Hepatol* 37(1): 56-62.
- Senn JJ**, Klover PJ, Nowak IA, Zimmers TA, Koniaris LG, Furlanetto RW, Mooney RA (2003). Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. *J Biol Chem* 278(16): 13740-13746.
- Seppälä-Lindroos A**, Vehkavaara S, Häkkinen AM, Goto T, Westerbacka J, Sovijärvi A, Halavaara J, Yki-Järvinen H (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): 3023-3028.
- Serviddio G**, Bellanti F, Tamborra R, Rollo T, Capitanio N, Romano AD, Sastre J, Vendemiale G, Altomare E (2008a). Uncoupling protein-2 (UCP2) induces mitochondrial proton leak and increases susceptibility of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) liver to ischaemia-reperfusion injury. *Gut* 57(7): 957-965.
- Serviddio G**, Bellanti F, Tamborra R, Rollo T, Romano AD, Giudetti AM, Capitanio N, Petrella A, Vendemiale G, Altomare E (2008b). Alterations of hepatic ATP homeostasis and respiratory chain during development of non-alcoholic steatohepatitis in a rodent model. *Eur J Clin Invest* 38(4): 245-252.
- Sewter C**, Berger D, Considine RV, Medina G, Rochford J, Ciaraldi T, Henry R, Dohm L, Flier JS, O'Rahilly S, Vidal-Puig AJ (2002). Human obesity and type 2 diabetes are

- associated with alterations in SREBP1 isoform expression that are reproduced ex vivo by tumor necrosis factor-alpha. *Diabetes* 51(4): 1035-1041.
- Shabalina IG**, Kramarova TV, Nedergaard J, Cannon B (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* 399(3): 405-414.
- Shadel GS, Clayton DA (1997)**. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annu Rev Biochem* 66: 409-435.
- Shang J**, Chen LL, Xiao FX, Sun H, Ding HC, Xiao H (2008). Resveratrol improves non-alcoholic fatty liver disease by activating AMP-activated protein kinase. *Acta Pharmacol Sin* 29(6): 698-706.
- Sheng Z**, Otani H, Brown MS, Goldstein JL (1995). Independent regulation of sterol regulatory element-binding proteins 1 and 2 in hamster liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(4): 935-938.
- Shi H**, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS (2006). TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 116(11): 3015-3025.
- Shi T**, Wang F, Stieren E, Tong Q (2005). SIRT3, a mitochondrial sirtuin deacetylase, regulates mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes. *J Biol Chem* 280(14): 13560-13567.
- Shimano H**, Horton JD, Shimomura I, Hammer RE, Brown MS, Goldstein JL (1997). Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. *J Clin Invest* 99(5): 846-854.
- Shimano H**, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Hasty AH, Osuga J, Tamura Y, Shionoiri F, Iizuka Y, Ohashi K, Harada K, Gotoda T, Ishibashi S, Yamada N (1999). Sterol regulatory element-binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes. *J Biol Chem* 274(50): 35832-35839.
- Shimomura I**, Bashmakov Y, Horton JD (1999a). Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus. *J Biol Chem* 274(42): 30028-30032.
- Shimomura I**, Bashmakov Y, Ikemoto S, Horton JD, Brown MS, Goldstein JL (1999b). Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(24): 13656-13661.

- Shimomura I**, Matsuda M, Hammer RE, Bashmakov Y, Brown MS, Goldstein JL (2000). Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Mol Cell* 6(1): 77-86.
- Shimomura I**, Shimano H, Horton JD, Goldstein JL, Brown MS (1997). Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *J Clin Invest* 99(5): 838-845.
- Shoelson SE**, Herrero L, Naaz A (2007). Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology* 132(6): 2169-2180.
- Siemann EH, Creasy LL** (1992). Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *Am J Eno Vitic* 43: 49-52.
- Silverman JF**, O'Brien KF, Long S, Leggett N, Khazanie PG, Pories WJ, Norris HT, Caro JF (1990). Liver pathology in morbidly obese patients with and without diabetes. *Am J Gastroenterol* 85(10): 1349-1355.
- Simiand J**, Keane M, Keane PE, Soubrié P (1998). SR 141716, a CB1 cannabinoid receptor antagonist, selectively reduces sweet food intake in marmoset. *Behav Pharmacol* 9(2): 179-181.
- Sinha K**, Chaudhary G, Gupta YK (2002). Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. *Life Sci* 71(6): 655-665.
- Skelly MM**, James PD, Ryder SD (2001). Findings on liver biopsy to investigate abnormal liver function tests in the absence of diagnostic serology. *J Hepatol* 35(2): 195-199.
- Slater SJ**, Seiz JL, Cook AC, Stagliano BA, Buzas CJ (2003). Inhibition of protein kinase C by resveratrol. *Biochim Biophys Acta* 1637(1): 59-69.
- Smith JS**, Brachmann CB, Celic I, Kenna MA, Muhammad S, Starai VJ, Avalos JL, Escalante-Semerena JC, Grubmeyer C, Wolberger C, Boeke JD (2000). A phylogenetically conserved NAD⁺-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(12): 6658-6663.
- Sone H**, Shimano H, Sakakura Y, Inoue N, Amemiya-Kudo M, Yahagi N, Osawa M, Suzuki H, Yokoo T, Takahashi A, Iida K, Toyoshima H, Iwama A, Yamada N (2002). Acetyl-coenzyme A synthetase is a lipogenic enzyme controlled by SREBP-1 and energy status. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282(1): E222-E230.
- Spranger J**, Kroke A, Möhlig M, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, Pfeiffer AF (2003). Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet* 361(9353): 226-228.

- Sreekumar R**, Rosado B, Rasmussen D, Charlton M (2003). Hepatic gene expression in histologically progressive non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 38(1): 244-251.
- Starai VJ**, Celic I, Cole RN, Boeke JD, Escalante-Semerena JC (2002). Sir2-dependent activation of acetyl-CoA synthetase by deacetylation of active lysine. *Science* 298(5602): 2390-2392.
- Starai VJ, Escalante-Semerena JC (2004)**. Identification of the protein acetyltransferase (Pat) enzyme that acetylates acetyl-CoA synthetase in *Salmonella enterica*. *J Mol Biol* 340(5): 1005-1012.
- Stella N**, Schweitzer P, Piomelli D (1997). A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature* 388(6644): 773-778.
- Stewart JR**, Christman KL, O'Brian CA (2000). Effects of resveratrol on the autophosphorylation of phorbol ester-responsive protein kinases: inhibition of protein kinase D but not protein kinase C isozyme autophosphorylation. *Biochem Pharmacol* 60(9): 1355-1359.
- Stewart JR, O'Brian CA (2004)**. Resveratrol antagonizes EGFR-dependent Erk1/2 activation in human androgen-independent prostate cancer cells with associated isozyme-selective PKC alpha inhibition. *Invest New Drugs* 22(2): 107-117.
- Stivala LA**, Savio M, Carafoli F, Perucca P, Bianchi L, Maga G, Forti L, Pagnoni UM, Albini A, Prosperi E, Vannini V (2001). Specific structural determinants are responsible for the antioxidant activity and the cell cycle effects of resveratrol. *J Biol Chem* 276(25): 22586-22594.
- Stoekman AK**, Ma L, Towle HC (2004). Mlx is the functional heteromeric partner of the carbohydrate response element-binding protein in glucose regulation of lipogenic enzyme genes. *J Biol Chem* 279(15): 15662-15669.
- St-Pierre J**, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD (2002). Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 277(47): 44784-44790.
- Su JL**, Simmons CJ, Wisely B, Ellis B, Winegar DA (1998). Monitoring of PPAR alpha protein expression in human tissue by the use of PPAR alpha-specific MAbs. *Hybridoma* 17(1): 47-53.
- Sugden MC, Holness MJ (2003)**. Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284(5): E855-E862.

- Sugiura T**, Kondo S, Sukagawa A, Tonegawa T, Nakane S, Yamashita A, Ishima Y, Waku K (1996). Transacylase-mediated and phosphodiesterase-mediated synthesis of N-arachidonylethanolamine, an endogenous cannabinoid-receptor ligand, in rat brain microsomes. Comparison with synthesis from free arachidonic acid and ethanolamine. *Eur J Biochem* 240(1): 53-62.
- Sumida Y**, Nakashima T, Yoh T, Furutani M, Hirohama A, Kakisaka Y, Nakajima Y, Ishikawa H, Mitsuyoshi H, Okanoue T, Kashima K, Nakamura H, Yodoi J (2003). Serum thioredoxin levels as a predictor of steatohepatitis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 38(1): 32-38.
- Summers SA** (2006). Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Prog Lipid Res* 45(1): 42-72.
- Sun NJ**, Woo SH, Cassady JM, Snapka RM (1998). DNA polymerase and topoisomerase II inhibitors from *Psoralea corylifolia*. *J Nat Prod* 61(3): 362-366.
- Suzuki A**, Lindor K, St Saver J, Lymp J, Mendes F, Muto A, Okada T, Angulo P (2005). Effect of changes on body weight and lifestyle in nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 43(6): 1060-1066.

T

- Tadolini B**, Juliano C, Piu L, Franconi F, Cabrini L (2000). Resveratrol inhibition of lipid peroxidation. *Free Radic Res* 33(1): 105-114.
- Tager JM**, Wanders RJ, Groen AK, Kunz W, Bohnensack R, Küster U, Letko G, Böhme G, Duszynski J, Wojtczak L (1983). Control of mitochondrial respiration. *FEBS Lett* 151(1): 1-9.
- Taghibiglou C**, Carpentier A, Van Iderstine SC, Chen B, Rudy D, Aiton A, Lewis GF, Adeli K (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): 8416-8425.
- Takaoka MJ** (1940). Of the phenolic of white hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes. Fil.). *J Faculty Sci Hokkaido Imperial University* 3: 1-16.
- Tedesco L**, Valerio A, Cervino C, Cardile A, Pagano C, Vettor R, Pasquali R, Carruba MO, Marsicano G, Lutz B, Pagotto U, Nisoli E (2008). Cannabinoid type 1 receptor blockade

- promotes mitochondrial biogenesis through endothelial nitric oxide synthase expression in white adipocytes. *Diabetes* 57(8): 2028-2036.
- Teodoro J**, Rolo AP, Oliveira PJ, Palmeira CM (2006). Decreased ANT content in Zucker fatty rats: relevance for altered hepatic mitochondrial bioenergetics in steatosis. *FEBS Lett* 580(8): 2153-2157.
- Teodoro JS**, Rolo AP, Duarte FV, Simões AM, Palmeira CM (2008). Differential alterations in mitochondrial function induced by a choline-deficient diet: understanding fatty liver disease progression. *Mitochondrion* 8(5-6): 367-376.
- Thaler H (1962a)**. The fatty liver and its pathogenetic relation to liver cirrhosis. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med* 335: 180-210.
- Thaler H (1962b)**. Fatty liver, its causes and concomitant diseases. *Dtsch Med Wochenschr* 87: 1049-1055.
- Thaler H (1969)**. Leber Biopsie. Berlin: Springer-Verlag, p. 176.
- Thomas EL**, Hamilton G, Patel N, O'Dwyer R, Doré CJ, Goldin RD, Bell JD, Taylor-Robinson SD (2005). Hepatic triglyceride content and its relation to body adiposity: a magnetic resonance imaging and proton magnetic resonance spectroscopy study. *Gut* 54(1): 122-127.
- Thornton-Jones ZD**, Kennett GA, Benwell KR, Revell DF, Misra A, Sellwood DM, Vickers SP, Clifton PG (2006). The cannabinoid CB1 receptor inverse agonist, rimonabant, modifies body weight and adiponectin function in diet-induced obese rats as a consequence of reduced food intake. *Pharmacol Biochem Behav* 84(2): 353-359.
- Tiranti V**, Savoia A, Forti F, D'Apolito MF, Centra M, Rocchi M, Zeviani M (1997). Identification of the gene encoding the human mitochondrial RNA polymerase (h-mtRPOL) by cyberscreening of the Expressed Sequence Tags database. *Hum Mol Genet* 6(4): 615-625.
- Tsang AW**, Escalante-Semerena JC (1998). CobB, a new member of the SIR2 family of eucaryotic regulatory proteins, is required to compensate for the lack of nicotinate mononucleotide:5,6-dimethylbenzimidazole phosphoribosyltransferase activity in cobT mutants during cobalamin biosynthesis in *Salmonella typhimurium* LT2. *J Biol Chem* 273(48): 31788-31794.
- Tsou K**, Brown S, Sañudo-Peña MC, Mackie K, Walker JM (1998). Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 83(2): 393-411.

Turrens JF (1997). Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep* 17(1): 3-8.

Twitchell W, Brown S, Mackie K (1997). Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 78(1): 43-50.

U

Ueda N, Kurahashi Y, Yamamoto S, Tokunaga T (1995). Partial purification and characterization of the porcine brain enzyme hydrolyzing and synthesizing anandamide. *J Biol Chem* 270(40): 23823-23827.

Ueno T, Sugawara H, Sujaku K, Hashimoto O, Tsuji R, Tamaki S, Torimura T, Inuzuka S, Sata M, Tanikawa K (1997). Therapeutic effects of restricted diet and exercise in obese patients with fatty liver. *J Hepatol* 27(1): 103-107.

Um SH, Frigerio F, Watanabe M, Picard F, Joaquin M, Sticker M, Fumagalli S, Allegrini PR, Kozma SC, Auwerx J, Thomas G (2004). Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* 431(7005): 200-205.

Utzschneider KM, Kahn SE (2006). Review: The role of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Endocrinol Metab* 91(12): 4753-4761.

Uygun A, Kadayifci A, Isik AT, Ozgurtas T, Deveci S, Tuzun A, Yesilova Z, Gulsen M, Dagalp K (2004). Metformin in the treatment of patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 19(5): 537-544.

V

Valenzano DR, Terzibasi E, Genade T, Cattaneo A, Domenici L, Cellierino A (2006). Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. *Curr Biol* 16(3): 296-300.

Van Gaal LF, Rissanen AM, Scheen AJ, Ziegler O, Rössner S; RIO-Europe Study Group (2005). Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. *Lancet* 365(9468): 1389-1397.

Vega RB, Huss JM, Kelly DP (2000). The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Mol Cell Biol* 20(5): 1868-1876.

- Verty AN, Allen AM, Oldfield BJ (2009).** The effects of rimonabant on brown adipose tissue in rat: implications for energy expenditure. *Obesity (Silver Spring)* 17(2): 254-261.
- Vickers SP, Webster LJ, Wyatt A, Dourish CT, Kennett GA (2003).** Preferential effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist, SR 141716, on food intake and body weight gain of obese (fa/fa) compared to lean Zucker rats. *Psychopharmacology (Berl)* 167(1): 103-111.
- Voshol PJ, Haemmerle G, Ouwens DM, Zimmermann R, Zechner R, Teusink B, Maassen JA, Havekes LM, Romijn JA (2003).** Increased hepatic insulin sensitivity together with decreased hepatic triglyceride stores in hormone-sensitive lipase-deficient mice. *Endocrinology* 144(8): 3456-3462.

W

- Wakabayashi T (2002).** Megamitochondria formation - physiology and pathology. *J Cell Mol Med* 6(4): 497-538.
- Wang GL, Fu YC, Xu WC, Feng YQ, Fang SR, Zhou XH (2009).** Resveratrol inhibits the expression of SREBP1 in cell model of steatosis via Sirt1-FOXO1 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 380(3): 644-649.
- Wang Q, Xu J, Rottinghaus GE, Simonyi A, Lubahn D, Sun GY, Sun AY (2002).** Resveratrol protects against global cerebral ischemic injury in gerbils. *Brain Res* 958(2): 439-447.
- Wang RT, Koretz RL, Yee HF Jr (2003).** Is weight reduction an effective therapy for nonalcoholic fatty liver? A systematic review. *Am J Med* 115(7): 554-559.
- Wang X, Briggs MR, Hua X, Yokoyama C, Goldstein JL, Brown MS (1993).** Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. II. Purification and characterization. *J Biol Chem* 268(19): 14497-14504.
- Wang Y, Botolin D, Xu J, Christian B, Mitchell E, Jayaprakasam B, Nair MG, Peters JM, Busik JV, Olson LK, Jump DB (2006).** Regulation of hepatic fatty acid elongase and desaturase expression in diabetes and obesity. *J Lipid Res* 47(9): 2028-2041.
- Wang Y, Leung LK (2007).** Pharmacological concentration of resveratrol suppresses aromatase in JEG-3 cells. *Toxicol Lett* 173(3): 175-180.
- Wang Z, Hall SD, Maya JF, Li L, Asghar A, Gorski JC (2003).** Diabetes mellitus increases the in vivo activity of cytochrome P450 2E1 in humans. *Br J Clin Pharmacol* 55(1): 77-85.

- Wanless IR, Lentz JS (1990).** Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors. *Hepatology* 12(5): 1106-1110.
- Watanabe T, Kubota N, Ohsugi M, Kubota T, Takamoto I, Iwabu M, Awazawa M, Katsuyama H, Hasegawa C, Tokuyama K, Moroi M, Sugi K, Yamauchi T, Noda T, Nagai R, Terauchi Y, Tobe K, Ueki K, Kadowaki T (2009).** Rimonabant ameliorates insulin resistance via both adiponectin-dependent and adiponectin-independent pathways. *J Biol Chem* 284(3): 1803-1812.
- Weltman MD, Farrell GC, Hall P, Ingelman-Sundberg M, Liddle C (1998).** Hepatic cytochrome P450 2E1 is increased in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 27(1): 128-133.
- Wendt IR, Chapman JB (1976).** Fluorometric studies of recovery metabolism of rat fast- and slow-twitch muscles. *Am J Physiol* 230(6): 1644-1649.
- Westwater JO, Fainer D (1958).** Liver impairment in the obese. *Gastroenterology* 34(4): 686-693.
- Williams CM, Kirkham TC (1999).** Anandamide induces overeating: mediation by central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology (Berl)* 1999 Apr;143(3):315-7.
- Williams CM, Kirkham TC (2002).** Reversal of delta 9-THC hyperphagia by SR141716 and naloxone but not dexfenfluramine. *Pharmacol Biochem Behav* 71(1-2): 333-340.
- Williams CM, Rogers PJ, Kirkham TC (1998).** Hyperphagia in pre-fed rats following oral delta9-THC. *Physiol Behav* 65(2): 343-346.
- Wilson RI, Nicoll RA (2002).** Endocannabinoid signaling in the brain. *Science* 296(5568): 678-682.
- Winder WW, Wilson HA, Hardie DG, Rasmussen BB, Hutber CA, Call GB, Clayton RD, Conley LM, Yoon S, Zhou B (1997).** Phosphorylation of rat muscle acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase and protein kinase A. *J Appl Physiol* 82(1): 219-225.
- Wojtczak L, Wieckowski MR (1999).** The mechanisms of fatty acid-induced proton permeability of the inner mitochondrial membrane. *J Bioenerg Biomembr* 31(5): 447-455.
- Wolfe AJ (2005).** The acetate switch. *Microbiol Mol Biol Rev* 69(1): 12-50.
- Wolfrum C, Stoffel M (2006).** Coactivation of Foxa2 through Pgc-1beta promotes liver fatty acid oxidation and triglyceride/VLDL secretion. *Cell Metab* 3(2): 99-110.

- Wood JG**, Rogina B, Lavu S, Howitz K, Helfand SL, Tatar M, Sinclair D (2004). Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature* 430(7000): 686-689.
- World Health Organization (1999)**. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Report of a WHO consultation. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes. *WHO bulletin* p.1-59.
- Wu P**, Blair PV, Sato J, Jaskiewicz J, Popov KM, Harris RA (2000). Starvation increases the amount of pyruvate dehydrogenase kinase in several mammalian tissues. *Arch Biochem Biophys* 381(1): 1-7.
- Wu P**, Sato J, Zhao Y, Jaskiewicz J, Popov KM, Harris RA (1998). Starvation and diabetes increase the amount of pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 4 in rat heart. *Biochem J* 329(Pt 1): 197-201.
- Wu Z**, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, Spiegelman BM (1999). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98(1): 115-124.

X

- Xu H**, Wilcox D, Nguyen P, Voorbach M, Suhar T, Morgan SJ, An WF, Ge L, Green J, Wu Z, Gimeno RE, Reilly R, Jacobson PB, Collins CA, Landschulz K, Surowy T (2006). Hepatic knockdown of mitochondrial GPAT1 in ob/ob mice improves metabolic profile. *Biochem Biophys Res Commun* 349(1): 439-448.

Y

- Yabe D**, Komuro R, Liang G, Goldstein JL, Brown MS (2003). Liver-specific mRNA for Insig-2 down-regulated by insulin: implications for fatty acid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(6): 3155-3160.
- Yahagi N**, Shimano H, Hasty AH, Matsuzaka T, Ide T, Yoshikawa T, Amemiya-Kudo M, Tomita S, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Osuga J, Harada K, Gotoda T, Nagai R, Ishibashi S, Yamada N (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): 19353-19357.

- Yamagishi SI**, Edelstein D, Du XL, Kaneda Y, Guzmán M, Brownlee M (2001). Leptin induces mitochondrial superoxide production and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic endothelial cells by increasing fatty acid oxidation via protein kinase A. *J Biol Chem* 276(27): 25096-25100.
- Yamashita H**, Takenoshita M, Sakurai M, Bruick RK, Henzel WJ, Shillinglaw W, Arnot D, Uyeda K (2001). A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(16): 9116-9121.
- Yamauchi T**, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferré P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T (2002). Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 28(11): 1288-1295.
- Yang S**, Zhu H, Li Y, Lin H, Gabrielson K, Trush MA, Diehl AM (2000). Mitochondrial adaptations to obesity-related oxidant stress. *Arch Biochem Biophys* 378(2): 259-268.
- Yang T**, Espenshade PJ, Wright ME, Yabe D, Gong Y, Aebersold R, Goldstein JL, Brown MS (2002). Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell* 110(4): 489-500.
- Yesilova Z**, Yaman H, Oktenli C, Ozcan A, Uygun A, Cakir E, Sanisoglu SY, Erdil A, Ates Y, Aslan M, Musabak U, Erbil MK, Karaeren N, Dagalp K (2005). Systemic markers of lipid peroxidation and antioxidants in patients with nonalcoholic Fatty liver disease. *Am J Gastroenterol* 100(4): 850-855.
- Yki-Järvinen H** (2005). Fat in the liver and insulin resistance. *Ann Med* 37(5): 347-356.
- Yokoyama C**, Wang X, Briggs MR, Admon A, Wu J, Hua X, Goldstein JL, Brown MS (1993). SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell* 75(1): 187-197.
- Yu C**, Chen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H, Wang Y, Bergeron R, Kim JK, Cushman SW, Cooney GJ, Atcheson B, White MF, Kraegen EW, Shulman GI (2002). Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem* 277(52): 50230-50236.
- Yu S**, Matsusue K, Kashireddy P, Cao WQ, Yeldandi V, Yeldandi AV, Rao MS, Gonzalez FJ, Reddy JK (2003). Adipocyte-specific gene expression and adipogenic steatosis in

the mouse liver due to peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 (PPARgamma1) overexpression. *J Biol Chem* 278(1): 498-505.

Yu XX, Mao W, Zhong A, Schow P, Brush J, Sherwood SW, Adams SH, Pan G (2000). Characterization of novel UCP5/BMCP1 isoforms and differential regulation of UCP4 and UCP5 expression through dietary or temperature manipulation. *FASEB J* 14(11): 1611-1618.

Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, Shoelson SE (2001). Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science* 293(5535): 1673-1677.

Z

Zang M, Xu S, Maitland-Toolan KA, Zuccollo A, Hou X, Jiang B, Wierzbicki M, Verbeuren TJ, Cohen RA (2006). Polyphenols stimulate AMP-activated protein kinase, lower lipids, and inhibit accelerated atherosclerosis in diabetic LDL receptor-deficient mice. *Diabetes* 55(8):2180-91.

Zelman S (1952). The liver in obesity. *Arch Intern Med* 90(2): 141-156.

Zhang Y, Ma K, Sadana P, Chowdhury F, Gaillard S, Wang F, McDonnell DP, Unterman TG, Elam MB, Park EA (2006). Estrogen-related receptors stimulate pyruvate dehydrogenase kinase isoform 4 gene expression. *J Biol Chem* 281(52): 39897-39906.

Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE (2001). Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 108(8): 1167-1174.

Zhou M, Xu A, Tam PK, Lam KS, Chan L, Hoo RL, Liu J, Chow KH, Wang Y (2008). Mitochondrial dysfunction contributes to the increased vulnerabilities of adiponectin knockout mice to liver injury. *Hepatology* 48(4): 1087-1096.

Zong H, Ren JM, Young LH, Pypaert M, Mu J, Birnbaum MJ, Shulman GI (2002). AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(25): 15983-15987.

Zucker LM, Zucker TF (1961). Fatty, a new mutation in the rat. *J Hered* 52: 275-278.

Résumé :

La stéatose hépatique est une pathologie associée à l'obésité et à l'insulinorésistance. Les mécanismes à l'origine du développement de la stéatose hépatique sont loin d'être élucidés. Cependant, une altération de la fonction mitochondriale pourrait contribuer à l'accumulation de lipides dans le foie. Par conséquent, l'objectif de ce travail est d'évaluer la fonction mitochondriale dans deux modèles animaux de stéatose hépatique ainsi que les effets de deux molécules, le rimonabant et le resvératrol. Dans un modèle génétique d'obésité, le rat Zucker, aucune altération de la phosphorylation oxydative n'est observée. Dans un modèle plus physiologique, le rat alimenté avec un régime riche en lipides pendant différentes durées, dans les premiers temps d'un apport accru en lipides, le métabolisme hépatique est orienté de manière à utiliser ou à stocker l'excès de lipides. Cette première adaptation est ensuite inversée et une diminution de l'oxydation des acides gras mais également une diminution du stockage de triglycérides sont observées. Le traitement avec du rimonabant de rats alimentés avec un régime en gras, a un effet bénéfique sur la fonction mitochondriale hépatique notamment en augmentant l'entrée des acides gras dans la mitochondrie et donc leur oxydation. Enfin, le traitement par du resvératrol de cellules HepG2, entraîne une augmentation de la consommation d'oxygène mitochondriale et une augmentation de l'activité du complexe I mais sans modification de la biogenèse mitochondriale. Même si la mitochondrie semble peu affectée au cours du développement de la stéatose hépatique, la considérer comme une cible thérapeutique reste pertinent.

Mots clés : *stéatose hépatique, mitochondrie, métabolisme lipidique, rimonabant, resvératrol.*

English title : MITOCHONDRIAL ENERGY METABOLISM IN THE DEVELOPMENT OF HEPATIC STEATOSIS.

Abstract :

Hepatic steatosis is a pathology associated with obesity and insulin resistance. Mechanisms behind the development of hepatic steatosis are far from being elucidated. However, impaired mitochondrial function could contribute to the accumulation of lipids in the liver. Therefore, the objective of this work is to evaluate mitochondrial function in two animal models of fatty liver and the effects of two molecules, rimonabant and resveratrol. In a genetic model of obesity, Zucker rat, no alteration of the oxidative phosphorylation is observed. In a more physiological model, rats fed with a high fat diet during different time, in the first times of high fat diet, hepatic metabolism is oriented to use or store the fat excess. The first adjustment is then reversed and a decrease in the fatty acids oxidation but also a decrease in the storage of triglycerides are observed. Treatment with rimonabant in rats fed a high fat diet, has a beneficial effect on liver mitochondrial function especially by increasing fatty acids entry into the mitochondria and thus their oxidation. Finally, treatment with resveratrol in HepG2 cells, causes an increase in mitochondrial oxygen consumption and an increase in complex I activity, but without change in mitochondrial biogenesis. Although the mitochondria seems not much affected during the development of hepatic steatosis, considered it as a therapeutic target is still relevant.

Keywords : *hepatic steatosis, mitochondria, lipids metabolism, rimonabant, resveratrol.*

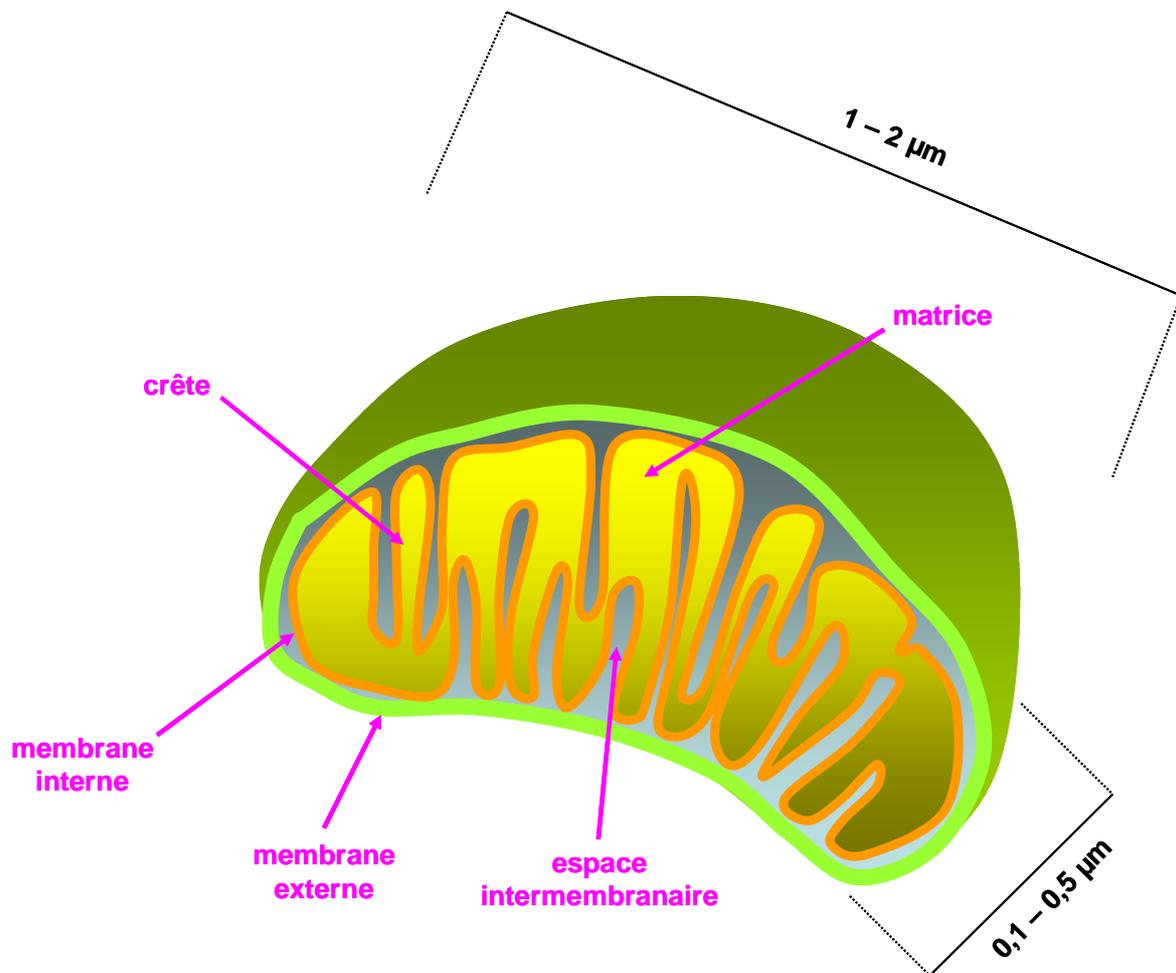


Figure 1 : Structure d'une mitochondrie

La mitochondrie est composée de deux membranes, externe et interne, délimitant un espace intermembranaire et une matrice. Les replis caractéristiques de la membrane interne sont appelés crêtes mitochondriales.

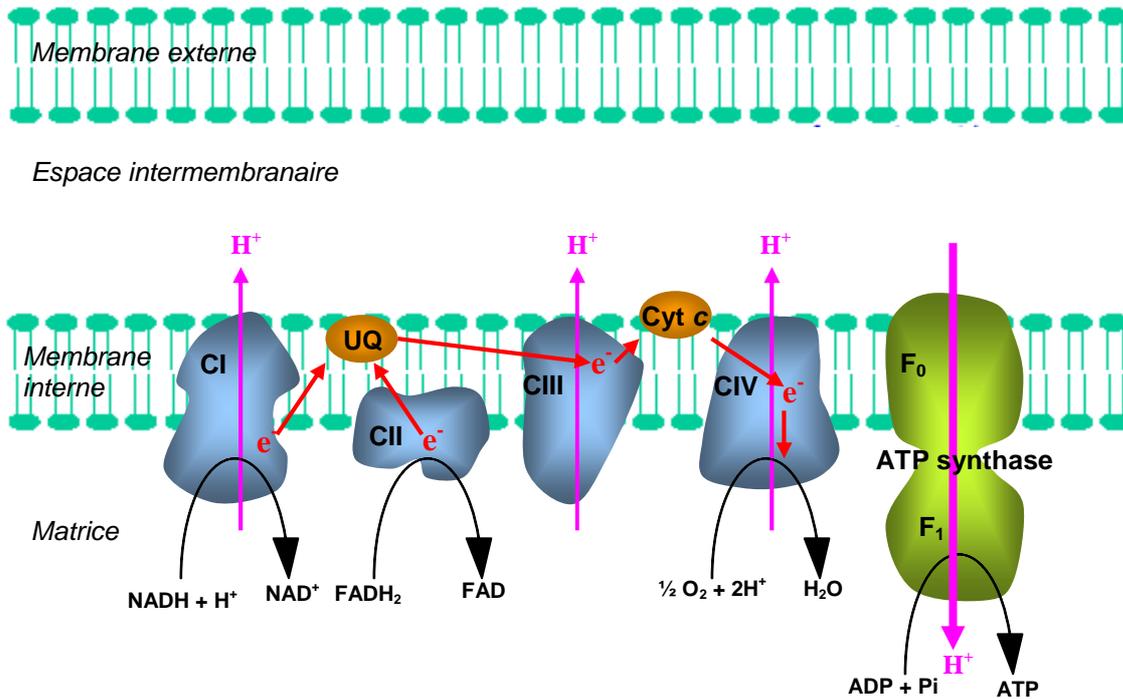


Figure 2 : Chaîne respiratoire mitochondriale

Sur ce schéma sont représentés les quatre complexes de la chaîne respiratoire (CI à CIV), les transporteurs mobiles d'électrons (UQ : ubiquinone et Cyt c : cytochrome c), ainsi que la $\text{F}_0\text{-F}_1$ ATP synthase. Le trajet des électrons (e^-) est représenté par les flèches rouges et celui des protons (H^+) par des flèches roses.

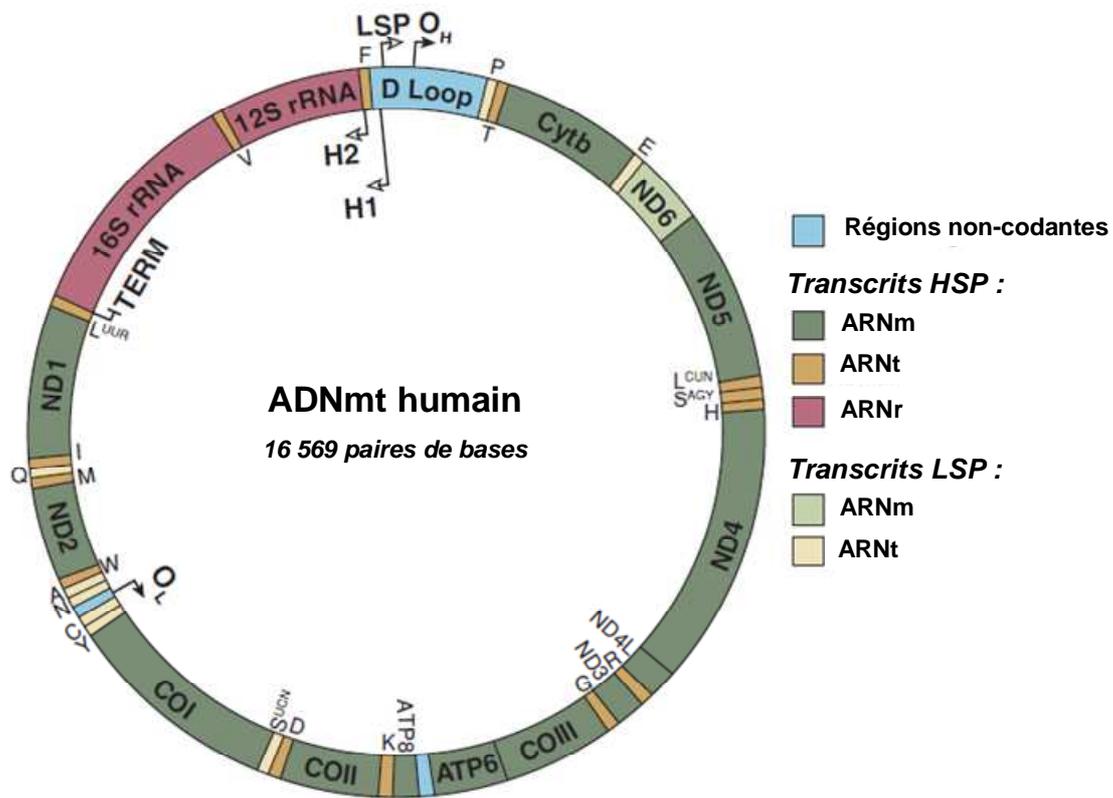


Figure 3 : ADN mitochondrial

L'ADN mitochondrial humain est une molécule bicaténaire circulaire d'environ 16 kilobases dépourvue d'introns et d'histones qui code pour 13 ARN messagers (ARNm), 22 ARN de transfert (ARNt) et 2 ARN ribosomiques (ARNr). Chaque brin contient un promoteur pour l'initiation de la transcription, le HSP (heavy strand promoter) et le LSP (light strand promoter). Le promoteur HSP comprend deux sites d'initiation de la transcription, H1 et H2. Les gènes codant pour les ARNt sont annotés avec la lettre correspondant à l'acide aminé. ATP: ATP synthase, CO: cytochrome *c* oxydase, Cytb: cytochrome *b*, ND: NADH déshydrogénase, O_H: origine de réplication du brin lourd, O_L: origine de réplication du brin léger, TERM: site de terminaison de la transcription. Schéma adapté de Falkenberg *et al.* (2007).

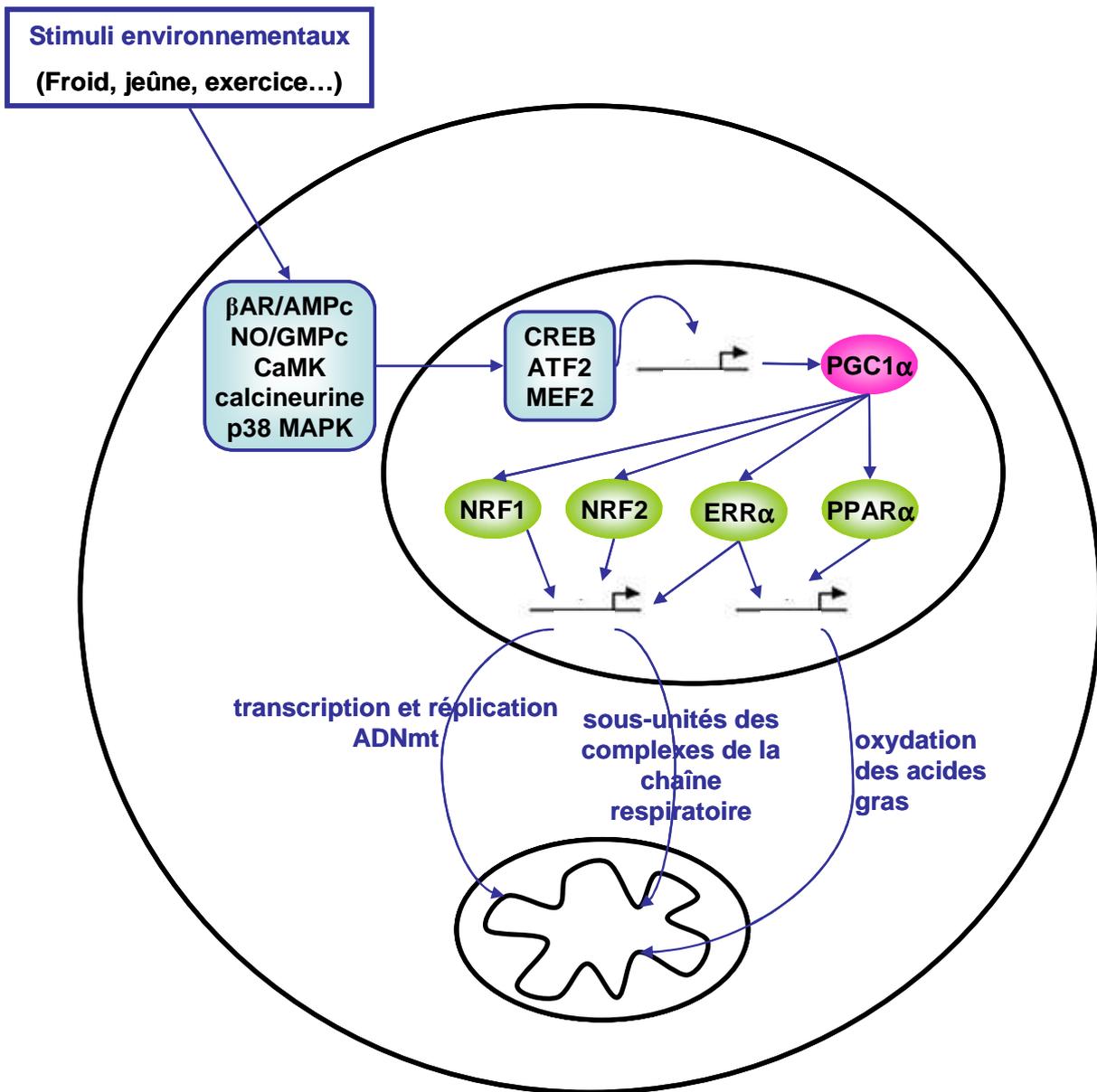


Figure 4 : Régulation du métabolisme énergétique mitochondrial orchestrée par PGC1 α

Des stimuli environnementaux régulent l'expression de PGC1 α de manière tissu-spécifique *via* des voies de signalisation dépendantes de l'AMPC, du GMPc et du Ca²⁺ qui aboutissent à l'activation de facteurs de transcription tels que CREB, MEF2 et ATF2. PGC1 α en association avec d'autres facteurs de transcription active l'expression de gènes nucléaires codant pour des protéines impliquées dans la transcription et la réplication de l'ADNmt, dans le fonctionnement de la chaîne respiratoire mais également dans l'oxydation mitochondriale des acides gras. β AR: récepteur β -adrénergique, NO: oxyde nitrique, CaMK: calcium/calmodulin-dependent protein kinase, p38 MAPK: mitogen-activated protein kinase, CREB: cAMP response element binding, ATF2: activating transcription factor 2, MEF2: myocyte enhancer factor 2.

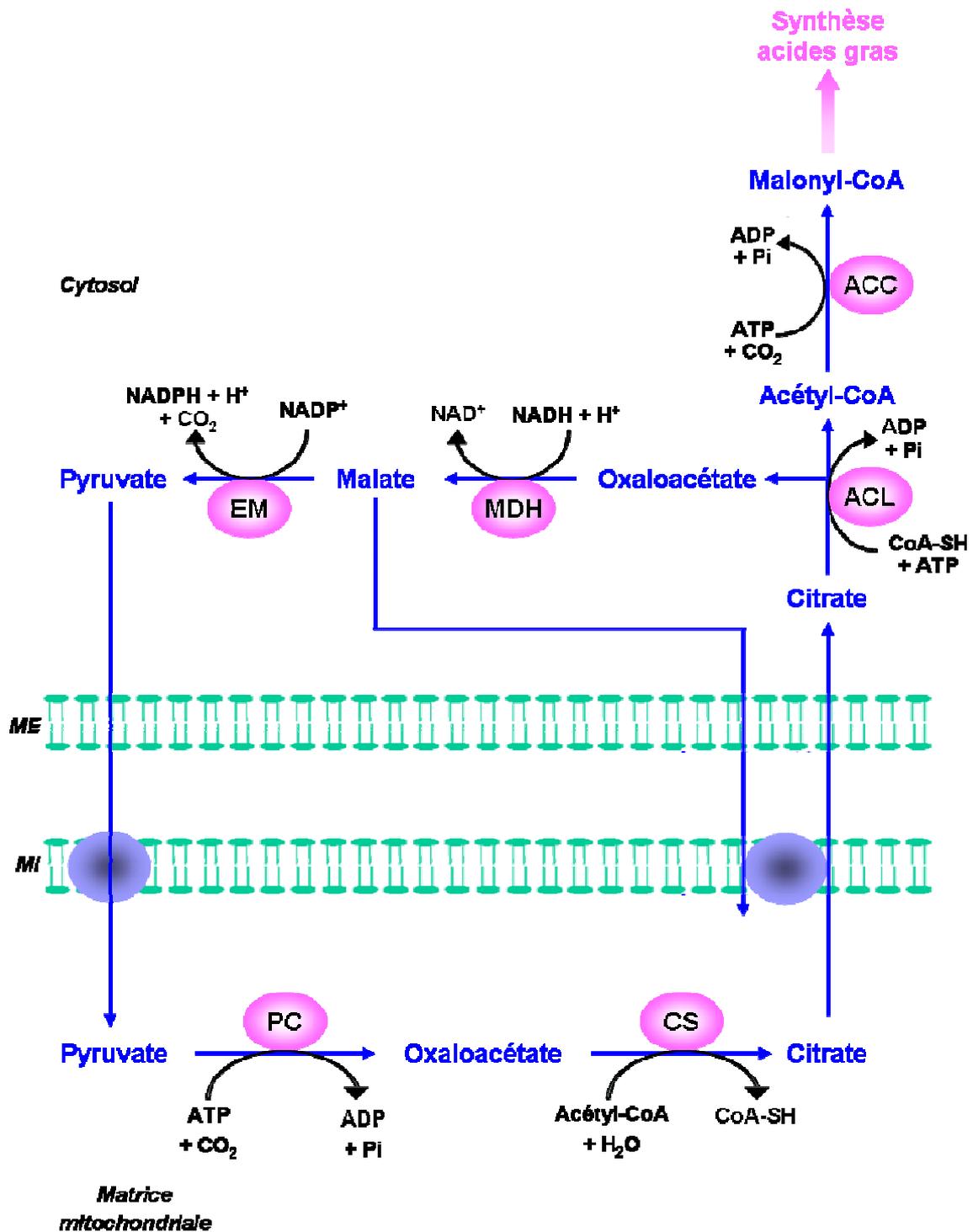


Figure 5 : "Navette citrate-malate-pyruvate"

ACC : Acétyl-CoA carboxylase, ACL : ATP-citrate lyase, CS : Citrate synthase, EM : Enzyme malique, MDH : Malate déshydrogénase, ME : Membrane externe, MI : Membrane interne, PC : Pyruvate carboxylase.

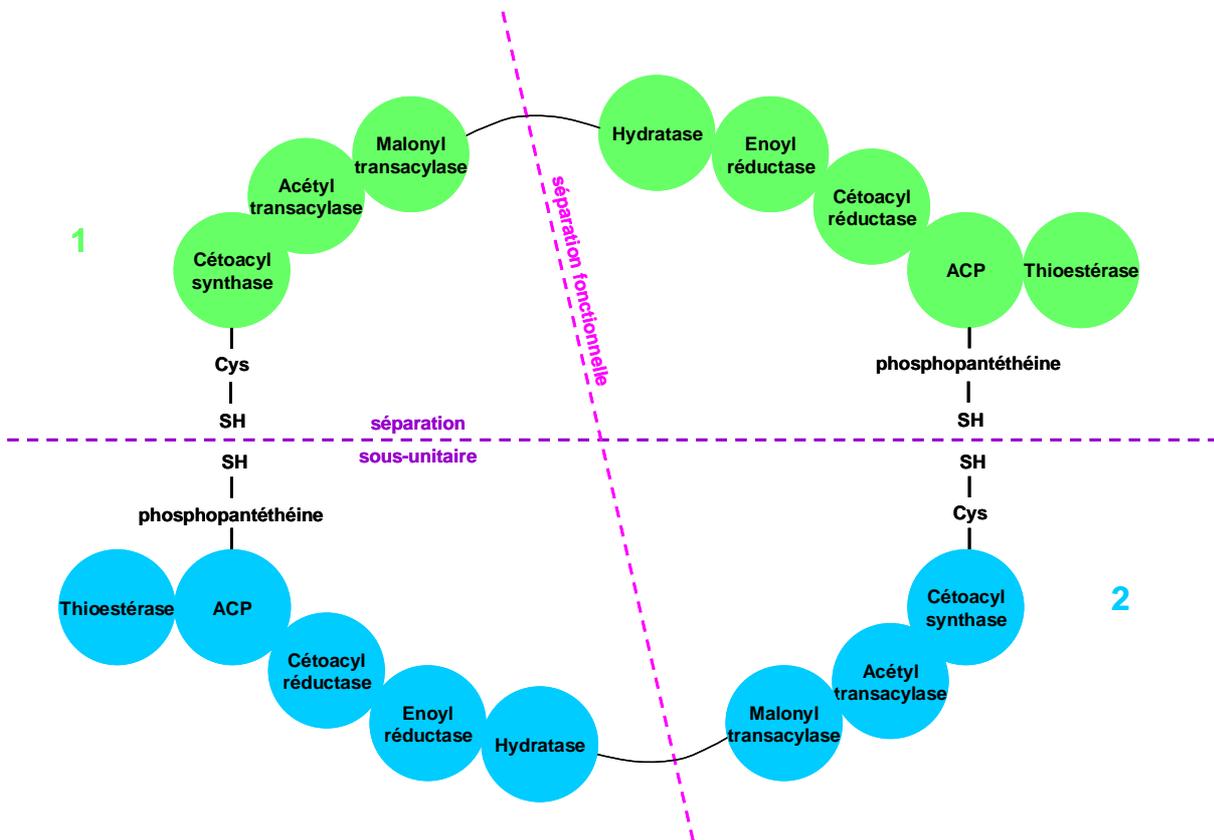


Figure 6 : Le complexe multienzymatique de l'acide gras synthase

Ce complexe est constitué de deux monomères polypeptidiques identiques (1 et 2), chacun portant sept activités enzymatiques et la protéine ACP (acyl carrier protein). Le groupement thiol (SH) de la phosphopantéthéine d'un des monomères se trouve à proximité du groupement thiol d'un résidu cystéine (Cys) de la cétoacyl synthase de l'autre monomère, suggérant ainsi un arrangement "tête-bêche" des deux monomères. L'unité fonctionnelle est formée par une partie d'un monomère interagissant avec la partie complémentaire de l'autre monomère. Ainsi, deux chaînes acétylées sont produites simultanément.

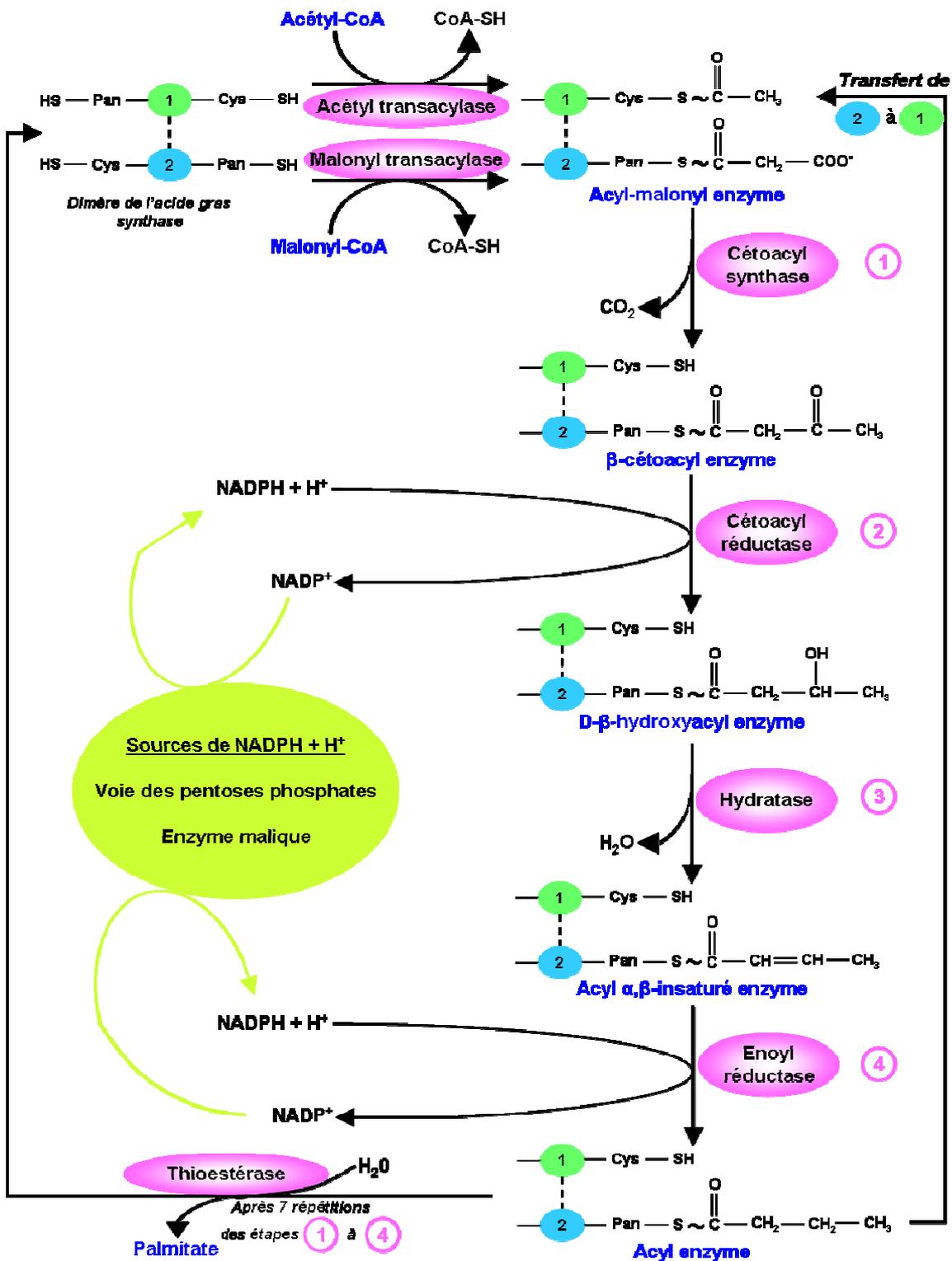


Figure 7 : Synthèse du palmitate

L'acides gras synthase fonctionne en dimère (1 et 2) et permet l'ajout de deux carbonnes à chaque cycle réactionnel jusqu'à la formation de palmitate.

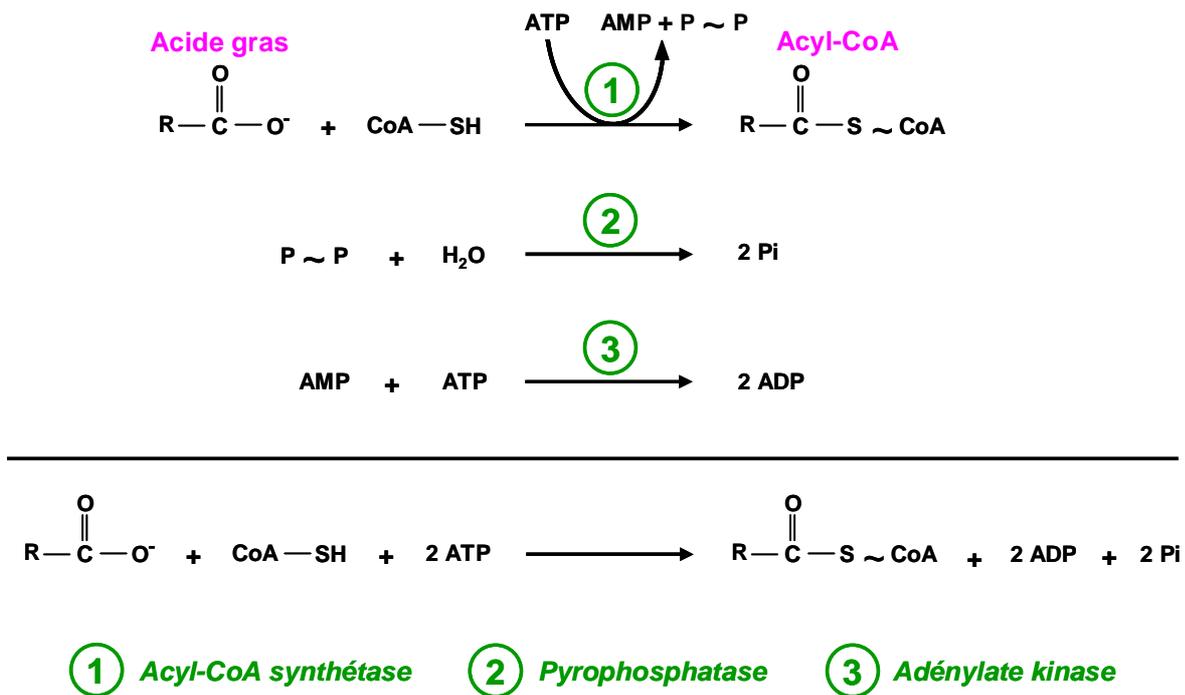


Figure 8 : Activation des acides gras

Les acides gras sont activés par formation d'une liaison thioester avec le coenzyme A. La formation d'une liaison thioester consomme de l'ATP, qui est clivé en AMP et en pyrophosphate. Le pyrophosphate est hydrolysé en 2 phosphates par une pyrophosphatase cytosolique. L'AMP est phosphorylé par l'adénylate kinase.

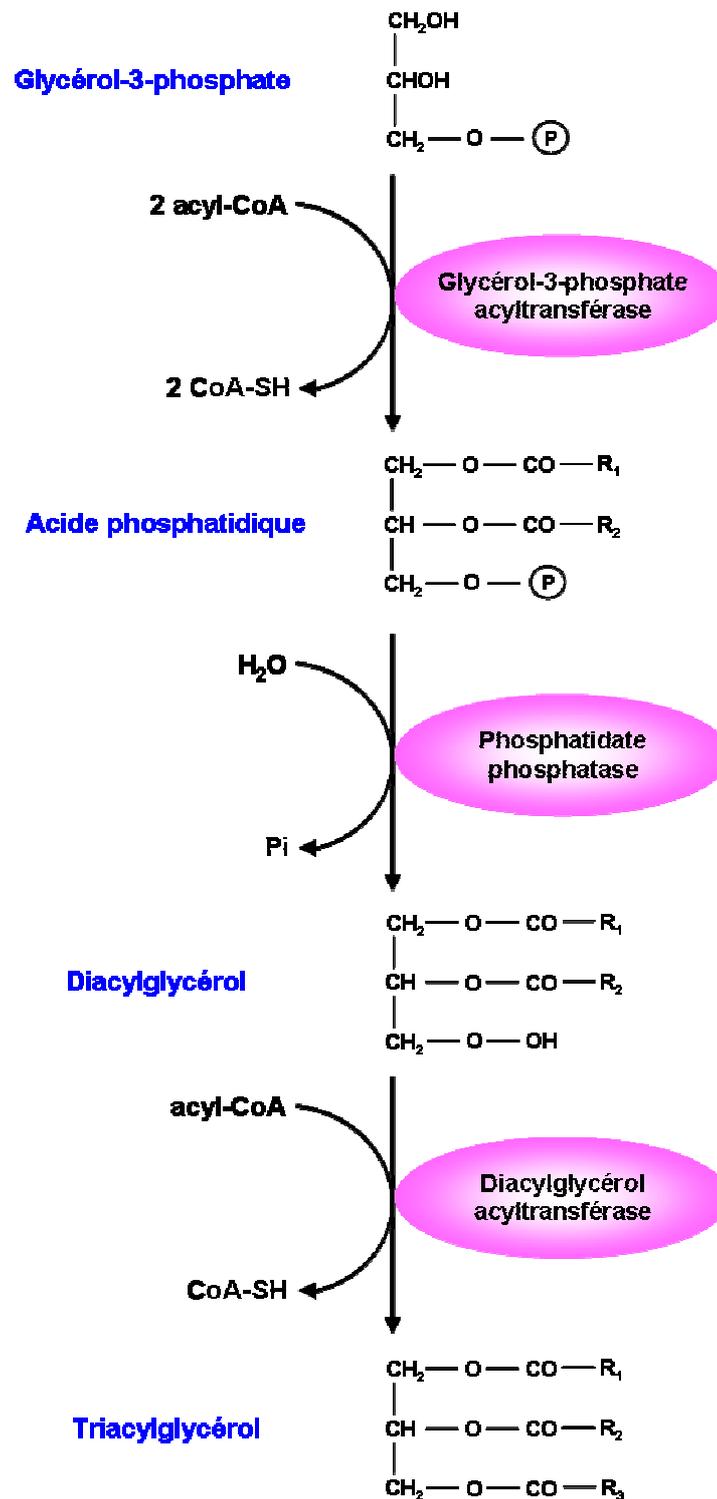


Figure 9 : Synthèse des triglycérides

La voie de synthèse des triglycérides aboutit à la conjugaison de trois acyl-CoA avec du glycérol *via* trois réactions enzymatiques successives.

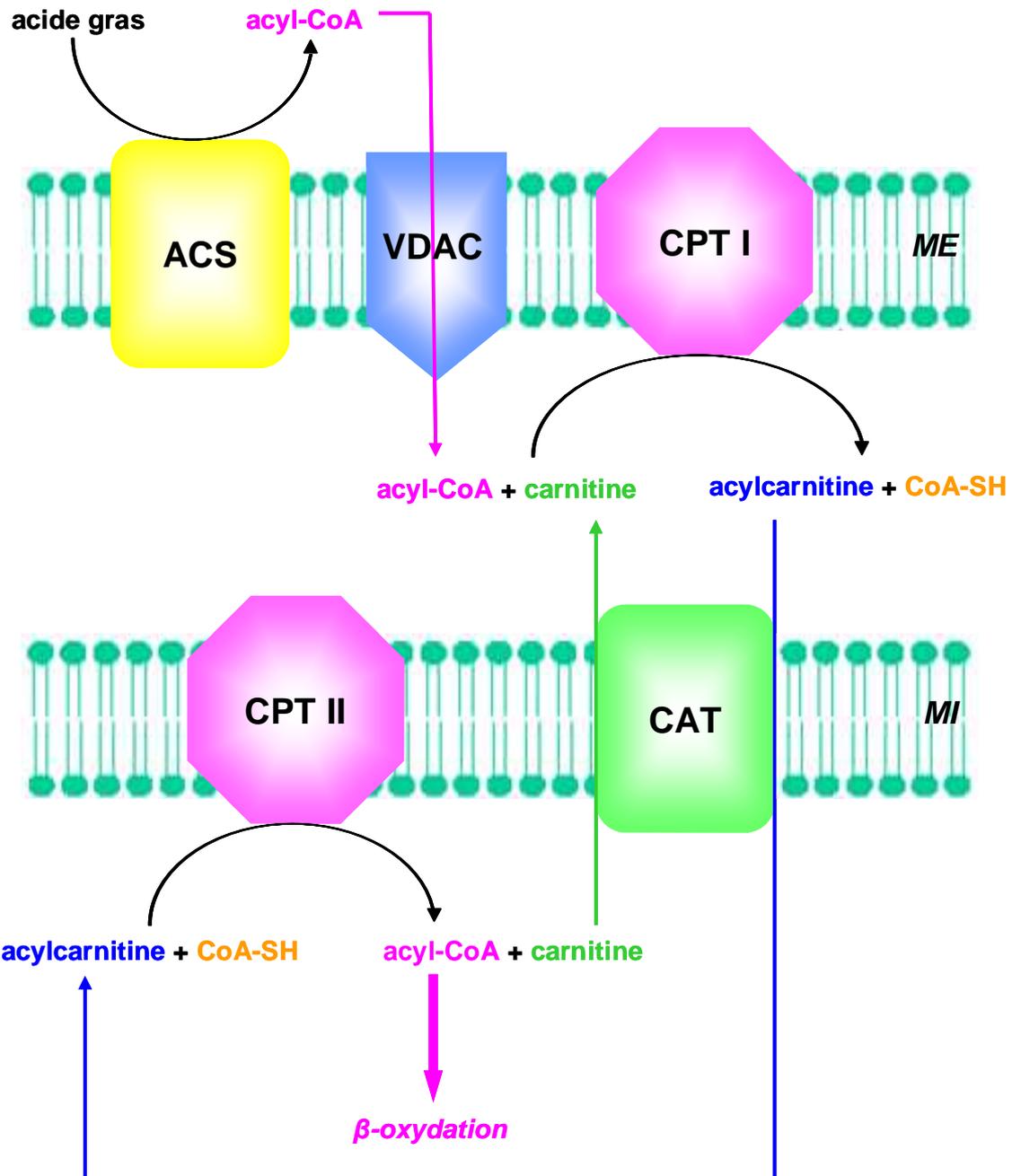


Figure 10 : Système carnitine palmitoyltransférase

L'acide gras à longue chaîne préalablement activé en acyl-CoA par l'acyl-CoA synthétase (ACS) traverse la membrane externe mitochondriale (ME) via VDAC (voltage-dépendant anion channel). L'acyl-CoA est ensuite complexé à la carnitine via la réaction catalysée par la carnitine palmitoyltransférase I (CPT I). L'acylcarnitine ainsi formé est échangé avec de la carnitine via la carnitine-acylcarnitine translocase (CAT) permettant alors son passage à travers la membrane interne (MI). Enfin l'acylcarnitine est retransformé en acyl-CoA via la réaction catalysée par la carnitine palmitoyltransférase II (CPT II).

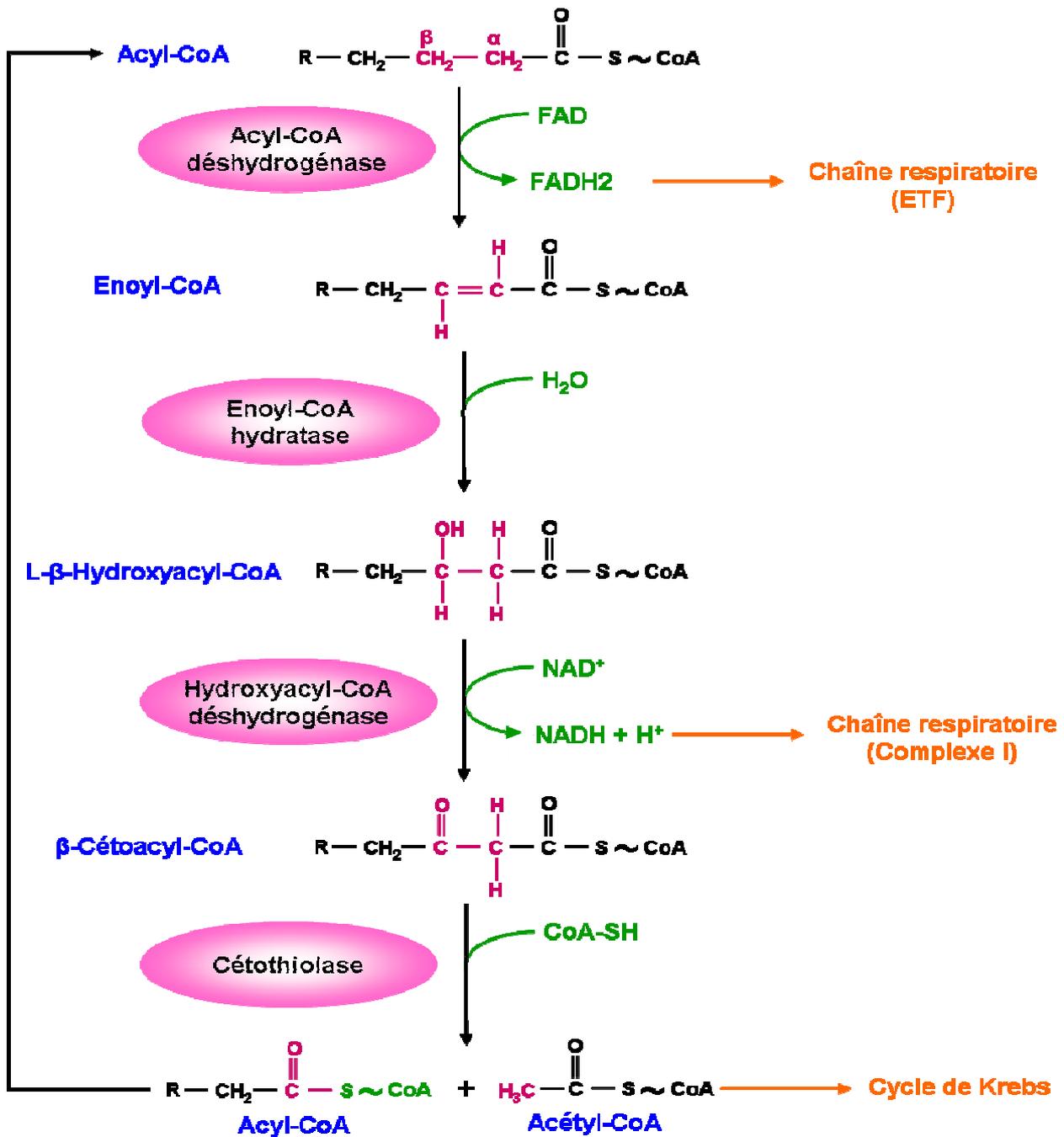


Figure 11 : Cycle de la β -oxydation

La première étape de la β -oxydation consiste à la déshydrogénation de l'acyl-CoA sur les carbones α et β par une flavoprotéine à FAD, l'acyl-CoA déshydrogénase, qui aboutit à la formation d'une double liaison entre les carbones α et β . Cette réaction conduit à la formation du Δ^2 -*trans*-enoyl-CoA et de FADH₂ qui va fournir des électrons à la chaîne respiratoire au niveau de l'ETF (electron-transferring flavoprotein) qui appartient au complexe II. L'étape suivante est une hydratation catalysée par l'enoyl-CoA hydratase qui permet la saturation de la double liaison formant ainsi du L- β -hydroxyacyl-CoA. Ce composé subit ensuite une déshydrogénation au niveau du carbone β catalysée par l'hydroxyacyl-CoA déshydrogénase. Cette réaction aboutit à la formation du β -cétoacyl-CoA et de NADH + H⁺ qui va fournir des électrons à la chaîne respiratoire au niveau du complexe I. La dernière étape est une thiolase catalysée par la cétothiolase aboutissant à la formation d'un acétyl-CoA qui peut entrer dans le cycle de Krebs et d'un acyl-CoA raccourci de deux carbones qui va servir de substrat au cycle suivant.

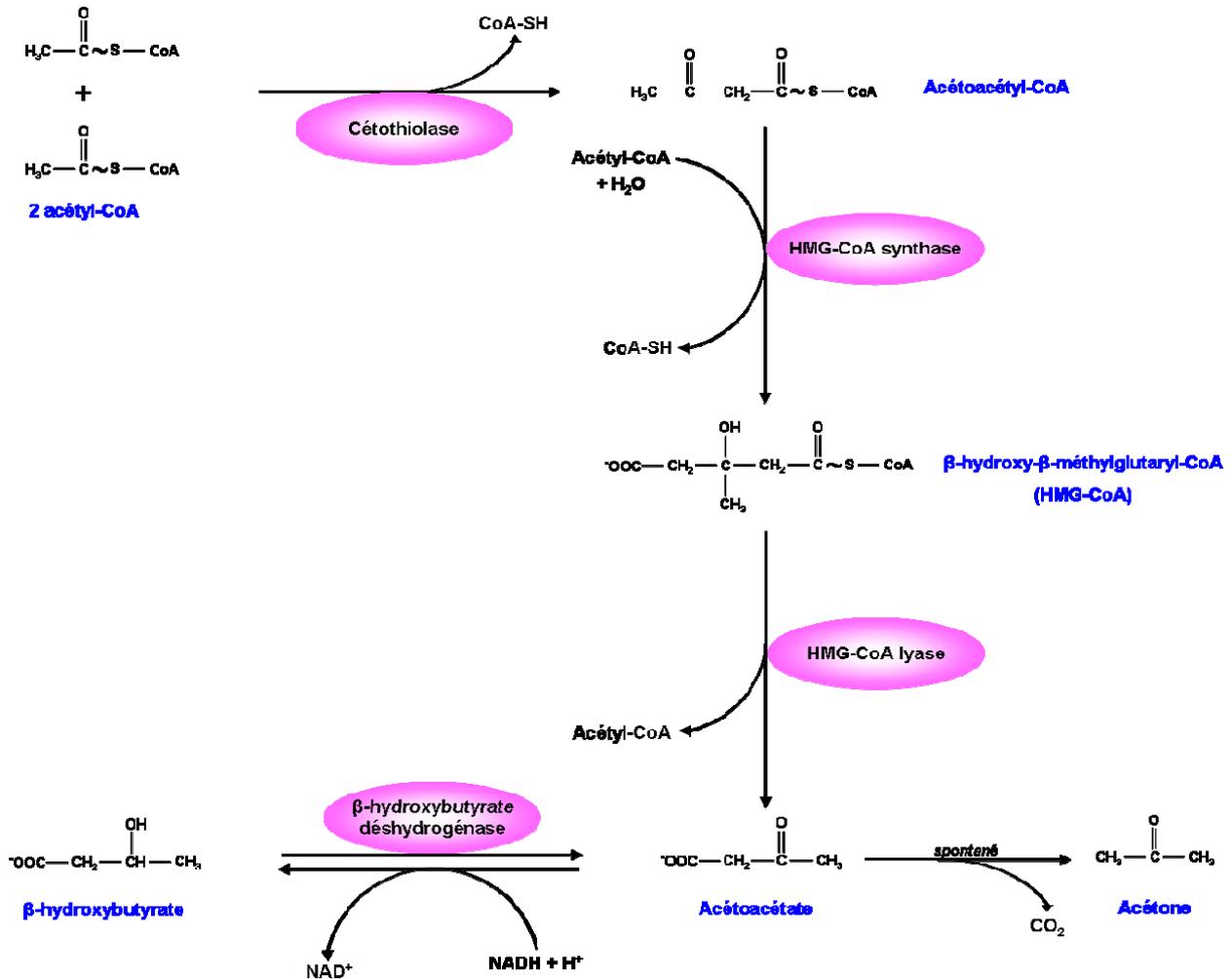
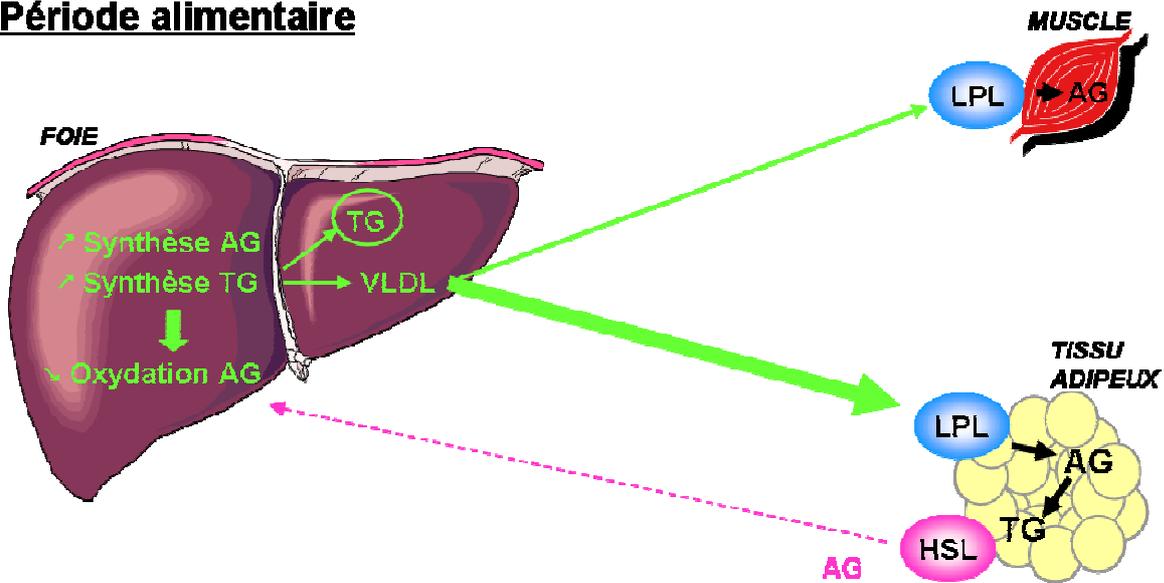


Figure 12 : Cétogenèse

La cétogenèse, qui a lieu exclusivement au sein des mitochondries hépatiques, correspond à la formation des corps cétoniques (acétoacétate et β -hydroxybutyrate) qui représentent une source énergétique pour les tissus extra-hépatiques.

Période alimentaire



Période de jeûne

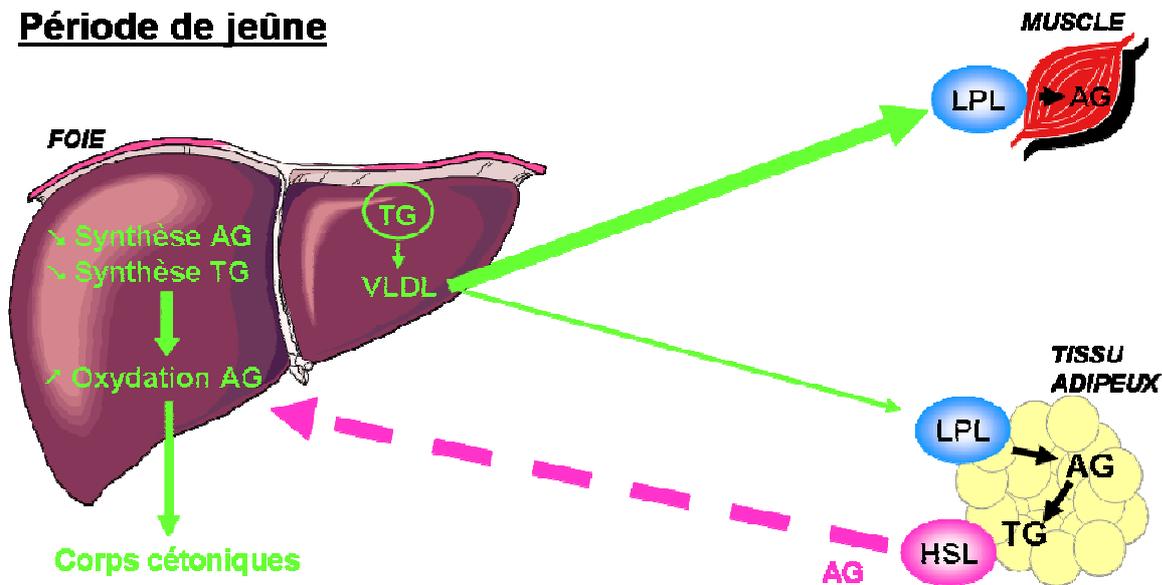


Figure 13 : Régulation de métabolisme lipidique hépatique

En période alimentaire, la synthèse des acides gras (AG) et des triglycérides (TG) est augmentée *via* le glucose et l'insuline. Le malonyl-CoA, intermédiaire de la synthèse des acides gras, inhibe l'oxydation des acides gras en inhibant la CPT I. Les triglycérides synthétisés sont principalement exportés *via* les VLDL pour être stockés dans le tissu adipeux. La LPL (lipoprotéine lipase) permet l'entrée des acides gras dans les tissus en hydrolysant les triglycérides. En période alimentaire, l'insuline inhibe l'HSL (hormone sensitive lipase) et donc la libération des acides gras par le tissu adipeux.

En période de jeûne, la concentration en insuline chute. Cela entraîne une diminution de la synthèse des acides gras et des triglycérides au niveau du foie et parallèlement l'augmentation de l'oxydation des acides gras et de la cétogenèse. L'HSL n'étant plus inhibée, les acides gras sont libérés du tissu adipeux pour rejoindre le foie. Le flux principal de VLDL est destiné aux autres tissus.

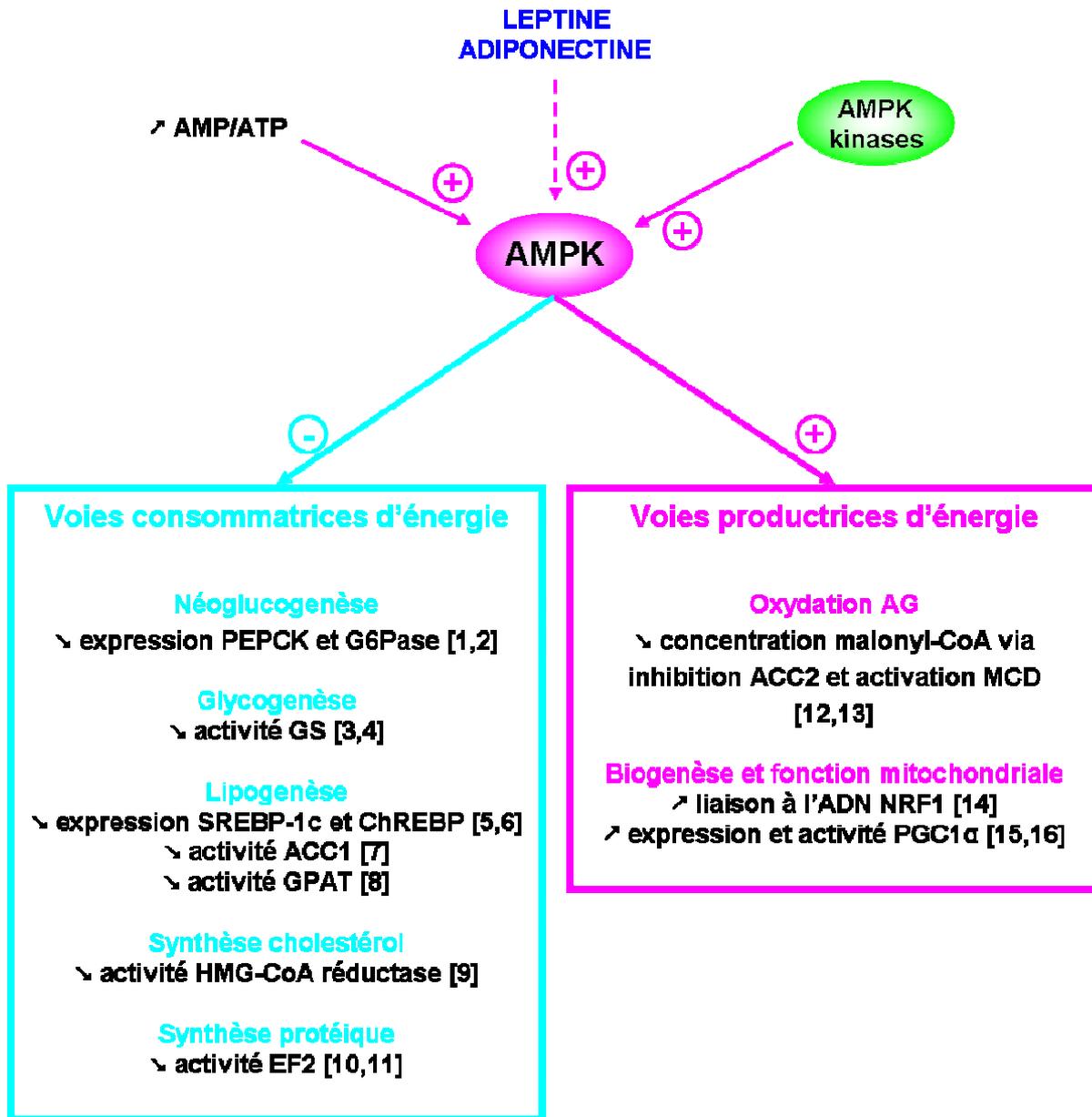


Figure 14 : AMPK : senseur énergétique

L'AMPK est activée par l'AMP et donc par toutes les situations de demande énergétique qui induisent une augmentation du rapport AMP/ATP cellulaire (Carling, 2004). Parallèlement l'AMPK est activée par phosphorylation *via* des AMPK kinases (Carling *et al.*, 2008). La leptine et l'adiponectine agissent en partie *via* l'AMPK (Minokoshi *et al.*, 2002, Yamauchi *et al.*, 2002). Cependant, la manière dont ces adipokines activent l'AMPK n'est pas encore complètement élucidée. Elles pourraient agir en augmentant le rapport AMP/ATP ou en activant une AMPK kinase. Une fois activée, l'AMPK va inhiber les voies métaboliques de synthèse consommant de l'énergie et de manière concomitante activer les voies métaboliques productrices d'énergie.

Abréviations : ACC : Acétyl-CoA carboxylase, AG : Acides gras, ChREBP : Carbohydrate response element regulatory protein, EF2 : Elongation factor 2, G6Pase : Glucose-6-phosphatase, GPAT : glycérol-3-phosphate acyltransférase, GS : Glycogène synthase, MCD : Malonyl-CoA décarboxylase, NRF1 : Nuclear respiratory factor 1, PEPCK : Phosphoenolpyruvate carboxykinase, PGC1 α : Proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α , SREBP-1c : Sterol regulatory element binding protein-1c.

Références : [1] Lochhead *et al.*, 2000, [2] Yamauchi *et al.*, 2002, [3] Carling et Hardie, 1989, [4] Jorgensen *et al.*, 2004, [5] Zhou *et al.*, 2001, [6] Kawaguchi *et al.*, 2002, [7] Munday *et al.*, 1988, [8] Muoio *et al.*, 1999, [9] Clarke et Hardie, 1990, [10] Horman *et al.*, 2002, [11] Browne *et al.*, 2004, [12] Winder *et al.*, 1997, [13] Assifi *et al.*, 2005, [14] Bergeron *et al.*, 2001, [15] Zong *et al.*, 2002, [16] Jäger *et al.*, 2007.

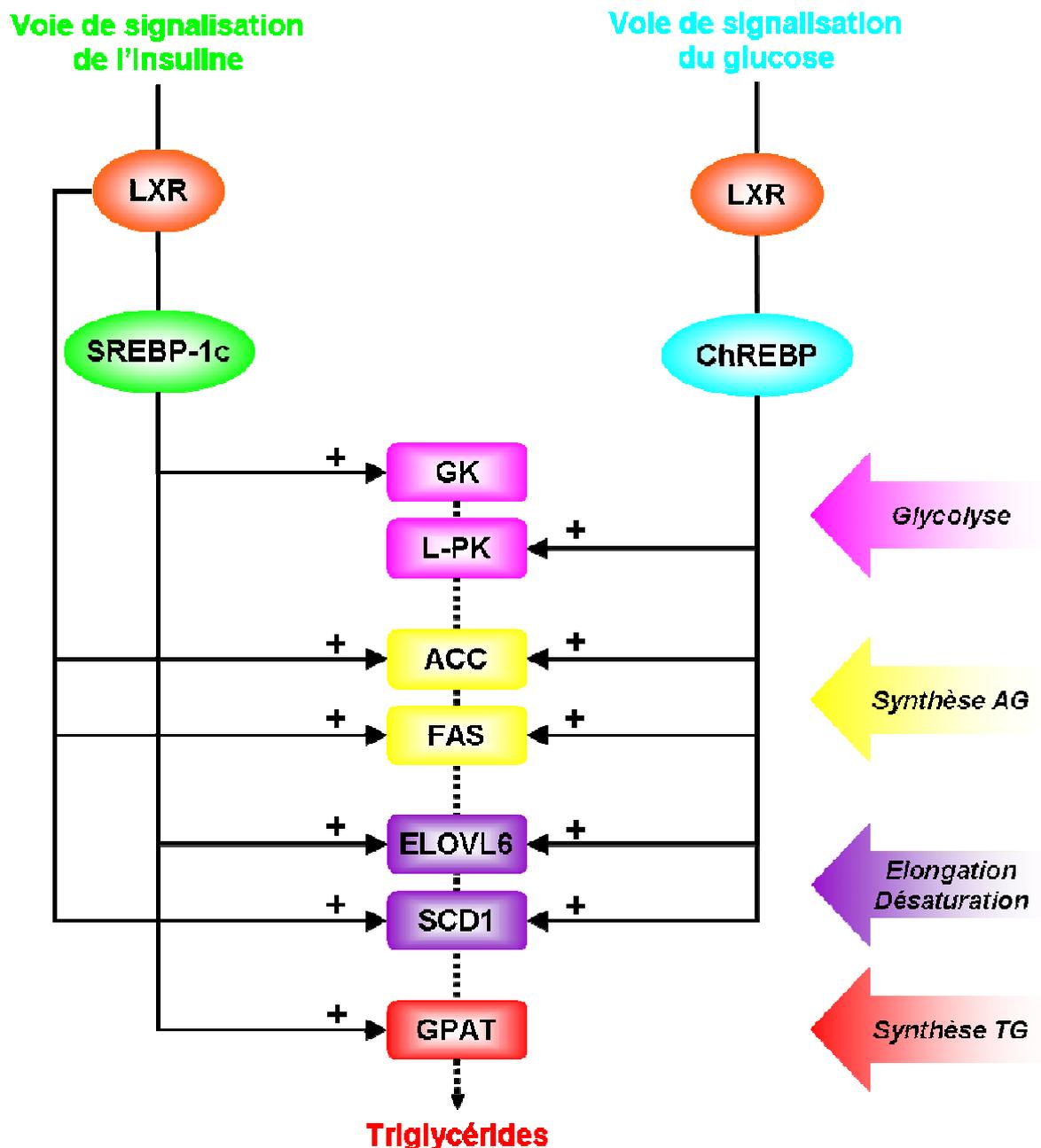


Figure 15 : Régulation transcriptionnelle de la lipogenèse

Les facteurs de transcription SREBP-1c et ChREBP, activés respectivement par les voies de signalisation de l'insuline et du glucose, régulent la transcription des gènes codant pour différentes enzymes clés de la lipogenèse. Les récepteurs nucléaires LXR jouent également un rôle essentiel dans la régulation de la lipogenèse, d'une part en activant directement la transcription des gènes codant pour certaines enzymes de cette voie et d'autre part en participant à la régulation transcriptionnelle dépendante de l'insuline de SREBP-1c et probablement celle dépendante du glucose de ChREBP. Schéma adapté de Postic et Girard (2008).

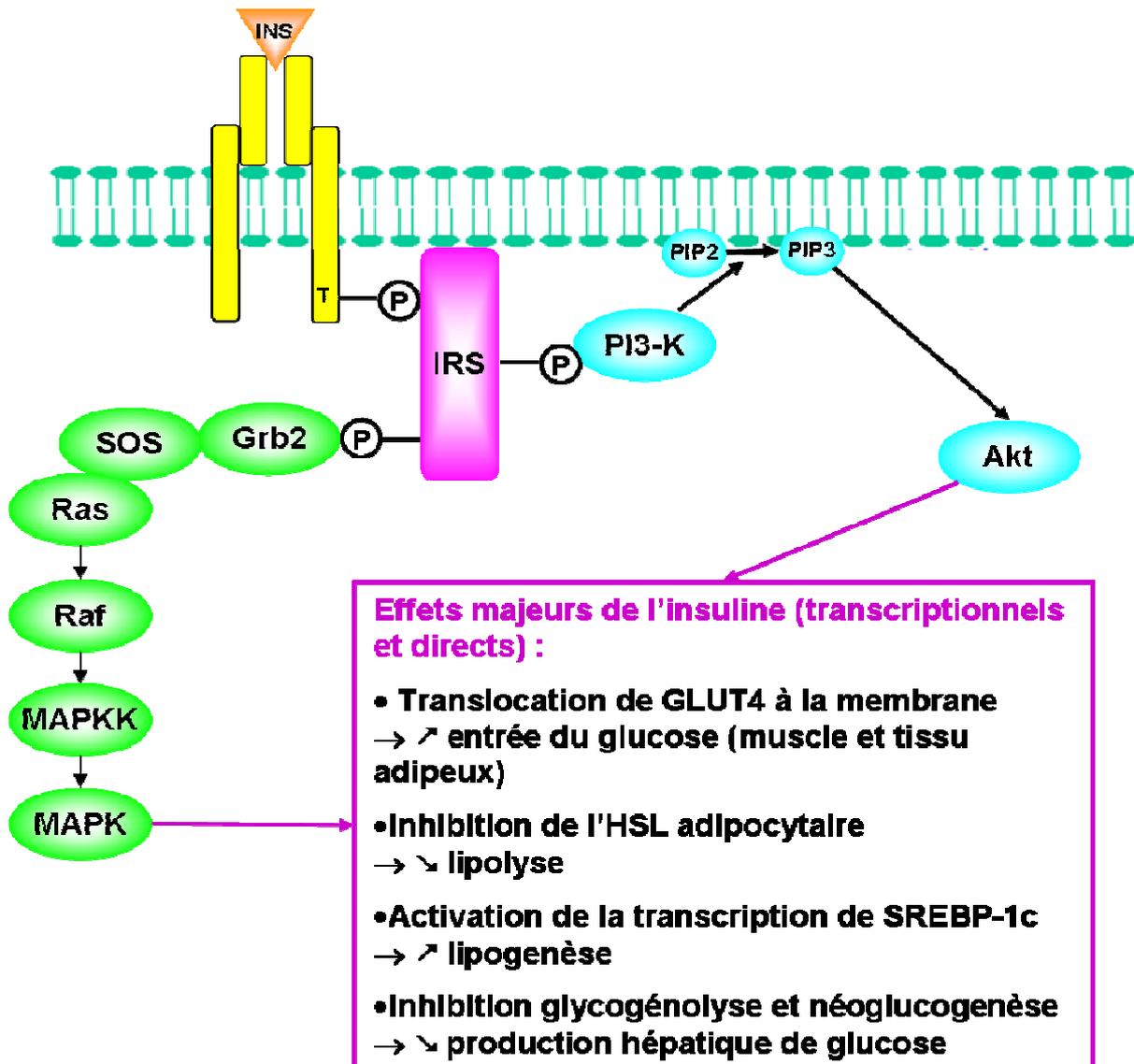


Figure 16 : Voies de signalisation de l'insuline

Une fois le récepteur de l'insuline activé, les IRS (insulin receptor substrates) se fixent au niveau des tyrosines phosphorylées *via* leur domaine PTB (phosphotyrosine binding) et sont eux-mêmes phosphorylés par le récepteur. Deux voies principales de signalisation commencent à partir des IRS :

- la voie de la PI-3 kinase (PI3-K), qui permet la phosphorylation du PIP2 (Phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate) en PIP3 (phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate) à l'origine de l'activation de la kinase Akt (ou PKB : protéine kinase B).

- la voie des MAP kinases (MAPK), qui est initiée par la liaison de l'adaptateur Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2) au niveau des tyrosines phosphorylées des IRS permettant l'activation de SOS (son of sevenless). SOS est un facteur d'échange nucléotidique qui permet l'activation de la protéine Ras qui elle-même active la kinase Raf. Raf va activer par phosphorylation la MAP kinase kinase (MAPKK) qui elle-même va activer la MAPK.

Ces deux voies de signalisation aboutissent à des effets transcriptionnels ou non-transcriptionnels sur le métabolisme permettant principalement le maintien de la glycémie.

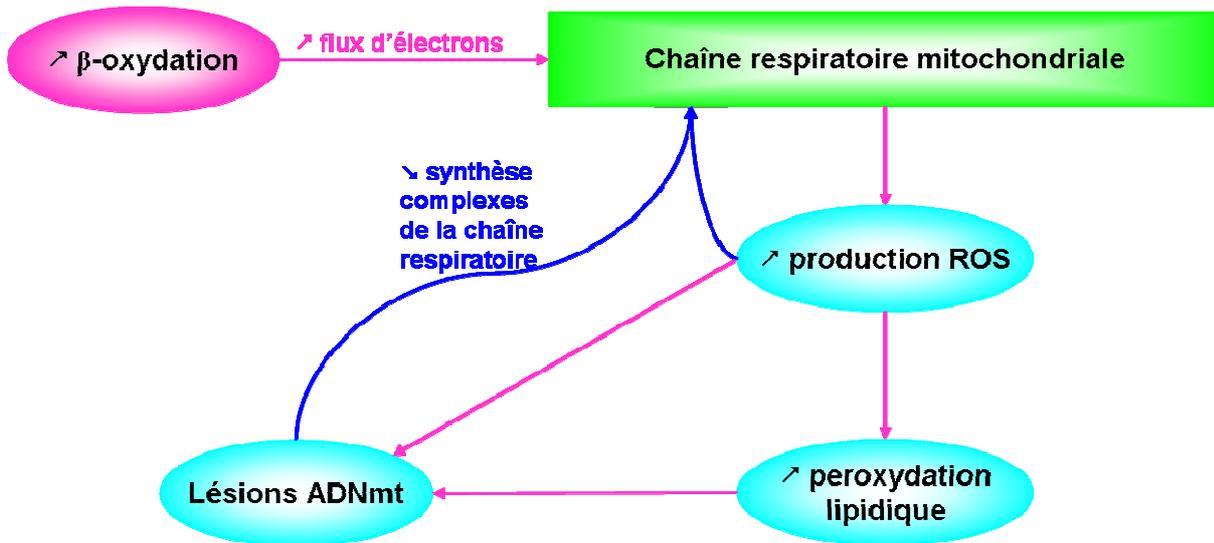
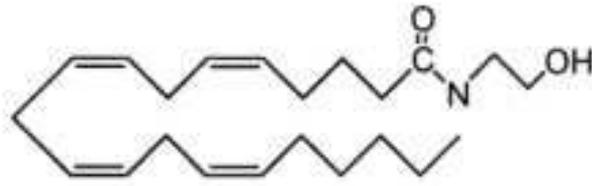
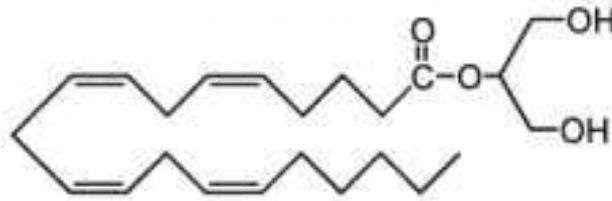


Figure 17 : Production de ROS et altération de la fonction mitochondriale en cas de NASH

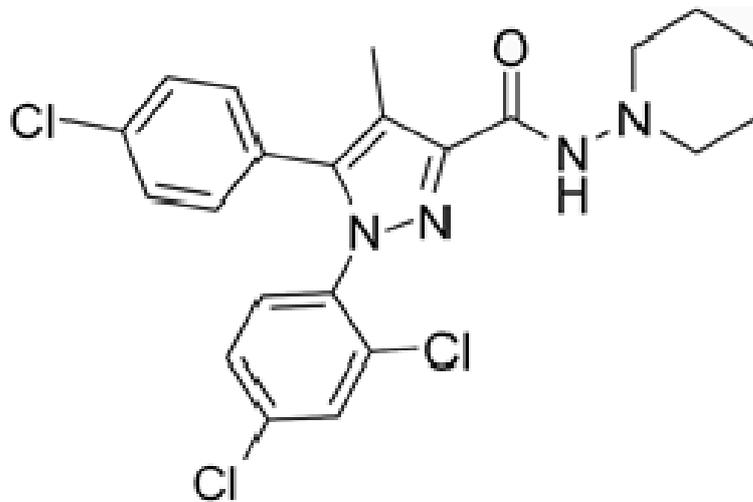
L'augmentation de la β -oxydation associée à la stéatose hépatique entraîne une augmentation du flux d'électrons le long de la chaîne respiratoire mitochondriale aboutissant ainsi à une production de ROS accrue. Ces ROS vont induire une peroxydation des lipides hépatiques qui va elle-même ainsi que les ROS conduire à des lésions de l'ADNmt. L'ADNmt lésé va produire moins de complexes fonctionnels de la chaîne respiratoire et en parallèle les ROS vont altérer le fonctionnement de la chaîne respiratoire qui en retour va produire plus de ROS initiant ainsi un cercle vicieux. Schéma adapté de Begriche *et al.*, 2006.



Anandamide



2-Arachidonoylglycérol (2-AG)



Rimonabant

Figure 18 : Structure des deux principaux endocannabinoïdes et du rimonabant

Les endocannabinoïdes sont synthétisés à partir de l'acide arachidonique et sont des ligands endogènes des récepteurs cannabinoïdes. Le rimonabant est un antagoniste spécifique des récepteurs CB1.

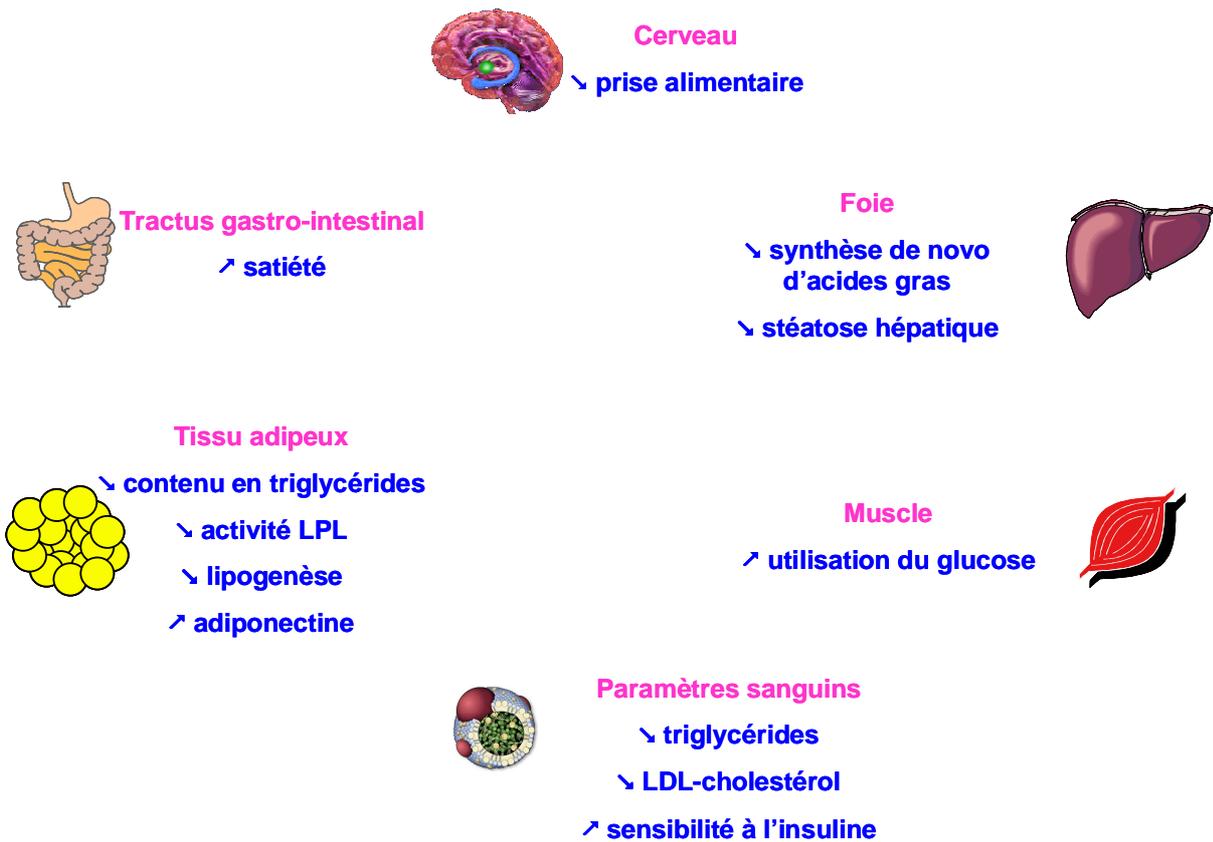


Figure 19 : Schéma bilan des effets du blocage des récepteurs CB1 par du rimonabant

Hormis son action sur la prise alimentaire au niveau central, le rimonabant agit sur différents organes périphériques ayant un rôle essentiel dans la régulation de l'homéostasie énergétique.

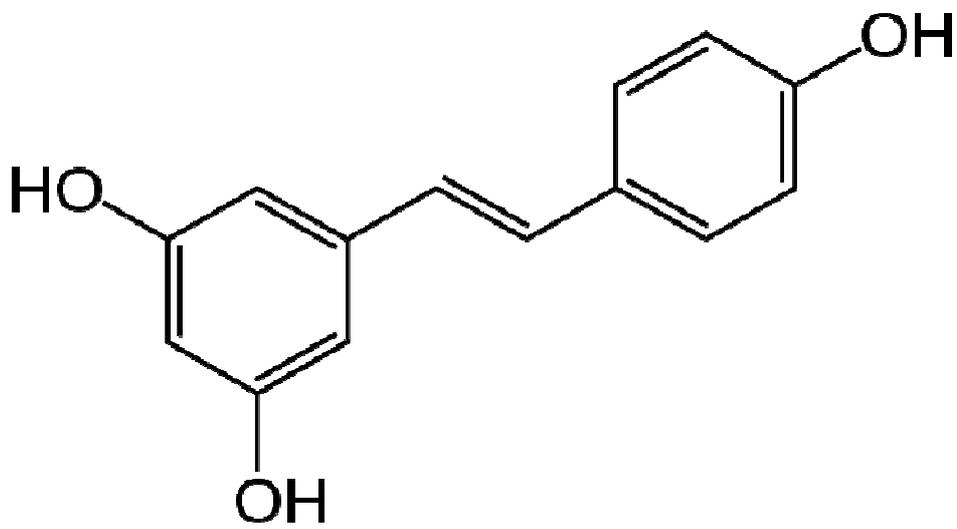


Figure 20 : Structure du resvératrol

Le resvératrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) est un polyphénol de la classe des stilbènes.

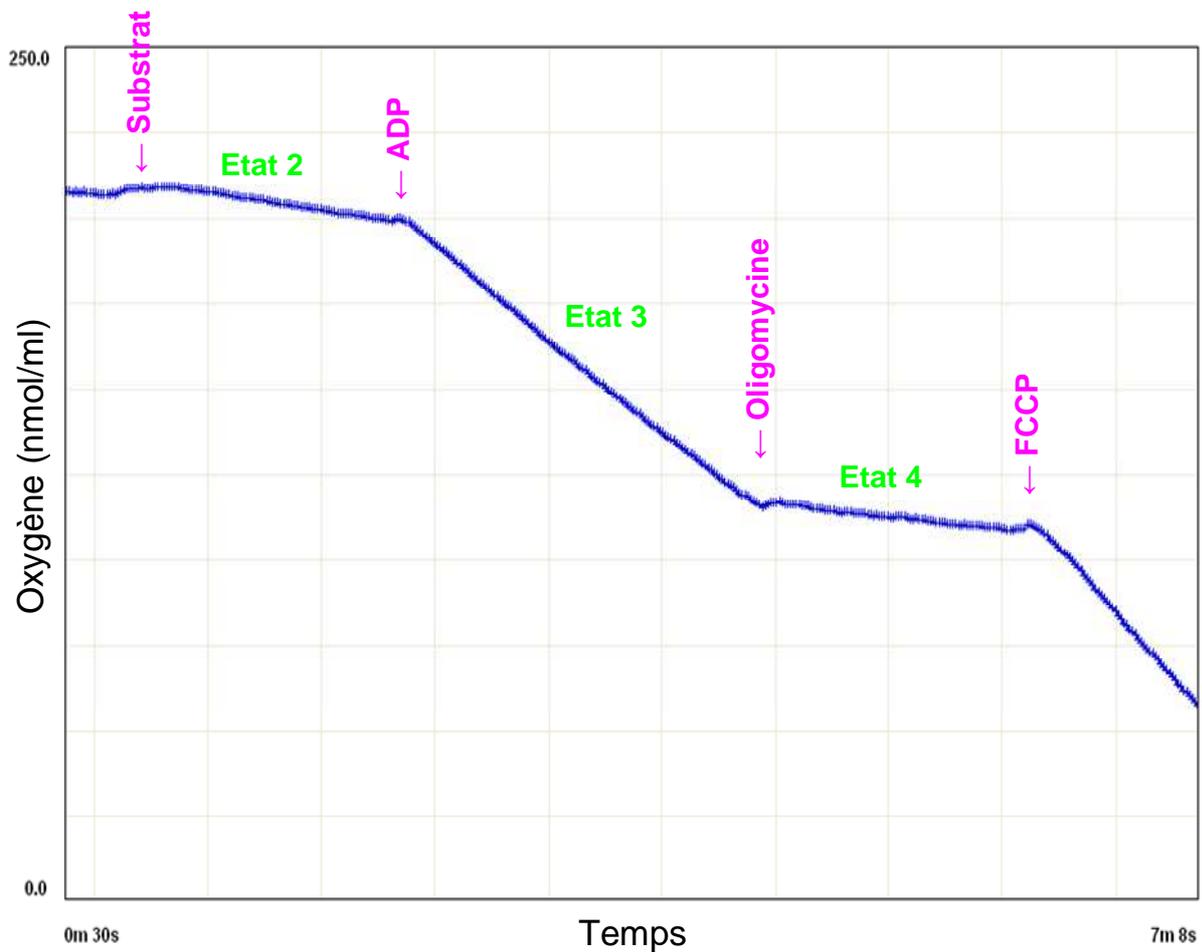


Figure 21 : Exemple de mesure de consommation d'oxygène sur mitochondries isolées

La consommation d'oxygène sur mitochondries isolées est mesurée par oxygraphie. L'état 2 est obtenu par l'ajout du substrat étudié. L'état 3 représente la consommation d'oxygène en condition phosphorylante et est obtenu par l'ajout d'ADP. L'état 4 représente la consommation d'oxygène en condition non-phosphorylante et est obtenu par l'ajout d'un inhibiteur de l'ATP synthase, l'oligomycine. Enfin, l'état de consommation maximale d'oxygène est obtenu par l'ajout d'un découplant, le FCCP.

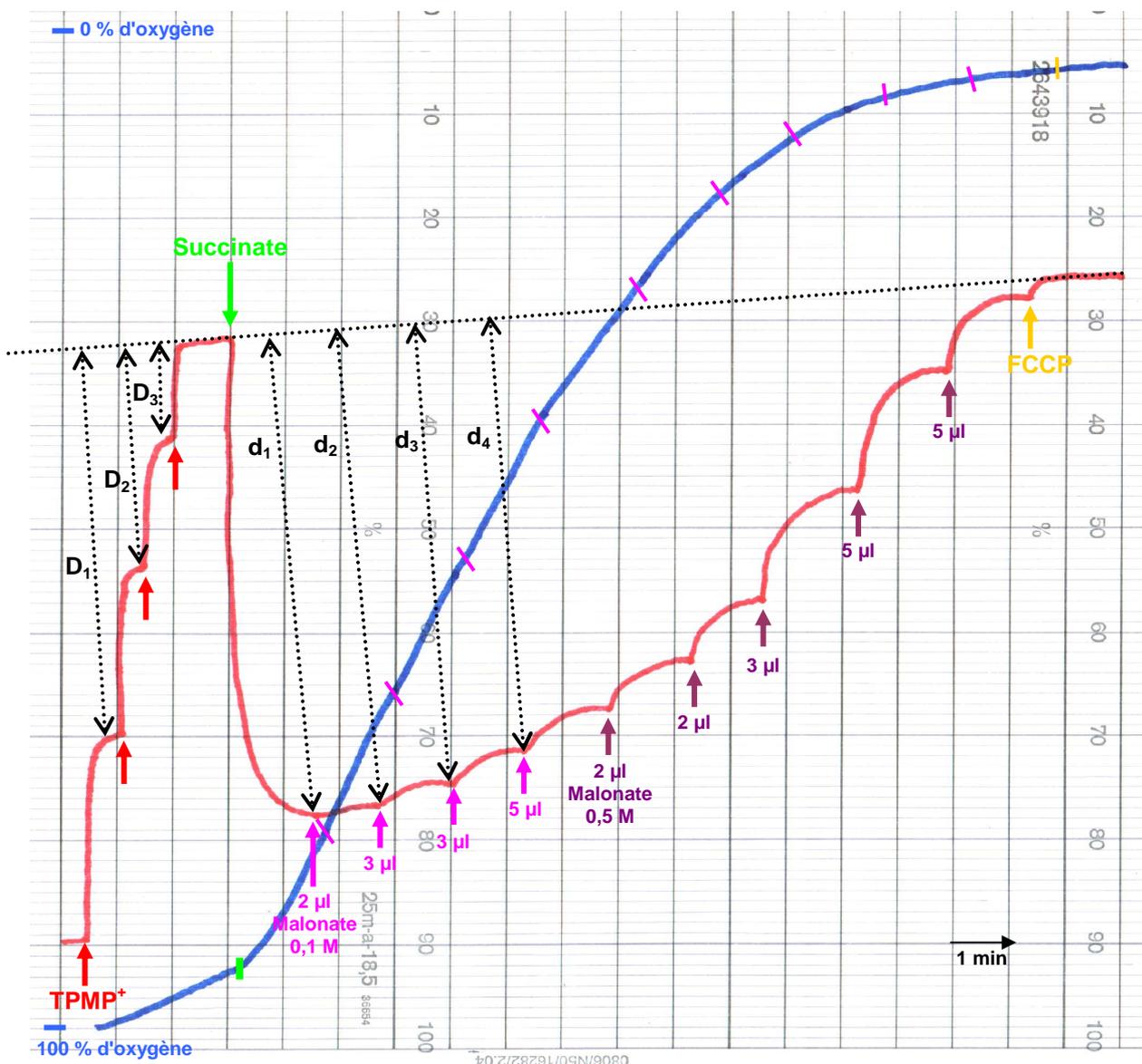


Figure 22 : Exemple de tracés obtenus en mesurant le potentiel de membrane en parallèle de la consommation d'oxygène en condition non-phosphorylante

Cette figure représente des tracés obtenus en suivant le protocole décrit dans la partie A-VI-3-a. La consommation d'oxygène mitochondriale est représentée par la courbe bleue. Le tracé rouge représente les variations de concentrations en TPMP⁺ extramitochondrial. La ligne de base de concentration en TPMP⁺ extramitochondrial (2 μM) est tracée en reliant le point correspondant à l'ajout de la dernière dose de TPMP⁺ au point correspondant à l'ajout de FCCP. Les distances de déviation sont mesurées perpendiculairement à la ligne de base. L'ajout séquentiel de 4 x 0,5 μM de TPMP⁺ permet de construire une droite de calibration en fonction des distances de déviation par rapport à la ligne de base (D₁₋₃) mesurée en mm. Pour chaque concentration de malonate, la distance de déviation en mm (d_{1-d_n}) peut être convertie en valeur de potentiel de membrane (mV) en utilisant la droite de calibration.

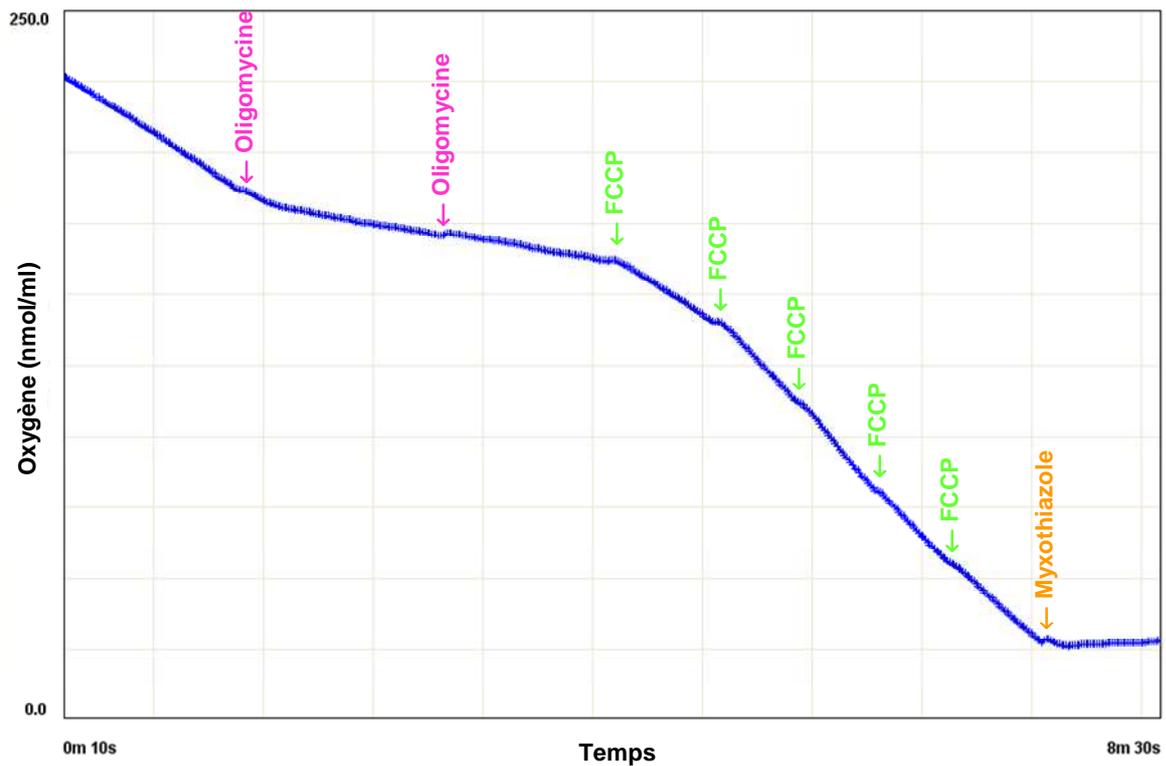


Figure 23 : Exemple de mesure de consommation d'oxygène sur cellules entières non perméabilisées

La consommation d'oxygène sur cellules entières non perméabilisées est mesurée par oxygraphie. La respiration de routine, qui reflète la consommation d'oxygène basale des cellules est mesurée avant l'ajout des inhibiteurs. L'ajout d'oligomycine permet de mesurer la consommation d'oxygène en condition non-phosphorylante. L'ajout de FCCP, en découplant la consommation d'oxygène de la synthèse d'ATP, permet de mesurer la capacité maximale de fonctionnement de la chaîne respiratoire. Enfin, l'ajout de myxothiazole (inhibiteur du complexe III) permet de mesurer la consommation d'oxygène résiduelle d'origine extra-mitochondriale.

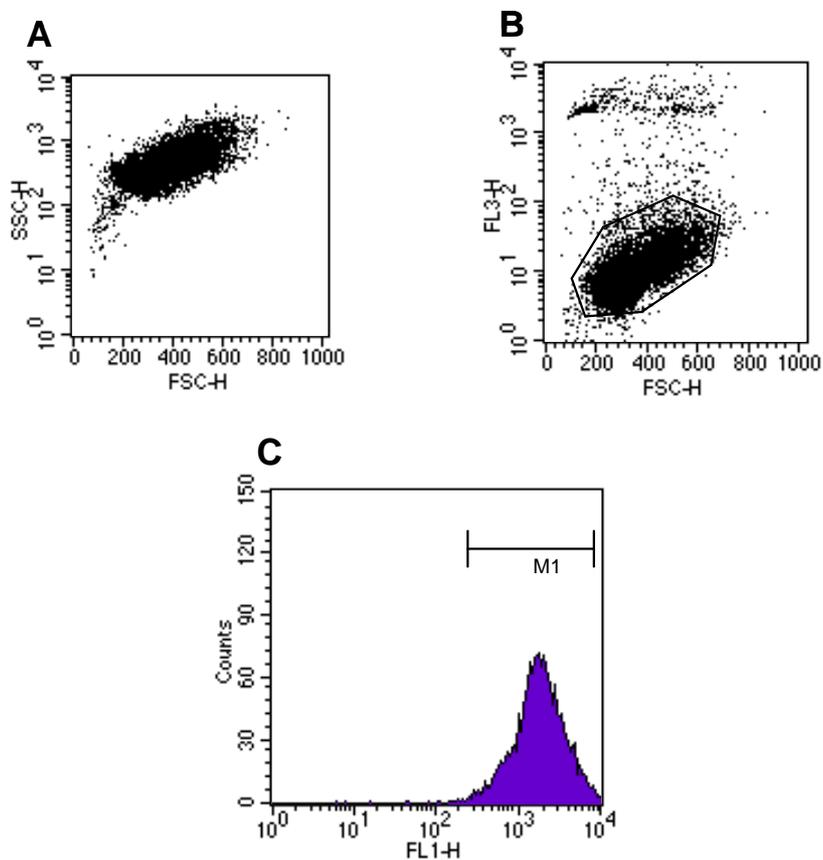


Figure 24 : Graphiques de cytométrie de flux

A- Ce graphique représente la granulosité (SSC : side scatter) des cellules en fonction de leur taille (FSC : forward scatter).

B- Ce graphique représente la fluorescence des cellules correspondant à l'iodure de propidium (à 610 nm) en fonction de la taille des cellules. Pour l'analyse des résultats, seules sont prises en compte les cellules avec une fluorescence faible, c'est à dire les cellules vivantes.

C- Cet histogramme représente le nombre de cellules en fonction de leur fluorescence due à la sonde DiOC₆(3) (à 511 nm). La fenêtre M1 permet de mesurer la moyenne de la fluorescence de la population cellulaire.

Figure supplémentaire de l'article 2

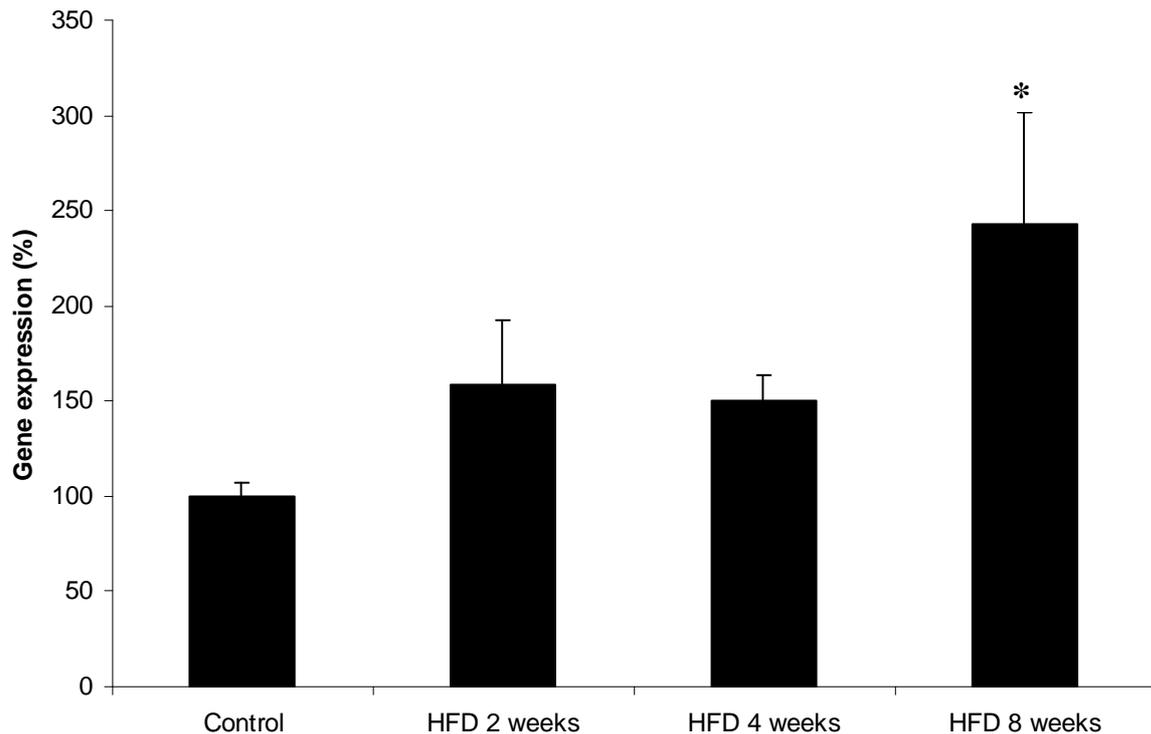


Figure 25 : Expression du gène *SOD2*

Les ARN totaux ont été extraits des foies de rats "control" et à 2, 4 et 8 semaines de régime riche en gras (n=6). Les échantillons ont été analysés par RT-PCR quantitative et les résultats sont normalisés en fonction de l'expression d'HPRT. L'expression de la SOD2 dans les foies de rats "control" a été rapportée à 100 %. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. Le *P* obtenu *via* l'ANOVA est de 0,0546. **P*=0,0078 *versus* control.

Figure supplémentaire de l'article 3

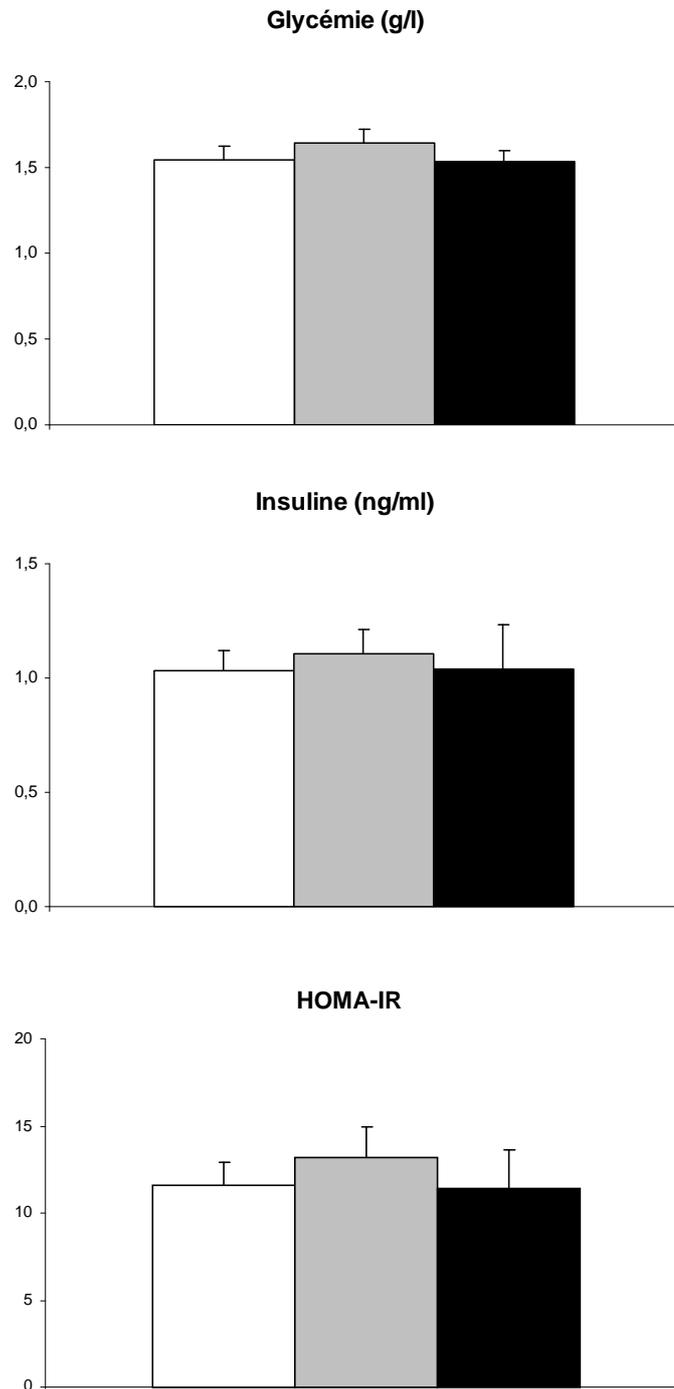


Figure 26 : Glycémie, insulinémie et HOMA-IR

La glycémie a été mesurée immédiatement sur le sang prélevé avec un glucomètre. Les concentrations en insuline dans le sérum ont été dosées par ELISA. L'HOMA-IR (homeostasis model assessment of insulin resistance) a été calculé en utilisant la formule : $(\text{Insuline } (\mu\text{U/ml}) \times \text{glycémie (mM)})/22,5$. Les résultats concernant les rats témoins sont représentés en blanc, en gris pour les rats appariés pour la prise alimentaire et en noir pour les rats traités avec du rimonabant.

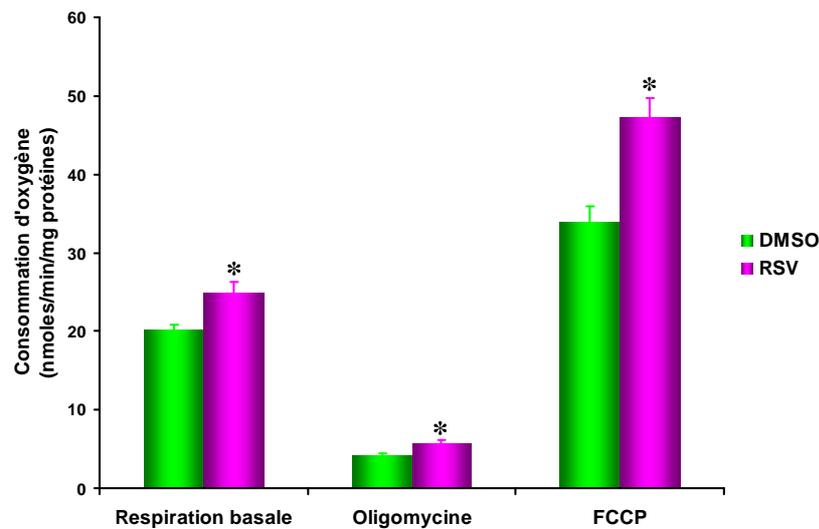


Figure 27 : Consommation d'oxygène

Des cellules HepG2 ont été traitées avec du resvératrol (RSV) à la concentration de 50 μM ou avec le même volume de DMSO pendant 24h. La consommation d'oxygène sur cellules non perméabilisées a été mesurée par oxygraphie. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm SEM (n = 8). * $P < 0,05$ versus DMSO selon un test t pour données non appariées.

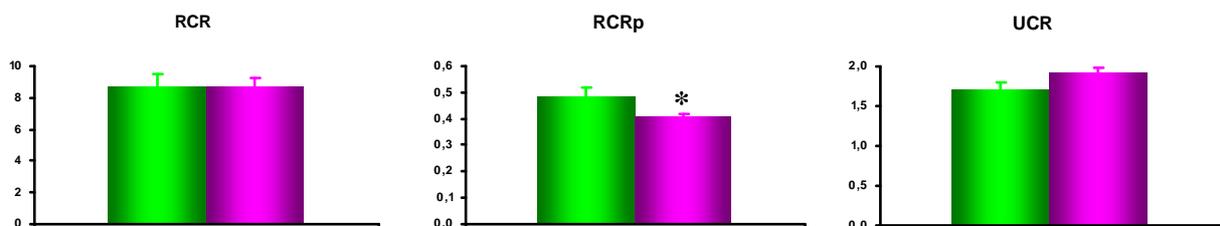


Figure 28 : Rapports de contrôle respiratoire

Des cellules HepG2 ont été traitées avec du resvératrol (en rose) à la concentration de 50 μM ou avec le même volume de DMSO (en vert) pendant 24h. La consommation d'oxygène sur cellules non perméabilisées a été mesurée par oxygraphie. Le RCR correspond au quotient de la capacité respiratoire maximale (FCCP) et de la respiration en condition non-phosphorylante (oligomycine). Le RCRp ou RCR phosphorylant est obtenu en soustrayant la respiration oligomycine à la respiration de routine et en divisant par la respiration FCCP. L'UCR (uncoupling control ratio) correspond au quotient de la respiration FCCP et de la respiration de routine. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm SEM (n = 8). * $P < 0,05$ versus DMSO selon un test t pour données non appariées.

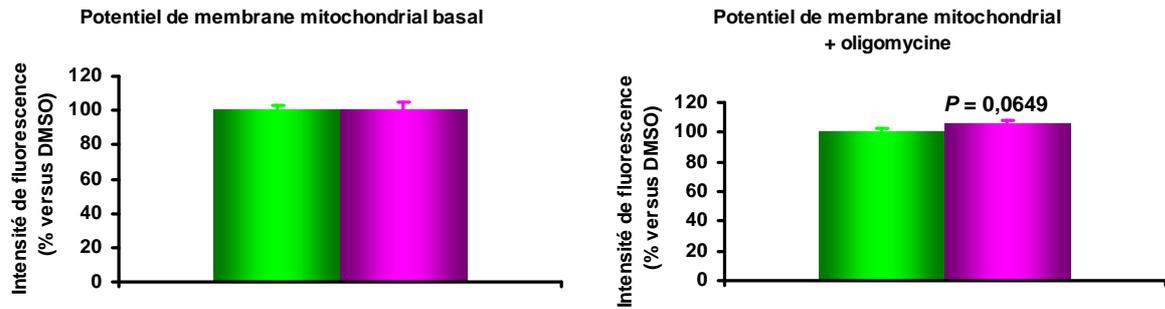


Figure 29 : Potentiel de membrane mitochondriale

Des cellules HepG2 ont été traitées avec du resvératrol (en rose) à la concentration de 50 μ M ou avec le même volume de DMSO (en vert) pendant 24h. Le potentiel de membrane mitochondriale a été mesuré en utilisant la sonde fluorescente DiOC₆(3). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux valeurs obtenues sur les HepG2 traitées avec du DMSO en fonction du jour de l'expérimentation. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm SEM (n = 9). La valeur de *P* présentée sur le graphique a été obtenue avec un test t pour données non appariées.

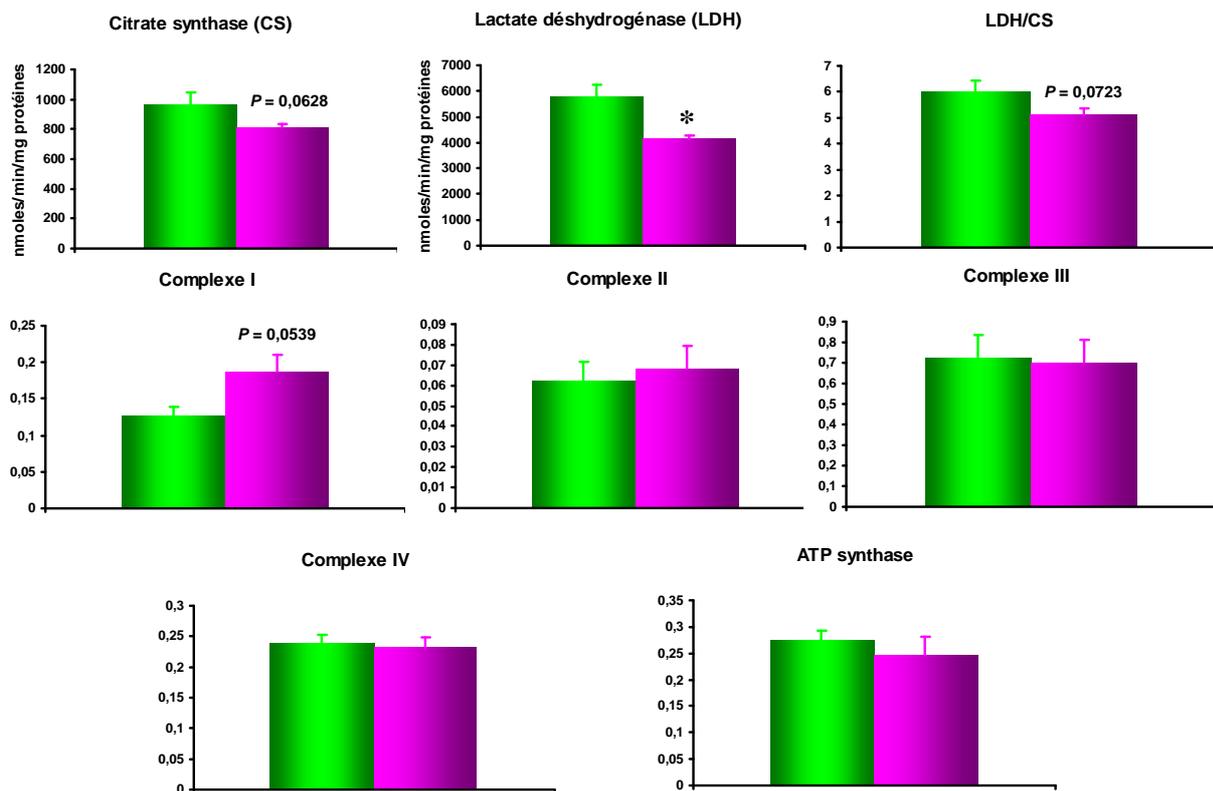


Figure 30 : Activités enzymatiques mitochondriales et activité de la LDH

Des cellules HepG2 ont été traitées avec du resvératrol (en rose) à la concentration de 50 μ M ou avec le même volume de DMSO (en vert) pendant 24h. Les activités enzymatiques des différents complexes de la chaîne respiratoire, de la citrate synthase (CS) et de la lactate déshydrogénase (LDH) ont été mesurées par spectrophotométrie. Les activités de la CS et de la LDH sont exprimées en nmol/min/mg de protéines. Les activités des complexes de la chaîne respiratoire sont exprimées en fonction de l'activité CS. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm SEM (n = 7). **P* < 0,05 versus DMSO selon un test t pour données non appariées.

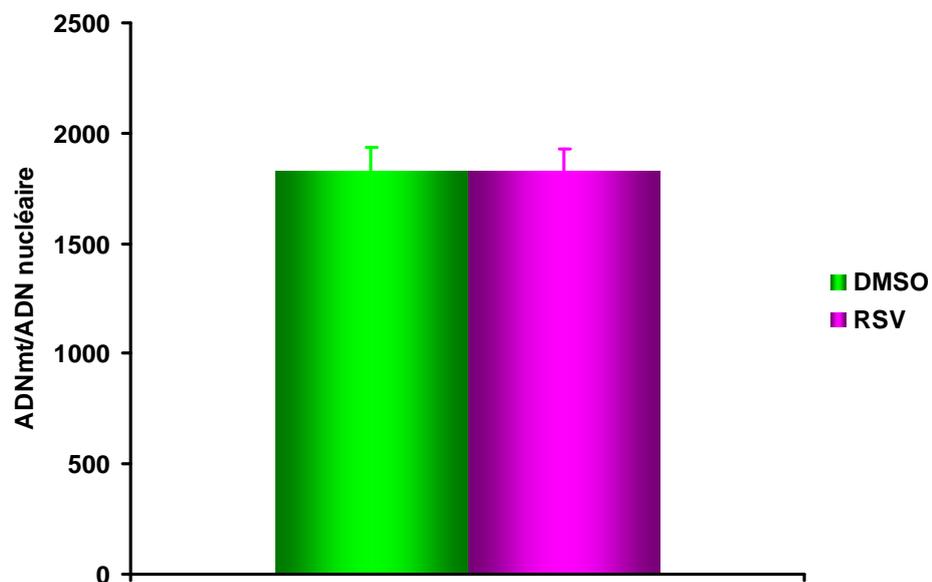


Figure 31 : Quantité d'ADNmt

Des cellules HepG2 ont été traitées avec du resvératrol (RSV) à la concentration de 50 μ M ou avec le même volume de DMSO pendant 24h. La quantité d'ADNmt a été mesurée par PCR quantitative en temps réel. Les résultats sont exprimés selon le ratio d'un gène mitochondrial (ND1) et d'un gène nucléaire (β -globine). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm SEM (n = 8).

Tableau 1 : Critères de diagnostic du syndrome métabolique

	<u>Critères selon NCEP ATPIII</u> <i>Présence d'au moins trois des facteurs suivants</i>	<u>Critères selon l'OMS</u> <i>Présence de diabète ou d'intolérance au glucose ou IR et d'au moins deux des facteurs suivants</i>
Hyperglycémie/résistance à l'insuline	Glycémie à jeun ≥ 110 mg/dl	Diabète de type 2 <i>ou</i> glycémie à jeun ≥ 110 mg/dl <i>ou</i> intolérance au glucose
Obésité abdominale	Tour de taille > 102 cm chez les hommes et > 88 cm chez les femmes	IMC > 30 kg/m ² <i>ou</i> ratio taille/hanches $> 0,9$ chez les hommes et $> 0,85$ chez les femmes
Hypertriglycéridémie	$\geq 1,7$ mmol/l	$\geq 1,7$ mmol/l
Concentration faible d'HDL cholestérol	< 1 mmol/l chez les hommes et $< 1,3$ mmol/l chez les femmes	$< 0,9$ mmol/l chez les hommes et < 1 mmol/l chez les femmes
Hypertension	$\geq 130/85$ mm Hg	$\geq 140/90$ mm Hg
Microalbuminurie	non incluse	≥ 20 µg/min <i>ou</i> ratio albumine/créatine ≥ 30 mg/g

NCEP ATPIII: National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III, OMS: Organisation Mondiale de la Santé, IR: insulino-résistance, IMC: indice de masse corporelle, HDL: high-density lipoprotein. D'après "Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults" (2001) et WHO (1999).

Tableau 2 : Diagnostic d'une NAFLD

Suspicion d'une NAFLD :
<ul style="list-style-type: none">• Exclure une consommation excessive d'alcool : Consommation d'alcool < 20-30 g/jour chez l'homme et < 20 g/jour chez la femme.
<ul style="list-style-type: none">• Exclure les causes secondaires de stéatose hépatique : Médicaments (corticostéroïdes, amiodarone, methotrexate, tamoxifene...) Etats nutritionnels altérés (gastroplastie, by-pass, perte de poids rapide, nutrition parentérale, cachexie...) Causes génétiques ou métaboliques (maladie de Wilson, lipodystrophie...) Autres (HIV, maladies inflammatoires intestinales, hépatotoxines environnementales...)
<ul style="list-style-type: none">• Exclure d'autres maladies causant des lésions hépatiques : Hépatite B et C Déficiency en antitrypsine alpha-1 Hépatites auto-immunes Maladie de Wilson
<ul style="list-style-type: none">• Recherche des manifestations du syndrome métabolique : Obésité et en particulier centrale Insulinorésistance, diabète Hyperlipidémie Hypertension
<ul style="list-style-type: none">• Imagerie pour rechercher une stéatose hépatique : Echographie Tomodensitométrie IRM
<ul style="list-style-type: none">• Biopsie hépatique : La biopsie hépatique est indispensable pour évaluer le grade et le stade de NAFLD

Tableau 3 : Classification des NAFLD

Grades de stéatose	
Grade 1 <i>discrète</i>	< 33 % hépatocytes affectés
Grade 2 <i>modérée</i>	33 % à 66 % d'hépatocytes affectés
Grade 3 <i>sévère</i>	> 66 % d'hépatocytes affectés

Grades de stéatohépatite	
Grade 1 <i>discrète</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Stéatose : discrète ou modérée; principalement macrovésiculaire • Ballonisation hépatocytaire : isolée (zone 3) • Inflammation lobulaire : dispersée et discrète (zone 1-2); aigüe (cellules polymorphonucléaires) et chronique (cellules mononucléaires) • Inflammation portale : absente ou discrète
Grade 2 <i>modérée</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Stéatose : discrète à sévère; macrovésiculaire et microvésiculaire • Ballonisation hépatocytaire : évidente (zone 3) • Inflammation lobulaire : cellules polymorphonucléaires associées aux hépatocytes ballonnés; fibrose péricellulaire; inflammation chronique discrète • Inflammation portale : absente ou discrète à modérée
Grade 3 <i>sévère</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Stéatose : sévère; macrovésiculaire et microvésiculaire • Ballonisation hépatocytaire : marquée (zone 3) • Inflammation lobulaire : aigüe et chronique; dispersée; cellules polymorphonucléaires concentrées dans la zone 3; fibrose périsinusoidale • Inflammation portale : discrète à modérée

Stades de fibrose	
Stade 1	Fibrose isolée ou étendue au niveau de la zone 3 périveineuse, périsinusoidale ou péricellulaire
Stade 2	Stade 1 + fibrose isolée ou étendue portale et périportale
Stade 3	Fibrose isolée ou étendue avec septa porto-portes et porto-sushépatiques
Stade 4	Cirrhose avec ou sans fibrose périsinusoidale résiduelle

Adapté de Brunt et al. (1999)

Tableau 4 : Effets du rimonabant sur la prise alimentaire et la perte de poids

Animaux	Régimes	Rimonabant	Durées	Effets	Références
Rats Wistar (M)	Standard	10 mg/kg/jour (ip)	14 jours	<ul style="list-style-type: none"> ➤ prise alimentaire pendant les 5 premiers jours ➤ poids maintenue 	Colombo <i>et al.</i> , 1998
Souris C57BL/6J (M)	Riche en gras pendant 12 à 17 semaines avant traitement	10 mg/kg/jour (o)	5 semaines	<ul style="list-style-type: none"> ➤ prise alimentaire pendant la première semaine ➤ poids maintenue 	Ravinet Trillou <i>et al.</i> , 2003
Rats Zucker obèses (M)	Standard	10 mg/kg/jour (o)	40 jours	<ul style="list-style-type: none"> ➤ prise alimentaire pendant les 15 premiers jours ➤ poids maintenue 	Vickers <i>et al.</i> , 2003
Souris C57BL/6J (M)	Riche en gras pendant 5 mois avant le traitement	10 mg/kg/jour (o)	10 semaines	<ul style="list-style-type: none"> ➤ prise alimentaire pendant les 15 premiers jours ➤ poids maintenue 	Poirier <i>et al.</i> , 2005
Souris C57BL/6J (M)	Riche en gras pendant 12 semaines avant le traitement	10 mg/kg/jour (o)	40 jours	<ul style="list-style-type: none"> ➤ prise alimentaire pendant la première semaine ➤ poids maintenue 	Jbilo <i>et al.</i> , 2005
Souris ob/ob (F)	Standard	10 mg/kg/jour (ip)	7 jours	<ul style="list-style-type: none"> ➤ prise alimentaire à partir du 5^{ème} jour et redevient normale au 7^{ème} jour ➤ poids à partir du 5^{ème} jour maintenue jusqu'au 7^{ème} jour 	Liu <i>et al.</i> , 2005
Rats Sprague-Dawley (M)	Riche en gras pendant 21 jours avant traitement	10 mg/kg/jour (ip)	14 jours	<ul style="list-style-type: none"> ➤ prise alimentaire pendant la tout le traitement mais qui réaugmente à partir du 2^{ème} jour ➤ poids maintenue 	Thornton-Jones <i>et al.</i> , 2006
Rats Wistar (F)	Riche en gras et en sucre pendant 6 semaines avant traitement	10 mg/kg/jour (o)	6 semaines	<ul style="list-style-type: none"> ➤ prise alimentaire pendant les 15 premiers jours ➤ poids maintenue 	Herling <i>et al.</i> , 2008

M : male, F, femelle, o : administration orale, ip: administration intra-péritonéale.

Tableau 5 : Enzymes cibles du resvératrol

Cibles du resvératrol		Effets biologiques associés	Références
Cyclo- et lipooxygénase	-	Diminution de l'inflammation et de la tumorigénèse chez la souris	Kimura <i>et al.</i> , 1985 Jang <i>et al.</i> , 1997
PKCs et p56 ^{lck}	-	Inhibition de la croissance cellulaire et induction de l'apoptose dans des lignées cellulaires cancéreuses	Jayatilake <i>et al.</i> , 1993 Atten <i>et al.</i> , 2005 Stewart et O'Brian, 2004
ERK1, JNK1, p38	-	Réversion de la stimulation de l'endothéline-1	El-Mowafy et White, 1999
IKK β	-	Inhibition de l'expression de COX2 induite par un ester de phorbol	Kundu <i>et al.</i> , 2006
STAT3, Src	-	Inhibition de la viabilité de plusieurs lignées cellulaires tumorales humaines	Kotha <i>et al.</i> , 2006
Ribonucléotide réductase	-	Inhibition de la synthèse d'ADN dans des lignées cellulaires leucémiques	Fontecave <i>et al.</i> , 1998
ADN polymérases α et δ	-	Non déterminé	Sun <i>et al.</i> , 1998 Stivala <i>et al.</i> , 2001
PKD	-	Action chemopréventive du cancer	Stewart <i>et al.</i> , 2000 Haworth et Avkiran, 2001
PKC α	-	Non déterminé	Slater <i>et al.</i> , 2003
Quinone réductase 2	-	Résistance à la mort cellulaire induite par la menadione	Buryanovskyy <i>et al.</i> , 2004
Aromatase	-	Non déterminé	Wang <i>et al.</i> , 2007
SIRT1	+	Augmentation de la durée de vie	Howitz <i>et al.</i> , 2003 Wood <i>et al.</i> , 2004
Adenylyl cyclase	+	Inhibition de la prolifération des cellules MCF7	El-Mowafy et Alkhalaf, 2003
AMPK	+	Amélioration du métabolisme	Baur <i>et al.</i> , 2006 Zang <i>et al.</i> , 2006

Adapté de Pirola et Fröjdjö, 2008

Tableau 6 : Caractéristiques des sirtuines

	Localisation cellulaire	Activité enzymatique	Cibles
SIRT1	Cytoplasmique, nucléaire	Déacétylase	PGC1 α , FOXOs, NF- κ B, AceCS1, MEF2, PCAF, histones H4K16 et H1K26, p53, p300, MyoD
SIRT2	Cytoplasmique, nucléaire	Déacétylase	Tubuline, histone H4K16
SIRT3	Mitochondriale, nucléaire	Déacétylase	AceCS2, GDH, Complexe I
SIRT4	Mitochondriale	ADP-ribosyl transférase	GDH
SIRT5	Mitochondriale	Déacétylase	?
SIRT6	Nucléaire	ADP-ribosyl transférase	?
SIRT7	Nucléaire	?	?

Selon Schwer et Verdin, 2008

Tableau 7 : Composition des différents régimes alimentaires

	Régime standard	Régime riche en gras
Protéines	16 %	22 %
Lipides	3 %	35 %
Glucides	60 %	28 %
Eau, fibres, vitamines et minéraux	21 %	15 %
Valeurs énergétiques (kcal/kg)	3310	5150

Tableau 8 : Différentes combinaisons de substrats et d'inhibiteurs utilisées pour la mesure de consommation d'oxygène de mitochondries isolées

	Concentration initiale	Concentration finale	Volume injecté pour 2 ml
Malate	0,5 M	2,5 mM	10 µl
Pyruvate	0,5 M	5 mM	20 µl
Roténone	2,5 mM	5 µM	4 µl
Succinate	0,5 M	5 mM	20 µl
Malate	0,5 M	2,5 mM	10 µl
Palmitoyl-l-carnitine	4 mM	40 µM	20 µl
Malate	0,5 M	2,5 mM	10 µl
Carnitine	100 mM	1 mM	20 µl
Palmitoyl CoA	4 mM	40 µM	20 µl
Myxothiazole	5 mM	5 µM	2 µl
Ascorbate	0,5 M	5 mM	20 µl
TMPD	100 mM	500 µM	10 µl

Tableau 9 : Résumé des études de la fonction mitochondriale hépatique dans des modèles de rats alimentés avec un régime déficient en choline et/ou en méthionine

Modèles	Résultats	Références
Rats Wistar CDD 4 semaines	<p>↗ consommation d'O₂ mitochondriale à l'état 4 (succinate), ↘ RCR et ↘ ADP/O</p> <p>↗ peroxydation lipidique</p> <p>⇒ la peroxydation lipidique altère le fonctionnement de la chaîne respiratoire qui en retour va produire plus de ROS</p>	Oliveira <i>et al.</i> , 2006
Rats Wistar CDD 30 jours	<p>↘ consommation d'O₂ mitochondriale à l'état 3 (glutamate/malate) et ↘ activité du complexe I</p> <p>↗ production H₂O₂ et ↗ peroxydation des cardioliipines</p> <p>⇒ dysfonction du complexe I due à une production accrue de ROS qui entraîne la peroxydation des cardioliipines</p>	Petrosillo <i>et al.</i> , 2007
Rats Wistar CDD 4, 8, 12 et 16 semaines	<p>↗ consommation d'O₂ mitochondriale à l'état 4 (glutamate/malate et succinate) pour tous les groupes, ↘ consommation d'O₂ mitochondriale à l'état 3 (glutamate/malate et succinate) à 4 et 16 semaines et ↘ potentiel de membrane à 4 et 16 semaines (↗ à 12 semaines), ↗ activité succinate déshydrogénase et cytochrome c oxydase à 12 semaines (↘ à 16 semaines), ↘ oxydation des protéines à 12 semaines (↗ à 16 semaines), ↗ protéine ANT à 12 semaines et ↘ à 16 semaines</p> <p>⇒ altération progressive de la fonction mitochondriale</p>	Teodoro <i>et al.</i> , 2008
Rats Wistar MCDD 3, 7 et 11 semaines	<p>↗ fuite protons due à UCP2 à 3, 7 et 11 semaines, ↗ production H₂O₂ et de la peroxydation des protéines à 7 et 11 semaines, ↘ contenu hépatique en ATP à 3, 7 et 11 semaines</p> <p>⇒ l'↗ de la fuite de protons médiée par UCP2 est un mécanisme protecteur vis-à-vis de l'↗ de la production de ROS mais qui entraîne une déplétion en ATP compromettant ainsi la capacité du foie à faire face à une demande accrue en énergie</p>	Serviddio <i>et al.</i> , 2008a
Rats Wistar MCDD 3, 7 et 11 semaines	<p>↗ consommation d'O₂ mitochondriale à l'état 4 (succinate) à 7 semaines, ↗ consommation d'O₂ mitochondriale à l'état 3 et 4 (succinate) à 3 semaines mais normalisée à 7 et 11 semaines, ↘ ADP/O (glutamate/malate) à 7 semaines, ↘ ADP/O (succinate) à 3, 7 et 11 semaines, ↘ activité complexe I à 7 et 11 semaines, ↗ activité complexe II à 3 semaines mais ↘ à 11 semaines, ↘ contenu hépatique en ATP mais sans variation de l'activité de l'ATP synthase</p> <p>⇒ dysfonction mitochondriale qui entraîne une déplétion hépatique en ATP</p>	Serviddio <i>et al.</i> , 2008b
Rats Wistar HFD (25 %) + MCDD 6 semaines	<p>↗ consommation d'O₂ mitochondriale à l'état 3 et 4 (glutamate/malate et succinate), ↘ ATP/O, ↗ fuite de protons, ↗ "slip redox" au niveau de la cytochrome c oxydase, ↘ production de ROS</p> <p>⇒ adaptation de la fonction mitochondriale de manière à limiter la stéatose et le stress oxydant</p>	Romestaing <i>et al.</i> , 2008

CDD : choline deficient diet, MCDD : methionine-choline deficient diet, HFD: high fat diet