



**HAL**  
open science

# Effets de la modulation de la masse grasse sur la production d'adiponectine chez la souris : conséquences sur le métabolisme hépatique des lipides

Louiza Djaouti

► **To cite this version:**

Louiza Djaouti. Effets de la modulation de la masse grasse sur la production d'adiponectine chez la souris : conséquences sur le métabolisme hépatique des lipides. Sciences agricoles. Université de Bourgogne, 2010. Français. NNT : 2010DIJOS074 . tel-00674047

**HAL Id: tel-00674047**

**<https://theses.hal.science/tel-00674047>**

Submitted on 8 Sep 2014

**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 DE BOURGOGNE  
Ecole Doctorale *E2S-UFR* Sciences de la Vie



# THESE

Présentée par

**Louiza DJAOUTI**

En vue d'obtenir le grade de  
**Docteur de l'Université de Bourgogne**

Discipline : Sciences de la vie

Spécialité : Physiologie de la Nutrition

*Effets de la modulation de la masse grasse sur la production  
d'adiponectine chez la souris :  
Conséquences sur le métabolisme hépatique des lipides*

Présentée et soutenue publiquement le lundi 13 Décembre 2010

**Jury :**

**Alain Géloën** *DR CNRS, IMBL, INSERM INSA, Lyon*

**Annie Quignard-Boulangé** *DR INRA- AgroParis Tech, Paris*

**Mohamed El-Hadi Khebbeb** *Pr Université, Annaba*

**Laurence Perségol** *Pr IUT-INSERM U866, Dijon*

**Pascal Degrace** *Pr UB-INSERM U866, Dijon*

**Rapporteur**

**Rapporteur**

**Examineur**

**Examineur**

**Directeur de thèse**

*A ma famille,*

*A mes amis,*

*A Mehdi*

## **Remerciements**

*Je tiens à exprimer tout d'abord mes remerciements aux membres du jury, qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse.*

*Monsieur **Alain Géloën**,*

*Directeur de Recherche de l'unité CNRS « régulation métaboliques nutrition et diabète » de l'INSA de Lyon, je le remercie de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail ; qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.*

*Madame **Annie Quignard-Boulangé***

*Directeur de Recherche de l'Unité « Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire » de l'UMR 914 INRA-AgroParis Tech, je la remercie d'avoir bien voulu juger ce travail ; qu'elle soit assurée de ma respectueuse gratitude.*

*Monsieur **Mohamed El-Hadi Khebbeb***

*Professeur à l'université de Badji Mokhtar au département de biologie animale d'Annaba (Algérie), je le remercie d'avoir accepté de porter un œil critique à ce travail, je tiens à lui exprimer ma reconnaissance.*

*Madame **Laurence Perségol***

*Professeur à l'UIT de génie biologique de Dijon, Je tiens à la remercie d'avoir accepté de faire partie de ce jury et d'avoir bien voulu juger ce travail, je lui adresse mes sincères remerciements.*

*Monsieur **Pascal Degrace***

*Professeur à la Faculté des Sciences de Dijon, qui m'a accueilli dans son équipe et qui a personnellement dirigé mes recherches, pour le temps, la patience, et le réconfort qu'il m'a accordé tout au long de ces années, pour m'avoir appris la rigueur, pour avoir été toujours très disponible et avoir eu une oreille attentive à mes questions malgré ses charges administratives ; je tiens à lui adresser ma profonde gratitude.*

***Aux autres membres de l'équipe :***

***Monsieur Joseph Gresti***

*Ingénieur de Recherches au laboratoire. Je lui suis très reconnaissant de m'avoir initié aux techniques de chromatographie et de m'avoir souvent apporté une aide judicieuse à mes « problèmes techniques ». Je tiens à le remercier aussi pour son soutien moral tout au long de ma thèse. Je tiens à lui adresser ma profonde gratitude et à lui exprimer mon amicale reconnaissance.*

***Laurent Demizieux***

*Maître de conférences à la faculté des sciences de Dijon, je lui exprime toute ma gratitude pour avoir toujours su me faire profiter de son expérience dans les moments où j'en avais besoin.*

***Tony Jourdan***

*Jeune docteur et collègue de bureau, je tiens à le remercier pour sa gentillesse, sa disponibilité et pour avoir partagé mes heures au laboratoire.*

***Madame Monique Baudoin***

*Secrétaire du laboratoire, je la remercie pour sa disponibilité malgré toutes les sollicitations des membres du laboratoire, et pour m'avoir aidé dans toutes les « tâches administratives » relatives à ce travail, elle a toujours su répondre à mes requêtes avec le sourire. Qu'elle en soit ici vivement remerciée.*

***Aux membres du laboratoire :***

***Sandrine Bellenger***

*Ingénieur d'Etudes au laboratoire, pour sa polyvalence technique et administrative qui m'a souvent aidée. Je la remercie aussi pour sa bonne humeur permanente.*

*Mes remerciements s'adressent aussi à mes « collègues de bureau » : **Cécile, Mélaine et Arnaud** pour leur bonne humeur et l'entraide qui règne dans le bureau étudiant. Je leur adresse tous mes encouragements pour la suite de leur carrière.*

*Mes remerciements vont également à **Ahlem, Zohra, Béatrice, Mika et Céline** pour leur soutien moral, leur gentillesse sans faille et leur amitié. Je tiens à leur exprimer toute ma gratitude.*

*Mes amitiés à tout le personnel du laboratoire, ils ont toujours fait preuve de disponibilité et d'égards envers moi.*

*Je remercie aussi vivement tous les membres du Département de Génie Biologique et tout particulièrement **Nathalie Bertrand** et **Laurence Perségol**, grâce à qui, mes activités d'enseignements ont été un plaisir et se sont toujours bien déroulées.*

## Résumé

L'adiponectine (ApN) est une adipokine de 30 KDa produite abondamment par le tissu adipeux qui a été décrite pour la première fois en 1995. Dès lors qu'une corrélation inverse entre les taux circulants d'ApN et l'adiposité a été mise en évidence, de très nombreuses études ont été initiées pour chercher à établir un lien avec les pathologies liées au syndrome métabolique. Ainsi, chez les patients obèses et diabétiques, une perte de poids induite par un traitement médicamenteux ou un régime hypocalorique s'accompagne d'une augmentation des taux circulants d'ApN et d'une amélioration des paramètres biochimiques. Il ressort de ces études que des taux élevés d'ApN sont corrélés à une amélioration de la sensibilité à l'insuline, des paramètres lipidiques et une diminution du risque cardiovasculaire. Cependant, les mécanismes d'action conduisant à l'amélioration du métabolisme lipidique et glucidique restent encore mal connus. Au cours de cette étude, nous avons, dans un premier temps, cherché à déterminer les conséquences d'une variation de la masse grasse sur la production de l'ApN chez la souris. Pour cela, différentes stratégies nutritionnelles et pharmacologiques, conduisant à une fonte ou à une augmentation de la masse grasse, ont été utilisées. Les résultats obtenus suggèrent que la production d'ApN n'est pas dépendante de la taille des adipocytes mais plutôt de leur état inflammatoire. Dans un second temps, grâce à un modèle d'explants de foie en culture, nous avons cherché à déterminer les effets directs de l'ApN sur le métabolisme lipidique du foie. Une première approche a consisté à tester les effets à long terme c'est à dire susceptibles de correspondre à des modifications d'expression génique et de synthèse protéique en incubant les explants pendant 21h dans un milieu de culture contenant de l'ApN en présence ou non d'insuline. Les résultats suggèrent que l'ApN accentue les effets de l'insuline, ce qui se traduit par une meilleure utilisation du glucose avec en contre partie une stimulation de la lipogenèse et une réduction de la  $\beta$ -oxydation en présence d'insuline. De plus, l'ApN apparaît exercer un effet sur les voies de catabolisme des HDL. Par une seconde approche, nous avons testé les effets à court terme de l'ApN sur les capacités  $\beta$ -oxydatives en traitant les explants pendant 45 min. Dans ces conditions plus appropriées pour mettre en évidence l'activation des voies de régulation rapides, la présence d'ApN entraîne une stimulation de la  $\beta$ -oxydation qui s'accompagne d'une augmentation de la p-AMPK. En conclusion, ces résultats suggèrent que l'ApN exerce des effets directs sur le métabolisme hépatique du glucose compatible avec l'effet insulino-sensibilisateur observé in vivo. En revanche, les résultats ne permettent pas, à ce stade, d'établir une relation entre une induction par l'ApN de l'activité  $\beta$ -oxydative des acides gras dans le foie et ces effets bénéfiques sur les paramètres lipidiques.

## Abstract

Adiponectin (ApN), a 30-kDa adipokine abundantly produced by adipose tissue has been described for the first time in 1995. Early findings demonstrating serum adiponectin levels are inversely correlated with obesity initiated intense investigation of the relationship between adiponectin and all symptoms of the metabolic syndrome. Of these studies, strong evidence suggests that a weight loss induced by medication or hypocaloric diet led to increased circulating ApN levels and improvement of biochemical parameters. Thus, high levels of ApN have been correlated with an improvement of insulin sensitivity and lipid parameters reducing cardiovascular risk. However mechanisms involved in the improvement of glucose and lipid metabolism are not fully understood. In this study, we wanted to determine whether variations of plasma ApN levels are associated with alterations of liver lipid metabolism in mice. For this, we used different nutritional and pharmacological strategies to induce fat mass variations and measured corresponding ApN production and lipid parameters. First, results suggested that production of ApN is not dependent on the size of adipocytes, but rather to their inflammatory state. The effect of ApN of liver metabolism was further studied using an in vitro model of liver explants in culture. A first approach consists of testing the long-term effects of ApN on liver incubating the slices for 21h in the presence or not of insulin. Biochemical and molecular data suggested that ApN accentuates the effects of insulin, resulting in improvement of glucose utilization associated with a stimulation of lipogenesis and a reduction in  $\beta$ -oxidation in the presence of insulin. In addition, ApN appears to affect HDL catabolism pathways. In a second approach, we tested the short-term effects of ApN on  $\beta$ -oxidative capacity treating the slices for 45 min. Under these conditions more appropriated to highlight the activation of fast regulatory pathways, ApN induced a stimulation of  $\beta$ -oxidation which was accompanied by an increase in p-AMPK. In conclusion, data suggested that ApN has direct effects on hepatic glucose metabolism consistent with the insulin-sensitizer effect demonstrated in vivo. However, at this stage, these results did not give evidence of a relationship between induction of liver fatty acid  $\beta$ -oxidation by ApN and its beneficial effects on lipid parameters.



## ABBREVIATIONS

**ABCA1:** ATP-Binding Cassette Transporter

**ACC:** Acétyl-CoA Carboxylase

**ACO:** Acyl CoA Oxydase

**ACRP30:** Adipocyte Complement-Related Protein of 30kDa

**AdiopR:** Adiponectin Receptor

**AGL:** Acides Gras Libres

**AMPK:** 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase.

**APM-1:** Adipose Most Abundant transcript-1

**ApN:** Adiponectine

**APPL:** Adaptor protein containing Pleckstrin homology domain, Phosphotyrosine-binding domain, and Leucine zipper motif

**C/EBP:** CCAAT / Enhancer Binding Protein

**C1q:** Complement factor C1q

**CCM:** Chromatographie sur Couche Mince

**CLA:** Conjugated Linoleic Acid

***t10c12*CLA:** *trans* 10, *cis*12 Conjugated Linoleic Acid

**CPT-1:** Carnitine palmitoyltransferase I

**CRH:** *Corticotropin-Releasing Hormone*

**CRH:** Corticotropin-Releasing Hormone

**DHA:** Acide docosahexaénoïque

**EC:** Ester de Colestérol

**EPA:** Acide eicosapentaénoïque

**Ero1-L $\alpha$ :** ER membrane-associated oxidoreductase 1-L $\alpha$

**ERp44:** ER protein of 44 kDa

**FAS:** Fatty Acid Synthase

**FAT/CD36:** FAT/Cluster of Differentiation 36

**FATP-1:** Fatty acid transporter-1

**FoxO1:** Forkhead box O1

**FSV:** Fraction Stroma-Vasculaire

**G6P:** Glucose-6-Phosphatase

**GBP28:** Gelatin Binding Protein

**GK:** Glucokinase

**HbA1c:** Hémoglobine Glyquée

**HDL:** High Density Lipoprotein

**HMW:** High Molecular Weight

**11 $\beta$ -HSD:** 11 $\beta$ -HydroxyStéroïde Déshydrogénase  
**HSHF:** High sucrose high fat  
**Id3:** Inhibitor of différenciation 3  
**IGFBP-3:** Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3  
**IL-6:** Interleukin-6  
**IMC:** Indice de Masse Corporelle  
**IR:** Insulino-Résistance  
**IRS:** Insulin receptor substrate  
**JNK:** c-Jun N-terminal Kinase  
**LDL:** Low Density Lipoprotein  
**LH:** Lipase Hépatique  
**LHS:** Lipase hormono-sensible  
**LMWA:** Low Molecular Weight  
**LRH:** Liver Receptor Homolog-1  
**LXR:** Liver X Receptor  
**MMW:** Medium Molecular Weight  
**p38MAPK:** p38 Mitogen-Activated Protein Kinase  
**PCK:** Protein C Kinase  
**PEPCK:** Phosphoénolpyruvate carboxykinase,  
**PiogTZ:** Pioglitazone  
**PPAR:** Peroxisome Proliferator-Activated Receptors  
**RosigTZ:** Rosiglitazone  
**SCD-1:** Stéaroyl-CoA Désaturase-1  
**SIRT1:** Sirtuin 1, désacétylases d'histone NAD-dépendantes  
**SNPs:** Single-Nucleotide Polymorphisms  
**SR-B1:** Scavenger Receptor de classe B de type 1  
**SREBP:** Sterol Regulatory Element Binding Protein  
**STZ:** Streptozotocine  
**TA:** Tissu adipeux  
**TASC:** TA sous-cutané  
**TAV:** TA Viscéral  
**TG:** Triglycérides  
**TNF $\alpha$ :** Tumor Necrosis Factor  $\alpha$   
**VLDL:** Very Low-Density Lipoprotein

# SOMMAIRE

## **INTRODUCTION**

PREAMBULE	1
I. L'ADIPONECTINE	5
1. Historique	5
2. Structure de la protéine native	5
3. Structure des isoformes multimériques	6
4. Biodisponibilité de l'ApN	8
5. Production de l'ApN	9
II. DONNEES CLINIQUES ILLUSTRANT LE ROLE DE L'APN DANS LES PATHOLOGIES ASSOCIEES AU SYNDROME METABOLIQUE	10
1. Conséquences des polymorphismes du gène de l'ApN	10
2. ApN et dyslipidémie	11
3. ApN, insulino-résistance et diabète de type II	12
III. REGULATION DE LA PRODUCTION D'APN	12
1. Régulation hormonale	12
1.1. Insuline	12
1.2. Glucocorticoïdes	13
1.3. Catécholamines et AMPc	14
2. Régulation par les cytokines	14
2.1. TNF $\alpha$	14
2.2. Ils	15
3. Régulation par la leptine	15
4. Régulation nutritionnelle	16
5. Régulation par les thiazolidinediones	17
IV. MECANISME DE REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DE LA PRODUCTION	18
1. Structure du gène de l'ApN	18
2. Régulation par différents facteurs de transcription	19
V. EFFICACITE BIOLOGIQUE DES DIFFERENTES ISOFORMES D'APN	21
VI. MECANISMES D'ACTION DE L'APN	25
1. Les Récepteurs de l'ApN	25
1.1. Propriétés et voies de signalisation	25
1.2. Régulation de l'expression	27
VII. MECANISMES CONDUISANT A L'AMELIORATION DE L'INSULINO-RESISTANCE PAR L'APN	28
1. Effets sur l'adiposité	29
2. Effets sur le métabolisme glucidique	30

3. Effets sur le métabolisme lipidique	31
3.1. Muscle	31
3.2. Foie	33
<b>PROBLEMATIQUE</b>	<b>35</b>
<b>APPROCHE IN VIVO</b>	
EVALUATION DES EFFETS DE LA MODULATION DE LA MASSE GRASSE SUR LES CONCENTRATIONS CIRCULANTES DE L'APN SUR LE METABOLISME LIPIDIQUE DU FOIE	37
1. Régime hyperglucidique et hyperlipidique (HSHF)	38
1.1. Caractérisation du modèle	38
1.2. Paramètres relatifs à l'ApN	40
1.3. Régulation génique dans les tissus adipeux	42
2. Traitement à l'acide linoléique conjugué (CLA)	43
2.1. Caractérisation du modèle	45
2.2. Paramètres relatifs à l'ApN	45
3. Traitement à la Streptozotocine (STZ)	47
3.1. Caractérisation du modèle	49
3.2. Paramètres relatifs à l'ApN	49
4. Traitement à la pioglitazone (PioGTZ)	52
4.1. Caractérisation du modèle	55
4.2. Paramètres relatifs à l'ApN	55
5. Conclusion approche <i>in vivo</i>	57
	59
<b>APPROCHE IN VITRO</b>	
I. MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE DES EXPLANTS DE FOIE	61
1. Modèle d'étude : Explants de foie	61
2. Description du dispositif expérimental et préparation des explants de foie	61
3. Test de viabilité par mesure de la consommation d'oxygène	62
4. Intégrité des ARNms	63
5. $\beta$ -oxydation sur explants de foie frais	63
6. Captage et incorporation des AG dans les différentes classes lipidiques	65
II. EVALUATION DES EFFETS DIRECTS DE L'APN SUR LE METABOLISME LIPIDIQUE DANS DES EXPLANTS DE FOIE	67
1. Caractérisation des conditions de culture	67
2. Effets d'un traitement de 21h par l'ApN sur les explants de foie sain	69
2.1. Effets d'un traitement par l'ApN en absence d'insuline	69
2.2. Effets d'un traitement par l'ApN en présence d'insuline	71
2.3. Effets d'un traitement par l'ApN en absence d'insuline sur des explants issus de souris obèses	76

3. Effets à court terme de l'ApN sur les capacités oxydatives des explants de foie en absence d'insuline	<b>78</b>
4. Discussion générale sur les effets de l'ApN dans les explants de foie	<b>80</b>
<b>III. EVALUATION DES EFFETS DIRECTS DE LA PIOGTZ SUR LE METABOLISME LIPIDIQUE DANS DES EXPLANTS DE FOIE</b>	<b>83</b>
1. Effet de la PioGTZ sur les paramètres lipidiques	<b>84</b>
2. Effet de la PioGTZ sur le captage du HDL-C	<b>86</b>
3. Effets de la PioGTZ sur l'expression de PPAR $\gamma$	<b>89</b>
4. Effets de la PioGTZ sur le métabolisme du glucose	<b>90</b>
 <b>CONCLUSION GENERALE &amp; PERSPECTIVES</b>	 <b>93</b>
 <b>MATERIEL &amp; METHODE</b>	
<b>I. ANIMAUX</b>	<b>100</b>
1. Souris	<b>100</b>
2. Traitement des animaux	<b>100</b>
2.1. Traitement des souris par la streptozotocine (STZ)	<b>100</b>
2.2. Traitement des souris par la Pioglitazone (PioGTZ)	<b>100</b>
2.3. Régime enrichi à l'acide linoléique conjugué (t10c12CLA)	<b>101</b>
2.4. Régime hyperglucidique et hyperlipidique (HSHF)	<b>101</b>
3. Sacrifice des animaux	<b>101</b>
<b>II. ANALYSES BIOCHIMIQUES</b>	<b>102</b>
1. Dosages sériques	<b>102</b>
1.1. Dosage des protéines totales	<b>102</b>
1.2. Dosage du glucose	<b>102</b>
1.3. Dosage des acides gras libres (AGL)	<b>102</b>
1.4. Dosage des triglycérides totaux	<b>102</b>
1.5. Dosage du cholestérol	<b>102</b>
1.6. Profils lipoprotéiques	<b>103</b>
1.7. Apolipoprotéines A-1 et B100	<b>103</b>
1.8. Dosage de l'insuline	<b>104</b>
1.9. Dosage de l'ApN	<b>104</b>
2. Dosages hépatiques	<b>104</b>
2.1. Intégrité des ARNms	<b>104</b>
2.2. Dosage des protéines du foie	<b>105</b>
2.3. Dosage des lipides totaux du foie	<b>105</b>
2.4. Dosage du glycogène	<b>105</b>
2.5. Activité de la lipase hépatique	<b>105</b>

2.6. Captage des lipoprotéines de haute densité (HDL)	106
III. EXPRESSION GENIQUE PAR RT-PCR (REVERSE TRANSCRIPTASE-POLYMERASE CHAIN REACTION) EN TEMPS REEL	106
IV. DOSAGE DE LA PHOSPHO-AMPK PAR WESTERN BLOT	108
V. MESURE DE LA CONSOMMATION D'OXYGENE DES EXPLANTS PAR OXYGRAPHIE	108
VI. OXYDATION DES ACIDES GRAS	109
1. Sur les explants de foie	109
2. Sur muscle soléaire	109
VII. CAPTAGE ET INCORPORATION DES ACIDES GRAS DANS LES DIFFERENTES CLASSES LIPIDIQUES	110
VIII. L'ADIPONECTINE	111
1. Adiponectine recombinante HEK293 (AbCys)	111
2. Validation de l'efficacité biologique de l'adiponectine recombinante HEK293	111
3. Dosage de l'ApN adipocytaire	113
IX. STATISTIQUES	113

## ***BIBLIOGRAPHIE***

## ***ANNEXES***

# *INTRODUCTION*

## ***PREAMBULE***

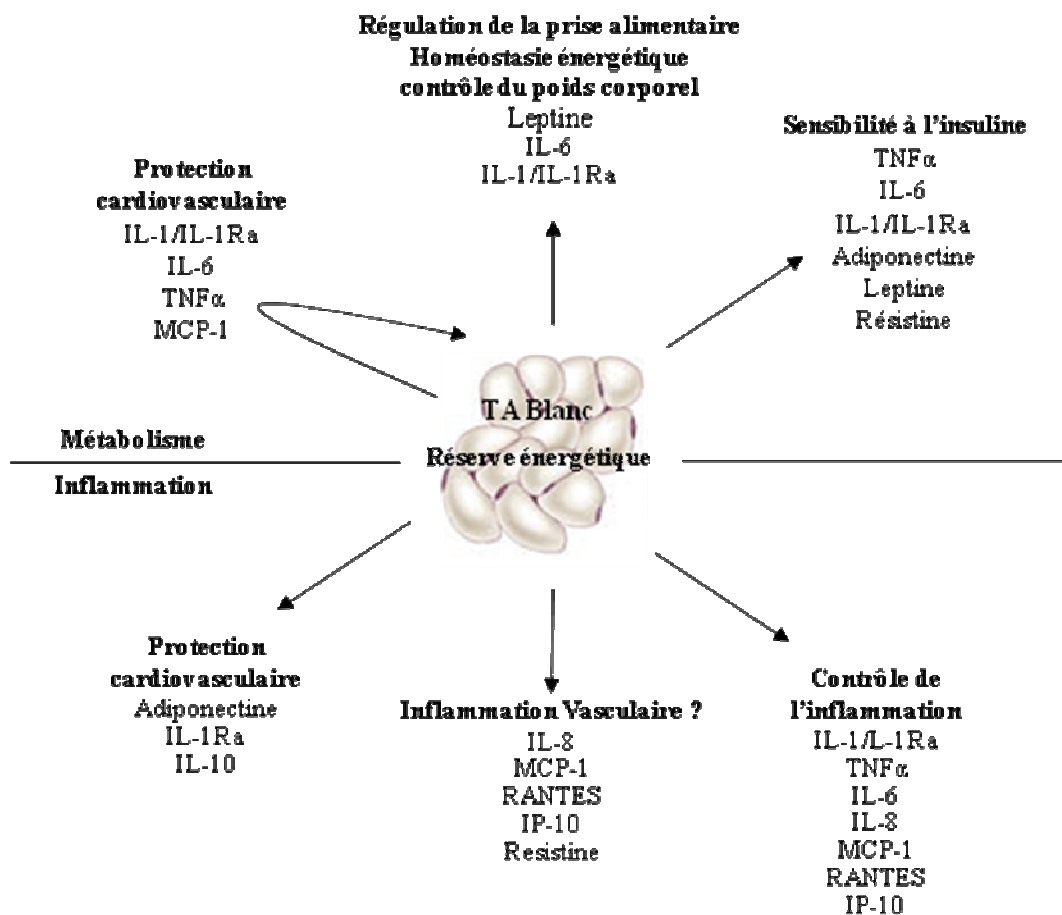
L'obésité est définie comme un excès de tissu adipeux (TA), qui s'accompagne dans la majorité des cas d'une insulino-résistance (IR) c'est-à-dire d'une diminution de la réponse des tissus sensibles (foie, muscle squelettique et TA) à l'action de l'insuline. Il est maintenant bien admis que l'installation d'une IR au niveau des adipocytes constitue un évènement majeur dans l'établissement des anomalies métaboliques liées à l'obésité telles que les dyslipidémies et le diabète de type II (Bergman and Mittelman, 1998). En effet, dans ces conditions, l'insuline n'a plus les mêmes capacités à freiner la lipolyse adipocytaire; des acides gras libres (AGL) sont alors libérés plus massivement dans la circulation (Arner, 2002) exerçant des effets lipotoxiques. L'augmentation du flux d'AGL vers le foie entraîne une hypertriglycéridémie via la stimulation de la synthèse et de la sécrétion de VLDL (*very low-density lipoprotein*) riches en triglycérides (TG) (Frayn, 2000). De plus, cette hypertriglycéridémie s'accompagne d'une baisse du HDL-cholestérol (HDL-C) (*high density lipoprotein-cholesterol*) et de modifications qualitatives des LDL (*low-density lipoprotein*) (Carr and Brunzell, 2004; Reilly and Rader, 2003). Le catabolisme réduit des particules riches en TG ainsi que d'autres facteurs conduisent également à cette réduction de la production des lipoprotéines de haute densité (HDL) (Despres et al., 1992). L'apparition d'une IR du TA peut également évoluer en diabète de type II au cours duquel un défaut de sécrétion d'insuline est constaté. Tant que les cellules  $\beta$  du pancréas sont fonctionnelles, une hyperinsulinémie compensatrice se met en place et permet la régulation de l'homéostasie glucidique, ceci correspond à l'état prédiabétique. La transition vers le diabète de type II se caractérise par une baisse de cette insulino-sécrétion compensatrice, ce qui induit une augmentation de la production hépatique de glucose. La plupart des études épidémiologiques font état d'une association très étroite entre l'excès pondéral et ce type de diabète. En effet, deux tiers des patients diabétiques de type II sont obèses. Le diabète survient cependant plus fréquemment chez les personnes avec une obésité dite androïde caractérisée par un excès de TA intra-abdominal, en particulier dans les régions omentales qui sont drainées par la veine porte. En effet, ce tissu graisseux viscéral présente une activité métabolique avec lipolyse accrue et libération massive d'AGL dans le système porte. Cette activité métabolique s'explique, entre autres, par la présence d'un plus grand nombre de récepteurs adrénergiques  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  et  $\beta_3$  dans ce tissu et par la rareté des récepteurs à l'insuline dans le TA omental, ce qui limite le rôle d'inhibiteur de la lipolyse de l'insuline. De plus, le phénomène de lipotoxicité sur le pancréas induit un dysfonctionnement dans la sécrétion de l'insuline. Cette lipotoxicité est due à une accumulation des TG dans les tissus, secondaire à l'augmentation chronique des concentrations



d'AGL dans le plasma. De même, l'hyperglycémie chronique entraîne un phénomène de glucotoxicité sur les cellules  $\beta$  du pancréas, participant ainsi à la diminution de l'insulinosécrétion (Raccah et al., 1999). Ainsi, la perturbation des fonctions du TA dans l'organisme jouerait donc un rôle clé dans le regroupement des anomalies métaboliques associées à l'obésité.

C'est l'accumulation des graisses corporelles qui est à l'origine de cette IR adipocytaire en provoquant une inflammation du TA (Ukkola and Bouchard, 2001). En effet, l'obésité est caractérisée par une inflammation chronique du TA blanc due à une production anormale d'adipokines pro-inflammatoires se traduisant par une induction de marqueurs plasmatiques de l'inflammation (Bastard et al., 2002; Hotamisligil et al., 1993). Il a été démontré chez l'animal (Weisberg et al., 2003; Xu et al., 2003a) puis chez l'Homme (Cancello et al., 2005; Cinti et al., 2005; Curat et al., 2004) que cette inflammation chronique du TA est caractérisée par une infiltration macrophagique. Ces macrophages semblent être responsables de l'expression d'une partie significative des cytokines inflammatoires TNF $\alpha$  (*Tumor necrosis factor  $\alpha$* ) et IL-6 (*Interleukin-6*) présentes dans ce tissu (Weisberg et al., 2003). Ces cytokines inflammatoires altèreraient la signalisation insulinique par une phosphorylation inactivatrice des résidus sérine/thréonine des IRS (*insulin receptor substrate*). Il est donc à l'heure actuelle assez légitime de penser que la production excessive de cytokines pro-inflammatoires par le TA d'animaux ou d'individus obèses, et en particulier par les macrophages présents au sein de ce tissu, ainsi que la baisse de production de cytokines anti-inflammatoires participent à la physiopathologie de l'IR. Les mécanismes responsables d'une diminution d'action de l'insuline dans le TA peuvent se situer au niveau de la liaison de l'hormone à son récepteur et en aval de ce dernier. Il est devenu évident que le TA et les AGL jouent un rôle clé dans la sensibilité à l'insuline. Les mécanismes moléculaires à l'origine des altérations métaboliques font intervenir des sécrétions du TA. En effet, le TA blanc, constitué d'adipocytes et de la Fraction Stroma-Vasculaire (FSV) (préadipocytes, fibroblastes, péricytes, cellules endothéliales et sanguines...), a longtemps été considéré comme un simple tissu de mise en réserve énergétique. Il s'est révélé ultérieurement capable de répondre à diverses hormones qui modulent l'accumulation (insuline) et la mobilisation (catécholamines) des TG ou des lipides neutres. De plus, au cours de la dernière décennie, le TA a acquis le statut de glande endocrine, synthétisant et sécrétant un grand nombre de molécules de natures peptidiques ou non peptidiques regroupées sous le terme d'adipocytokines suite à leur analogie structurelle avec les cytokines (Juge-Aubry et al., 2005; Wajchenberg, 2000) (**figure 1**). Ces adipocytokines sont impliquées entre autre dans le contrôle

de l'homéostasie énergétique, dans l'IR, l'inflammation et la pression artérielle. Le TA apparait donc comme un des acteurs fondamentaux dans la régulation de l'homéostasie énergétique de l'organisme.



**Figure 1 :** Les sécrétions du TA blanc d'après Juge-Aubry, 2005

Les dépôts adipeux sont localisés dans plusieurs zones de l'organisme et classés en deux grandes catégories. TA sous-cutané (TASC) et le TA interne (ou profond). Le TASC est composé d'un dépôt de TASC superficiel et TASC profond. Le TA interne est composé du TA viscéral (TAV), non viscéral, intra et périmusculaire (Shen et al., 2003). Selon les sites adipeux, des différences subtiles de réponse hormonale et de développement hyperplasique et/ou hypertrophique ont été mises en évidence. En effet, les dépôts SC et profonds semblent avoir un profil sécrétoire différent (Einstein et al., 2005; Fain et al., 2004). Le tissu viscéral présente une plus forte expression de cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$  par exemple) que le SC. Au cours du développement de l'obésité, l'infiltration macrophagique, responsable de la majorité des sécrétions du TA, plus particulièrement le TNF $\alpha$  (Fain et al., 2004; Fain et al., 2006), semble être

plus importante dans le TA profond comparativement au TASC (Harman-Boehm et al., 2007). La quantité de TA profond est plus fortement corrélée à la résistance à l'insuline que celle du TASC (Fox et al., 2007). L'ensemble de ces observations montre que les dépôts adipeux, en plus de leur localisation différente, présentent des caractéristiques métaboliques distinctes.

D'après une étude *in vitro* menée par Alvarez-Llamas *et al.*, le TAV humain sécrète environ 259 protéines (Alvarez-Llamas et al., 2007). Ces protéines sont classées en cinq catégories : signalisation, homéostasie de matrice extracellulaire, fonction immunitaire, fonction de dégradation et autres. Plusieurs études montrent que la FSV et plus particulièrement les macrophages, sont responsables de la majorité des sécrétions du TA (Fain et al., 2004; Fain et al., 2006). Il semblerait que seul 1/3 des sécrétions d'adipokines soient imputables à l'adipocyte lui-même (Alvarez-Llamas et al., 2007; Chen et al., 2005) comme c'est le cas pour la leptine et l'adiponectine (Fain et al., 2004). Ces molécules spécifiques de l'adipocyte interviennent de façon essentielle dans le contrôle du métabolisme énergétique et régulent également la réponse immunitaire.

Plusieurs arguments sont en faveur de l'implication de l'adiponectine dans l'amélioration de la sensibilité à l'insuline au niveau périphérique. L'intérêt pour l'adiponectine est resté modeste jusqu'en 1999-2000, jusqu'à la découverte de la corrélation inverse des taux d'ApN à l'obésité, au diabète de type II et aux maladies coronariennes (Arita et al., 1999; Hotta et al., 2000). Par la suite, des corrélations entre les taux plasmatiques de l'hormone et différentes pathologies métaboliques ont été rapportées. Parmi les premières études, Hotta *et al.* suggèrent que l'hypoadiponectinémie est liée au développement de la résistance à l'insuline. En effet, les taux plasmatiques d'adiponectine sont diminués au stade pré-diabétique et cette diminution est accentuée lorsque le type II diabète est établi ceci en parallèle d'une diminution de la sensibilité à l'insuline (Hotta et al., 2001). Certaines études ont apporté la preuve que le degré d'hypoadiponectinémie est plus étroitement lié au degré de résistance à l'insuline et à l'hyperinsulinémie qu'au degré d'adiposité (Weyer et al., 2001). Les taux plasmatiques d'adiponectine semblent également être indépendant des taux sériques de TG (Hotta et al., 2000), qui sont généralement augmentés au cours d'un diabète de type II et d'une IR. L'ensemble de ces observations dévoilent un rôle probable de l'adiponectine dans plusieurs anomalies métaboliques fréquemment observées dans le syndrome métabolique.

## ***I. L'ADIPONECTINE***

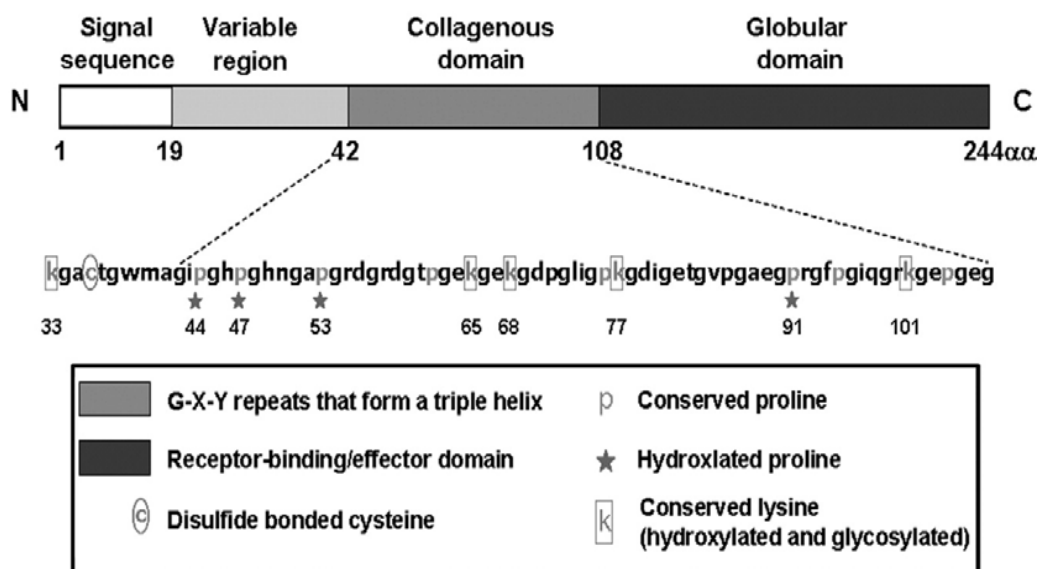
### **1. Historique**

L'adiponectine humaine et l'adiponectine murine ont été identifiées de manière indépendante et simultanée par quatre équipes de recherches différentes. Cette molécule a été caractérisée, en 1995, en tant que protéine abondamment sécrétée par des adipocytes 3T3-L1 et présente à des concentrations plasmatiques élevées chez la souris. En référence à son homologie avec le facteur C1q du complément, l'adiponectine a d'abord été appelée ACRP30 (*Adipocyte Complement-Related Protein of 30kDa*) (Scherer et al., 1995), puis clonée sous le nom d'AdipoQ (Hu et al., 1996). C'est cette étude qui a révélé pour la première fois la diminution d'expression de son gène chez les sujets obèses. Chez l'Homme, le gène de l'adiponectine a été cloné à partir du TA sous le nom d'APM-1 (*Adipose Most Abundant transcript-1*) suite à un séquençage aléatoire d'une banque d'ADNc (Maeda et al., 1996) puis, isolé du plasma humain sous le nom de GBP28 (*Gelatin Binding Protein*) (Nakano et al., 1996). De toute cette nomenclature, le nom d'adiponectine (ApN) est le plus largement accepté, et c'est ce terme qui sera utilisé tout au long de ce manuscrit.

### **2. Structure de la protéine native**

L'ApN est une protéine d'un poids moléculaire d'environ 30 kDa, comprenant 244 acides aminés (aa) chez l'Homme et 247 aa chez la souris. Les premiers aa sont très conservés. Ils représentent 80 % d'homologie avec toutes les espèces de Mammifères clonées à ce jour (Wang et al., 2002). L'analyse de la protéine révèle 4 domaines : un peptide signal de sécrétion à l'extrémité amino-terminale destiné à être clivé, une région variable spécifique de 27 aa, un domaine *collagen-like* suivi d'un domaine globulaire à l'extrémité carboxy-terminale (**figure 2**). Le domaine collagène comporte 22 répétitions de la séquence Gly-X-Y ou Gly-X-Pro, séquences caractéristiques des protéines avec triple hélice, semblables aux fibres de collagène (Tsao et al., 2002). La structure primaire de l'ApN, et plus particulièrement son domaine globulaire, présente des homologies séquentielles importantes avec un grand nombre de protéines impliquées dans l'inflammation et la réponse immunitaire (Ouchi et al., 2003; Scherer et al., 1995; Yokota et al., 2000). Parmi ces protéines, on retrouve la sous-unité du facteur C1q (*Complement factor C1q*) ; la partie globulaire du collagène de type VIII et X ; hib 27, une protéine du sérum d'animaux hibernants l'été; les collectines (MBL, *Mannose binding lectin* ; SP, protéine du surfactant et conglutinine) et enfin les cytokines de la famille du TNF $\alpha$ . Malgré

les similitudes observées entre la structure primaire de l'ApN et les différentes protéines citées précédemment, seul le TNF $\alpha$  partage une homologie surprenante avec la structure cristalline de la partie globulaire de l'ApN (analysée à une résolution de 2.1 angströms (Shapiro and Scherer, 1998) et en dépit de leur manque d'homologie entre leurs séquences primaires).

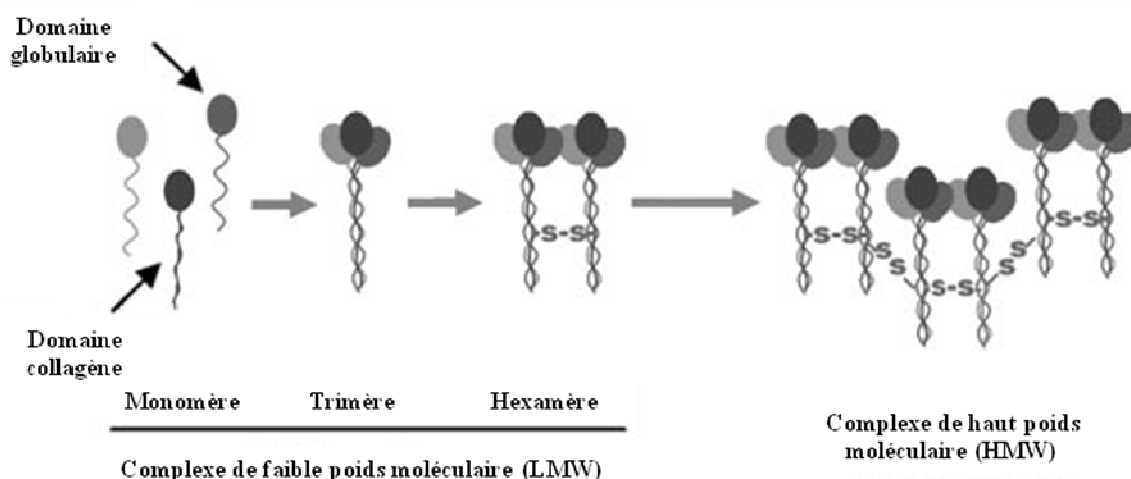


**Figure 2** : Analyse de séquence de la structure primaire de l'ApN (Richards 2006)

### 3. Structure des isoformes multimériques

La protéine native n'existe pas sous forme isolée et s'assemble par la partie globulaire en trimères. Ces trimères peuvent ensuite s'associer de manière plus complexe par les triples hélices du domaine collagène (Berg et al., 2002). On retrouve ainsi dans le plasma des complexes de haut poids moléculaire formés par association de 2 à 6 trimères (soit 6 à 18 unités). L'intégrité des différentes formes actives de l'ApN nécessite dans un premier temps des liaisons hydrophobiques pour sa formation et des liaisons non covalentes pour sa stabilité. Il semble que la présence d'un pont disulfure au niveau du résidu Cys-39 entre deux monomères du trimère soit indispensable pour la formation ultérieure des oligomères d'ApN (bien que ce dernier ne soit pas nécessaire à la formation et la stabilité du trimère d'ApN) (Pajvani et al., 2003; Tsao et al., 2003). L'ApN est sécrétée dans la circulation humaine sous trois isoformes d'oligomères : des trimères de faible poids moléculaire (*Low-Molecular Weight*, LMW) d'environ 67 kDa, des hexamères de poids moléculaire moyen (*Medium-Molecular Weight*, MMW) d'environ 120 kDa

et des multimères de haut poids moléculaire de 12 à 18 sous-unités (*High-Molecular Weight*, HMW) > 300 kDa (Phillips et al., 2003; Tsao et al., 2002) (**figure 3**). Les isoformes MMW et HMW sont les formes prédominantes détectées dans le sérum, tandis que les petits complexes comme les trimères sont quasiment indétectables (Pajvani et al., 2003; Trujillo and Scherer, 2005). La forme globulaire de l'ApN serait également détectée dans le plasma et représenterait 1% de l'ApN totale (Fruebis et al., 2001).



**Figure 3 :** Modèle d'assemblage de l'ApN. Trois monomères forment un trimère par interactions entre leurs domaines globulaires, et les trimères s'associent entre eux par interactions entre leurs domaines collagènes. Quatre à six trimères sont associés de manière non-covalente pour former un complexe de haut poids moléculaire (d'après Richards 2006).

Des études réalisées chez la souris ont permis de mettre en évidence que l'ApN subit des modifications post-traductionnelles importantes lors de sa sécrétion par les adipocytes (Wang et al., 2006; Wang et al., 2002). Ces modifications post-traductionnelles concernent essentiellement 4 résidus proline identifiés dans le domaine collagène et 5 résidus lysine (le premier est identifié dans la région variable et les 4 autres dans le domaine collagène). Les résidus proline sont uniquement hydroxylés, en revanche, les résidus lysine subissent une hydroxylation suivi d'une glycosylation. L'hydroxylation et la glycosylation des résidus lysine jouent un rôle important dans la médiation de certains effets de l'ApN. En effet, la substitution des quatre résidus lysine avec de l'arginine dans le domaine collagène diminue considérablement les concentrations physiologiques de l'ApN ainsi que sa capacité à renforcer l'action hépatique de l'insuline en limitant la production de glucose (Wang et al., 2002). De plus, l'hydroxylation et la glycosylation de plusieurs résidus conservés de lysine dans le domaine collagène sont

nécessaires pour l'assemblage intracellulaire et la stabilisation structurelle des oligomères au niveau de la triple hélice (Uitto and Lichtenstein, 1976). Ainsi, un déficit d'hydroxylation et de glycosylation des résidus lysine interfère avec la formation des multimères HMW (Richards et al., 2006). Récemment, Whitehead *et al.* ont confirmé la présence de ces modifications post-traductionnelles chez l'Homme et ont identifié trois hydroxylations additionnelles sur les résidus Pro<sup>71</sup>, Pro<sup>76</sup> et Pro<sup>95</sup> (Richards et al., 2006). En plus de ces trois principales isoformes de l'ApN, un fragment globulaire de l'ApN (gApN) issu d'une protéolyse et possédant des propriétés métaboliques *in vitro* et *in vivo* chez la souris a été mis en évidence. Il semblerait que ce fragment protéolytique de l'ApN soit un puissant stimulateur de l'oxydation des acides gras dans le muscle (Fruebis et al., 2001). Waki et al. ont été les premiers à décrire un mécanisme supposé de protéolyse dans la production d'un fragment globulaire de l'ApN. Il s'agit d'un clivage dépendant d'une élastase leucocytaire, sécrétée par des monocytes activés ou des neutrophiles (macrophages) (Waki et al., 2005). En revanche, l'importance physiopathologique de ce clivage reste encore à démontrer.

#### 4. Biodisponibilité de l'ApN

Dans la circulation générale, les concentrations sériques d'ApN totale sont de l'ordre de 5 à 30 µg/mL, ce qui représente 0,01 % des protéines plasmatiques totales (Arita et al., 1999). L'ApN plasmatique suit un rythme circadien (Yildiz et al., 2004). Après un déclin nocturne, les taux d'ApN plasmatiques augmentent progressivement à partir de 4 heures du matin pour atteindre un paroxysme vers 8 heures (Gavrila et al., 2003). Avec une demi-vie de 75 min (Halberg et al., 2009), l'ApN est éliminée rapidement. Par ailleurs, les courbes de variation de l'ApN sont similaires entre les sujets minces et obèses, malgré une différence de niveau de sécrétion. En effet, dans des conditions physiopathologiques (régime alimentaire riche en graisses et modèle de souris obèses ob/ob déficientes en leptine), les taux d'ApN sérique sont réduits et sa clairance retardée de manière significative, ce qui suggère une baisse spectaculaire de sa production. Par conséquent, une clairance rapide va de paire avec une activité métabolique et une biodisponibilité élevée, tandis qu'une clairance retardée est un indicateur d'un dysfonctionnement métabolique (Halberg et al., 2009). *In vivo*, la clairance varie également selon la nature des différents complexes d'ApN : elle est plus lente pour HMW-ApN et plus rapide pour le complexe trimérique (Halberg et al., 2009). Concernant la dégradation de l'ApN, le foie semble être le principal site de clairance, suivi du rein qui excrèterait seulement les produits de dégradation finaux (Halberg et al., 2009).



Même si les taux plasmatiques d'ApN restent remarquablement constants, il existe un dimorphisme sexuel : les femmes ont une adiponectinémie d'environ 40 % plus élevée que les hommes (Arita et al., 1999; Nishizawa et al., 2002), et la ménopause n'en modifie pas les concentrations (Nishizawa et al., 2002, Combs, 2003 #108). Cette différence apparaît au cours de la puberté. Chez des souris mâles castrées, l'injection d'androgènes serait à l'origine d'une réduction des taux d'ApN. Ce traitement induit également une IR. Au contraire, l'ovariectomie ne modifie pas ses concentrations chez les souris femelles. Un dimorphisme sexuel existe également en ce qui concerne la synthèse des différentes isoformes d'ApN. Chez la femme, le complexe d'ApN-HMW prédomine par rapport à la forme hexamérique, tandis que chez l'homme, la majorité de l'ApN est présente sous forme hexamérique (Pajvani et al., 2003). Il y aurait une inhibition sélective de la sécrétion de la forme HMW par la testostérone (Xu et al., 2005).

## 5. Production de l'ApN

L'ApN est abondamment produite et sécrétée par le TA blanc et les taux sériques d'ApN présentent une corrélation négative ferme avec la masse grasse intra-abdominale (Cnop et al., 2003; Fisher et al., 2002). Néanmoins, le niveau d'expression des ARNm est différent selon la localisation et le type de tissu étudié. En effet, il est 30 % plus faible dans le TA viscéral que dans le TASC abdominal, que les sujets soient minces ou obèses (Lihn et al., 2004). Ces résultats doivent cependant être interprétés avec précaution, les taux d'ARNm ne reflétant pas toujours de manière réelle les concentrations sériques de la protéine (Combs et al., 2003).

Outre le TA, l'ApN est également synthétisée par d'autres tissus et organes (cardiomyocytes, muscles squelettiques, ostéoblastes, placenta, hypophyse...) (Berner et al., 2004; Caminos et al., 2005; Delaigle et al., 2006; Krause et al., 2008; Pineiro et al., 2005; Rodriguez-Pacheco et al., 2007; Shinoda et al., 2006).

Les taux sériques de l'ApN exclusivement produite par les adipocytes sont affectés par la variation de la masse adipeuse à l'inverse de la plupart des adipokines. Ainsi l'expression et les taux sériques de l'ApN sont diminués au cours de l'obésité (Arita et al., 1999; Hu et al., 1996). Cette relation inverse entre l'ApN et la masse corporelle est également observée chez les sujets extrêmement minces présentant une anorexie mentale (Delporte et al., 2003; Pannacciulli et al., 2003). Toutefois, un seuil minimal de masse grasse fonctionnelle est nécessaire pour maintenir cette relation inverse. En effet, chez des patients lipotrophiques et lipodystrophiques, la réduction des taux d'ApN plasmatiques est proportionnelle à la perte de masse grasse (Haque



et al., 2002). Cette relation inverse entre masse grasse et adiponectinémie est également illustrée par l'effet de régimes hypocaloriques ou d'actes de chirurgie bariatrique qui conduisent à une perte de la masse grasse et à une augmentation des taux sériques de l'ApN (Xydakis et al., 2004; Yang et al., 2001). En revanche, la liposuction chez les femmes obèses ne modifie pas les concentrations plasmatiques d'ApN malgré une perte de poids et une diminution de leur BMI (Fasshauer et al., 2004). La perte de poids consécutive à un régime ou à une chirurgie semble également affecter la proportion des différentes isoformes de l'ApN puisqu'elle entraîne une augmentation des multimères HMW et MMW et, à l'inverse, provoque une diminution de la quantité de la plus petite forme LMW dans le plasma (Bobbert et al., 2005; Kobayashi et al., 2004).

En résumé, les niveaux plasmatiques d'ApN dépendent de la quantité de la masse grasse. Cette relation inverse entre les concentrations d'ApN et le niveau d'adiposité semble s'expliquer par la présence d'une boucle de rétroaction inhibitrice contrôlant l'expression et la sécrétion de l'ApN. L'hypothèse actuelle est qu'une augmentation de l'adiposité génère une rétro-inhibition de la production d'ApN. A l'inverse, l'augmentation des concentrations d'ApN observée lors d'une perte de poids pourrait s'expliquer par une levée d'inhibition accompagnant la diminution de l'adiposité. Parmi les mécanismes conduisant à une plus grande sécrétion d'ApN par les adipocytes, certains sont à mettre en relation avec une augmentation de la sensibilité à l'insuline (Pajvani and Scherer, 2003; Trujillo and Scherer, 2005) et une diminution de l'état inflammatoire (Kopp et al., 2005). Même si le TASC semble produire plus d'ApN que le TAV, la faible adiponectinémie associée à l'obésité est corrélée à l'expansion du TAV dont le métabolisme est le plus affecté au cours de cette pathologie.

## ***II. DONNEES CLINIQUES ILLUSTRANT LE ROLE DE L'APN DANS LES PATHOLOGIES ASSOCIEES AU SYNDROME METABOLIQUE***

### **1. Conséquences des polymorphismes du gène de l'ApN**

Il existe de nombreux polymorphismes du gène de l'ApN qui ont pu être associés à certaines modifications métaboliques. Le *screening* de son gène dans différentes populations a permis d'identifier 8 mutations dans l'exon 3 ainsi que 10 SNPs (*single-nucleotide polymorphisms*) localisés dans l'exon 2 et dans l'intron 2 (Vasseur et al., 2002). Les rares mutations détectées dans l'exon 3 sont localisées soit dans le domaine collagène (G84R et G90S), soit à la charnière du domaine collagène et globulaire de l'ApN (Y111H et I164T). Elles sont reliées au niveau de

l'expression de l'ApN et au diabète de type II (Vasseur et al., 2005). Les mutations des résidus glycine à la position 84 et 90 rompent la structure triple hélice de collagène. Elles réduisent le nombre de répétition de Gly-X-Y ou Gly-X-Pro de 22 à 14 et 16 respectivement, avec pour conséquence un risque accru de développer un diabète de type II. La mutation en position 111 peut partiellement entraver la polymérisation des homotrimères de collagène (Vasseur et al., 2002) d'où des modifications dans l'organisation spatiale de la protéine. Ces altérations peuvent interférer avec les modifications post-traductionnelles impliquant les résidus lysine ou modifier les interactions de la protéine avec ses récepteurs. Les 10 SNPs identifiés dans le gène de l'ApN concernent des changements de bases T-G : T45G, T94G et G276T. Ils sont associés au niveau d'expression de la protéine, à l'IMC (Indice de Masse Corporelle), à l'IR ou au diabète de type II dans les populations d'origine caucasienne et japonaise (Hara et al., 2002; Menzaghi et al., 2002; Stumvoll et al., 2002). Il en va de même pour l'haplotype associant les deux polymorphismes T45G (dans l'exon 2) et G276T (dans l'intron 2), fortement associés aux paramètres définissant le syndrome métabolique (IMC, pression artérielle, glycémie et insulïnémie à jeun, résistance à l'insuline et HDL-Cholestérol) dans une population italienne (Menzaghi et al., 2002). Deux autres SNPs dans la région du promoteur du gène de l'ApN, le SNP -11377 C/G et le SNP -11391 A/G, révèlent également une forte association avec l'adiponectinémie et le diabète de type II dans la population française (Vasseur et al., 2005). Enfin, deux études récentes ont montré l'existence d'une association entre le polymorphisme T45G ou G276T et les maladies cardiovasculaires chez les sujets diabétiques d'origine caucasienne (Bacci et al., 2004; Hara et al., 2002). En plus de toutes ces observations, le fait que l'hypoadiponectinémie soit généralement associée aux maladies du syndrome métabolique (Maeda et al., 2002; Okamoto et al., 2002; Shimabukuro et al., 2003) suggère que cette protéine exerce des effets anti-obésité, anti-inflammatoires, anti-athérosclérotiques et anti-diabétiques.

## 2. ApN et dyslipidémie

La dyslipidémie est caractérisée par des concentrations anormalement élevées de lipoprotéines ou de lipides (Cholestérol et/ou TG) dans le sang. C'est un facteur de risque de maladie athéromateuse. L'hypoadiponectinémie est associée d'une part à de faibles concentrations de HDL-C et à une diminution de la taille des particules LDL et d'autre part à une augmentation des TG et des marqueurs de l'inflammation systémique (Im et al., 2006; Tsukinoki et al., 2005). La corrélation entre ApN, TG et HDL-C reste fortement significative même après ajustement d'un

grand nombre de facteurs comme l'âge, le sexe, le BMI, un antécédent d'hypertension ou de diabète, la prise d'alcool, la cigarette et la prise d'hypolipémiants (von Eynatten et al., 2006). De plus, l'ApN exerce des effets bénéfiques sur le métabolisme du cholestérol puisqu'elle accélère le transport du cholestérol reverse en augmentant l'assemblage des lipoprotéines dans le foie. En effet, elle augmente les taux d'ARNm d'ABCA1 (*ATP-binding cassette transporter*) impliqués dans l'initiation de la formation des HDL-C et la Synthèse de la lipoprotéineA-1 dans le foie (Matsuura et al., 2007). Des études récentes suggèrent que l'ApN circulante induit des modifications du catabolisme des lipoprotéines conduisant à une augmentation des HDL (Verges et al., 2006) et une diminution des VLDL chez l'Homme (Lara-Castro et al., 2006). Il existe également une association significative entre l'ApN et les enzymes du métabolisme lipidique (von Eynatten et al., 2005; von Eynatten et al., 2004). Ces résultats amènent à l'hypothèse selon laquelle l'ApN influence directement les concentrations de lipides circulants, spécialement les TG et les HDL-C plasmatiques (von Eynatten et al., 2005).

### **3. ApN, insulino-résistance et diabète de type II**

Des études montrent que des concentrations basses en ApN prédisent le risque de développement du diabète de type II, même en l'absence d'autres indicateurs d'IR (Lindsay et al., 2002; Spranger et al., 2003). En effet, les concentrations plasmatiques d'ApN sont plus faibles chez les sujets qui plus tard, développent un diabète de type II par rapport aux sujets sains. A l'inverse, de fortes concentrations d'ApN sont associées à un risque considérablement réduit de développement d'un diabète de type II après ajustement aux facteurs de l'IR (l'âge, le sexe, le rapport taille-hanches, l'IMC, le tabagisme, l'activité physique, la consommation d'alcool, et l'Hémoglobine glyquée (HbA1c) (Spranger et al., 2003).

## ***III. REGULATION DE LA PRODUCTION D'APN***

### **1. Régulation hormonale**

#### ***1.1. Insuline***

L'administration d'insuline chez des sujets diabétiques de type II entraîne une légère diminution des taux sériques de l'ApN (11-13 %), mais pas de son expression. L'effet de l'insuline sur l'ApN serait donc lié à une accélération de sa dégradation plutôt qu'à un changement de sa

production (Lihn et al., 2003). Chez la souris, l'administration aigue d'insuline diminue légèrement l'ApN circulante, aux dépends de la forme HMW (Pajvani et al., 2003). Chez les patients présentant un diabète de type 1, les taux sériques d'ApN sont élevés (Imagawa et al., 2002; Perseghin et al., 2003). Dans ce cas, ni l'absence d'insuline, ni l'hyperglycémie n'expliquent l'élévation des taux plasmatiques d'ApN.

*In vitro*, les effets de l'insuline sur l'expression et la production de l'ApN dans les adipocytes sont ambigus. Dans les 3T3-L1, les premières études montrent un effet stimulateur de l'insuline sur les ARNm de l'ApN (Scherer et al., 1995) ainsi que dans le tissu viscéral humain (Debard et al., 2004). En revanche, ces résultats ont été contredits par l'équipe de Fasshauer qui a montré une diminution dose-dépendante des taux d'ARNm de l'ApN dans les cellules 3T3-L1 incubées en présence d'insuline (Fasshauer et al., 2002).

## 1.2. Glucocorticoïdes

Au cours de l'obésité le *turnover* des glucocorticoïdes est accéléré et l'exposition du TAV à sa propre production de cortisol pourrait contribuer à réduire l'expression des ARNm de l'ApN des sujets obèses, pouvant mener à une réduction des taux sériques de l'ApN (Halleux et al., 2001). En effet, des études *in vitro* ont montré que les glucocorticoïdes réduisent l'expression et la sécrétion de l'ApN dans des cultures de cellules 3T3-L1 et dans des adipocytes humains (Fasshauer et al., 2002; Halleux et al., 2001; Hawkins et al., 1997). L'association d'une hypercorticostéronémie et d'une hypoadiponectinémie a été observée chez des souris obèses ob/ob. Dans ce modèle, lorsque le taux de corticostérone redescend à des valeurs physiologiques après une adrénalectomie, on assiste à une normalisation des taux d'ARNm et de l'ApN circulante (Makimura et al., 2002). De plus, l'élévation des taux de corticostérone spécifiquement dans le TA de souris surexprimant la 11 $\beta$ -HSD-1 (11 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase type 1) (enzyme qui réduit le cortisone en cortisol), s'accompagne d'une diminution des ARNm ApN (Masuzaki et al., 2001). Inversement, des souris surexprimant la 11 $\beta$ -HSD-2 (11 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase type 2) (enzyme qui catalyse l'oxydation du cortisol en cortisone) dans le tissu adipeux, (menant à une inactivation locale des glucocorticoïdes), présentent une augmentation de l'expression d'ApN (Kershaw et al., 2005). Chez l'Homme, les taux circulants d'ApN diminuent 30 minutes après l'administration intraveineuse d'hydrocortisone (Fallo et al., 2004).

L'ensemble de ces données suggère qu'une surexposition aux glucocorticoïdes exercerait un effet inhibiteur sur l'expression des ARNm ApN au niveau du TA conduisant à une baisse de ses taux circulants.

### **1.3. Catécholamines et AMPc**

Les catécholamines, appelées également hormones du stress, sont des neurotransmetteurs impliqués dans les mécanismes adrénergiques de la lipolyse chez l'homme. Elles jouent un rôle important dans l'homéostasie énergétique, notamment en contrecarrant l'action anti-lipolytique de l'insuline et des récepteurs adrénergiques- $\alpha 2$  (Lafontan et al., 1979). Au contraire, l'activation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques par les catécholamines conduit à une augmentation de l'AMPc et à une augmentation de l'activité lipolytique. Des études ont mis en évidence un effet inhibiteur d'agonistes  $\beta$ -adrénergiques, dépendant de l'AMPc, sur l'expression et la sécrétion de l'ApN, à la fois dans des cultures d'explants de TA de souris et dans des cellules 3T3-L1 (Delporte et al., 2002; Fasshauer et al., 2001). Cet effet inhibiteur a été confirmé *in vivo* chez la souris et *in vitro* chez l'Homme (Delporte et al., 2002; Kappes and Loffler, 2000). Ainsi, la capacité des catécholamines à inhiber la production d'ApN pourrait altérer la signalisation de l'insuline et, de ce fait, contribuer potentiellement à la pathogenèse de l'insulinorésistance comme proposé par Fasshauer et al., 2001.

## **2. Régulation par les cytokines**

### **2.1. TNF $\alpha$**

Une relation inverse existe entre les concentrations sériques d'ApN et le TNF- $\alpha$  (Lau et al., 2005) suggérant que la production d'ApN est altérée par l'inflammation du TA. En effet, dans les adipocytes, le TNF $\alpha$  essentiellement produit par macrophages infiltrés lors d'une obésité (Fain et al., 2004; Fain et al., 2006), régule négativement l'expression des facteurs de transcription impliqués dans la transcription du gène de l'ApN, tel que PPAR $\gamma$  (Zhang et al., 1996), C/EBP (Kita et al., 2005; Ron et al., 1992) SREBPs (Qiao and Shao, 2006; Sewter et al., 2002). Ces effets répresseurs du TNF $\alpha$  sur le gène de l'ApN pourraient être médiés par JNK c-Jun N-terminal kinase). Cette dernière a la capacité de phosphoryler PPAR $\gamma$  et de réduire son affinité aux sites de liaison à l'ADN (Kim et al., 2005; Lim et al., 2008) (**figure 5**). L'activation de JNK induite par TNF $\alpha$  est PCK (*Protein C Kinase*) dépendante (Lim et al., 2008). Le TNF $\alpha$  exercerait également un effet inhibiteur sur l'expression de l'ApN en diminuant l'activité transcriptionnelle

du facteur de transcription Sp1 (Barth et al., 2002). De plus le TNF $\alpha$  induit l'expression de IGFBP-3 (*Insulin-like growth factor binding protein 3*) un inhibiteur de croissance, qui réprime la transcription du gène de l'ApN et induit une IR (Zappala and Rechler, 2009).

## 2.2. ILs

Dans le cas une d'IR avérée dans le cadre de l'obésité (Fernandez-Real et al., 2001; Straub et al., 2000), la baisse de tolérance au glucose (Muller et al., 2002) et d'un diabète de type II (Kado et al., 1999; Pickup et al., 1997), les taux plasmatiques de l'IL-6, cytokine aux propriétés pro- et anti-inflammatoire (Ohshima et al., 1998; Tilg et al., 1994), sont augmentés. Dans ces conditions, l'IL-6 modulerait les taux d'ApN et ses effets insulino-sensibilisateurs de manière négative. *In vitro*, IL-6 diminue à la fois l'expression des ARNm de l'ApN et sa sécrétion dans les adipocytes en culture 3T3-L1 (Fasshauer et al., 2003). Chez l'Homme, cet effet inhibiteur sur les ARNm de l'ApN a également été démontré (Bruun et al., 2003). De plus, les souris déficientes en IL-6 présentent des taux plasmatiques élevés d'ApN, par rapport aux souris témoins, lorsqu'elles sont soumises à un régime riche en graisses (Di Gregorio et al., 2004).

D'autres ILs semblent capables d'exercer des effets régulateurs sur la production d'ApN. L'IL-18 est négativement corrélée aux taux sériques de l'ApN dans l'obésité et le diabète de type II (Esposito et al., 2002; Thompson et al., 2007). L'IL-18 aurait également un effet inhibiteur sur l'expression de l'ApN dans les adipocytes 3T3-L1 et pourrait jouer un rôle majeur dans la suppression de l'expression génique de l'ApN dans l'obésité (Chandrasekar et al., 2008; Kim et al., 2006). Inversement, l'IL-15, une cytokine exprimée abondamment dans le muscle squelettique, stimule la sécrétion d'ApN par les adipocytes 3T3-L1 différenciés et inhibe l'accumulation lipidique dans ces cellules. Ces résultats soutiennent l'hypothèse selon laquelle l'IL-15 participe à la modulation de la composition corporelle ainsi que la sensibilité à l'insuline, notamment en stimulant l'anabolisme protéique et en réduisant l'expansion du TA (Quinn et al., 2005). Par contre, l'IL-1 $\beta$  réduit les taux d'ARNm ApN dans des explants de TA sous-cutané et viscéral humains (Lihn et al., 2004).

## 3. Régulation par la leptine

L'ApN et la leptine sont inversement corrélées *in vivo* (Matsubara et al., 2002) mais pas *in vitro* (Zhang et al., 2002). Un des mécanismes sous-jacents serait une régulation réciproque de la leptine et de l'ApN par le TNF $\alpha$ . En effet, TNF $\alpha$  stimule la production de la leptine et inhibe

celle de l'ApN (Bruun et al., 2003; Fasshauer et al., 2002; Ruan et al., 2002). De plus la leptine stimule la production de TNF $\alpha$  (Loffreda et al., 1998) et cet effet est atténué par l'ApN (Zhao et al., 2005). Cependant, des études suggèrent que des facteurs nerveux issus de l'hypothalamus sont également mis en jeu dans cette relation inverse entre leptine et ApN (Huypens and Quartier, 2006).

Chez la souris obèse (ob/ob), un traitement par la leptine augmente les taux d'ARNm, le contenu intra-adipocytaire et la sécrétion de l'ApN habituellement réduits. Ces mêmes paramètres sont également augmentés après incubation dans les adipocytes 3T3-F442A en présence de la leptine (Delporte et al., 2004).

L'ensemble de ces études montrent bien un effet modulateur de la leptine sur la production de l'ApN, cependant les résultats sont controversés et nécessitent des expériences complémentaires.

#### 4. Régulation nutritionnelle

Tout d'abord, il a été démontré que la prise alimentaire en tant que telle a peu d'influence sur les fluctuations circadiennes de l'ApN circulante, un repas entraînant seulement une légère augmentation transitoire de sa concentration plasmatique (Calvani et al., 2004). A l'inverse, l'apport calorique du régime exerce des effets importants sur l'adiponectinémie compte tenu de son impact sur la modulation de la masse grasse. Ainsi, les régimes hypocaloriques à long terme conduisent à une perte de la masse grasse et à une augmentation des taux sériques de l'ApN alors que des régimes hypocaloriques à court terme n'ont aucune incidence sur ces taux (Gavrila et al., 2003; Xydakis et al., 2004). Il existe peu d'informations concernant les effets de la nature des nutriments sur la production d'ApN. Toutefois, il a été montré qu'un régime hyperlipidique comprenant une majorité d'EPA (*acide eicosapentaénoïque*) et de DHA (*acide docosahexaénoïque*), stimule l'expression de l'ApN et augmente ses taux circulants chez les rongeurs (Flachs et al., 2006). Il a également été rapporté qu'une consommation journalière en acides gras polyinsaturés n-3 conduit à l'induction de l'ApN plasmatique chez des patients en surpoids (Krebs et al., 2006). L'EPA et le DHA sont des agents hypolipémiants, avec des effets prophylactiques sur les maladies cardiovasculaires et protégeant de l'IR ainsi que de l'obésité chez les rongeurs (Ruzickova et al., 2004). Ces effets semblent toutefois ne pas être simplement consécutifs à la réduction de la masse grasse induite par l'EPA et le DHA mais à des modifications rapides de composition des phospholipides membranaires (Lefils et al., 2010). Dans cette étude, les effets bénéfiques du DHA sur la production d'ApN sont d'ailleurs

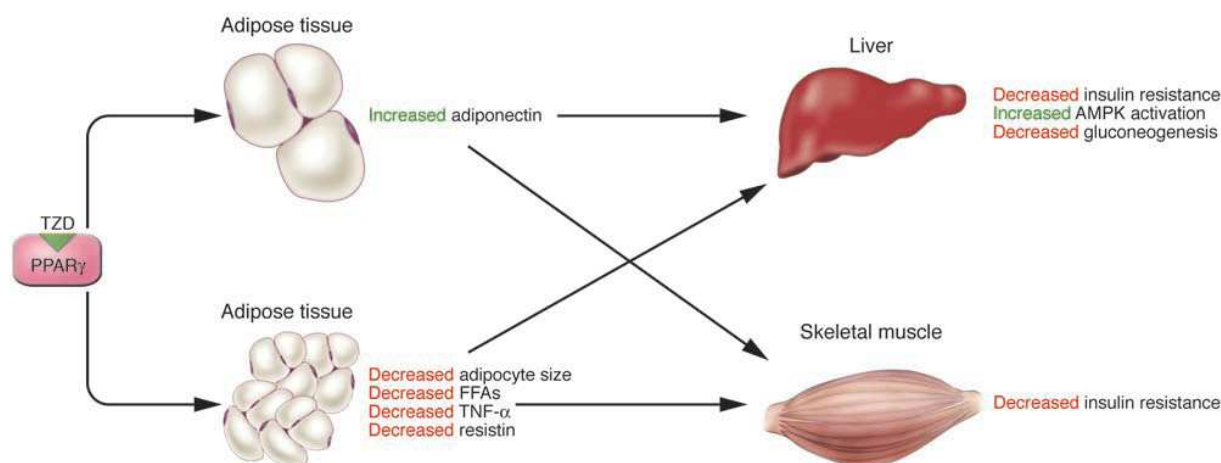


maintenus au delà de la période de traitement alors même que les animaux reprennent du poids (Lefils et al.). Par ailleurs, il a été démontré que les mécanismes impliqués dépendent de l'activation de PPAR $\gamma$  (Neschen et al., 2006).

## 5. Régulation par les thiazolidinediones

La pioglitazone et la rosiglitazone appartiennent à la famille des thiazolidinediones ou glitazones (GTZ), et sont utilisées comme agents antidiabétiques oraux, ce sont de puissants agonistes des PPAR $\gamma$ . Ils potentialisent les effets de l'insuline au niveau périphérique (foie, muscle squelettique et TA) sans en stimuler sa sécrétion (Steiner and Lien, 1987) réduisant ainsi l'hyperglycémie et améliorant le profil lipidique chez les patients diabétiques de type II (**figure 6**). En effet, l'apparition d'une IR ou d'un syndrome métabolique, qui précède l'établissement du diabète de types II, est généralement associée à une dyslipidémie caractérisée par des concentrations plasmatiques élevées de TG et des particules de LDL (Low Density Lipoprotein) petites et denses, et par des taux abaissés en HDL-C (High Density Lipoprotein) (Haffner, 2002). Néanmoins, c'est au niveau du TA que les GTZ jouent leur rôle principal en stimulant la différenciation adipocytaire (de Souza et al., 2001). En effet, les adipocytes produits en réponse aux TZD sont plus petits, et donc plus sensibles à l'action de l'insuline (McLaughlin et al., 2009). In vivo, plusieurs études menées chez l'homme mince, obèse ou diabétique de type II, ont montré qu'un traitement prolongé par les GTZ augmente les taux plasmatiques de l'ApN (Maeda et al., 2001; Yang et al., 2002; Yu et al., 2002). Toutefois, les mécanismes d'action semblent être différents entre la Pioglitazone (PioGTZ) et la Rosiglitazone (RosiGTZ). La pioglitazone augmente les taux plasmatiques d'ApN chez l'Homme sans aucun effet sur l'expression du gène de l'ApN dans le TA (Rasouli et al., 2006) ce qui suggère une action sur sa sécrétion. A l'inverse, la rosiglitazone renforce l'activité du promoteur de l'ApN et augmente ainsi l'expression du gène de l'ApN d'une manière dose-dépendante dans les adipocytes 3T3-L1 en culture (Maeda et al., 2001). En conclusion, l'amélioration de l'IR et du diabète de type II par les GTZ apparaît associée à l'augmentation de la production d'ApN même si actuellement, on considère qu'il existe également des effets ApN-indépendants (Kubota et al., 2006).





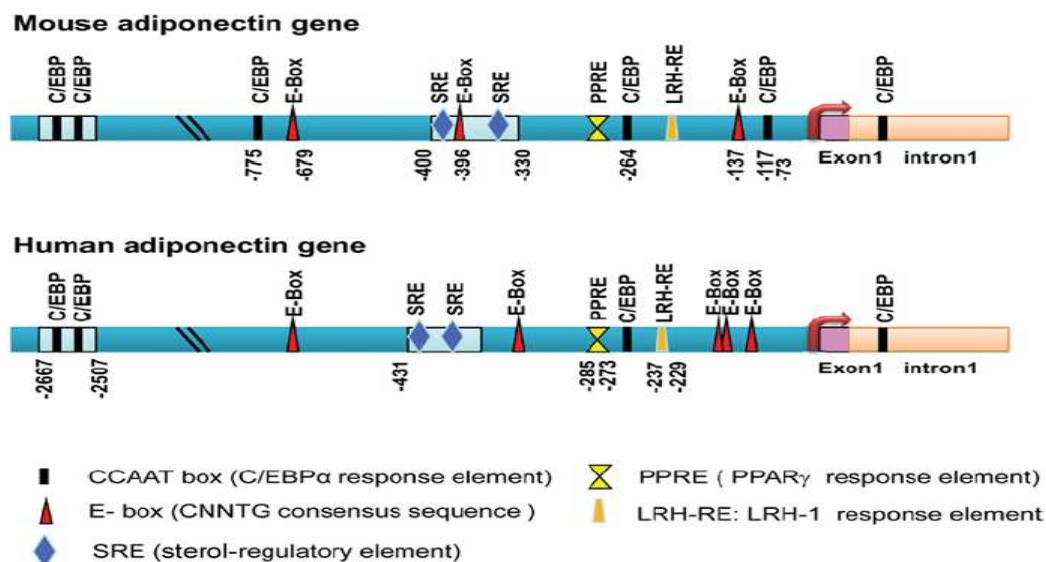
**Figure 6 :** Les GTZ améliorent l'IR et le diabète de type II de manière dépendante et indépendante de l'ApN. Deux voies différentes sont impliquées dans l'amélioration de l'IR induite par les GTZ. L'augmentation des niveaux d'ApN en réponse aux GTZ améliore l'IR, ce qui augmente l'activation AMPK, et diminue la néoglucogenèse dans le foie. D'autre part, indépendamment de l'ApN, les GTZ diminuent la taille des adipocytes, les taux sériques en AGL, l'expression de TNF $\alpha$  et la résistine, contribuant ainsi à amélioration de résistance à l'insuline dans le muscle squelettique (Kadowaki 2005).

#### ***IV. MECANISME DE REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DE LA PRODUCTION***

##### **1. Structure du gène de l'ApN**

Chez l'Homme, le gène de l'ApN est situé sur le bras long du chromosome 3 (région 3q27). A cet endroit a été localisée une susceptibilité au syndrome métabolique et au diabète de type II (Vionnet et al., 2000). Certaines caractéristiques phénotypiques du syndrome métabolique (obésité, IR, hypertension artérielle, maladies cardiovasculaires...) sont d'ailleurs associées à un QTL (*Quantitative trait loci*) situé sur le chromosome 3, dans la région codant le gène de l'ApN. D'après Comuzzie, ce QTL aurait des effets sur les concentrations plasmatiques d'ApN, suggérant une forte contribution génétique aux taux circulants de l'ApN (Comuzzie et al., 2001). Chez la souris, ce gène se trouve sur le chromosome 16 (Das et al., 2001). Chez l'homme et la souris, le gène de l'ApN comporte 2 introns et 3 exons dont seulement deux sont traduits en protéine (Schaffler et al., 1999). Ce gène est long de 16 kb et son ADNc est de 4,5 kb (Kappes and Loffler, 2000). L'activité transcriptionnelle basale du gène de l'ApN est située chez l'homme dans une région allant de -676-41 du promoteur (Kita et al., 2005) et dans un fragment d'environ

1 kb situé en amont du site d'initiation de la transcription du gène de l'ApN chez la souris (Das et al., 2001; Schaffler et al., 1998). À l'heure actuelle, il existe encore peu d'informations sur le promoteur de l'ApN, région conservée chez l'Homme et la souris. Ce promoteur ne semble pas contenir de sites conventionnels de liaison pour certains facteurs, tels que TATA-box ou encore CRE (*cAMP response element*). Cependant, la présence de sites de liaison à plusieurs facteurs de transcription et éléments régulateurs ont déjà été décrits comme C/EBP- $\alpha$  (*CCAAT/ enhancer binding protein  $\alpha$* ), C/EBP- $\beta$ , PPAR- $\gamma$  (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptors  $\gamma$* ), SREBP (*Sterol Regulatory Element Binding Protein*), SP1 et SP3 et E-box (protéines à motif hélice-boucle-hélice) (**figure 4**). Ces facteurs de transcription ont montré leur capacité de modulation de l'ApN au niveau transcriptionnel, en plus de jouer un rôle important dans la différenciation adipocytaire.



**Figure 4 :** Structure basique du promoteur du gène de l'ApN de l'homme et la souris (Liu, 2010)

## 2. Régulation par différents facteurs de transcription

La régulation de la transcription du gène de l'ApN par C/EBP- $\alpha$  (*CCAAT/ enhancer binding protein*) et PPAR- $\gamma$  est réalisée à différents sites du gène ApN (**figure 5**). La protéine C/EBP- $\alpha$ , qui joue un rôle important dans la transformation des préadipocytes en adipocytes, régule positivement la transcription du gène ApN *via* une interaction avec un *intronic enhancer* situé dans le premier intron (Qiao et al., 2005). L'expression adipeuse du gène ApN est induite et maintenue par la liaison directe de l'hétérodimère PPAR- $\gamma$ /RXR $\alpha$  au site PPRE (*PPAR*

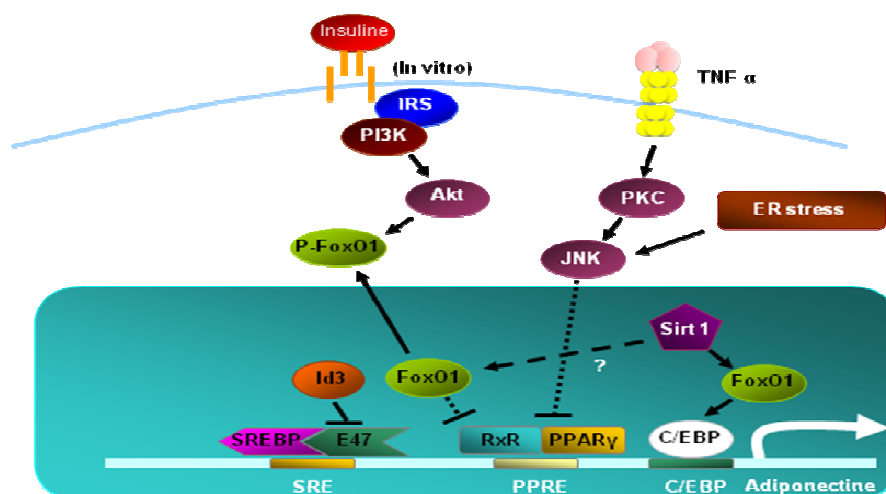
*response element*) au sein du promoteur de l'ApN (Iwaki et al., 2003). D'autres récepteurs nucléaires, comme LRH-1, se lieent également au LRH-RE (*liver receptor homolog-1 response element*) et fonctionnent comme facteur compétent, augmentant ainsi la transactivation de PPAR- $\gamma$ /RXR (**figure 5**) (Iwaki et al., 2003). Le promoteur de l'ApN est également capable de lier les facteurs de transcription SP1 et SP3, qui semblent respectivement stimuler et inhiber son activité. Le TNF- $\alpha$  exercerait un effet inhibiteur sur l'expression d'ApN en diminuant l'activité transcriptionnelle de SP1 (Barth et al., 2002).

PPAR $\gamma$  a été identifié comme un régulateur favorable à l'ensemble du processus de la biosynthèse de l'ApN. Néanmoins des études récentes suggèrent que l'effet principal de PPAR $\gamma$  serait de favoriser le processus d'assemblage et de sécrétion de l'ApN, plutôt que celui de sa transcription. Dans ce sens, la pioglitazone, un agoniste de PPAR $\gamma$ , augmente les taux plasmatiques d'ApN chez les sujets humains, sans aucun effet sur l'expression du gène de l'ApN dans le TA (Rasouli et al., 2006). De plus, le traitement d'adipocytes par des agonistes PPAR $\gamma$  augmente la synthèse et la sécrétion de HMW-ApN, sans affecter l'expression des ARNm ni la synthèse de l'ApN native (Banga et al., 2009; Qiang et al., 2007). Un des mécanismes probables par lequel les thiazolidinediones augmenteraient les niveaux d'ApN ainsi que sa sécrétion serait de stimuler l'expression des protéines impliquées dans l'assemblage et la sécrétion d'ApN telle qu'Ero1- $\alpha$ . En effet, l'activation de PPAR $\gamma$  améliore le niveau d'expression d'Ero1- $\alpha$  dans les adipocytes matures chez la souris (Cheng et al., 2007; Qiang et al., 2007).

Quant au SREBP-1c, il régule positivement l'activité promotrice de l'ApN *via* l'interaction directe de l'hétérodimère SREBP-1c/E47 aux séquences consensus E-box du promoteur lors de la différenciation dans les adipocytes mûrs. À l'inverse, l'activité transcriptionnelle de l'ApN est réprimée dans les adipocytes indifférenciés. Dans ce cas, les protéines Id3 (*inhibitor of differentiation 3*) agissent comme des dominantes négatives en réduisant la disponibilité de E47 aux séquences E-box du promoteur par simple liaison (Doran et al., 2008; Moldes et al., 1999; Seo et al., 2004) (**figure 5**).

La biosynthèse et la sécrétion de l'ApN sont également régulées par SIRT1 (*sirtuin 1, désacétylases d'histone NAD-dépendantes*), enzyme impliquée dans la régulation du métabolisme glucidique et lipidique par désacétylation de divers substrats cellulaires, dans les adipocytes. Une surexpression modérée de SIRT1 chez la souris augmenterait les niveaux d'ApN (Banks et al., 2008). La restriction calorique régule positivement les taux d'expression de SIRT1

(Liang et al., 2009) et d'ApN (Zhu et al., 2004). Ainsi, SIRT1 induirait potentiellement, par un mécanisme sous-jacent, une régulation positive de l'ApN. Ce mécanisme passerait par une désacétylation du facteur de transcription FoxO1 (*Forkhead box O1*) (acteur clé des réponses transcriptionnelles à l'insuline qui joue un rôle central dans l'adaptation métabolique au cours du jeûne), ce qui le piège dans le noyau et favoriserait l'expression du gène de l'ApN (Frescas et al., 2005; Qiao and Shao, 2006) (**figure 5**).



**Figure 5 :** Régulation en amont de la transcription de l'ApN par différentes voies de signalisation d'après Liu, 2010.

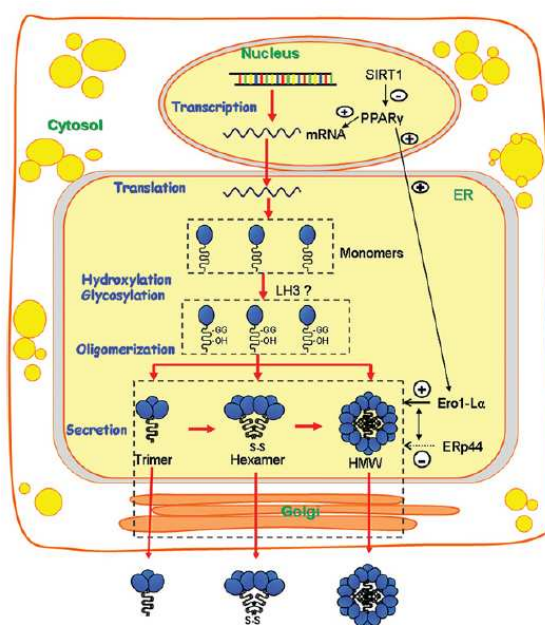
## V. EFFICACITE BIOLOGIQUE DES DIFFERENTES ISOFORMES D'APN

Des données épidémiologiques et génétiques suggèrent que les effets métaboliques et bénéfiques de l'ApN chez l'Homme pourraient être principalement médiés par le complexe HMW (Lara-Castro et al., 2006; Liu et al., 2007). Plusieurs observations soutiennent l'hypothèse selon laquelle les multimères HMW sont les plus bioactifs et constitueraient un meilleur marqueur que l'ApN totale dans la prédiction de la résistance à l'insuline, le syndrome métabolique (Hara et al., 2006) et le diabète de type II (Nakashima et al., 2006; Retnakaran et al., 2007). L'augmentation du ratio HMW/ApN totale, mais pas l'ApN totale elle-même, est en effet bien corrélée avec l'amélioration de la sensibilité à l'insuline au cours du traitement par des insulinosensibilisateurs, les thiazolidinediones, chez des souris diabétiques et chez des patients diabétiques de type II (Pajvani et al., 2004). D'autre part, la baisse des taux sériques d'ApN totale observée chez les patients présentant un diabète de type II ou des maladies

cardiovasculaires, comparés à des sujets sains, est presque entièrement imputable à la réduction sélective de l'oligomère HMW, sans changements manifestes de concentration des complexes trimériques et hexamériques (Basu et al., 2007; Kobayashi et al., 2004). A l'inverse, la perte de poids, soit par restriction calorique ou par pontage gastrique, entraîne une élévation sélective de l'ApN-HMW mais pas des deux autres isoformes (Bobbert et al., 2005; Swarbrick et al., 2006). Récemment, Lara-Castro *et al.* ont examiné, de manière approfondie, les relations entre les concentrations circulantes d'ApN totale, ses différents oligomères, la répartition relative (ratio) de ces derniers et les paramètres associés au syndrome métabolique. Ces auteurs ont montré que l'ApN est associée à une sensibilité accrue à l'insuline, à une réduction de la graisse abdominale, à la hausse de l'activité oxydative basale des lipides, et à de fortes concentrations de LDL moins athérogènes et des HDL plus cardioprotectrices. Ils ont également démontré que c'est la quantité de complexes d'ApN-HMW, et non celle de l'ApN totale, qui est principalement responsable de ces relations (Lara-Castro et al., 2006). De plus, l'importance biologique de l'ApN-HMW est également mise en évidence dans des cas de mutations génétiques rares dans le domaine collagène de l'ApN. Ces mutations sont caractérisées par des niveaux extrêmement bas de la forme HMW, due à une capacité réduite d'oligomérisation, et sont étroitement associées au diabète de type II (Hara et al., 2002; Tasanen et al., 2000; Waki et al., 2003).

Les différentes formes de l'ApN possèdent donc des effets métaboliques distincts. Cependant, une fois sécrétés, ces oligomères ne sont pas interchangeable, ce qui suggère que leur répartition dans la circulation est principalement contrôlée au niveau de la sécrétion des adipocytes (Pajvani et al., 2003). Plusieurs études ont démontré l'importance de protéines chaperonnes du ER (réticulum endoplasmique site de modification de protéine et de production de macromolécules), ERp44 (*ER protein of 44 kDa*) et Ero1 (*ER membrane-associated oxidoreductase*)-L $\alpha$ , dans l'assemblage de HMW-ApN et sa sécrétion (**figure 7**) (Cheng et al., 2007; Qiang et al., 2007). D'une part, la protéine ERp44 piègerait l'ApN dans l'ER par une interaction covalente avec le groupement thiol du résidu Cys<sup>39</sup> de l'ApN (Alberini et al., 1990; Anelli et al., 2003) et m'attierait l'ApN dans un environnement oxydant favorable aux modifications post-traductionnelles, telle que la formation des ponts disulfures. D'autre part, la protéine Ero1-L $\alpha$ , du fait de sa fonction oxydoréductrice, favoriserait la libération de l'ApN en entrant en compétition avec ERp44 (Dias-Gunasekara and Benham, 2005). Par ailleurs, la sécrétion de l'ApN est inhibée par la surexpression de ERp44 et augmentée par le traitement siRNA (ARN interférent empêchant l'expression de gènes) de cette protéine chaperonne. A l'inverse des effets inhibiteurs d'ERp44, une surexpression d'Ero1-L $\alpha$  augmente de manière sélective la forme l'HMW-ApN

(Cheng et al., 2007; Qiang et al., 2007). En revanche, un traitement siRNA du gène *Ero1-L $\alpha$* , inhibe la sécrétion de la forme l'HMW-ApN mais augmente la sécrétion de la forme trimérique de l'ApN (Cheng et al., 2007). Chez les souris obèses *ob / ob*, la diminution de l'expression de ERp44 et *Ero1-L $\alpha$*  dans le TA est associée à la réduction du ratio HMW/total ApN dans la circulation. Inversement, les agonistes PPAR $\gamma$ , les thiazolidinediones, qui induisent sélectivement la sécrétion d'HMW-ApN, stimulent l'expression de *Ero1-L $\alpha$*  dans les adipocytes 3T3-L1 et le TA des souris obèses *ob / ob* (Cheng et al., 2007; Qiang et al., 2007).



**Figure 7 :** Les voies cellulaires de la biosynthèse des trois oligomères de l'ApN. L'activation de PPAR $\gamma$  induit l'expression d'*Ero1-L $\alpha$* , qui se lie à son tour à ERp44 comme un partenaire privilégié, conduisant à la libération de l'HMW-ApN piégé par le groupement thiol (Wang, 2008).

L'ApN semble également exercer ses effets sur le foie par l'intermédiaire de la forme HMW. En effet, Sherer *et al.* ont montré que l'ApN recombinante, issue de cellules de mammifères capables de former la HMW-ApN peut diminuer l'hyperglycémie chez des souris diabétiques en inhibant la production de glucose (Berg et al., 2001). A l'inverse, l'ApN d'origine bactérienne incapable de former la HMW-ApN est quasiment inactive. Ces mêmes auteurs ont comparé les effets aigus de chaque oligomère d'ApN, préalablement purifié par gel de filtration chez les souris déficientes en ApN : une injection intraveineuse d'HMW-ApN conduit à la baisse de la concentration du glucose sanguin, de manière dose dépendante, mais pas la forme hexamérique (Pajvani et al., 2004). De plus, des études *ex-vivo* sur des hépatocytes primaires de rat ont montré la nécessité de la formation d'HMW-ApN pour engendrer les effets insulino-sensibilisateurs de l'ApN au niveau



du foie (Wang et al., 2002). Une injection aiguë ou chronique d'ApN recombinante supplémentée de la forme HMW-ApN entraîne l'activation marquée d'AMPK (*5' adenosine monophosphate-activated protein kinase*) dans le foie. et une réduction prolongée de l'hyperglycémie et de la résistance à l'insuline chez les souris diabétiques db/db. Cependant, ces effets métaboliques disparaissent lorsque les souris sont traitées avec de l'ApN recombinante en absence de HMW-ApN (Wang et al., 2006). Ces résultats sur l'animal sont compatibles avec les observations cliniques montrant que le ratio HMW/ApN totale est étroitement corrélé avec la sensibilité à l'insuline dans le foie (Pajvani et al., 2004).

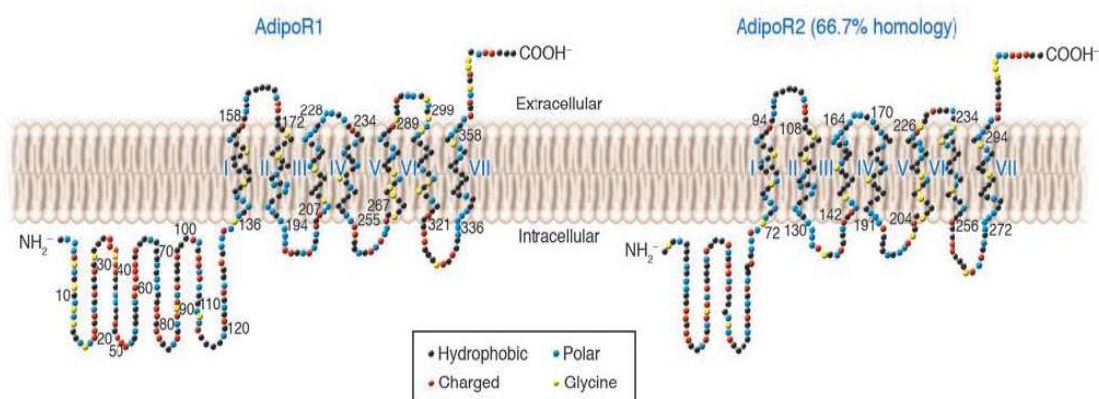
Dans le muscle, Lodish et le groupe de Kadowaki ont montré que l'ApN globulaire d'origine bactérienne, formée exclusivement de la forme trimérique, augmente puissamment la  $\beta$ -oxydation des acides gras et améliore la sensibilité à l'insuline (Fruebis et al., 2001; Yamauchi et al., 2001). D'autre part, l'ApN issue d'*Escherichia Coli*, qui contient un pourcentage plus élevé de la forme hexamérique et une petite portion de la forme trimérique, est beaucoup moins efficace que l'ApN globulaire dans le tissu musculaire. Lodish *et al.* ont démontré que les différentes formes d'ApN activent différentes voies de signalisation dans les cellules musculaires C2C12 (Fruebis et al., 2001; Tsao et al., 2002; Tsao et al., 2003; Yamauchi et al., 2001). Les formes HMW-ApN et hexamérique activent NF- $\kappa$ B mais pas la forme trimérique. Au contraire, seule la forme trimérique induit la phosphorylation de la sous-unité AMPK $\alpha$  sur Thr<sup>172</sup> (Yamauchi et al., 2003a). Ces résultats montrent donc que la forme trimérique de l'ApN joue le rôle le plus puissant dans la médiation des effets bénéfiques de l'ApN au niveau du muscle squelettique. Toutefois, il est important de souligner que ces études fonctionnelles sur le muscle squelettique ont utilisé le domaine globulaire d'ApN d'origine bactérienne comme source de la forme trimérique de l'ApN. Or, cette dernière, ne subit pas de modifications post-traductionnelles, à l'inverse de l'ApN endogène. De ce fait, ces résultats présentent un intérêt pharmacologique mais leur importance physiologique reste incertaine. D'un autre côté, Hada *et al.* ont récemment purifié les 3 formes d'ApN à partir de sérum humain et comparé l'efficacité biologique de cette ApN endogène sur des cellules musculaires C2C12 (Hada et al., 2007). Contrairement aux résultats susmentionnés, c'est la forme HMW qui a la plus haute affinité pour les fractions membranaires des cellules C2C12 et l'effet activateur de l'AMPK le plus puissant dans cette lignée cellulaire. Ces données obtenues avec une ApN qui se rapproche le plus de celle trouvée dans les conditions physiologiques soulèvent la possibilité que l'HMW-ApN soit comme dans le foie, la forme la plus bioactive dans le muscle squelettique et justifient des études plus approfondies.

## VI. MECANISMES D'ACTION DE L'APN

### 1. Les Récepteurs de l'ApN

#### 1.1. Propriétés et voies de signalisation

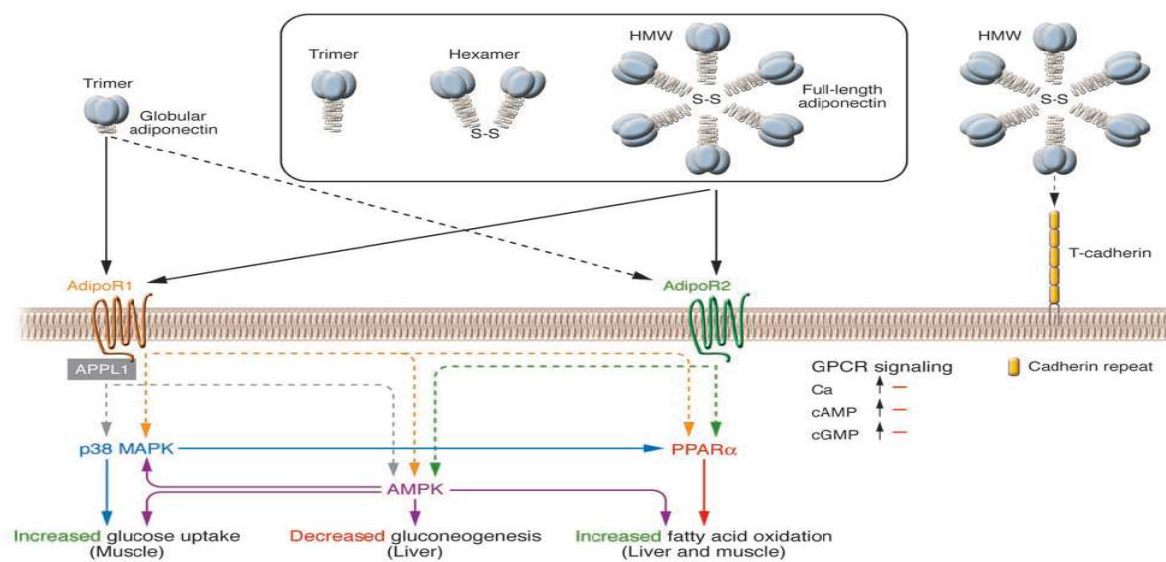
Deux récepteurs à l'ApN ont été clonés, *Adiponectin receptor 1* (AdipoR1) et *Adiponectin receptor 2* (AdipoR2). Ce sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires qui présentent une topologie opposée à celle des récepteurs couplés aux protéines G avec une extrémité N-terminale intracellulaire et une extrémité C-terminale extracellulaire (**figure 8**). Ils ne sont pas couplés aux protéines G et n'ont pas les seconds messagers de ces derniers (AMPC, GMPc, Ca<sup>++</sup>) (Yamauchi et al., 2003a). AdipoR1 a une expression ubiquitaire, avec une prédominance dans le muscle squelettique. Quant à AdipoR2, il est préférentiellement exprimé dans le foie (Yamauchi et al., 2003a). Ces deux récepteurs sont également exprimés dans d'autres tissus et organes, comme les cellules  $\beta$  du pancréas (Kharroubi et al., 2003), les monocytes-macrophages, les plaques d'athérosclérose (Chinetti et al., 2004), le cerveau ainsi que le TA, où leur expression est augmentée pendant la différenciation adipocytaire (Fasshauer et al., 2004; Yamauchi et al., 2003b). L'affinité de l'ApN pour ses récepteurs dépend de sa forme. Ainsi, AdipoR1 possède une forte affinité pour l'ApN globulaire mais une affinité plus faible pour la forme totale, tandis que l'affinité d'AdipoR2 est intermédiaire pour les deux formes d'ApN (Yamauchi et al., 2003a).



**Figure 8** : Structure des récepteurs de l'ApN. AdipoR1 et AdipoR2 contiennent 7 domaines transmembranaires mais sont structurellement et topologiquement différents des récepteurs couplés aux protéines G (Kadowaki 2005).



Les voies de signalisation activées par AdipoR1 et R2 font intervenir PPAR $\alpha$ , AMPK et p38MAPK (*p38 mitogen-activated protein kinase*) (**figure 9**). L'activation de PPAR $\alpha$  semble impliquée uniquement dans le métabolisme des acides gras, en revanche, l'activation d'AMPK ou de p38MAPK pourrait être impliquée dans l'oxydation des acides gras ainsi que dans le captage du glucose (Yamauchi et al., 2003a).



**Figure 9 :** Transduction du signal par les récepteurs de l'ApN. gApN existe sous forme d'un trimère tandis que l'ApN « entière » existe au moins sous 3 formes de multimères (LMW, MMW, HMW). AdipoR2 présente une faible affinité pour gApN (représenté par une ligne en pointillé). La surexpression d'AdipoR1/R2 a peu d'effet sur l'AMPc, le GMPc et le Ca<sup>2+</sup> intracellulaire, AdipoR1/R2 ne semblent donc pas couplés aux protéines G. Par contre, ils activent différentes voies comme le PPAR $\alpha$ , l'AMPK et la p38 MAPK avec pour conséquence une augmentation de l'oxydation des acides gras, du captage du glucose et une diminution de la gluconéogenèse. La T-cadhérine est aussi capable de lier l'ApN mais n'a pas d'effet sur la signalisation cellulaire de cette dernière. L'interaction de APPL1 (adaptor protein containing pleckstrin homology domain, phosphotyrosine-binding domain, and leucine zipper motif 1) avec AdipoR1 apparaît jouer un rôle important dans la signalisation de l'ApN (Kadowaki 2005).

Hug *et al.* ont identifié la T-cadhérine, une glycoprotéine impliquée dans l'adhésion cellulaire, comme un récepteur potentiel pour l'ApN. Elle est exprimée dans les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses, où elle est co-localisée avec l'ApN. Seuls les complexes de haut poids moléculaire d'ApN sont capables de se lier à la T-cadhérine, ce qui implique que les modifications post-traductionnelles de l'ApN sont essentielles à sa liaison. Il est donc envisageable que la T-cadhérine qui est une protéine extracellulaire sans domaine intracellulaire, puisse agir comme une adiponectin binding protein plutôt que comme corécepteur. Quoiqu'il en soit, la T-cadhérine n'est pas exprimée dans le foie (Hug et al., 2004)

Plus récemment, une protéine adaptatrice au domaine N-terminal intracellulaire du récepteur de l'ApN, APPL (*adaptor protein containing pleckstrin homology domain, phosphotyrosine-binding domain, and leucine zipper motif*), a été identifiée (Mao et al., 2006). Elle existe sous deux isoformes, APPL1 et APPL2. Les deux isoformes semblent être compétitives et jouent un rôle clé dans l'activation ou l'inhibition de l'AMPK (Cheng et al., 2007; Mao et al., 2006). Le rôle principal est attribué à APPL1 car il a été montré que l'ApN, en se liant au domaine C-terminal extracellulaire de AdipoR1, favorise la fixation de APPL 1 sur l'extrémité N terminale et activant ainsi les voies de signalisation favorisant l'oxydation des lipides et le captage du glucose de l'insuline. APPL1 apparaît donc comme étant un médiateur important dans la sensibilité à l'insuline *via* l'ApN dans le muscle squelettique. La liaison d'APPL1 aux récepteurs d'ApN est essentiellement consécutive à la phosphorylation de l'AMPK au Thr<sup>172</sup>. APPL1 interagit avec environ 14 protéines. Il a également un impact comme médiateur des autres voies de signalisation (action directe avec les récepteurs membranaires ou des protéines de signalisation) et joue donc un rôle crucial dans la prolifération cellulaire, dans diverses voies de signalisation de l'apoptose (Liu et al., 2002), la survie cellulaire (Schenck et al., 2008), la localisation des protéines endosomales (Varsano et al., 2006), et le remodelage de la chromatine (Miaczynska et al., 2004). Quant à APPL 2, il produit les effets inverses une fois lié à APPL1 (Cheng et al., 2007; Mao et al., 2006).

### ***1.2. Régulation de l'expression***

Plusieurs études cliniques ont permis d'établir des corrélations inverses entre le niveau d'expression d'AdipoR1 dans les muscles squelettiques et le diabète de type II ou les paramètres associés (Civitarese et al., 2004; Debard et al., 2004). Chez les souris db/db (déficiente en récepteurs de la leptine), les taux d'expression d'AdipoR1/R2 sont diminués de moitié dans le foie par rapport aux souris sauvages. Cette réduction pourrait être impliquée dans le développement de la résistance à l'insuline et du diabète observés chez les souris obèses. Ainsi, au cours de l'obésité, on assiste à la fois à une diminution de l'ApN circulante et à une diminution de l'expression des récepteurs conduisant à une réduction de la sensibilité à l'ApN. Au contraire, la surexpression d'AdipoR1 ou d'AdipoR2 dans le foie des souris db/db améliore considérablement l'état pathologique et ceci via deux voies de signalisation différentes (Yamauchi et al., 2007). La surexpression d'AdipoR1 réduit la production hépatique de glucose

et augmente l'oxydation des acides gras via l'activation de l'AMPK, tandis que la surexpression d'AdipoR2 active l'oxydation des acides gras et inhibe l'inflammation et le stress oxydatif via PPAR $\alpha$  (Yamauchi et al., 2007). En conclusion, les récepteurs à l'ApN hépatiques jouent un rôle déterminant dans la régulation du métabolisme glucido-lipidique et sont indispensables à l'existence des effets biologiques de l'ApN.

AdipoR1/R2 sont exprimés dans le TA viscéral et sous-cutané de manière significativement plus faible que dans le muscle. En revanche, ils sont inversement corrélés à la concentration circulante de l'ApN dans le muscle alors que seul AdipoR2 dans le tissu sous-cutané est positivement associé aux taux d'ApN circulante (Bluher et al., 2006; Bluher et al., 2007). Dans le TA, l'expression d'AdipoR1 et d'AdipoR2 est réduite par l'obésité et régulée négativement par le TNF  $\alpha$  (Kadowaki and Yamauchi, 2005; Lord et al., 2005). A l'inverse, dans le muscle et le foie, les deux récepteurs seraient augmentés chez les souris hypoinsulinémiques-hyperglycémiques ou soumises à un jeûne (Tsuchida et al., 2004).

L'expression d'AdipoR1 ne semble être affectée par aucun facteur hormonal, et seule l'hormone de croissance stimule l'expression d'AdipoR2 (Fasshauer et al., 2004). Le jeûne régule également de manière positive le gène de l'AdipoR2 et augmente son expression uniquement dans le TA épидidymaire (Bluher et al., 2005). Il semblerait que l'expression des deux récepteurs suive un rythme circadien avec une baisse de leur synthèse dans le TA blanc et brun durant la nuit (Bluher et al., 2005).

Les récepteurs nucléaires impliqués dans le métabolisme des lipides jouent également un rôle dans la régulation des récepteurs de l'ApN. Ainsi, des agonistes de PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$  augmenteraient l'expression d'AdipoR2 alors que les agonistes de LXR (*Liver X Receptor*) induisent à la fois AdipoR1 et AdipoR2 dans les macrophages humains (Chinetti et al., 2004).

## ***VII. MECANISMES CONDUISANT A L'AMELIORATION DE L'INSULINO-RESISTANCE PAR L'APN***

L'apparition d'une IR au niveau périphérique est souvent liée à une lipotoxicité et conduit à plus long terme à l'installation d'un diabète de type II. A l'origine de cette IR, une accumulation des graisses corporelles provoquant une inflammation du TA (Ukkola and Bouchard, 2001). Ce phénomène inflammatoire englobe autour de l'obésité centrale et de l'IR, le diabète de type II, les dyslipidémies et l'hypertension artérielle, des pathologies favorisant l'apparition de maladies

cardio-vasculaires (Ferrannini, 1993; Reaven, 1988). L'ApN possède des effets insulino-sensibilisateurs en réduisant l'hyperglycémie présente lors d'une IR ou d'un diabète de type II. En effet, plusieurs études sur des modèles de rongeurs ont établi une fonction stimulatrice de l'ApN, particulièrement en ce qui concerne la captation du glucose par les tissus périphériques (muscle, tissu adipeux) mais également sur la réduction de la gluconéogenèse via l'activation de l'AMPK (Berg et al., 2001; Combs et al., 2004; Fruebis et al., 2001; Satoh et al., 2005; Xu et al., 2003a; Yamauchi et al., 2003b; Yamauchi et al., 2001). Des souris, surexprimant par transgénèse la forme globulaire ou « entière » de l'ApN, sont protégées de l'IR (Combs et al., 2004; Yamauchi et al., 2003b). Des effets similaires ont été observés *a contrario* chez des souris déficientes en ApN. Suite à l'administration d'un régime riche en graisses, ces souris développent une IR sévère accompagnée de concentrations sériques élevés en TNF $\alpha$  et en AGLs par rapport aux souris témoins (Kubota et al., 2002; Maeda et al., 2002). Ces trois paramètres sont corrigés par la simple administration d'ApN (Maeda et al., 2002). Chez l'Homme, les taux plasmatiques de l'ApN sont négativement et indépendamment corrélés à la production de glucose endogène (Stefan et al., 2003), ce qui confirme les données observées chez les animaux.

### 1. Effets sur l'adiposité

Des études chroniques résultant essentiellement de manipulations génétiques sur la variation du poids corporel et de la masse grasse ont été réalisées. Ces expériences ont donné lieu à des résultats contradictoires. Un modèle de souris KO pour le gène de l'ApN ne développe pas d'obésité, même soumis à un régime riche en graisse (Maeda et al., 2002). En revanche, une augmentation de la masse grasse, essentiellement au niveau inter-scapulaire et orbitaire, a été constatée chez des souris surexprimant une forme d'ApN mutée dans le domaine collagène, sous contrôle d'un promoteur ubiquitaire (CMV) ou d'un promoteur adipocytaire (aP2). Toutefois, cette croissance ne s'accompagne ni d'une augmentation de la prise alimentaire, ni d'un changement de la dépense énergétique sur une durée de 24h (Combs et al., 2004). Cette hypertrophie sélective pourrait être la conséquence d'un effet autocrine de l'ApN ou due à un changement hormonal secondaire à la surexpression de l'ApN. Par ailleurs, chez des souris ob/ob, déficientes en leptine et surexprimant la partie globulaire de l'ApN sous contrôle du promoteur SAP (*serum amyloid P*, promoteur hépatique) aucune variation du poids corporel n'a été observée malgré une augmentation importante de la prise alimentaire (Yamauchi et al., 2003b). L'ApN, dans la régulation du poids corporel, semble donc plus active sur la dépense

énergétique que sur la prise alimentaire. Plusieurs études suggérant un effet anti-obésité de l'ApN à court et moyen terme soutiennent également cette hypothèse. Ainsi il a été montré qu'une administration périphérique ou intracérébroventriculaire (ICV) en aigu d'ApN entraîne une perte de poids corporel de manière dose-dépendante et ce, aux dépens de la masse grasse (Qi et al., 2004). Cette perte semble s'expliquer soit par une hausse des dépenses énergétiques (Qi et al., 2004) *via* l'augmentation de la température corporelle, par l'expression des ARNm UCP1 et 2 dans les tissus adipeux brun et blanc et de UCP3 dans le muscle squelettique, ainsi que par une consommation accrue d'O<sub>2</sub> (Masaki et al., 2003; Qi et al., 2004; Yamauchi et al., 2001) consécutive à une augmentation de l'oxydation des lipides induite (Fruebis et al., 2001). Il semblerait que l'augmentation des dépenses énergétiques induite par l'ApN soit en partie d'origine centrale. En effet, juste après l'administration intra-péritonéale d'ApN, une augmentation de l'activité du système nerveux sympathique autonome innervant le TA brun a été observée (Masaki et al., 2003). De plus, l'administration ICV d'ApN provoque une élévation de l'expression hypothalamique des ARNm CRH (*corticotropin-releasing hormone*), qui est, entre autres, capable de relayer une activation du système nerveux sympathique (Qi et al., 2004) en augmentant le métabolisme cellulaire et la production de chaleur *via* la production de glucocorticoïdes. L'effet central de l'ApN semble être provoqué principalement par les formes hexamériques et trimériques. En effet, que ce soit chez l'Homme ou le rongeur, seuls les complexes hexamériques et trimériques d'ApN sont présents dans le liquide céphalo-rachidien (Ebinuma et al., 2007; Kubota et al., 2007; Kusminski et al., 2007). L'HMW-ApN étant de largement plus grande taille (> 500 KDa), elle ne passe pas la barrière hémato-encéphalique.

## 2. Effets sur le métabolisme glucidique

Des études suggèrent que les effets insulino-sensibilisateurs de l'ApN passent principalement par une augmentation de la capture de glucose par les tissus périphériques et par une diminution de la gluconéogenèse *via* l'activation de l'AMPK. Ainsi dans le foie, l'ApN potentialise l'effet inhibiteur de l'insuline sur la production de glucose par une diminution de l'expression d'enzymes clés de la gluconéogenèse (phosphoénolpyruvate carboxykinase, PEPCCK, et glucose-6- phosphatase, G6Pase) (Berg et al., 2001; Combs et al., 2001), ce qui entraîne une réduction de la glycémie (**figure 11**). L'ApN modifie aussi la cascade de signalisation de l'insuline *in vivo* (en potentialisant la phosphorylation, sur des résidus tyrosines, du récepteur à l'insuline, de IRS-1 et de la PKB (Maeda et al., 2002)). En revanche, elle ne semble avoir

aucun effet sur la teneur et la synthèse du glycogène, sur la captation du glucose ou sur la glycolyse dans le foie (Berg et al., 2001). Dans le muscle squelettique, l'ApN exercerait ses effets antidiabétiques en modulant les voies du métabolisme glucidique, plus particulièrement l'oxydation du glucose, la synthèse du glycogène et la production du lactate (**figure 10**). Plusieurs études montrent un effet stimulateur de l'ApN globulaire sur le transport du glucose aussi bien dans le muscle squelettique isolé que dans les myocytes en culture (Maeda et al., 2002; Tomas et al., 2002; Yamauchi et al., 2002) en favorisant la translocation du transporteur de glucose Glut4 vers la membrane cellulaire (Ceddia et al., 2005). L'ApN réduit également la production du glycogène (Ceddia et al., 2005). Cette réduction pourrait être induite par l'activation de l'AMPK par l'ApN, qui à son tour phosphoryle directement et inactive la glycogène synthase (Kahn et al., 2005). De plus, il a été démontré que les myocytes traitées à l'ApN orientent le métabolisme du glucose vers la production de lactate (Ceddia et al., 2005).

Dans le TA, l'ApN exercerait des effets autocrine sur les adipocytes. Un traitement des adipocytes de rat avec l'ApN globulaire augmente l'absorption du glucose via l'activation de l'AMPK (Wu et al., 2003). Dans les adipocytes 3T3-L1, la surexpression de l'ApN favorise la différenciation adipocytaire, accroît la teneur en lipides et améliore la sensibilité à l'insuline (Fu et al., 2005). L'ApN favorise le stockage des graisses préférentiellement dans le TA et augmente ainsi la sensibilité à l'insuline (Kim et al., 2007a).

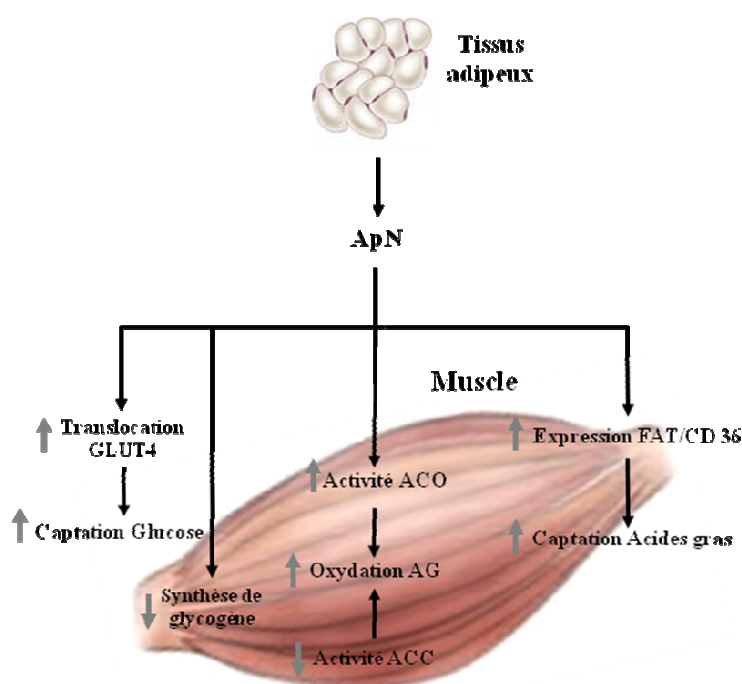
### 3. Effets sur le métabolisme lipidique

#### 3.1. Muscle

Plusieurs études suggèrent que les effets insulino-sensibilisateurs de l'ApN peuvent également être consécutifs à une augmentation de la  $\beta$ -oxydation des acides gras dans le muscle (Bruce et al., 2005; Fruebis et al., 2001; Tomas et al., 2002; Yamauchi et al., 2002) (**figure 10**). La stimulation de l'oxydation des acides gras entraîne une réduction du contenu en TG des tissus avec pour conséquence, une amélioration de la voie de signalisation de l'insuline. Les effets de l'ApN sont associés à la phosphorylation de PPAR $\alpha$  et de l'AMPK (Yamauchi et al., 2003a). Les récepteurs nucléaires PPAR $\alpha$  sont nécessaires pour la transcription de nombreux gènes impliqués dans l'oxydation des acides gras (Schoonjans et al., 1996), ceci suggère que l'activation de PPAR $\alpha$  par l'ApN peut améliorer l'utilisation des acides gras dans le muscle. Cette stimulation de la  $\beta$ -oxydation musculaire serait également la conséquence du changement d'expression de gènes cibles du PPAR $\alpha$ , comme CD36 et FATP-1 (*fatty acid transporter-1*), transporteur d'acides gras, et l'acyl CoA oxydase ACO), enzyme clé de la  $\beta$ -oxydation (Tugwood et al., 1992). D'autre part, l'ApN stimule la phosphorylation de l'AMPK dans



plusieurs de ses tissus cibles (muscle squelettique, foie, cœur, endothélium, adipocytes et cerveau (Cheng et al., 2007; Kubota et al., 2007; Shibata et al., 2004; Tsao et al., 2003; Yamauchi et al., 2002)). Cette stimulation par l'ApN est abolie par l'expression dominante de la forme non active de l'AMPK, ce qui conforte son rôle obligatoire dans la médiation des multiples actions de l'ApN. L'AMPK, une fois activée, phosphoryle l'acétyl CoA carboxylase (ACC) entraînant son inactivation avec, pour conséquence, une réduction des concentrations intracellulaires en malonyl-CoA. La répression allostérique du malonyl-CoA sur la carnitine palmitoyltransférase (CPT-1) est ainsi levée, favorisant le transfert des acides gras à longues chaînes dans les mitochondries, siège de leur oxydation (Tomas et al., 2002; Yamauchi et al., 2002). De plus, l'activation de l'AMPK régule négativement le facteur de transcription SREBP1c impliqué dans la régulation de la biosynthèse des lipides et du cholestérol. Une baisse de SREBP1c s'accompagne d'une régulation négative des gènes impliqués dans la lipogenèse tels que l'ACC, la FAS (*fatty acid Synthase*) et la GPAT (glycérol-3 phosphate acyltransférase) (Tomita et al., 2005; Woods et al., 2000; Yamauchi et al., 2002).

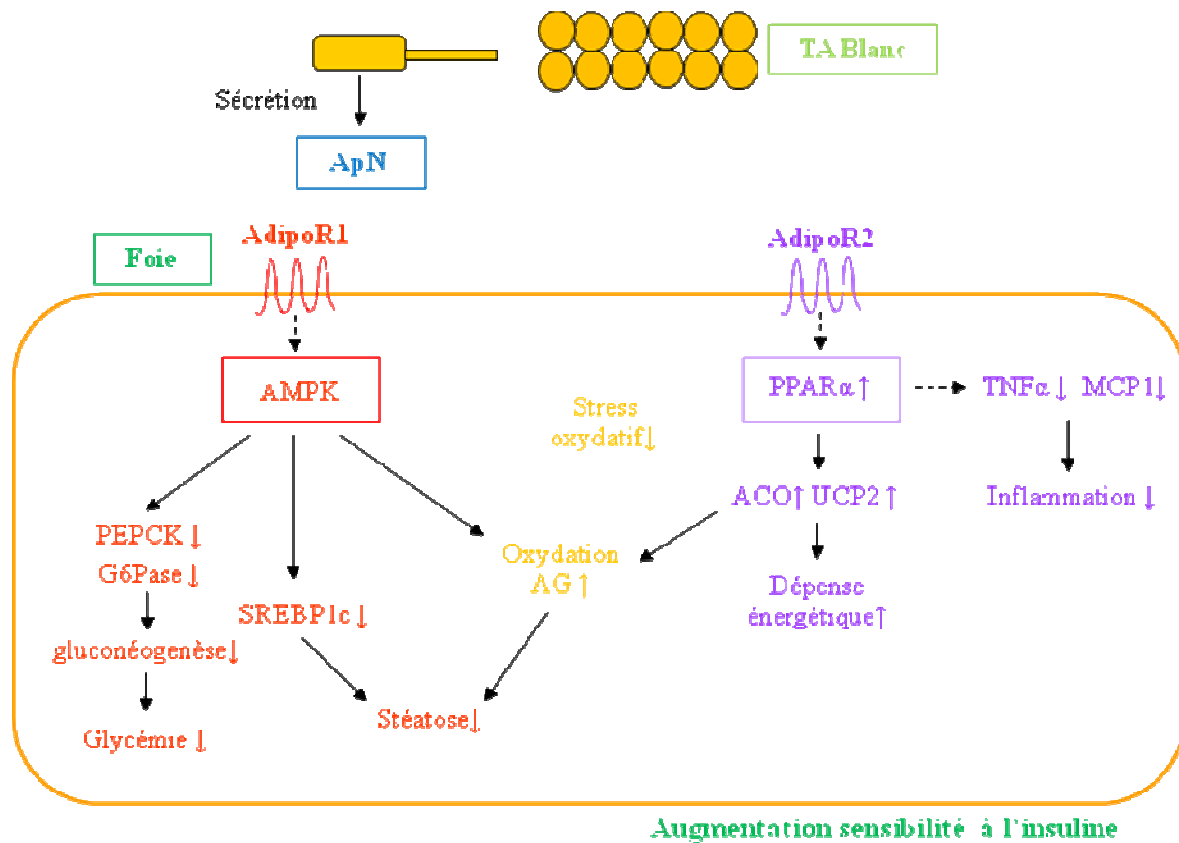


**Figure 10 :** Les effets de l'ApN sur le métabolisme glucidique et lipidique dans le muscle. L'ApN diminue l'expression d'enzymes clés de la gluconéogenèse (PEPCK et G6Pase) ce qui entraîne une augmentation de la captation du glucose *via* l'augmentation de la translocation de Glut4. Par phosphorylation, l'AMPK inhibe également l'ACC, réduisant ainsi les concentrations intracellulaires en malonyl-CoA. Ce dernier, lève l'inhibition sur CPT-1 de manière allostérique ce qui favorise l'oxydation des AG.

### 3.2. Foie

Les effets insulino-sensibilisateurs de l'ApN s'exerceraient également sur le foie et plusieurs études mettent en évidence l'activation de voies semblables à celles décrites dans le muscle qui pourraient conduire à une stimulation de la  $\beta$ -oxydation. Ainsi, il a été montré que, outre son action sur la néoglucogénèse *via* l'activation de l'AMPK, l'administration d'ApN, *in vivo*, atténue l'activité de deux enzymes limitantes impliquées dans la synthèse des acides gras : la FAS et l'ACC (Xu et al., 2003a). L'ApN atténue l'activité de la FAS en régulant négativement l'expression de son gène, alors que celle de l'ACC est atténué par *via* l'activation d'AMPK (Yamauchi et al., 2002). Il est donc suggéré que l'inhibition de la voie de synthèse des acides gras s'accompagne d'une augmentation de la  $\beta$ -oxydation par l'activation de l'activité CPT-1 (Winder and Hardie, 1999). D'autre part, l'ApN pourrait également stimuler l'oxydation des acides gras *via* l'activation de PPAR $\alpha$  en régulant positivement plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme lipidique. Le rôle des récepteurs de l'ApN dans l'activation des différentes voies susceptibles de conduire à une activation de la  $\beta$ -oxydation a été défini dans une étude utilisant des souris obèses chez qui AdipoR1 ou AdipoR2 a été surexprimé dans le foie (Yamauchi et al., 2007). Ainsi, il apparaît que AdipoR1, en activant la voie de l'AMPK, réduit la néoglucogénèse et augmente l'oxydation des AG *via* l'inhibition de l'ACC tandis qu'AdipoR2 active la voie de PPAR $\alpha$  qui peut également conduire à une stimulation de l'oxydation (**figure 11**). Même si cette étude renseigne précisément sur les voies de signalisation et les voies métaboliques activées par chacun des récepteurs, elle ne correspond pas exactement à des conditions physiologiques et la question concernant les effets de l'ApN sur la  $\beta$ -oxydation hépatique reste à préciser. Une étude fait d'ailleurs état de résultats contradictoires en montrant une augmentation de la  $\beta$ -oxydation dans le muscle soléaire et le foie chez des souris déficientes en ApN (-/-) (Ma et al., 2002). La plupart des travaux suggérant une stimulation de la  $\beta$ -oxydation par l'ApN dans le foie ont consisté à mesurer l'activité d'enzymes limitantes impliquées dans le métabolisme lipidique (Xu et al., 2003; Yamauchi et al., 2002) et ont été réalisés *in vivo* ce qui peut, par conséquent, impliquer l'action de facteurs indépendants. Ainsi, l'action propre de l'ApN sur le métabolisme lipidique reste encore mal connue et nécessite plus d'investigations afin de préciser si cette dernière agit de manière directe ou indirecte sur le catabolisme des graisses hépatiques.





**Figure 11** : Les effets de l'ApN sur le métabolisme glucidique et lipidique dans le foie. L'ApN active deux voies de signalisations distinctes selon le type de récepteur lié. AdipoR1 active la voie de l'AMPK, réduit la néoglucogenèse et augmente l'oxydation des AG (via l'inhibition de l'ACC et activation de la CPT-I). Tandis qu'AdipoR2 active la voie de PPAR $\alpha$ , stimulant ainsi l'oxydation des AG et inhibe l'inflammation et le stress oxydatif. Les deux voies de signalisation aboutissent à une diminution de la stéatose hépatique et à une augmentation de la sensibilité à l'insuline in vivo (d'après Yamauchi et al. 2007).

En conclusion, les effets insulino-sensibilisateurs de l'ApN, semblent principalement s'exercer via des voies de signalisation impliquant l'AMPK et être le résultat d'une régulation fine et conjointe des métabolismes glucidiques et lipidiques dans le muscle, le foie et le TA. Le rôle respectif du foie et du muscle dont les mécanismes, qui conduisent à l'amélioration de l'IR associée à l'augmentation des taux d'ApN, ne sont pas clairement définis. Mais il semble falloir dissocier le rôle des AdipoRs du foie et celui du facteur concentration en ApN qui semblerait avoir un effet puissant sur le muscle. Au final, les conditions qui mènent à une expression élevée de récepteurs dans le foie, associées à une concentration élevée en ApN, semblent les plus favorables à une amélioration de l'IR.

# *PROBLEMATIQUE*

Il ressort de cette analyse bibliographique que l'ApN, qui est produite spécifiquement et abondamment par le tissu adipeux (Kadowaki et al., 2006), joue un rôle primordial dans l'étiologie de l'obésité, du diabète de type 2 et des maladies coronariennes. En effet, chez les patients obèses et diabétiques, une perte de poids s'accompagne d'une augmentation des taux circulants d'ApN et d'une amélioration des paramètres biochimiques (Arita et al., 1999; Hotta et al., 2000). Ainsi, l'adiponectinémie est corrélée à une augmentation des HDL (Verges et al., 2006) et une diminution des VLDL chez l'Homme (Lara-Castro et al., 2006) et à une diminution de l'insulino-résistance (Yamauchi et al., 2001). De ce fait, l'ApN et ses récepteurs constituent de nouvelles cibles thérapeutiques pour les traitements du syndrome métabolique et du diabète. Pourtant les mécanismes d'action conduisant à l'amélioration du métabolisme lipidique et glucidique restent encore mal connus.

C'est pourquoi, au cours de cette étude, nous utiliserons différentes stratégies nutritionnelles et pharmacologiques permettant de modifier le métabolisme adipocytaire et la masse adipeuse afin d'en établir les conséquences sur la production d'ApN et ses effets sur le métabolisme des lipides du foie.

Dans une première approche *in vivo*, des souris sont soumises à différents traitements afin de diminuer (acide linoléique conjugué (CLA), streptozotocine (STZ)) ou augmenter (régime enrichi en sucres et en graisses, glitazones (GTZ)) la masse adipeuse. Après avoir déterminé les conséquences de ces traitements sur l'adiponectinémie, nous nous intéresserons aux relations existantes entre les taux d'ApN et le métabolisme hépatique des lipides. Les analyses concernent les paramètres morphologiques, biochimiques et moléculaires en relation avec le métabolisme des lipides et de l'ApN : détermination des paramètres biochimiques sanguins et hépatiques, mesure d'activité et d'expression de protéines relatives à l'hydrolyse et à l'incorporation des lipides plasmatiques, à l'oxydation des acides gras, à la lipogenèse, à l'estérification des acides gras. La compréhension des mécanismes de régulation impliqués passe également par la mesure de l'expression du gène de l'ApN et de ses récepteurs. Ces différents modèles apportent également des informations quant à la relation existantes entre la variation de la masse grasse viscérale et la production d'ApN.

La seconde partie du travail, *in vitro*, a consisté à développer un modèle d'explants de foie en culture adapté à l'étude des effets directs de différents composés sur les voies du métabolisme

des lipides. Cette approche est ensuite utilisée pour étudier l'impact et les mécanismes d'action de l'ApN sur le foie isolé du reste de l'organisme. Nous cherchons tout particulièrement à déterminer les effets exercés par l'ApN sur l'oxydation des acides gras. L'objectif étant de déterminer si l'amélioration des paramètres lipidiques plasmatiques associés à l'augmentation de l'adiponectinémie peut être la conséquence d'une activation du catabolisme des AG dans le foie. En effet, l'accumulation de lipides dans les cellules musculaires et hépatiques semble être un facteur déterminant dans l'établissement de la résistance à l'insuline associée à l'obésité et au diabète (Zhang et al. 2009). Par conséquent, les facteurs stimulant l'activité  $\beta$ -oxydative pourraient s'avérer bénéfiques en réduisant les lipides et leurs métabolites cytoplasmiques. Cette question est particulièrement pertinente puisque la voie de dégradation des AG est directement liée à celle de la lipogenèse conduisant à la formation de TG puis à la sécrétion de lipoprotéines ; ce qui peut, à terme, modifier l'homéostasie lipidique de l'organisme entier.

*APPROCHE IN VIVO*

## EVALUATION DES EFFETS DE LA MODULATION DE LA MASSE GRASSE SUR LES CONCENTRATIONS CIRCULANTES DE L'APN ET SES EFFETS SUR LE METABOLISME LIPIDIQUE DU FOIE

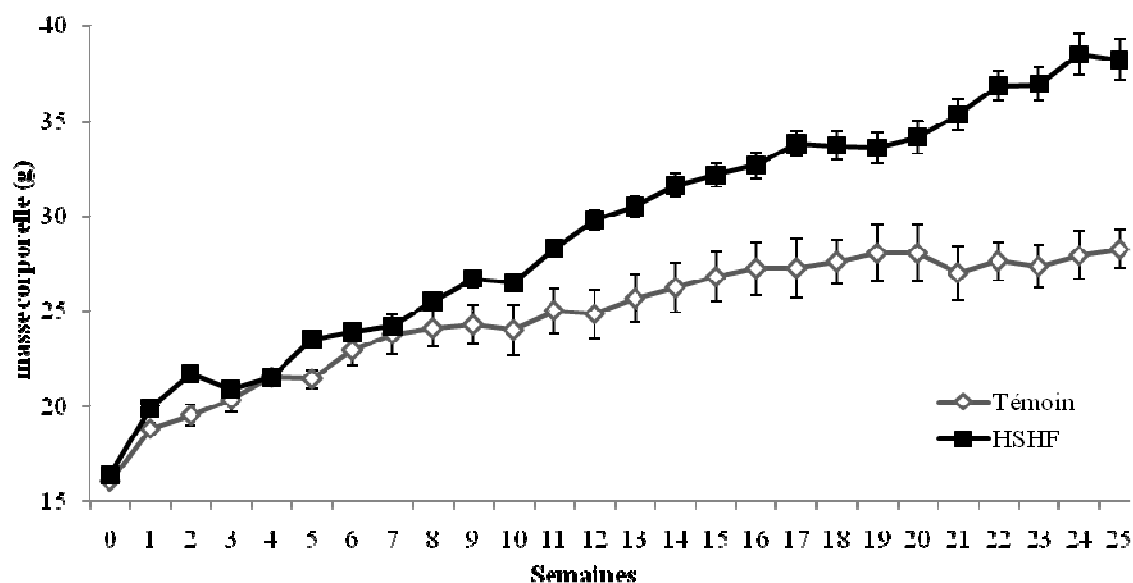
La découverte d'une corrélation négative entre les taux plasmatiques de l'ApN et l'obésité, le diabète de type 2 et les maladies coronariennes (Arita et al., 1999; Hotta et al., 2000) a suscité un intérêt particulier pour l'ApN. Le point commun entre ces trois pathologies est l'inflammation du tissu adipeux. Ce phénomène inflammatoire est lié de façon causale à l'obésité et à ses pathologies associées, telles que l'IR, le diabète de type 2 et certaines pathologies cardio-vasculaires. En effet, l'obésité est associée à une réponse inflammatoire chronique, caractérisée par une production anormale de marqueurs plasmatiques de l'inflammation tels que le TNF $\alpha$  et l'IL6 (Bastard et al., 2002; Hotamisligil et al., 1993) qui sont à l'origine de l'inhibition de la production d'ApN (Bruun et al., 2003; Maeda et al., 2002). A l'inverse, une simple réduction pondérale est associée à une normalisation de ces marqueurs inflammatoires (Cottam et al., 2004; Ryan and Nicklas, 2004; van Dielen et al., 2004) ainsi qu'à une augmentation des taux d'ApN (Yang et al., 2001). Ceci suggère que la variation de la masse grasse joue un rôle important dans la production des différents types d'adipokines : Pro ou anti-inflammatoire. C'est pourquoi, dans le cadre de ce travail, nous nous sommes particulièrement intéressés à la relation entre la variation de la masse grasse et les taux plasmatiques d'ApN. Pour cela, nous avons choisi une approche *in vivo* qui consiste à traiter des souris C57BL/6 par des agents ou régime capables de moduler la masse adipeuse, connus pour provoquer soit une diminution de la masse adipeuse (CLA, STZ) soit une prolifération adipocytaire (GTZ, régime hyperglucidique et hyperlipidique (HSHF)) (**tableau 1**). Nous avons déterminé l'impact de ces différents traitements sur les paramètres plasmatiques et en particulier les taux d'ApN et ses conséquences sur le métabolisme des lipides dans le foie.

**Tableau 1** : Tableau récapitulatif des traitements et régime utilisés et de leurs effets sur la masse grasse

Lot souris C57 BL/6	Traitement 12 jours				Régime 25 semaines	
	Témoin	CLA	STZ	GTZ	Témoin	HSHF
Modalités	/	CLA 1%	STZ 45 mg/kg/5j	PioGTZ 10 mg/kg	Régime standard	Régimes hyperglucidique et hyperlipidique
Effet	/	fonte du TA	Suppression insuline et fonte du TA	Stimulation de la prolifération adipocytaire	/	Augmentation masse grasse

## 1. Régime hyperglucidique et hyperlipidique (HSHF)

Le traitement HSHF a été choisi dans le but d'induire une obésité dans des conditions proches de celles observées chez l'Homme. Pour cela, un lot de 20 souris C57BL/6 âgées de 11 semaines a été soumis à un régime de type « cafétéria » (42 g/Kg de sucres et 22.5 g/Kg en lipides) pendant 25 semaines (**figure 12**).



**Figure 12** : Evolution du poids corporel au cours de la période d'induction de l'obésité avec le régime HSHF

### 1.1. Caractérisation du modèle

L'analyse des paramètres morphologiques et plasmatiques (**tableau 2**) confirme le caractère obèse des souris HSHF. En effet, les masses des deux tissus adipeux (TA) épидидymaire et inguinal sont significativement différentes par rapport au TA du lot témoin. La glycémie des souris HSHF n'est pas différente de celle mesurée chez les témoins malgré une augmentation du taux d'insuline ce qui suggère que les souris HSHF présentent une insulino-résistance. Les taux sériques d'AGL et de cholestérol total sont augmentés par le régime HSHF par rapport au régime témoin ; tandis que la concentration en TG est 50% plus basse. Dans le foie, le régime HSHF induit une stéatose hépatique avec une augmentation de 5 fois la teneur en TG tandis que celle du cholestérol reste inchangée. Enfin, Les réserves de glycogène sont moindres chez les souris HSHF comparées aux témoins suggérant une stimulation de la glycogénolyse.

**Tableau 2 :** Effets du régime HSHF sur la composition corporelle, les paramètres plasmatiques et hépatiques sur des souris C57BL/6

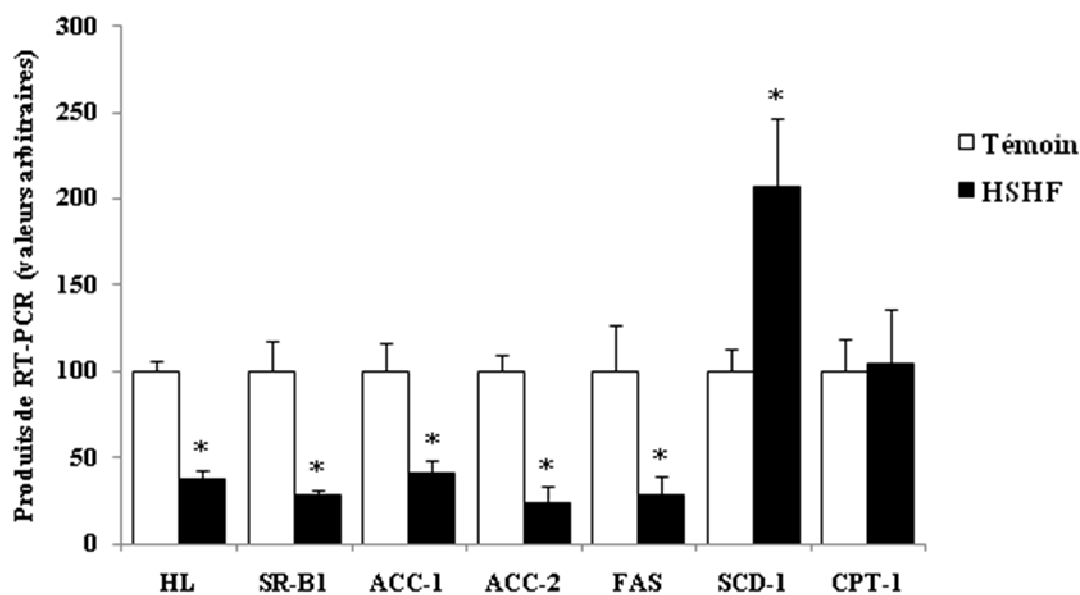
	Témoin	HSHF
<b>Poids des souris</b>	26,02 ± 1,73	35,94 ± 1,09
<b>Masse des organes</b>		
Foie (g)	1,38 ± 0,03	1,49 ± 0,06*
TAViscéral (g/100g mc)	2,25 ± 0,36	5,60 ± 0,34*
TA ss-cutané (g/100g mc)	1,04 ± 0,13	2,86 ± 0,21*
<b>Paramètres plasmatiques</b>		
Glucose (mg/mL)	2,79 ± 0,16	2,72 ± 0,21
insuline (ng/mL)	0,4 ± 0,03	0,59 ± 0,07*
Adiponectine (µg/mL)	63,05 ± 3,24	42,31 ± 7,21*
Acides gras libres (mmol/L)	0,30 ± 0,04	0,54 ± 0,06*
Triglycérides (mg/mL)	0,74 ± 0,06	0,36 ± 0,03*
Cholestérol total (mg/mL)	1,09 ± 0,04	2,05 ± 0,07*
<b>Paramètres hépatiques</b>		
Glycogène (mg/g)	66,7 ± 8,1	49,2 ± 4,2*
Triglycérides (mg/g)	24,4 ± 4,5	118,7 ± 17,6*
Cholestérol (mg/g)	16,07 ± 0,94	17,98 ± 1,63

Les résultats sont des moyennes ± E.S.M. (témoin n=5, HSHF n=10). Les animaux sont utilisés à après un jeûne de 4 h. \*différence significative à  $p < 0,05$ .

L'analyse de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique (**figure 13**) indique de manière surprenante que les niveaux d'ARNm des enzymes de la lipogénèse acétyl-CoA carboxylase (ACC) 1et 2, et fatty acid synthase (FAS) ont été inhibés chez les souris HSHF par rapport aux souris témoins et ceci malgré le développement d'une stéatose. Au contraire, L'expression de la stéaroyl-CoA désaturase-1 (SCD-1) qui convertit les AG saturés en monoinsaturés est stimulée chez les souris HSHF. Ces données suggèrent que dans nos conditions expérimentales, la stéatose hépatique soit principalement due à l'apparition d'une IR au niveau du TA c'est-à-dire à une diminution de l'effet de l'insuline sur la lipolyse adipocytaire plutôt qu'à une stimulation de la lipogénèse. Ainsi, le flux d'AGL vers le foie étant augmenté les hépatocytes limitent la synthèse *de novo* d'AG mais par contre activent les voies conduisant à leur désaturation et incorporation dans les TG.



D'autre part, les résultats ne relèvent aucune modification des taux de transcrite de la carnitine palmitoyltransferase I (CPT-I), enzyme limitante de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale. Par contre l'expression de la lipase hépatique (HL) et de SR-B1 (*scavenger receptor* de classe B de type 1) est réduite par le régime suggérant un rôle pour ces protéines dans l'altération des profils lipoprotéiques observée au cours de l'obésité.

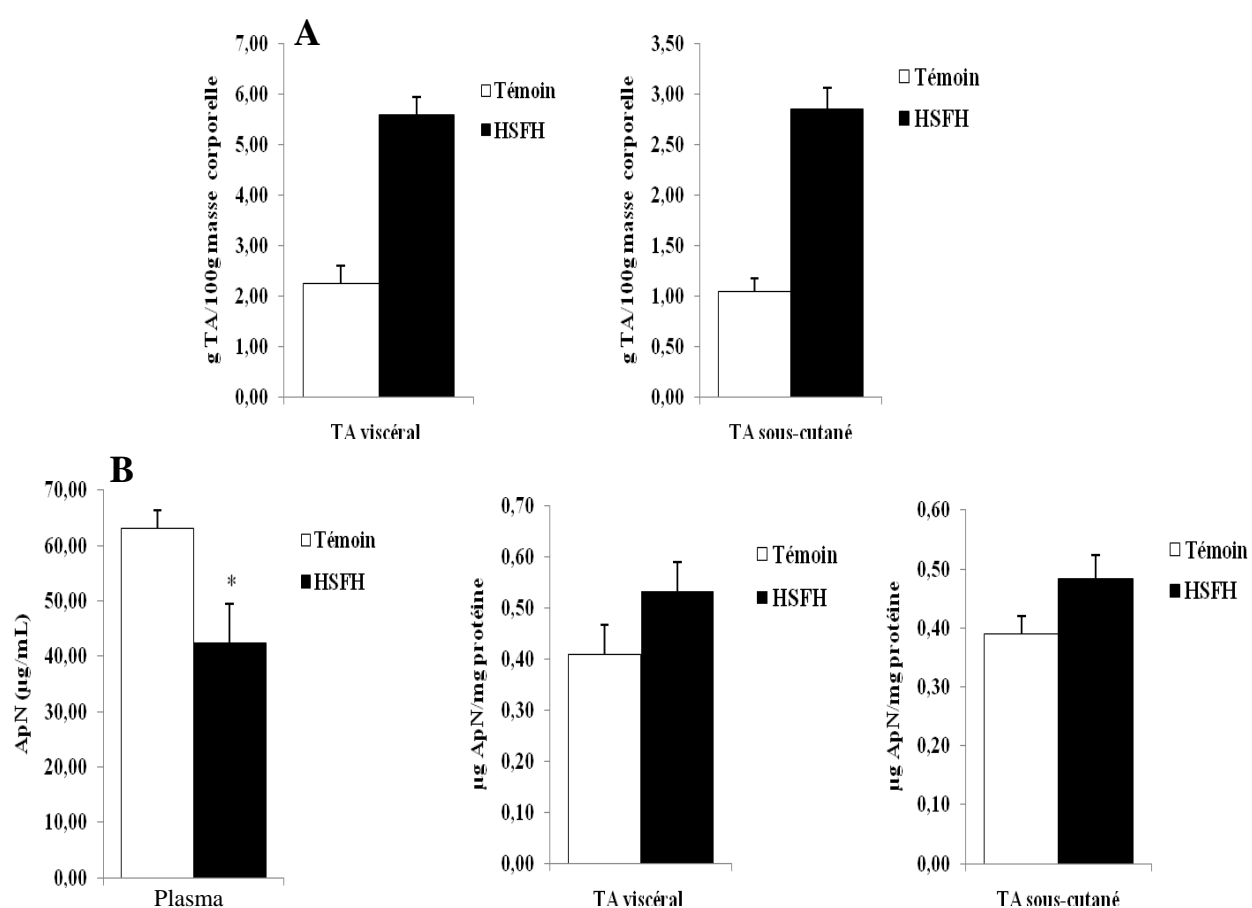


**Figure 13** : Effets du régime HSHF sur l'expression des ARNm des gènes HL , SR-B1, ACC1, ACC2, FAS et CPT-1 impliqués dans le métabolisme lipidique du foie chez des souris C57BL/6. Les résultats sont des moyennes  $\pm$  E.S.M. (n=5). Les animaux sont utilisés après un jeûne de 4 h. \*différence significative à  $p < 0,05$ .

### 1.2. Paramètres relatifs à l'ApN

Dans la littérature, de nombreux rapports font état d'une corrélation négative entre les concentrations sériques d'ApN, la masse du TA et d'une variation de la production d'ApN en fonction de la distribution du TA (Cnop et al., 2003; Fisher et al., 2002). Dans notre étude, l'élévation de la masse des dépôts graisseux est également associée à des taux sériques d'ApN réduits (**figure 14**). Afin d'essayer de déterminer l'implication respective du TAV et du TASC, nous avons étudié ces deux tissus séparément. En premier lieu, on constate que les souris témoins présentent des concentrations en ApN comparables dans le TASC et le TAV lorsque les valeurs sont exprimées en  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de protéines. Toutefois, le tissu adipeux sous-

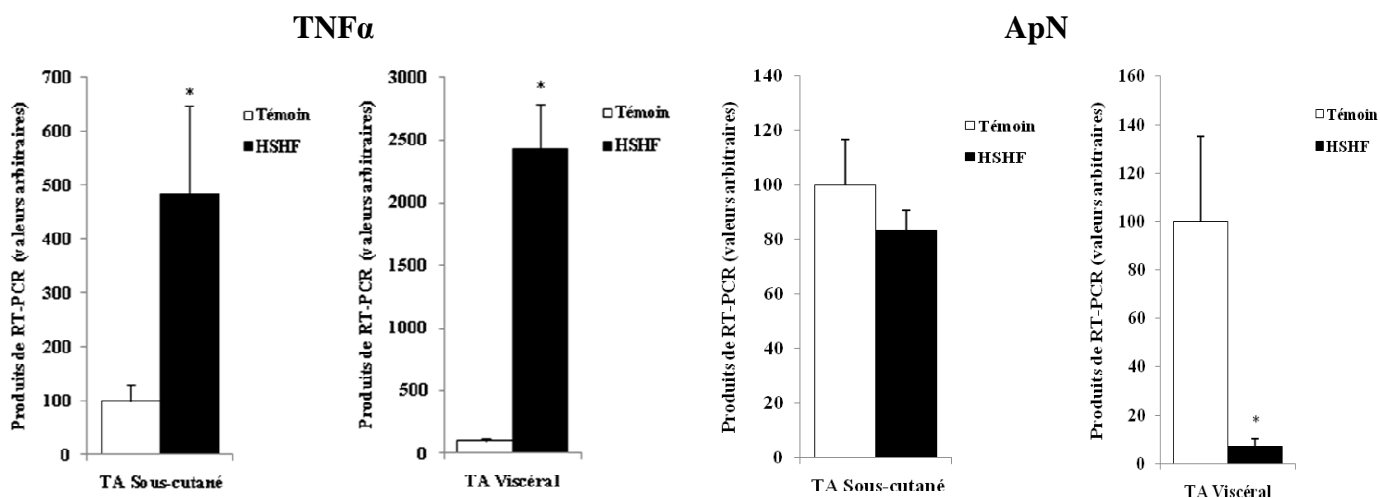
cutané est constitué d'adipocytes de plus petite taille et par conséquent plus riches en protéine que le TAV ( $9,24 \pm 1,93$  vs  $5,29 \pm 0,93$ ). De ce fait, lorsque les valeurs sont rapportées au g de tissu, on obtient une concentration en ApN plus élevée pour le TASC que pour le TAV ( $3,48 \pm 0,03$  vs  $2,09 \pm 0,06$ ) ce qui est en accord avec les données de la littérature montrant que le TASC à une capacité sécrétoire 30% supérieure que celle du TAV (Lihn et al., 2004). Curieusement, l'induction de l'obésité chez les souris HSHF, ne semblent pas réduire les contenus intracellulaires en ApN qui sont même augmentés dans le TASC. Ce dernier résultat nous a amené à nous poser des questions quant à la pertinence des données concernant les concentrations intracellulaires et à orienter nos hypothèses vers d'autres facteurs tels que la synthèse et la sécrétion de l'ApN.



**Figure 14 :** Effets du régime HSHF sur la masse grasse dans le TAV et TASC (A), et sur la concentration de l'ApN dans le plasma et dans les adipocytes du TA viscéral et sous-cutané (B). Les résultats sont des moyennes  $\pm$  E.S.M. (n=5). Les animaux sont utilisés après un jeûne de 4 h. \*différence significative à  $p < 0,05$ .

### 1.3. Régulation génique dans les tissus adipeux

Il est rapporté dans la littérature que le TNF $\alpha$  exerce un effet inhibiteur sur l'expression de l'ApN dans le TA (Barth et al., 2002). De plus, l'état inflammatoire semble également s'accompagner d'une diminution des capacités de sécrétion de l'ApN (Bruun et al., 2005). Ainsi, les différences entre les dépôts graisseux en terme de production d'ApN pourraient être directement liées au degré d'inflammation du tissu comme proposé par certains auteurs (Phillips et al., 2008). Dans notre étude, la surexpression du gène de TNF $\alpha$  dans les deux types de TA des souris HSHF, reflète bien un état inflammatoire chronique ce qui est caractéristique de l'obésité. Il est intéressant de noter que l'induction de TNF- $\alpha$  est beaucoup plus importante dans le TAV que dans les graisses sous cutanées (respectivement x24 et x 4.8). Parallèlement on observe que l'expression du gène de l'ApN est fortement réprimée dans le TAV qui présente la plus forte induction de TNF $\alpha$  alors qu'elle ne l'est pas significativement dans le TASC (**figure 15**) ce qui suggère que la synthèse et la sécrétion de l'ApN doivent être fortement réduites dans le TAV.



**Figure 15** : Effets du régime HSHF sur l'expression des ARNm des gènes de l'ApN et du TNF $\alpha$  mesurés dans le TA viscéral et sous-cutané des souris C57BL/6.

Les résultats sont des moyennes  $\pm$  E.S.M. (n=5). Les animaux sont utilisés après un jeûne de 4 h. \*différence significative à  $p < 0,05$ .

A partir de ces données et celles de la littérature, nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle l'état inflammatoire induit par l'obésité conduit à une diminution de la production d'ApN par le TAV largement responsable de la réduction de l'ApN circulante. Il est vraisemblable que les capacités sécrétoires du TASC, qui présente un degré d'inflammation

moindre, soient moins altérées. D'ailleurs, les personnes présentant un développement important du TAV sont plus susceptibles de développer un syndrome métabolique et un diabète de type II que celles présentant une proportion élevée de TASC (Krotkiewski et al., 1983).

## 2. Traitement à l'acide linoléique conjugué (CLA)

Le terme **CLA** (*conjugated linoleic acid*) désigne un groupe d'isomères positionnels et géométriques de l'acide linoléique produits naturellement par isomérisation bactérienne dans le rumen des ruminants (*cis 9, trans 11 C18 : 2*) ou encore par hydrogénation catalytique au cours de traitements technologiques ou culinaires (*trans-10, cis-12 C18 :2*). Les effets biologiques attribués aux CLA sont nombreux, souvent mal compris, voire contradictoires. Les CLA sont décrits comme des modulateurs de la réponse immunitaire, comme possédant des propriétés anticancéreuses, anti-athérogènes antidiabétiques, ou encore comme étant à l'origine d'une résistance à l'insuline (Wahle et al., 2004). L'effet réducteur de la masse grasse par le *trans-10, cis-12 C18 :2* décrit dans plusieurs modèles animaux reste toutefois l'effet biologique le plus spectaculaire même si les études menées chez l'Homme sont peu démonstratrices (Wang and Jones, 2004). La souris est particulièrement sensible aux effets du *t10c12CLA* puisque cet isomère induit une fonte massive du tissu adipeux et une stéatose hépatique (Degrace et al., 2003). Dans ces conditions de lipoatrophie, les fonctions sécrétrices du tissu adipeux sont perturbées et les taux d'adipokines circulants telles que l'adiponectine sont fortement diminués (Poirier et al., 2006).

### 2.1. Caractérisation du modèle

Dans cette étude, en ajoutant 1% de *t10c12CLA* au régime standard après 12 jours, nous avons bien provoqué une fonte de la masse grasse qui s'est accompagnée de modifications métaboliques. Le fait que le stockage des acides gras dans le tissu adipeux soit perturbé contribue à augmenter le dépôt ectopique de lipides dans le foie. Ainsi, on observe une quantité de TG 2,5 fois plus élevée dans le foie des souris *t10c12CLA* par rapport aux témoins (**tableau 3**). Des études précédemment menées au laboratoire (Degrace et al., 2006) ont mis en évidence une stimulation de l'expression de gènes comme celui de FAT/CD36 et du VLDLR par le *t10c12CLA* suggérant une augmentation des capacités de captage des lipides par le foie. Ainsi la faible triglycéridémie relevée chez les souris *t10c12CLA* pourrait s'expliquer par une activation de la clairance des lipides plasmatiques par le foie. Le régime a également tendance à diminuer les capacités  $\beta$ -oxydatives (**tableau 3**). Par conséquent, il semble que dans ces conditions, une arrivée massive de lipides vers le foie couplée à un catabolisme réduit des acides gras soit responsable de l'installation d'une stéatose.

Les paramètres glucidiques semblent être quant à eux peu modifiés par le traitement. En effet, les souris *t10c12CLA* présentent une glycémie et des réserves de glycogène hépatique normales avec des taux d'insuline légèrement diminués.

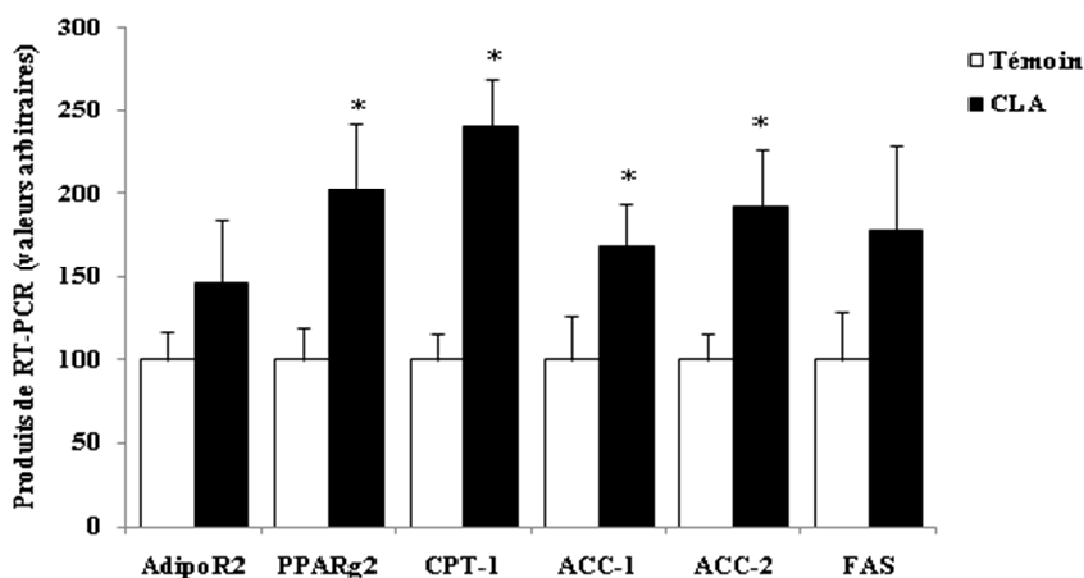
Dans ce modèle, la réduction de la masse grasse s'accompagne d'une forte diminution de la concentration plasmatique en ApN (**tableau 3**), il est donc envisageable qu'une telle diminution ait des conséquences directes sur le métabolisme hépatique. Ainsi, compte tenu des effets activateurs démontrés de l'adiponectine sur l'oxydation des acides gras dans le muscle, il n'est pas exclu que des taux réduits d'adiponectine soient, à l'inverse, associés à la faible activité  $\beta$ -oxydative observée dans le foie.

**Tableau3** : Effets du traitement *t10c12CLA* sur la composition corporelle, les paramètres plasmatiques et hépatiques sur des souris C57BL/6.

	Témoin	<i>t10c12CLA</i>
<b>Poids des souris</b>	29,4 ± 0,6	26,6 ± 0,6*
<b>Masse des organes</b>		
Foie (g/100g mc)	5,35 ± 0,04	6,55 ± 0,24
TA viscéral (g/100g mc)	1,43 ± 0,13	0,42 ± 0,08*
<b>Paramètres plasmatiques</b>		
Insuline ( $\mu$ g/L)	0,35 ± 0,02	0,25 ± 0,03*
Glucose (mg/mL)	2,2 ± 0,1	2,6 ± 0,4
Adiponectine ( $\mu$ g/mL)	51 ± 10,9	6,18 ± 2,18*
Triglycérides (mg/mL)	0,96 ± 0,05	0,53 ± 0,06*
Cholestérol total (mg/mL)	1,5 ± 0,2	2,6 ± 0,4*
<b>Paramètres hépatiques</b>		
Glycogène (mg/g)	43,4 ± 4,2	42,9 ± 6,8
Triglycérides (mg/g)	16,9 ± 1,5	44,84 ± 6,0*
Cholestérol total (mg/g)	4,0 ± 0,7	3,84 ± 0,7
$\beta$ -oxydation de l'acide palmitique (nmol/g foie.h)	7,23 ± 1,90	6.26 ± 0,40

*Les résultats sont des moyennes  $\pm$  E.S.M. (n=4). Les animaux sont utilisés à après un jeûne de 4 h. \*différence significative à  $p < 0,05$ .*

L'expression de certains gènes est également modifiée par le traitement puisque les deux isoformes ACC, la FAS et PPAR $\gamma$  sont induits suggérant une activation de la lipogenèse (**figure 16**). La surexpression de la CPT-I traduit vraisemblablement ici un effet adaptatif comme rencontré dans les cas de déficit  $\beta$ -oxydatif (Degrace et al., 2007). Les effets hépatoprotecteurs de l'ApN vis à vis de la stéatose ont été mis en évidence récemment dans une étude utilisant des souris KO (Zhou et al., 2008) . Chez ces souris, les effets d'un régime hyperlipidique sur le foie sont exacerbés et corrigés par l'ApN. Pour aller plus loin dans notre étude et renforcer nos hypothèses, il serait intéressant à ce stade, de tester les effets d'une administration d'ApN à des souris *t10c12CLA* sur les paramètres hépatiques.



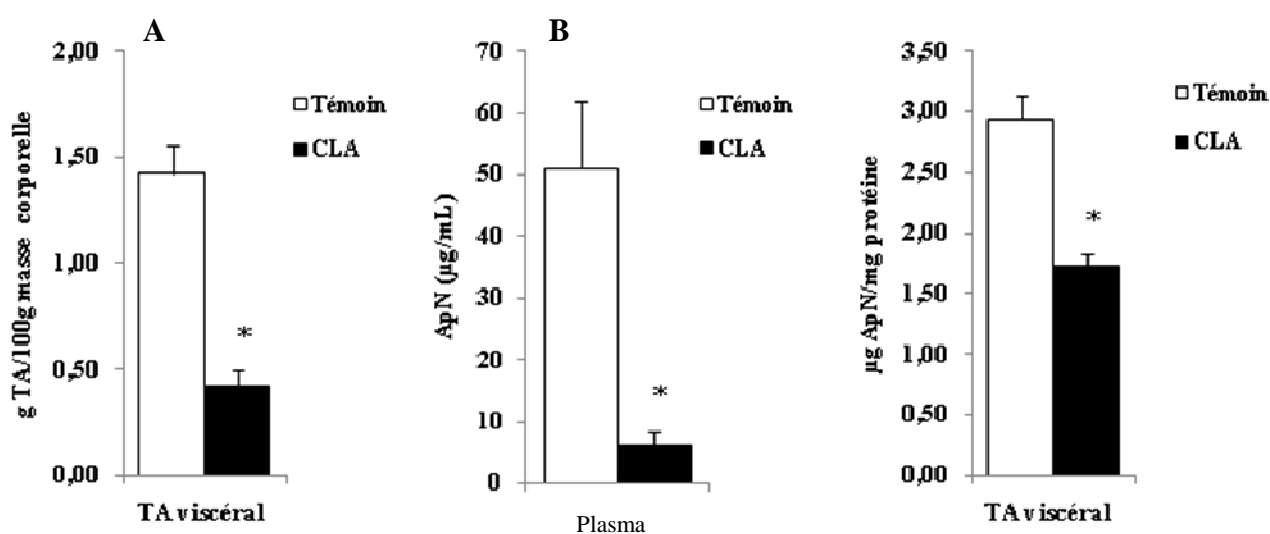
**Figure 16** : Effets du traitement *t10c12CLA* sur l'expression des ARNm des gènes AdipoR2, PPAR $\gamma$ 2, CPT-1, ACC1, ACC2 et FAS impliqués dans le métabolisme lipidique du foie mesurée chez des souris C57/B16.

Les résultats sont des moyennes  $\pm$  E.S.M. (n=5). Les animaux sont utilisés après un jeûne de 4 h. \*différence significative à  $p < 0,05$ .

## 2.2. Paramètres relatifs à l'ApN

Nous avons vu, en accord avec la littérature, que la fonte du TA périépididymaire observée chez les souris *t10c12CLA* est associée à de faible taux d'ApN circulante (**figure 17**). La lipotrophie est la conséquence des effets du *t10c12CLA* qui, d'une part, diminue le captage

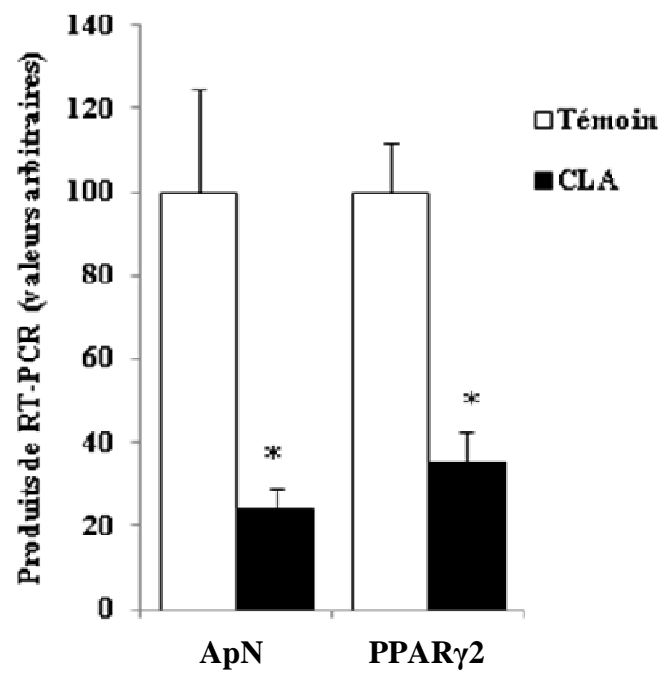
des TG dans les adipocytes en inhibant l'activité de la LPL (Lin et al., 2001; Xu et al., 2003; Zabala et al., 2006; Zhai et al., 2010) et d'autre part régule négativement la prolifération adipocytaire en inhibant spécifiquement l'expression du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ 2 (Granlund et al., 2003). Dans notre étude, l'expression de PPAR $\gamma$ 2 dans le TA périépididymaire des souris *t10c12CLA* est d'ailleurs fortement réprimée par rapport aux souris témoins (**figure 18**). Quant à la réduction significative de l'ApN circulante, elle semble être due à une inhibition de sa production puisque le traitement *t10c12CLA* réprime l'expression adipocytaire du gène de l'ApN et diminue sa concentration intracellulaire. Il est à noter que le *t10c12CLA* favorise l'infiltration de macrophages dans le TA et conduit à une induction rapide de l'expression de deux adipocytokines pro-inflammatoires, TNF $\alpha$  et l'IL-6, sans affecter leurs taux dans le sérum (Poirier et al., 2006). Ainsi, l'effet inhibiteur du *t10c12CLA* sur la production d'ApN pourrait s'exercer via ces cytokines comme cela a été mis en évidence dans plusieurs études (Hernandez-Diaz et al., ; Ohashi et al., 2004; Poirier et al., 2006; Tsuboyama-Kasaoka et al., 2000). Dans les adipocytes 3T3-L1, le *t10c12CLA* induit directement la sécrétion d'IL-6 (Poirier et al., 2006).



**Figure 17:** Effets du traitement *t10c12CLA* sur la masse du TA viscéral (A), et sur la concentration de l'ApN dans le plasma et dans les adipocytes du TA viscéral (B).

Les résultats sont des moyennes  $\pm$  E.S.M. ( $n=5$ ). Les animaux sont utilisés après un jeûne de 4 h. \*différence significative à  $p<0,05$ .





**Figure 18:** Effets du traitement *t10c12*CLA sur l'expression des ARNm des gènes de l'ApN et du PPAR $\gamma$ 2 mesurée dans le TA viscéral des souris C57BL/6.

Les résultats sont des moyennes  $\pm$  E.S.M. ( $n=5$ ). Les animaux sont utilisés après un jeûne de 4 h. \*différence significative à  $p<0,05$ .

### 3. Traitement à la streptozotocine (STZ)

La streptozotocine (STZ) est un antibiotique anti-tumoral de synthèse utilisé en chimiothérapie anti-cancéreuse. Ce médicament, toxique pour le pancréas est indiqué pour le traitement des adénocarcinomes métastatiques des îlots de Langerhans. Le traitement STZ est également largement utilisé pour induire un diabète de type 1 dans les modèles animaux (Nesovic et al., 1992; Schulz et al., 1990). En effet, du fait de son action cytotoxique sur les cellules  $\beta$  du pancréas (Delaney et al., 1995; Heller et al., 1994; Nukatsuka et al., 1990; Szkudelski, 2001), l'injection de STZ conduit à la suppression de la production de l'insuline. L'insuline étant un puissant inhibiteur de la lipolyse, en cas de déficience on assiste à une levée d'inhibition aboutissant à une réduction drastique du TA blanc. Le mécanisme d'activation est dépendant des teneurs en AMPc dans les adipocytes (Chiappe de Cingolani, 1986) qui augmente l'activité de la lipase hormono-sensible (LHS) (Sztalryd and Kraemer, 1995). Dans le cadre notre étude, nous avons choisi de traiter des souris à la STZ dans le but d'induire une fonte du tissu adipeux dans des conditions d'insulino-déficience. Pour cela des souris C57BL/6 mâles âgées de 11 semaines ont reçu 5 injections intrapéritonéales d'une solution de STZ préparée dans du citrate de sodium à pH 4,5 (45 mg/kg), à raison d'une injection par jour pendant 5 jours. Les souris appartenant au lot témoin ont reçu des injections de citrate seul. Les souris soumises à une alimentation standard ont été sacrifiées 12 jours après l'apparition du diabète détecté par un suivi de glycémie.

#### 3.1. Caractérisation du modèle

Nous constatons tout d'abord que les souris STZ présentent des taux d'insuline indétectables associés à une hyperglycémie, ce qui atteste de l'efficacité du traitement. L'effet recherché sur la masse grasse est bien observé puisque ces souris sont lipoatrophiques. Les injections de STZ entraînent également l'altération des paramètres lipidiques. En effet, les animaux présentent une hypercholestérolémie et une hypertriglycéridémie (**tableau 4**) et l'analyse des profils lipoprotéiques indique que ces variations sont principalement la conséquence d'une augmentation de la fraction VLDL-Cholestérol (**tableau 5**).

Dans ce modèle de diabète de type I, l'absence d'insuline force le métabolisme hépatique à utiliser les acides gras comme substrats énergétiques et des corps cétoniques sont produits pour fournir de l'énergie aux tissus périphériques comme les muscles ou le cerveau. Ce switch métabolique est illustré par plusieurs évènements majeurs observés dans le foie. Tout d'abord,

on constate que les stocks de glycogène sont épuisés et que les réserves de TG diminuent en même temps que l'activité  $\beta$ -oxydative augmente. Il est raisonnable d'associer ces régulations à l'activation de l'AMPK observée dans le foie des souris STZ. En effet, la p-AMPK inhibe la synthèse des lipides et active la  $\beta$ -oxydation (Saggerson, 2008).

**Tableau 4:** Effets du traitement STZ sur la composition corporelle, les paramètres plasmatiques et hépatiques sur des souris C57BL/6.

	Témoin	STZ
<b>Poids des souris</b>	29,4 $\pm$ 0,6	18,86 $\pm$ 0,48*
<b>Masse des organes</b>		
Foie (g/100g mc)	5,35 $\pm$ 0,04	6,29 $\pm$ 0,52
TA viscéral (g/100g mc)	1,43 $\pm$ 0,13	0,14 $\pm$ 0,02*
<b>Paramètres plasmatiques</b>		
Insuline ( $\mu$ g/L)	0,35 $\pm$ 0,02	ND
Glucose (mg/mL)	2,2 $\pm$ 0,1	4,84 $\pm$ 0,12*
Adiponectine ( $\mu$ g/mL)	51 $\pm$ 10,9	71,07 $\pm$ 5,08
Triglycérides (mg/mL)	0,96 $\pm$ 0,05	4,4 $\pm$ 1,5*
Cholestérol total (mg/mL)	1,5 $\pm$ 0,2	4,01 $\pm$ 0,44*
<b>Paramètres hépatiques</b>		
Glycogène (mg/g)	43,4 $\pm$ 4,2	15,5 $\pm$ 4,9*
Triglycérides (mg/g)	16,9 $\pm$ 1,5	5,81 $\pm$ 1,99*
Cholestérol total (mg/g)	4,0 $\pm$ 0,7	4,35 $\pm$ 0,43
$\beta$ -oxydation de l'acide palmitique (nmol/g foie.h)	7,23 $\pm$ 1,90	14,18 $\pm$ 5,45

Les résultats sont des moyennes  $\pm$  E.S.M. (n=4). Les animaux sont utilisés à après un jeûne de 4 h.

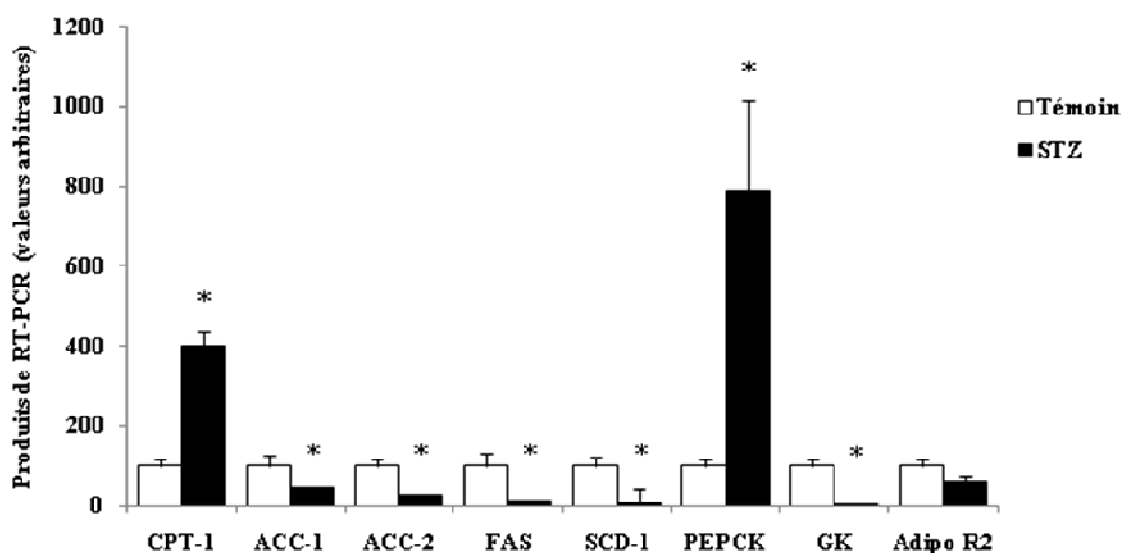
\*différence significative à  $p < 0,05$ . N.D. : Non détecté.

**Tableau 5:** Effets du traitement STZ sur le profil lipoprotéique des souris C57BL/6.

	Témoin	STZ
<b>Profil lipoprotéique</b>		
VLDL cholestérol (mmol/L)	0.020 ± 0.001	0.296 ± 0.003*
LDL cholestérol (mmol/L)	0.36 ± 0.04	2.77 ± 0.22*
HDL cholestérol (mmol/L)	3.50 ± 0.37	7.10 ± 0.56*

Les résultats sont des moyennes ± E.S.M. (n=4). Les animaux sont utilisés à après un jeûne de 4 h. \*différence significative à p<0,05.

L'absence d'insuline s'accompagne également d'effets sur l'expression de certains gènes tout aussi démonstratifs (**figure 19**). Ainsi les ARNm de la CPT-I sont fortement augmentés en accord avec l'activation de la β-oxydation et les gènes relatifs à la lipogenèse (ACC1, ACC2, FAS et SCD-1) sont quant à eux réprimés. En ce qui concerne le métabolisme du glucose, la cellule sur-exprime la PEPCK, enzyme clé de la néoglucogenèse pendant que la voie de la glycolyse est inhibée comme le suggère la diminution de l'expression de la glucokinase (GK).



**Figure 19:** Effets du traitement STZ sur l'expression des ARNm des gènes CPT-I, ACC1, ACC2, FAS et SCD-1 impliqué dans le métabolisme lipidique, PEPCK et GK impliqués dans le métabolisme glucidique et AdipoR2 mesurée dans le foie des souris C57BL/6.

Les résultats sont des moyennes ± E.S.M. (n=5). Les animaux sont utilisés après un jeûne de 4 h. \*différence significative à p<0,05.

Dans ce modèle, il apparaît clairement que les effets du traitement STZ sur le foie sont dus aux conséquences directes de l'absence d'insuline sur les hépatocytes et ne peuvent en aucun cas être associés à l'ApN plasmatique qui ne varie pas significativement. Toutefois, il est intéressant de noter que les ARNm d'AdipoR2 sont diminués dans le foie des souris STZ, c'est à dire en absence d'insuline. Néanmoins, le résultat le plus remarquable qu'il convient de discuter est le fait que le traitement provoque une lipomatrophie sans altérer la concentration d'ApN plasmatique.

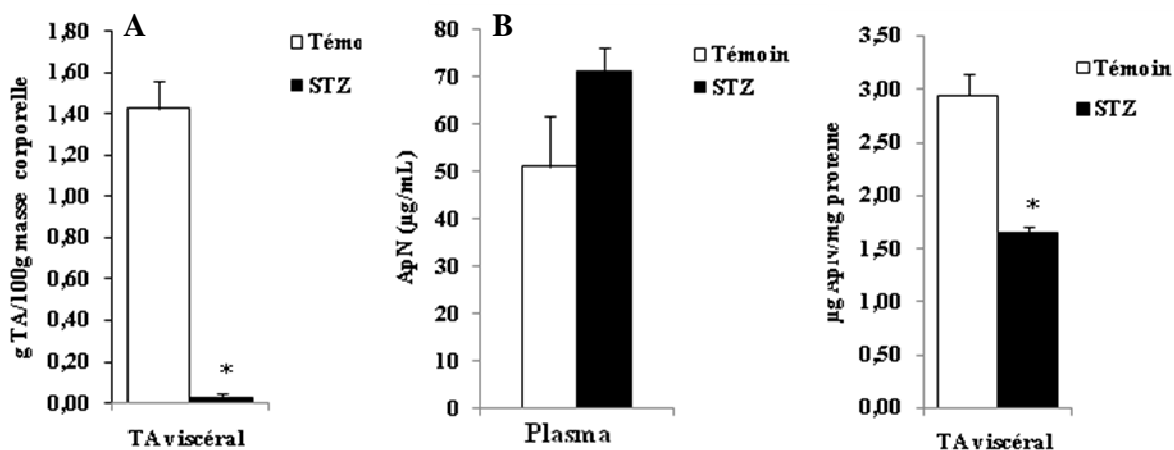
### 3.2. Paramètres relatifs à l'ApN

Les mécanismes de régulation de la production d'ApN par l'insuline sont encore mal compris. Toutefois, l'administration d'insuline chez des sujets diabétiques de type 2 entraînant une légère diminution des taux sériques de l'ApN (11-13 %) sans affecter son expression, il est suggéré que l'effet de l'insuline sur l'ApN soit lié à une accélération de sa dégradation plutôt qu'à un changement de sa production (Lihn et al., 2003). Au contraire, chez des sujets extrêmement minces présentant une anorexie mentale (Delporte et al., 2003; Pannacciulli et al., 2003) ainsi que chez les patients présentant un diabète de type 1 non traités, la réduction de la masse grasse s'accompagne d'une augmentation considérable des taux sériques d'ApN. Dès lors que l'insulinémie est normalisée, les taux d'ApN sont régulées (Imagawa et al., 2002; Perseghin et al., 2003).

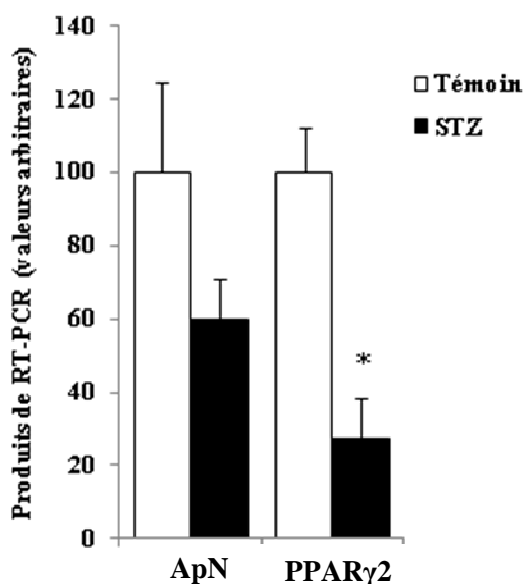
Dans notre modèle, la fonte du tissu adipeux induite par le traitement STZ provoque également une élévation de l'adiponectinémie ( $p < 0,12$ ) (**figure 20**) qui s'accompagne d'une diminution de l'expression du gène de l'ApN et de sa concentration dans le tissu adipeux (**figure 21**). De tels résultats ont été rapportés chez des patients souffrant d'insuffisance rénale, pathologie associée à une hyperadiponectinémie où l'expression du gène de l'ApN dans le TA est moindre comparativement aux sujets sains (Marchlewska et al., 2004). Une répression de l'expression du gène de l'ApN est également observée lorsque l'ApN est présente en excès *in vivo* après modification génétique (Bauche et al., 2006) ou *in vitro* par addition d'ApN recombinante dans les adipocytes 3T3-F442A (Bauche et al., 2006). L'ensemble de ces données suggère que l'ApN exerce un rétrocontrôle négatif sur sa propre expression et production.

Quoi qu'il en soit, nos résultats mettent en évidence que la fonte du tissu adipeux peut être associée à une production normale voire même à une surproduction d'adiponectine. Dans notre modèle de souris déficiente en insuline, la réduction de la masse grasse peut s'expliquer à la fois par l'activation de la lipolyse et par l'inhibition de la prolifération des adipocytes. A ce sujet, plusieurs études montrent le rôle déterminant de l'insuline dans le contrôle de la prolifération du TA en modifiant le niveau d'expression du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  et l'accumulation des lipides dans ces nouvelles cellules (Faust et al., 1978; Shillabeer and Lau, 1994). (Ailhaud et al., 1992; MacDougald and Lane, 1995). PPAR $\gamma$ , majoritairement exprimé dans le TA blanc (Chawla et al., 1994), est exprimé dans les pré-adipocytes en voie de différenciation terminale et est responsable de l'induction de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique (Arner, 2003; Ferre, 2004). Ainsi, l'absence d'insuline provoquée soit par un jeûne prolongée soit par un traitement STZ, réprime l'expression de PPAR $\gamma$ 2 dans le TA périépididymaire (Vidal-Puig et al., 1996). En accord avec ces données, l'expression de PPAR $\gamma$ 2 est régulée négativement dans le TA périépididymaire chez les souris STZ.

L'ensemble de ces informations suggère que dans le tissu adipeux des souris STZ, la prolifération des adipocytes est réduite et les adipocytes se vident de leur contenu en graisses mais restent néanmoins capables de produire de l'ApN. Les mécanismes à l'origine de ces événements restent à élucider mais il est envisageable que les effets provoqués par l'absence d'insuline soient à mettre en relation avec une diminution de l'état inflammatoire du tissu adipeux. En effet, la production d'ApN est inversement corrélée à l'inflammation et l'insuline exerce un effet stimulateur sur l'expression de TNF $\alpha$  et IL6 dans le TA (Krogh-Madsen et al., 2004). Les résultats suggèrent également que les mécanismes impliqués sont indépendants de l'activation de PPAR $\gamma$ .



**Figure 20:** Effets du traitement STZ sur la masse du TA viscéral (A), et sur la concentration de l'ApN dans le plasma et dans les adipocytes du TAV (B).  
 Les résultats sont des moyennes  $\pm$  E.S.M. (n=5). Les animaux sont utilisés après un jeûne de 4 h. \*différence significative à  $p < 0,05$ .



**Figure 21:** Effets du traitement STZ sur l'expression des ARNm des gènes de l'ApN et de PPARγ2 mesurée dans le TA viscéral des souris C57BL/6.  
 Les résultats sont des moyennes  $\pm$  E.S.M. (n=5). Les animaux sont utilisés après un jeûne de 4 h. \*différence significative à  $p < 0,05$ .

#### 4. Traitement à la pioglitazone (PioGTZ)

PPAR $\gamma$ 2 est fortement exprimé dans les adipocytes (Elbrecht et al., 1996; Mukherjee et al., 1997), où il est impliqué dans le contrôle du stockage des lipides et joue un rôle déterminant dans l'induction de l'adipogenèse (Kersten et al., 2000; Tontonoz et al., 1994). Les composés de la famille des thiazolidinediones (troglitazone, la rosiglitazone et PioGTZ) sont des agonistes PPAR $\gamma$  (Seimandi et al., 2005) et des agents antidiabétiques reconnus (Kelly and Bank, 2007). Ainsi, la PioGTZ est utilisée dans nos expériences comme un agoniste sélectif de PPAR $\gamma$ 2 capable de stimuler la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes matures (Kletzien et al., 1992). Cette maturation est spécifiquement liée à l'activation des récepteurs nucléaires PPAR $\gamma$ 2 chez l'Homme comme chez la souris (Leyvraz et al., 2010). Habituellement utilisée dans le traitement du diabète de type 2, la PioGTZ provoque une augmentation significative de la masse adipeuse sans atteindre un statut d'obésité. Paradoxalement à l'effet d'un régime hypercalorique, l'augmentation de la masse grasse s'accompagne d'une élévation des taux sériques d'ApN. En effet, plusieurs études menées chez l'homme mince, obèse ou diabétique de type 2, ont montré qu'un traitement prolongé (2 semaines à 6 mois) par des GTZ, augmente les taux plasmatiques d'ApN (Maeda et al., 2001; Yang et al., 2002; Yu et al., 2002). Ainsi en traitant des souris à la PioGTZ (10 mg/kg de poids corporel), nous avons cherché d'une part à stimuler la production d'ApN par les adipocytes et d'autre part à déterminer si l'augmentation de la concentration plasmatique en ApN est associée à des modifications du métabolisme hépatique.

##### 4.1. Caractérisation du modèle

Dans notre expérience, le traitement PioGTZ administré pendant seulement 12 jours à des souris normales tend à augmenter la masse relative du tissu adipeux TAV et induit significativement la concentration d'ApN circulante (**tableau 6**). Il conduit également à la modification de plusieurs paramètres plasmatiques en relation avec le métabolisme glucidique. Ainsi, on observe une insulïnémie significativement plus faible chez les souris GTZ par rapport aux témoins qui s'accompagne d'une tendance à la baisse de la glycémie, de la triglycéridémie et du cholestérol plasmatique. Parallèlement, on assiste à une légère baisse des contenus en cholestérol et TG hépatiques alors que le glycogène est significativement augmenté par le traitement, ce qui pourrait traduire une amélioration de la sensibilité du foie à l'insuline (et éventuellement des autres tissus). En effet, chez les patients atteints d'un diabète de type 2, la pioglitazone réduit l'hyperglycémie et améliore le profil lipidique en augmentant



la sensibilité à l'insuline du foie, du tissu adipeux et du muscle squelettique (Steiner and Lien, 1987) sans que la sécrétion ne soit stimulée. Compte tenu des données de la littérature, il est raisonnable de penser que les améliorations métaboliques induites par le traitement PioGTZ sont associées à l'augmentation des taux d'ApN et en particulier à son effet activateur de la  $\beta$ -oxydation (Muoio et al., 1999; Winder and Hardie, 1999). Dans notre modèle, bien que nous n'ayons pas observé d'induction de l'activité  $\beta$ -oxydative dans le foie, il ne serait pas exclu que le catabolisme des acides gras soit augmenté dans le muscle squelettique.

**Tableau 6** : Effets du GTZ sur la composition corporelle, les paramètres plasmatiques et hépatiques sur des souris C57BL/6.

	<b>Témoin</b>	<b>GTZ</b>
<b>Poids des souris</b>	29,4 $\pm$ 0,6	28,6 $\pm$ 0,6
<b>Masse des organes</b>		
Foie (g/100g mc)	5,35 $\pm$ 0,04	5,45 $\pm$ 0,24
TA viscéral (g/100g mc)	1,43 $\pm$ 0,13	1,68 $\pm$ 0,13
<b>Paramètres plasmatiques</b>		
Insuline ( $\mu$ g/L)	0,35 $\pm$ 0,02	0,14 $\pm$ 0,02*
Glucose (mg/mL)	2,2 $\pm$ 0,1	1,9 $\pm$ 0,2
Adiponectine ( $\mu$ g/mL)	51 $\pm$ 10,9	125 $\pm$ 12,15*
Triglycérides (mg/mL)	0,96 $\pm$ 0,05	0,75 $\pm$ 0,07
Total cholestérol (mg/mL)	1,5 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,1
<b>Paramètres hépatiques</b>		
Triglycérides (mg/g)	16,9 $\pm$ 1,5	12,95 $\pm$ 2,44
Total cholestérol (mg/g)	4,0 $\pm$ 0,7	3,25 $\pm$ 0,29
Glycogène (mg/g)	43,4 $\pm$ 4,2	66,11 $\pm$ 10,7*
$\beta$ -oxydation de l'acide palmitique (nmol/g foie.h)	7,23 $\pm$ 1,90	5,88 $\pm$ 1,42

Les résultats sont des moyennes  $\pm$  E.S.M. (n=6). Les animaux sont utilisés à après un jeûne de 4 h. \*différence significative à  $p < 0,05$ .

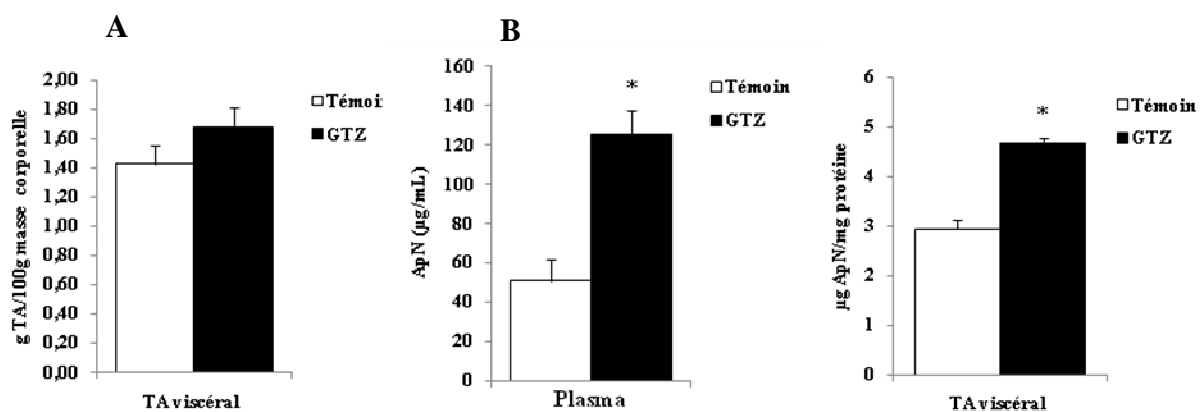
#### 4.2. Paramètres relatifs à l'ApN

Il est suggéré dans la littérature que les GTZ n'ont pas d'effet immédiat et un traitement de plusieurs semaines semble nécessaire pour observer les effets métaboliques (Suter et al., 1992). Toutefois, une augmentation des concentrations plasmatiques d'ApN a déjà été observée chez l'Homme au bout de seulement 2 semaines de traitement à la PioGTZ (Maeda et al., 2001). Dans notre étude menée chez la souris, on observe un doublement des taux d'ApN en 12 jours de traitement qui s'accompagne d'une tendance à l'augmentation de la masse relative du TAV tandis que son contenu en ApN augmente de manière significative comparé aux témoins (**figure 22**). L'augmentation du contenu en ApN des adipocytes pourrait s'expliquer par une stimulation du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ 2 par la PioGTZ qui favoriserait le processus d'assemblage et de sécrétion de l'ApN, plutôt que celui de sa transcription (**figure 23**). Dans ce sens, le traitement PioGTZ, ne semble pas affecter l'expression du gène de l'ApN. Ceci est en accord avec la littérature qui montre que la PioGTZ augmente les taux plasmatiques d'ApN chez l'Homme, sans aucun effet sur l'expression du gène de l'ApN dans le tissu adipeux (Rasouli et al., 2006). Un des mécanismes probables par lequel les thiazolidinediones augmenteraient les niveaux d'ApN ainsi que sa sécrétion est de stimuler l'expression des protéines impliquées dans l'assemblage et la sécrétion d'ApN telle qu'Ero1-L $\alpha$ . En effet, l'activation de PPAR $\gamma$  améliore le niveau d'expression d'Ero1-L $\alpha$  dans les adipocytes matures chez la souris (Cheng et al., 2007; Qiang et al., 2007).

Le fait que la masse de TAV ne soit pas significativement augmentée par le traitement alors que l'adiponectinémie est plus forte suggère que les effets de la PioGTZ sur la prolifération adipocytaire aient pu majoritairement concerner le TASC. D'après la littérature, la surproduction d'ApN induite par les GTZ serait due à la constitution d'un nouveau pool d'adipocytes qui concernerait principalement le TASC (Berger and Wagner, 2002). Ainsi, la prolifération dans le TASC de pré-adipocytes en adipocytes de petites tailles soit beaucoup plus sensibles à l'insuline (McLaughlin, 2009 #305) permettrait à la fois de corriger les taux plasmatiques d'AGL et de modifier la balance entre adipocytokines aux effets métaboliques défavorables et adipocytokines aux effets favorables. Dans ce sens, il a été démontré que les GTZ diminuent la sécrétion de TNF $\alpha$  par le TA (Reginato and Lazar, 1999) qui est fortement liée à l'apparition de l'IR (Hotamisligil et al., 1993). Ces données suggèrent que le mode d'action des GTZ nécessite une modification de la composition corporelle (Bhatia and Viswanathan, 2006; Kim et al., 2007b). En effet, il est bien démontré que les GTZ induisent

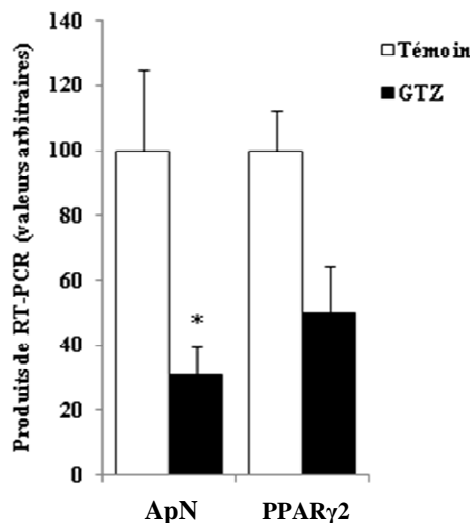
une redistribution des graisses du compartiment viscéral vers le compartiment sous-cutané, ce qui est associé à une diminution de la concentration circulante d'AGL (Arner, 2003; Koenen et al., 2009).

Plusieurs études suggèrent plutôt un effet apoptotique des GTZ sur les gros adipocytes insulino-résistants du TAV lors d'un diabète de type 2 (Ferre, 2004; Holst and Grimaldi, 2002; Larsen et al., 2003; Picard and Auwerx, 2002). Toutefois, dans notre étude, nous avons utilisé des souris saines avec un TAV dont les adipocytes constitutifs ne présentent pas les caractéristiques d'un TAV de souris obèses.



**Figure 22:** Effets du traitement GTZ sur la masse du TA viscéral (A), et sur la concentration de l'ApN dans le plasma et dans les adipocytes du TA viscéral (B).

Les résultats sont des moyennes  $\pm$  E.S.M. ( $n=5$ ). Les animaux sont utilisés après un jeûne de 4 h. \*différence significative à  $p<0,05$ .



**Figure 23:** Effets du traitement GTZ sur l'expression des ARNm des gènes de l'ApN et de PPAR $\gamma$ 2 mesurée dans le TA viscéral des souris C57/Bl6.

Les résultats sont des moyennes  $\pm$  E.S.M. ( $n=5$ ). Les animaux sont utilisés après un jeûne de 4 h. inverse existante entre la masse grasse et l'adiponectinémie bien démontrée dans les études

cliniques concernant l'obésité, n'est pas applicable stricto-sensu. Ainsi, le régime HSHF induisant l'obésité chez les souris a bien conduit à une baisse de la concentration circulante en ApN. Les résultats suggèrent en plus que le TAV est le principal responsable de cette variation, ceci étant à mettre en relation avec son état inflammatoire beaucoup plus marqué que celui du TASC. Au contraire, le traitement par le CLA réduit à la fois la masse grasse et l'adiponectinémie. Dans ce cas, la fonte du tissu adipeux ne correspond pas à une amélioration du métabolisme adipocytaire, comme on peut le constater à la suite de régimes amaigrissants, mais à une altération du tissu caractérisée par une infiltration de macrophages et par conséquent par une inflammation importante. Le traitement STZ conduit, lui aussi, à une réduction drastique de la masse grasse mais est associée à une production normale d'ApN. Aucune donnée ne semble mettre en évidence l'induction d'un état inflammatoire du tissu adipeux suite à des injections de STZ. Il est donc possible que dans ces conditions, les mécanismes de production de l'ApN ne soient pas altérés du fait de l'absence d'inflammation. Les GTZ, qui stimulent la prolifération adipocytaire, ont également un effet bénéfique sur l'état inflammatoire du tissu adipeux [Reginato, 1999 #432] et dans notre modèle d'étude, le traitement par la PioGTZ stimule la production d'ApN.

Par conséquent, l'ensemble de ces données suggère que la production d'ApN n'est pas dépendante de la taille des adipocytes mais de leur état inflammatoire. Ces deux paramètres peuvent être directement liés comme c'est le cas au cours de l'obésité (les macrophages infiltrent les adipocytes ayant dépassés un certain degré de remplissage) mais également totalement indépendants.

Compte tenu des effets de l'ApN sur le métabolisme glucido-lipidique évoqués dans la littérature, il est raisonnable de penser que les variations d'ApN circulante induites par les différents traitements peuvent conduire à des modifications du métabolisme hépatique. Toutefois, l'administration de CLA et les injections de STZ conduisant respectivement à l'induction rapide d'une stéatose et à un catabolisme accéléré des graisses, il est fort probable que les altérations du métabolisme lipidique soient induites par l'arrivée massive d'acides gras vers le foie et que le rôle de l'ApN soit négligeable. Par contre, lors des traitements HSHF et GTZ au cours desquels la morphologie du tissu adipeux est altérée de façon moins drastique, les variations de l'adiponectinémie pourraient être associées à des modifications du métabolisme hépatique. Dans le cas du traitement GTZ, il convient également d'envisager la possibilité que la PioGTZ puisse exercer un effet direct sur le foie. C'est pourquoi, dans la suite de ce travail, nous avons cherché à déterminer d'une part les effets de la pioGTZ et

d'autre part ceux de l'ApN sur le métabolisme hépatique. Pour cela, nous utilisons un modèle d'explants de foie en culture permettant de tester les effets directs de ces composés.

*APPROCHE IN VITRO*

## I. MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE DES EXPLANTS DE FOIE

### 1. Modèle d'étude : Explants de foie

Afin d'étudier les effets propres de l'ApN sur le métabolisme hépatique, nous avons choisi un modèle d'étude original : les explants de foie en culture. Cette technique a été développée notamment dans les domaines de la pharmacologie et de la toxicologie pour étudier le métabolisme hépatique du médicament. Dans ce modèle l'organisation tissulaire et les interactions cellule-matrice et cellule-cellule sont conservées. Ainsi, l'exploration de l'environnement cellulaire d'un tissu intact isolé permet une compréhension plus précise des effets métaboliques *in vivo*.

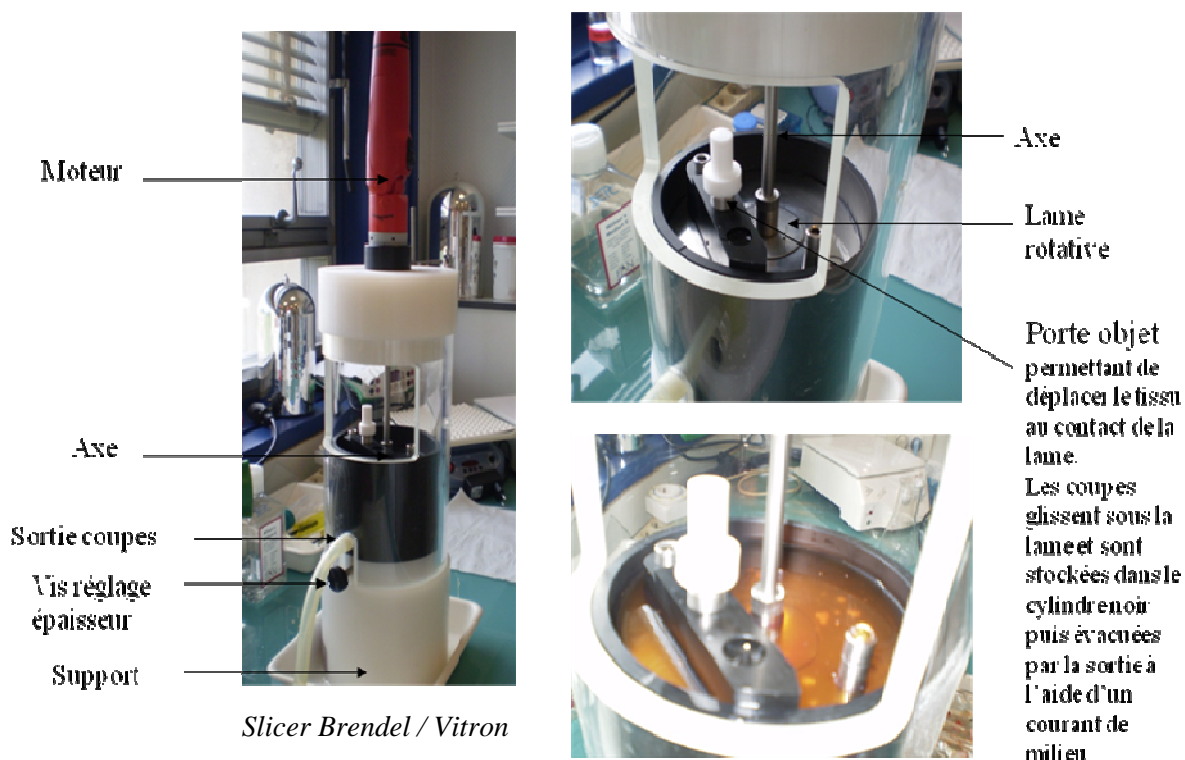
Le protocole expérimental des explants de foie en culture utilisé a été adapté à partir de la méthode décrite par Graulet et al. (Graulet et al., 1998). Dans un premier temps, différents tests préliminaires ont été réalisés afin d'établir les conditions optimales à la survie des tissus en culture. Dans ce cadre, plusieurs paramètres tels que le matériel, le prélèvement du foie, le tampon de rinçage, le milieu d'incubation (pH, oxygénation, insuline, ...) et le système d'incubation (boîte de culture, tube, durée d'incubation, ...) ont été testés. A l'issue de chaque essai, un test de viabilité des cellules est effectué en mesurant leur consommation en oxygène via un oxygraphe. L'intégrité des ARNm est également contrôlée afin de valider le protocole expérimental final.

### 2. Description du dispositif expérimental et préparation des explants de foie

Après perfusion *via* le cœur avec du tampon de HBS (*Hank's Balanced Salts*) froid et saturé en oxygène, le foie est immédiatement prélevé et coupé en utilisant un appareil muni d'une lame rotative (Slicer Brendel / Vitron, Tucson, AZ) (**figure 24**) dans le même milieu en tranches très fines d'une épaisseur d'environ 200  $\mu\text{m}$ . Les coupes sont ensuite rincées et pré-incubées 30 minutes à 37°C dans du HBS. Cette étape permet aux explants de foie de s'adapter à leur nouveau milieu en recréant un équilibre osmotique et réorientant leur métabolisme énergétique. Les explants sont ensuite placés soit dans des tubes percés sur le dessus afin de permettre les échanges gazeux soit dans des boîtes de culture contenant du milieu d'incubation WME oxygénée (William's Medium E) supplémenté en sérum de veau foetal inactivé (10%) et avec un cocktail d'antibiotiques-antifongiques (1%). Le volume de milieu est d'environ 1 ml par coupe de foie. Le traitement est alors appliqué (adiponectine,

## Approche *in vitro* : Mise au point de la technique des explants de foie

glitazones...) puis les tubes ou les boîtes sont installés horizontalement sur un agitateur à bascule et incubés pendant 21 h dans une étuve à 37°C sous atmosphère contrôlée (95% d'air et 5% de CO<sub>2</sub>). À la fin de la période d'incubation, les explants sont répartis au hasard pour les différentes expériences décrites ultérieurement. Les premières expériences ont consisté à valider le protocole par des mesures biochimiques et tests de viabilité des explants de foie (**figure 24**).

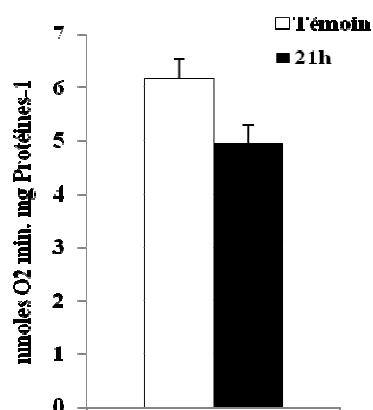


**Figure 24** : Images du dispositif Expérimental

### 3. Test de viabilité par mesure de la consommation d'oxygène

La mesure de la consommation d'oxygène rend compte de l'activité mitochondriale et par conséquent de la vitalité cellulaire. Les résultats obtenus par oxygraphie montrent clairement que les explants restent viables puisque la mesure de l'activité respiratoire affiche une baisse de 20% seulement après 21h d'incubation (**figure 25**)

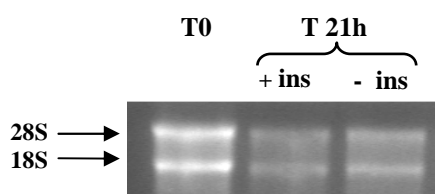




**Figure 25:** Teste de viabilité des explants de foie de souris : mesure de la consommation d'oxygène par oxygraphie.  
*Les résultats sont des moyennes  $\pm$  E.S.M. (n=5).*

#### 4. Intégrité des ARNms

A l'issue des 21 h d'incubation, les ARN totaux sont extraits des différents tissus. L'absence de traînées en particulier sous la bande 18S, et un rapport d'intensité des bandes 28S/18S d'environ 2, garantissent l'intégrité des ARN (**figure 26**).



**Figure 26 :** Électrophorèse d'ARNs sur gel d'agarose à 1%. ins : insuline

#### 5. $\beta$ -oxydation sur explants de foie frais

L'étude de l'impact des différents traitements sur le métabolisme lipidique du foie, a été réalisée grâce à un dispositif expérimental adapté de Graulet et al. (Graulet et al., 1998). L'objectif étant d'explorer l'utilisation des AG par le foie, nous avons essayé de créer les conditions les plus favorables à l'étude de deux voies métaboliques : la  $\beta$ -oxydation et l'estérification. Des essais préliminaires ont été réalisés sur tissus frais afin de déterminer les

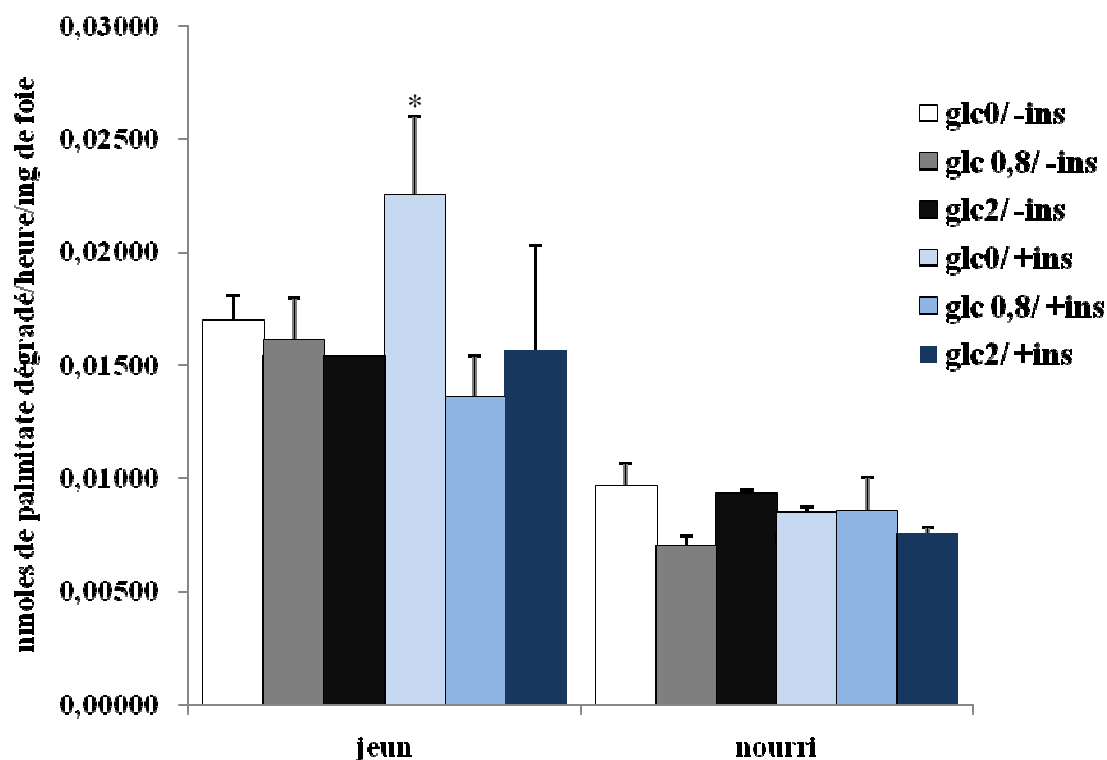
## Approche *in vitro* : Mise au point de la technique des explants de foie

conditions les plus favorables à l'oxydation des AG et de valider notre modèle expérimental. Les mêmes conditions d'incubation seront utilisées pour l'étude de la voie d'estérification.

Des coupes ont été réalisées à partir de foies fraîchement prélevés sur des souris à jeun ou nourries puis ont été incubées à 37°C pendant 2h sous une légère agitation dans un milieu du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplémenté en différentes concentrations de glucose (0, 0.8 et 2 g/L) et d'insuline (12.5µM), en cocktail d'antibiotiques-antifongiques (1%) et en L-carnitine (0,50 mM) et en présence de 0,2 mM d'acide palmitique marqué sur le radical carboxyle [1-14C] (55,5 GBq / mol, PerkinElmer, Courtaboeuf, France) couplé à l'albumine dans un rapport molaire de 2,5 / 1. A l'issue de l'incubation, la quantité d'AG utilisée pour la β-oxydation est déterminée par la mesure de leurs produits de dégradation. Ainsi, l'oxydation totale correspond à la somme de la radioactivité portée par le CO<sub>2</sub> libéré et les produits acido-solubles.

De manière générale, les résultats obtenus lors des tests préliminaires valident la fonctionnalité de notre modèle expérimental puisqu'on observe une oxydation des AG plus importante dans les coupes de foie de souris à jeun par rapport à celles nourries (**figure 27**). On note également que la présence de glucose ne semble pas significativement altérer l'activité β-oxydative. Par ailleurs, à l'état à jeun, la présence d'insuline dans un milieu sans sucre stimule la β-oxydation des acides gras (**figure 27**). Compte tenu de ces résultats, les analyses seront réalisées sur des animaux à jeun, dans un milieu de culture contenant une concentration physiologique de glucose avec ou sans insuline.

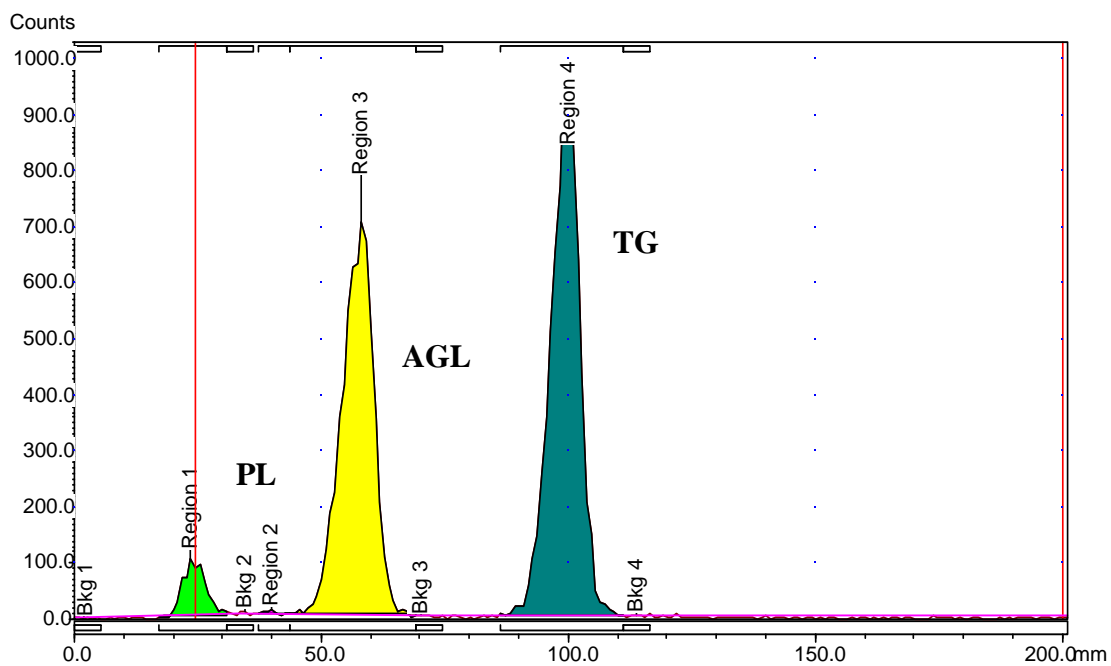
Cette procédure sera également appliquée à la mesure de l'activité β-oxydative sur des explants de foie préalablement mis en culture 21h dans différents milieux.



**Figure 27** : Oxydation de l'acide palmitique dans des explants de foie de souris à jeun et nourries: test de différentes concentrations de glucose (0, 0.8 et 2 g/L) et d'insuline (12.5 $\mu$ M). Les résultats sont des moyennes  $\pm$  E.S.M. (n=3). \*différence significative à  $p < 0,05$ .

## 6. Captage et incorporation des AG dans les différentes classes lipidiques

Les explants de foies en culture sont incubés à 37°C pendant 2h sous une légère agitation dans un milieu du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) sans glucose et sans insuline, supplémenté en cocktail d'antibiotiques-antifongiques (1%) et en L-carnitine (0,50 mM) et en présence de 0,2 mM d'acide palmitique marqué sur le radical carboxyle [1-14C] (55,5 GBq / mol, PerkinElmer, Courtaboeuf, France) fixés à l'albumine (Bovin Serum Albumin, BSA) dans un rapport molaire de 2,5 / 1. A la fin de la période d'incubation, les lipides totaux sont extraits et l'incorporation de acides gras dans les différentes classes lipidiques est déterminée par radiochromatographie après séparation sur couche mince (**figure 28**).



**Figure 28:** Exemple de radio-chromatogramme obtenu après CCM des lipides totaux des explants de foie ayant été incubés en présence d'acide oléique 0,2 mM pendant 2 h. **PL** : Phospholipides ; **AGL** : Acides Gras Libres ; **TG** : Triacylglycérols. Le pic correspondant aux AGL représente les acides gras radioactifs non métabolisés.

## II. EVALUATION DES EFFETS DIRECTS DE L'APN SUR LE METABOLISME LIPIDIQUE DANS DES EXPLANTS DE FOIE

Plusieurs études démontrent l'existence d'une association significative entre l'ApN et le métabolisme lipidique (von Eynatten et al., 2005; von Eynatten et al., 2004) supportant l'hypothèse selon laquelle l'ApN influence directement les concentrations de lipides circulants, spécialement les TG et les HDL-C plasmatiques (von Eynatten et al., 2005). Le foie possédant des récepteurs à l'ApN, il est envisageable que ces effets concernent directement le métabolisme hépatique. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à l'étude des effets de l'ApN premièrement sur la régulation des voies d'estérification et de  $\beta$ -oxydation des acides gras qui peuvent avoir un impact sur la production des lipoprotéines et deuxièmement sur la régulation de l'expression de protéines impliquées dans le catabolisme des lipoprotéines circulantes.

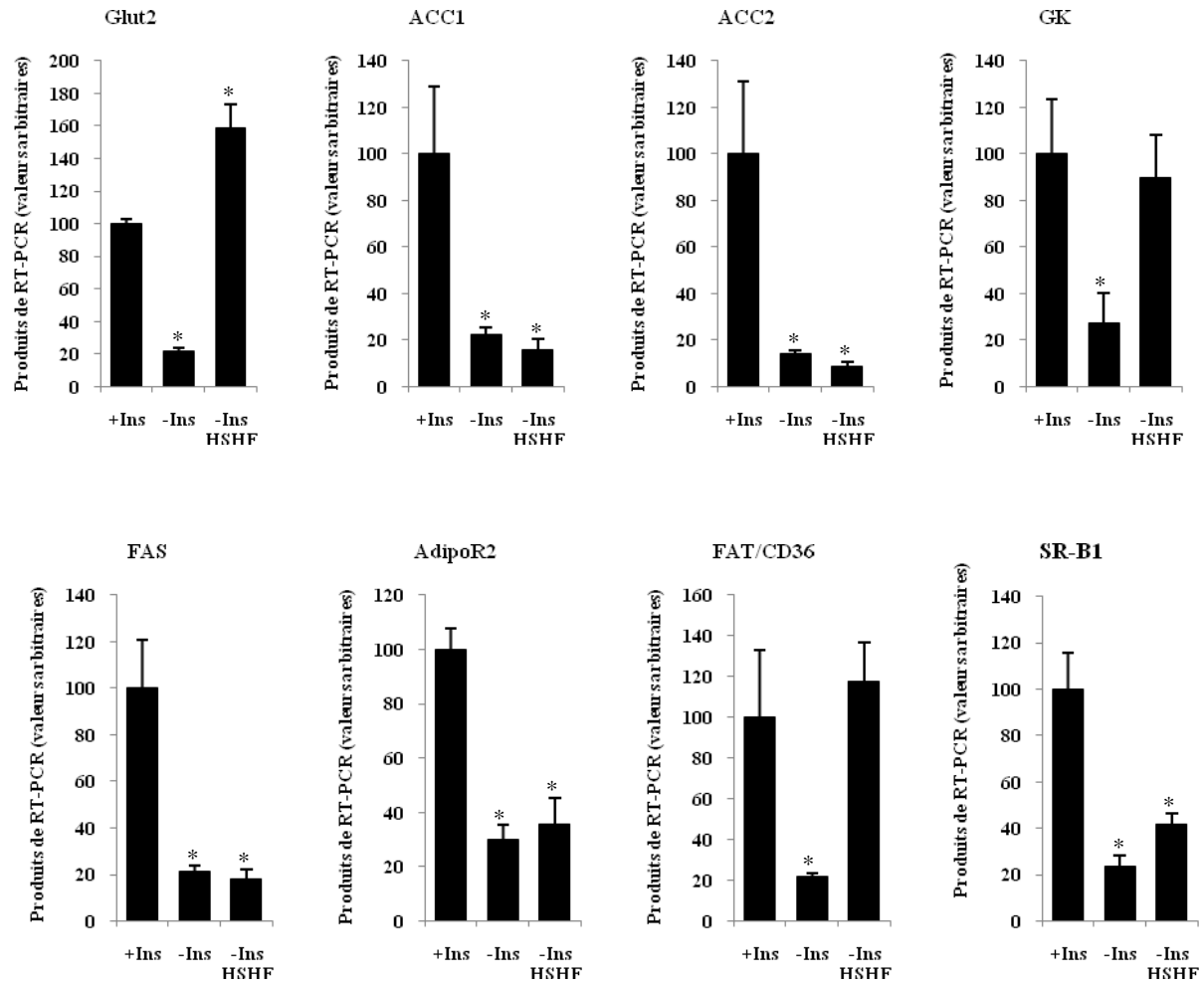
Les effets de l'ApN sur le métabolisme des lipides ont tout d'abord été évalués à long terme sur des coupes de foie préalablement incubées pendant 21h dans un milieu de culture contenant 1  $\mu$ M d'ApN en présence ou non d'insuline. Les régulations métaboliques observées après une telle durée de traitement seront susceptibles de correspondre à des modifications d'expression génique et de synthèse protéique. Ensuite nous avons testé les effets à court terme de l'ApN sur les capacités  $\beta$ -oxydatives en traitant les explants pendant 90 min. Ces conditions sont plus appropriées pour mettre en évidence l'activation des voies de régulation rapides comme celle impliquant l'AMPK.

### 1. Caractérisation des conditions de culture

Les conditions de culture (+/- insuline) ont tout d'abord été comparées en analysant l'expression de gènes clé du métabolisme glucido-lipidique. Lorsque les explants sont cultivés en présence d'insuline, l'utilisation du glucose et la lipogénèse semblent être favorisées comme le suggèrent les niveaux d'ARNm de Glut2, GK, ACC1, ACC2 et FAS (**figure 29**). Les expressions de FAT/CD36 et d'AdipoR2 sont également plus élevées en présence d'insuline.

Par conséquent, les conditions de culture avec et sans insuline induisent des régulations qui à l'échelle de l'organisme entier, peuvent être comparées à celles observées respectivement à

l'état nourri et à jeun chez l'animal sain (non insulino-résistant). Ces conditions doivent être considérées séparément puisqu'elles peuvent permettre de mettre en évidence des effets de l'ApN sur des voies de signalisation différentes impliquant par exemple les récepteurs à l'insuline ou les métabolites du glucose.



**Figure 29:** Expression des ARNm des gènes, Glut2, GK, ACC1, ACC2, FAS, AdipoR2, FAT/CD36 et SR-B1 dans les explants de foie de souris C57Bl/6 témoins en présence ou en absence d'insuline et de souris obèses (HSHF) en absence d'insuline.

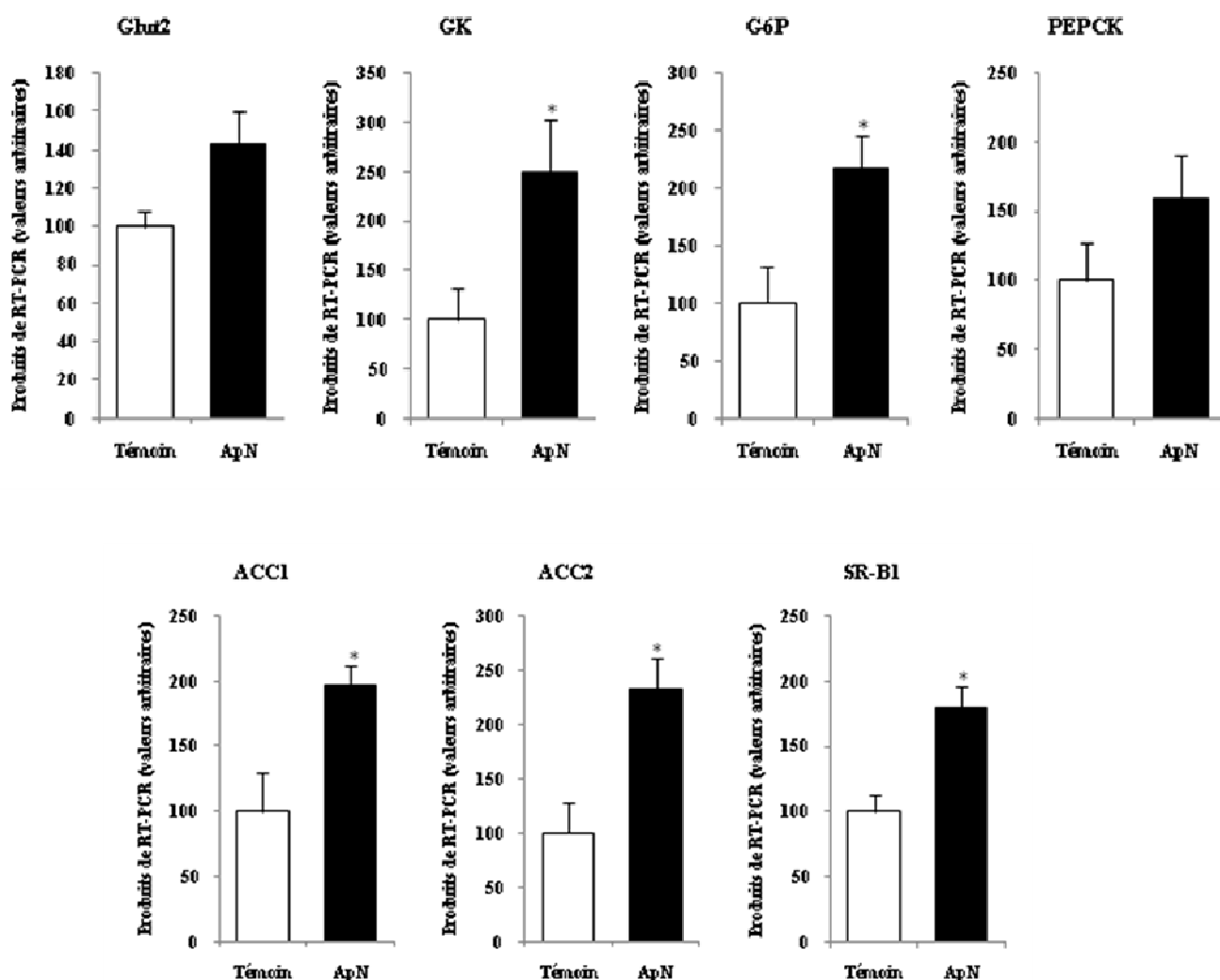
Les résultats sont des moyennes  $\pm$  E.S.M. (n=5). Les animaux sont utilisés après un jeûne de 4 h. \*différence significative à  $p < 0,05$ .

## 2. Effets d'un traitement par ApN sur les explants de foie

### 2.1. Effets d'un traitement par l'ApN en absence d'insuline

Les explants sont traités dans un milieu sans insuline afin de mimer des conditions de jeûne plus propices à l'étude de l'oxydation des AG.

Tout d'abord, l'analyse de l'expression de gènes du métabolisme glucido-lipidique révèle un effet stimulateur de l'ApN sur certains gènes sensibles à l'insuline. Ainsi, on observe une induction de l'expression de Glut2, GK, ACC1 et ACC2 (**figure 30**) ainsi qu'un effet stimulateur sur l'expression de la PEPCK et la G6P.

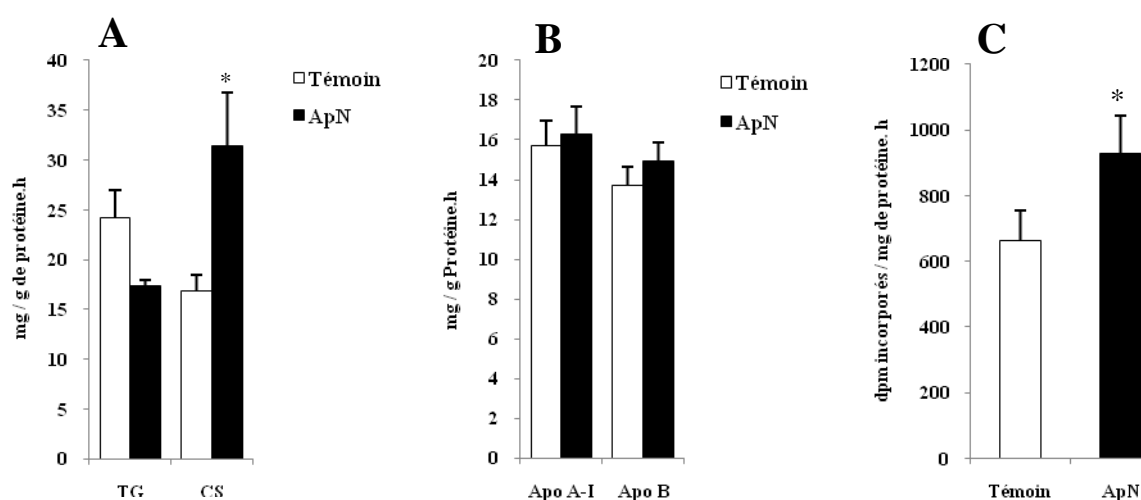


**Figure 30:** Effets d'un traitement par l'ApN (1  $\mu$ M) en absence d'insuline sur l'expression des ARNm des gènes Glut2, GK, ACC1, ACC2, PEPCK et G6P dans les explants de foie de souris C57Bl/6.

Les résultats sont des moyennes  $\pm$  E.S.M. (n=5). Les animaux sont utilisés après un jeûne de 4 h. \*différence significative à  $p < 0,05$ .

L'expression de SR-B1 dans le foie est régulée par le cholestérol, les acides gras polyinsaturés, des hormones (oestrogènes, testostérone, hormone adrenocorticotropique) et des cytokines (Rhains and Brissette, 2004). Dans notre étude il apparaît que l'expression de SR-B1 est également sensible à l'insuline (**figure 29**). Par conséquent, une stimulation de l'expression de SR-B1 par l'ApN via l'activation de voies impliquant l'insuline n'est pas exclue. Quoi qu'il en soit, dans ces conditions, l'induction de l'expression de SR-B1 par l'ApN s'accompagne d'une augmentation des capacités de captage des HDL et de la concentration intracellulaire en cholestérol (**figure 31**). La production des VLDL et des HDL estimée par le dosage de l'apoB et l'apoAI dans le milieu de culture ne semble pas être modifiée par le traitement.

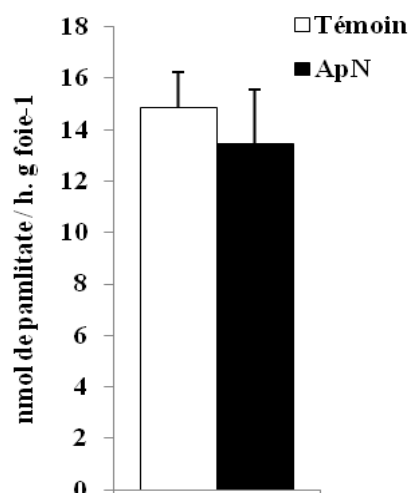
En ce qui concerne les capacités  $\beta$ -oxydatives, le traitement par l'ApN ne conduit à aucune variation lorsqu'il est appliqué en absence d'insuline, c'est à dire dans des conditions pourtant favorables aux réactions conduisant au catabolisme des acides gras (**figure 32**).



**Figure 31:** Effets d'un traitement par l'ApN (1  $\mu$ M) en absence d'insuline sur le contenu en TG et cholestérol (CS) (A), en ApoA-I et ApoB (B) ainsi que l'incorporation des HDL (C) dans les explants de foie de souris C57/B16.

Les résultats sont des moyennes  $\pm$  E.S.M. (n=5). Les animaux sont utilisés après un jeûne de 4 h. \*différence significative à  $p < 0,05$ .





**Figure 32:**  $\beta$ -oxydation de l'acide palmitique dans les explants de foie de souris C57/B16 traités par l'ApN (1  $\mu$ M) en absence d'insuline.

Les résultats sont des moyennes  $\pm$  E.S.M. (n=3). Les animaux sont utilisés après un jeûne de 4 h.

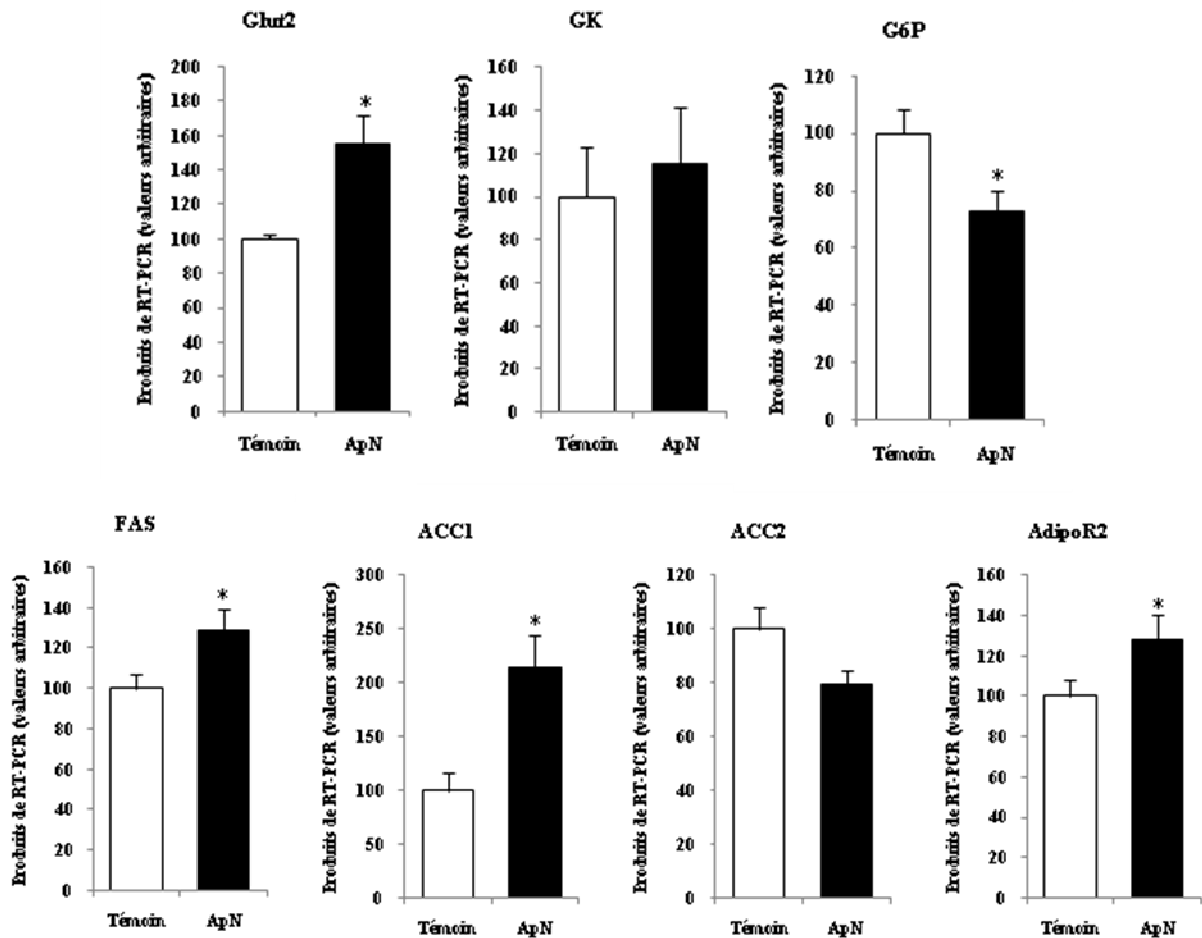
## 2.2. Effets d'un traitement par l'ApN en présence d'insuline

Dans ces conditions de culture favorables à l'utilisation du glucose, l'analyse du profil d'expression génique semble mettre en évidence un effet potentialisateur de l'ApN sur l'action de l'insuline. En effet, on observe une baisse de l'expression de la G6P et une induction de Glut2 suggérant une diminution de la néoglucogenèse et une meilleure utilisation du glucose (**figure 33**). Parallèlement, le traitement à l'ApN stimule l'expression de deux gènes de la lipogenèse sensibles à l'insuline, ACC1 et FAS bien que l'ACC2 ne soit pas affecté.

Ces données suggèrent qu'en présence d'insuline, l'ApN favorise l'utilisation du glucose via la glycolyse avec pour conséquence une réduction de la néoglucogenèse et une stimulation de la lipogenèse. L'effet activateur de l'ApN sur la glycolyse n'est pas ici associé à une augmentation des taux d'ARNm de la GK dont l'expression est déjà stimulée par la présence d'insuline. Les résultats indiquant un effet de l'ApN sur le métabolisme du glucose sont en accord avec la littérature qui rapporte un effet inhibiteur de l'ApN sur la production de glucose par le foie (Berg et al., 2001; Combs et al., 2001). L'utilisation de souris transgéniques a permis de démontrer que le mécanisme de régulation est dépendant de la

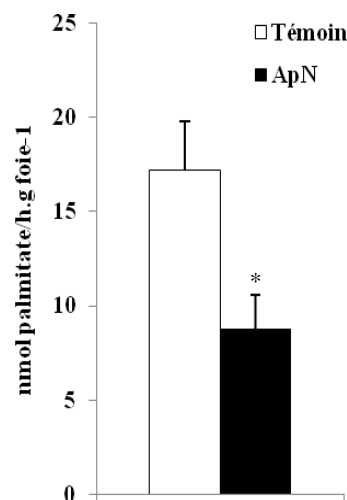
présence des récepteurs à l'ApN (Yamauchi et al., 2007). L'efficacité biologique de l'ApN dépend de sa concentration circulante mais également des capacités fonctionnelles de ses récepteurs. Par conséquent, dans les conditions de culture utilisées (+ insuline), l'expression élevée des AdipoR2 pourrait en partie expliquer la sensibilité des explants à l'ApN. De plus, les niveaux d'ARNm AdipoR2 sont augmentés par le traitement, phénomène qui pourrait être associé à la stimulation de la lipogenèse et à l'accumulation de TG dans les cellules (Shimizu et al., 2007).

Plusieurs études indiquent que les effets biologiques de l'ApN impliquant les AdipoR2 dépendent de l'activation de l'AMPK (Andreelli et al., 2006). Cependant dans nos conditions, il semble que l'ApN agisse sur la régulation transcriptionnelle de la glycolyse et de la lipogenèse en exerçant plutôt des effets sur les voies de régulation impliquant l'insuline et /ou le glucose. L'action de l'ApN sur la voie de signalisation de l'insuline a d'ailleurs été évoquée récemment (Mao et al., 2006; Yano et al., 2008). L'hypothèse de la stimulation de la lipogenèse via l'insuline est renforcée par les résultats biochimiques faisant état d'une diminution de l'activité  $\beta$ -oxydative (**figure 34**). En effet, l'utilisation accrue du glucose conduirait à la production de malonyl-CoA puissant inhibiteur de la CPT-I alors qu'une activation de l'AMPK par l'ApN devrait s'accompagner d'une induction de la  $\beta$ -oxydation.



**Figure 33:** Effets d'un traitement par l'ApN (1  $\mu$ M) en présence d'insuline (12,5  $\mu$ M) sur l'expression des ARNm des gènes, G6P, Glut2, GK, ACC1, ACC2, FAS, GK et l'AdipoR2 dans les explants de foie de souris C57/B16.

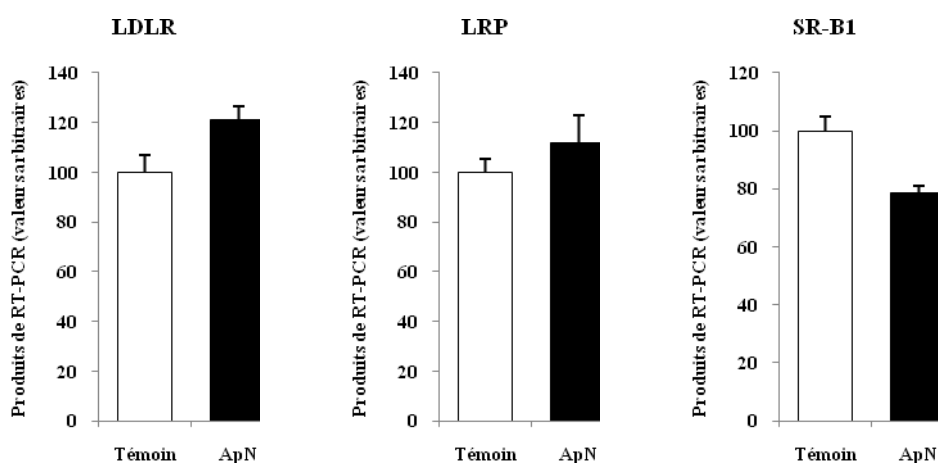
Les résultats sont des moyennes  $\pm$  E.S.M. (n=5). Les animaux sont utilisés après un jeûne de 4 h. \*différence significative à p<0,05.

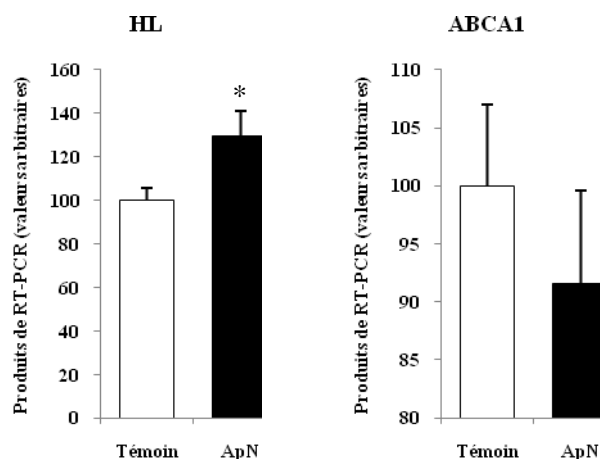


**Figure 34:**  $\beta$ -oxydation de l'acide palmitique dans les explants de foie de souris C57/B16 traitée par l'ApN (1  $\mu$ M) en présence d'insuline (12,5  $\mu$ M).

Les résultats sont des moyennes  $\pm$  E.S.M. (n=3). Les animaux sont utilisés après un jeûne de 4 h.

Puisqu'il existe une corrélation entre ApN, TG et HDL-C, nous nous sommes également intéressés à l'impact du traitement sur l'expression génique de LDLR, LRP, SR-B1, HL et ABCA1, protéines impliquées dans le catabolisme des lipoprotéines (**figure 35**). Alors que le traitement par l'ApN n'exerce aucun effet sur l'expression des récepteurs de lipoprotéines à ApoB LDLR et LRP, nous observons une augmentation des ARNm HL et une diminution des ARNm SR-B1. La diminution des transcrits SR-B1, si elle se traduit par une diminution du nombre de récepteurs, pourrait conduire à une réduction du captage des HDL (et par conséquent des EC qu'elles contiennent). Le fait que l'expression de HL soit augmentée par le traitement renforce cette hypothèse puisqu'une relation inverse entre les concentrations intracellulaires des EC et l'expression de HL a été mise en évidence (Jansen et al., 1980). Par conséquent, il est possible que dans ces conditions, l'induction de l'expression de HL corresponde à une réponse adaptative associée à une baisse du cholestérol intracellulaire. Les mécanismes à l'origine de la diminution de l'expression de SR-B1 restent à déterminer mais l'effet de l'ApN semble ici indépendant des voies impliquant l'insuline dont l'activation conduit au contraire à une induction de l'expression de SR-B1 (**figure 29**).





**Figure 35:** Effets d'un traitement par l'ApN (1  $\mu$ M) en présence d'insuline (12,5  $\mu$ M) sur l'expression des ARNm des gènes, LDLR, LRP, SR-B1, HL et ABCA1 dans les explants de foie de souris C57/B16.

Les résultats sont des moyennes  $\pm$  E.S.M. (n=5). Les animaux sont utilisés après un jeûne de 4 h. \*différence significative à  $p < 0,05$ .

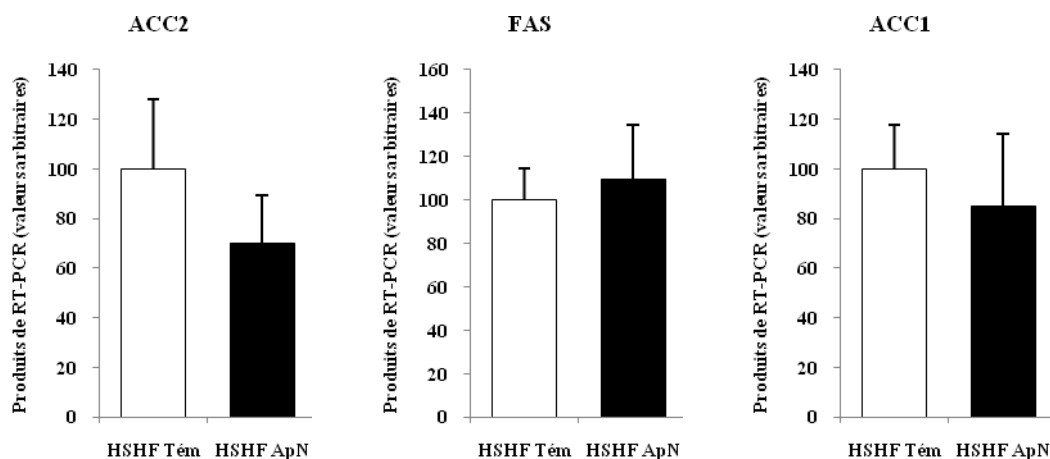
En conclusion, ces résultats suggèrent que, dans des conditions favorables à l'utilisation du glucose, l'ApN :

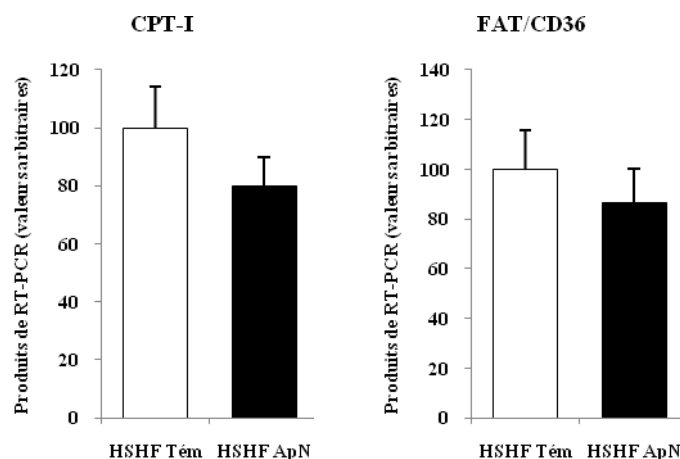
- accentue les effets de l'insuline, ce qui se traduit par une meilleure utilisation du glucose avec en contre partie une stimulation de la lipogenèse et une réduction de la  $\beta$ -oxydation.
- exerce un effet indépendant sur les voies de catabolisme des HDL

### ***2.3. Effets d'un traitement par l'ApN en absence d'insuline sur des explants issus de souris obèses***

Nous avons ensuite cherché à tester les effets de l'ApN sur des explants de foie prélevés sur des souris obèses. Ces souris, généreusement fournies par Mme B. Husson de la société Exichol-Dijon, qui ont été nourries pendant 13 semaines avec un régime HSHF (D12492, Research Diets, New Brunswick, USA) ont développé un surpoids ( $28,3 \pm 0,3$  vs  $44,07 \pm 1,15$ ) et une hyperglycémie ( $1,73 \pm 0,07$  vs  $2,57 \pm 0,05$ ). Les conséquences d'un tel régime sur la régulation du métabolisme glucido-lipidique ont été évoquées précédemment (Approche *in vivo*). Toutefois les animaux de cette série étant devenus diabétiques, il est vraisemblable

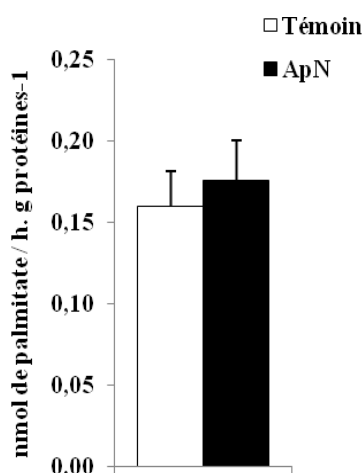
qu'ils présentent une forte activité néoglucogénique hépatique. Le profil d'expression génique des explants après 21h de culture (**figure 29**) traduit le fait que les hépatocytes sont armés pour utiliser activement le glucose (ARNm Glut2, GK élevés par rapport aux explants de foie sain cultivés dans les mêmes conditions). Ces tissus conservent un faible niveau d'expression des enzymes de la lipogenèse (ACC1,2 et FAS) et présentent au contraire une expression de la CPT-I et de FAT/CD36 plus élevée (**figure 29**). Dans ces conditions, l'effet insulino-sensibilisateur de l'ApN observé précédemment sur tissu sain ne semble pas s'appliquer aux explants stéatotiques à en juger par le fait que le traitement n'induit aucune modification significative sur l'expression génique. Ce résultat est quelque peu inattendu puisque nous pensions que les effets bénéfiques de l'ApN seraient amplifiés sur des foies de souris insulino-résistantes. Il est envisageable que la mise en culture des explants constitue déjà un traitement susceptible de masquer les effets de l'ApN. En effet, les hépatocytes passent d'un milieu riche en glucose et en insuline (*in vivo*) à un milieu contenant 1 g de glucose et très peu d'insuline. Quoi qu'il en soit, dans ces conditions plutôt favorables à l'utilisation des acides gras, un traitement de 21h par l'ApN n'apparaît pas avoir d'effet stimulateur sur l'activité  $\beta$ -oxydative (**figure 37**).





**Figure 36:** Effets d'un traitement par l'ApN (1  $\mu$ M) en absence d'insuline sur l'expression des ARNm des gènes ACC1, ACC2, FAS, CPT-1 et FAT/CD36 dans les explants de foie de souris obèses (régime HSHF).

Les résultats sont des moyennes  $\pm$  E.S.M. (n=5). Les animaux sont utilisés après un jeûne de 4 h. \*différence significative à  $p < 0,05$ .



**Figure 37:**  $\beta$ -oxydation de l'acide palmitique dans les explants de foie de souris obèses traités par l'ApN (1  $\mu$ M) en absence d'insuline.

Les résultats sont des moyennes  $\pm$  E.S.M. (n=5). Les animaux sont utilisés après un jeûne de 4 h.

### 3. Effets à court terme de l'ApN sur les capacités oxydatives des explants de foie en absence d'insuline

Les données de la littérature plaident en faveur d'une stimulation de la  $\beta$ -oxydation aussi bien dans le muscle que dans le foie (Fruebis et al., 2001; Tomas et al., 2002; Yamauchi et al., 2002). Toutefois, si les études concernant le muscle mettent clairement en évidence une

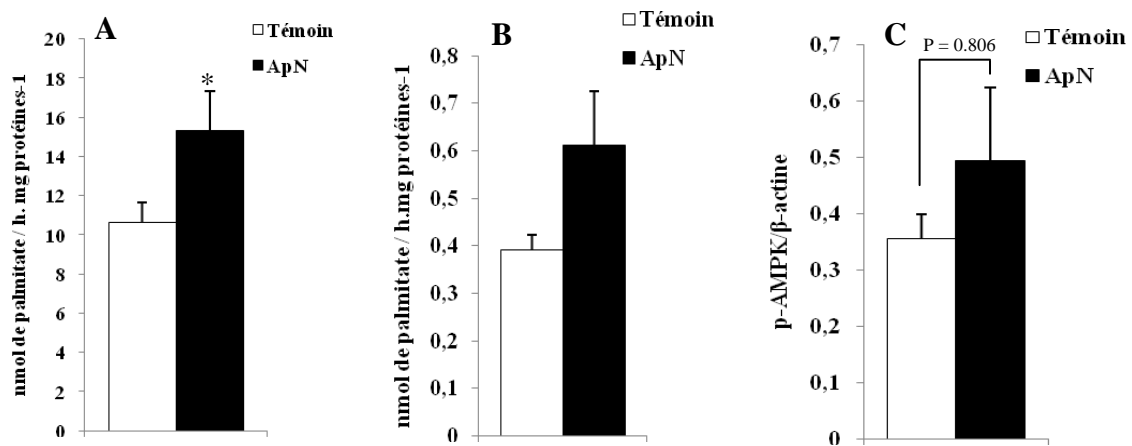
augmentation de l'activité oxydative, celles concernant le foie s'appuient uniquement sur des mesures indirectes (AMPK, activités enzymatiques de la CPT-1, de l'ACC et de la FAS). De plus, elles rendent compte d'effets à court terme de l'ApN (traitement jusqu'à 90 min) basés sur l'activation rapide de voies de régulation comme celle impliquant l'AMPK. C'est pourquoi nous avons testé les effets rapides de l'ApN sur le modèle d'explants.

Yamauchi et al. ont observé une augmentation de l'activité  $\beta$ -oxydative *in vitro* sur un modèle de cellules musculaires en culture (myocytes C2C12) traité 60 min avec de l'ApN et ont démontré que cette stimulation était indépendante d'une activité transcriptionnelle et dépendante de l'activation de l'AMPK (Yamauchi et al., 2002). Bien que l'activation de l'AMPK dans des hépatocytes isolés ait également été mise en évidence dans cette étude, curieusement aucune donnée relative à l'activité  $\beta$ -oxydative n'est indiquée. C'est pourquoi il nous a semblé important de tester ce paramètre sur le modèle d'explants de foie.

Dans un premier temps, nous avons testé l'effet de l'ApN sur l'activité  $\beta$ -oxydative du muscle soléaire traité 45 min afin de vérifier si nos conditions expérimentales permettaient de retrouver des résultats en accord avec ceux de la littérature. Les résultats obtenus avec un muscle entier indiquent que la présence d'ApN entraîne une stimulation de la  $\beta$ -oxydation (**figure 38A**) qui peut être reliée à l'effet activateur de l'ApN sur l'AMPK démontré par Yamauchi et al. *in vitro* et *in vivo* (Yamauchi et al., 2002).

Lorsque ces conditions sont appliquées au foie sain, la  $\beta$ -oxydation est également stimulée et s'accompagne d'une augmentation de la p-AMPK ( $p = 0,806$ , **figure 38B et C**). Toutefois, cet effet n'est pas retrouvé lorsque l'expérience est répétée avec des explants de foies prélevés sur des souris obèses. Il est possible que dans ces conditions, les hépatocytes stéatotiques qui présentent une forte activité lipogénique voient leur activité  $\beta$ -oxydative fortement réprimée par la présence de malonyl-CoA.





**Figure 38:** Effets d'un traitement par l'ApN (1  $\mu$ M) en absence d'insuline sur la  $\beta$ -oxydation de l'acide palmitique dans le muscle soléaire entier (A) et les explants de foie (B) ainsi que sur l'activation de la p-AMPK (C) dans les explants de foie de souris C57Bl/6.

Les résultats sont des moyennes  $\pm$  E.S.M. (n=5). Les animaux sont utilisés après un jeûne de 4 h. \*différence significative à  $p < 0,05$ .

#### 4. Discussion générale sur les effets de l'ApN dans les explants de foie

Les 2 conditions de traitement à long terme (21h) semblent mettre en évidence un effet insulino-sensibilisateur de l'ApN sur le foie conduisant à une stimulation du catabolisme du glucose en accord avec les résultats trouvés dans la littérature dans plusieurs tissus (Berg et al., 2001; Combs et al., 2001; Maeda et al., 2002). Un tel effet pourrait être bénéfique à l'échelle de l'organisme entier et particulièrement en présence de diabète de type II, puisqu'il correspondrait à une réduction de la production de glucose par le foie. Il est à noter que les effets s'exercent en présence d'insuline ou en absence d'insuline c'est à dire dans des conditions assimilables à des situations physiologiques voire pathophysiologiques variées (différents stades de diabète type II, diabète type I).

Les effets de l'ApN sur le métabolisme glucidique dans le foie ont déjà été mis en évidence *in vitro* dans plusieurs études. Ainsi, Berg et al. ont constaté une réduction de la production de glucose par des hépatocytes de rat traités par l'ApN en présence d'insuline (Berg et al., 2001). Dans une autre étude menée sur un modèle de cellules d'hépatome de rat exprimant l'ApN, cet effet a clairement été démontré en absence d'insuline (Zhou et al., 2005). Nos résultats semblent également en accord avec une activation de l'utilisation du glucose par les explants de foie traités par l'ApN à en juger par l'augmentation de l'expression de la GK. Toutefois, contrairement à ce qui a été démontré par Zhou et al., nous n'observons pas d'inhibition de l'expression de la PEPCK et de la G6P, les ARNm codant pour ces enzymes étant même augmentés (Zhou et al., 2005). L'induction simultanée de la GK et du couple PEPCK/G6P n'étant pas physiologique, il est envisageable que ce résultat corresponde à un biais propre au modèle expérimental et aux conditions de culture. En effet, une telle situation a déjà été rencontrée *in vitro* lorsque le métabolisme du glucose est augmenté même en absence d'insuline (Argaud et al., 1997; Massillon et al., 1996). Ainsi, ces données moléculaires suggèrent que l'ApN stimule l'utilisation du glucose en absence d'insuline et il est envisageable que le glucose et/ou ses catabolites soient responsables des inductions constatées.

L'impact de l'ApN sur la régulation du métabolisme du glucose semble s'exercer quel que soit le niveau d'expression du récepteur AdipoR2 (faible en absence d'insuline et élevé en

présence d'insuline) ce qui suggère que les voies impliquées pourraient être, au moins en partie, indépendantes de l'activation de ce récepteur.

Les effets de l'ApN sur l'activité  $\beta$ -oxydative dans le foie sont beaucoup moins évidents et semblent dépendre de conditions particulières. L'action à court terme de l'ApN impliquant l'activation de l'AMPK décrite dans la littérature pour le muscle est mise en évidence sur le modèle d'explants de foie sain. Par contre, les effets à long terme pouvant être à l'origine d'adaptations géniques ne sont pas favorables à une activation de la  $\beta$ -oxydation puisqu'ils semblent stimuler la lipogenèse en favorisant l'action de l'insuline.

Toutefois, *in vivo*, une augmentation des concentrations plasmatiques d'ApN correspond généralement à une amélioration du métabolisme adipocytaire (par traitement médicamenteux ou perte de masse grasse) qui a pour conséquence de réduire la production d'AGL et des cytokines inflammatoires. Ces facteurs peuvent exercer des effets indirects importants sur le foie et contribuer à l'amélioration du métabolisme lipidique en particulier dans des situations pathologiques telles que l'obésité et le diabète.

La LH est impliquée à différents niveaux du métabolisme des lipoprotéines puisqu'elle exerce une activité lipasique à la fois sur les TG et les PL (Wang et al., 1999; Wittayalerpanya et al., 2006) et possède la capacité de se lier aux HDL. En interagissant avec les HDL et en catalysant l'hydrolyse des PL, la LH conduirait à un remodelage des particules lipoprotéiques qui serait favorable à la prise en charge du cholestérol par les cellules (Groot et al., 1981; Kuusi et al., 1980). Chez des patients normoglycémiques et des diabétiques de type 2, l'hyperinsulinémie étant associée avec une activité LH élevée et des taux faibles de HDL (Syvanne et al., 1995). Ainsi, la LH pourrait être à l'origine de la relation inverse existant entre insuline et HDL. L'augmentation de l'expression de la LH induite par l'ApN en présence d'insuline peut correspondre à un effet compensateur de la baisse de SR-B1. SR-B1 joue également un rôle majeur dans le contrôle de l'uptake des HDL-CE et les variations de son expression dans le foie impactent directement sur les taux d'HDL-CE plasmatiques en modulant le transport reverse du cholestérol. Ainsi, chez des souris surexprimant SR-B1 dans le foie, on assiste à une importante diminution des taux d'HDL-CE et d'apoA-I (Kozarsky et al., 1997).

A priori, dans notre modèle, les variations d'expression de SR-B1 et de la LH induites par l'ApN dans les différentes situations semblent plutôt favorables à une augmentation de l'uptake des HDL. Ce résultat, transposé à l'organisme entier, ne représente pas à priori un évènement favorable puisqu'il diminuerait les concentrations plasmatiques d'HDL en accélérant leur clairance. Toutefois, cette situation (surexpression localisée au foie uniquement) n'est pas physiologique et il est probable que, *in vivo*, l'augmentation de l'expression de SR-B1 ou de la LH s'accompagne d'autres inductions qui dans l'ensemble accélèrent le transport reverse du cholestérol. Par exemple, il a été montré que la synthèse des HDL et l'efflux de cholestérol étaient augmentés par l'ApN (Tsubakio-Yamamoto et al., 2008). Au final, les taux d'HDL sont positivement corrélés à l'ApN chez l'Homme (Ryo et al., 2004; Zoccali et al., 2002).

En conclusion, l'ApN exerce des effets directs sur l'expression de l'HL et de SR-B1 qui peuvent conduire à une augmentation des capacités de captage des HDL et par conséquent modifier la cinétique de ces lipoprotéines. L'interprétation physiologique de ces résultats reste à déterminer.

### III. EVALUATION DES EFFETS DIRECTS DE LA PIOGTZ SUR LE METABOLISME LIPIDIQUE DANS DES EXPLANTS DE FOIE

Dans l'étude *in vivo*, le traitement par la PioGTZ a conduit à des modifications du métabolisme hépatique qui peuvent être la conséquence indirecte d'une amélioration de la sensibilité à l'insuline dans le muscle et le tissu adipeux, d'une augmentation de l'ApN circulante ou encore d'un effet direct de la PioGTZ sur les hépatocytes. C'est pourquoi, nous avons utilisé le modèle d'explants de foie pour déterminer si la PioGTZ peut avoir une action directe sur le métabolisme hépatique. Par comparaison, nous avons parallèlement testé les effets de la Rosiglitazone (RosiGTZ ; Avandia, GlaxoSmithKline) qui a une action anti-diabétique comparable à la PioGTZ sans toutefois avoir les mêmes effets sur le statut lipidique. En effet, des études cliniques récentes suggèrent que la PioGTZ réduit les TG plasmatiques mais pas la RosiGTZ, que les 2 glitazones augmentent le HDL-C avec un effet plus marqué pour la PioGTZ et que la RosiGTZ induit une augmentation du taux de LDL-C alors que la pioglitazone est neutre sur ce dernier (Goldberg et al., 2005).

La Pioglitazone (PioGTZ ; Actos, Takeda) est une molécule développée pour ses propriétés hypoglycémiantes et actuellement utilisée comme agent antidiabétique pour le traitement du diabète de type II (Bowen et al., 1991; Nolan et al., 1994; Saltiel, 2001; Yki-Jarvinen, 2004). Ce composé, qui appartient à la famille des Glitazones (GTZ) ou thiazolidinediones, agit principalement en diminuant la résistance à l'insuline et exerce également un effet bénéfique sur le métabolisme des lipides et lipoprotéines.

Malgré l'utilisation clinique intensive de cette molécule pour le traitement du diabète de type II, les mécanismes précis par lesquels la PioGTZ exerce ces effets sur le métabolisme des lipides sont encore très mal connus. Les GTZ sont des ligands spécifiques de l'isoforme gamma des PPARs qui contrôle la transcription de gènes impliqués dans la différenciation adipocytaire, le transport, la synthèse et le stockage des acides gras (Castelein et al., 1994; Gurnell et al., 2000; Hallakou et al., 1997; Tontonoz et al., 1995). Ainsi, la stimulation de l'adipogenèse par les GTZ via PPAR $\gamma$  favoriserait, d'une part la prise en charge des acides gras circulants par les tissus adipeux avec un effet bénéfique sur la sensibilité à l'insuline (Berger and Moller, 2002; Sharma and Staels, 2007; Ye et al., 2002) et d'autre part la production d'adipocytokines telles que la leptine (De Vos et al., 1996; Kallen and Lazar,

1996) ou l'adiponectine (Kubota et al., 2006; Maeda et al., 2001) capables d'améliorer le métabolisme glucido-lipidique (Guerre-Millo, 2008).

Les données de la littérature semblent donc démontrer que les GTZ améliorent la sensibilité à l'insuline en agissant spécifiquement sur le tissu adipeux (Berger and Moller, 2002; He et al., 2003; Hevener et al., 2003; Norris et al., 2003). Toutefois, compte tenu du rôle central du foie dans la régulation du métabolisme glucido-lipidique, les effets directs des GTZ sur les hépatocytes doivent également être envisagés.

Cette étude a été réalisée sur des coupes de foie mises en culture pendant 21h dans un milieu contenant soit la PioGTZ ou la RosiGTZ. Chez l'Homme, la posologie de la PioGTZ et la RosiGTZ est respectivement de 30 et 4 mg par jour en une prise. Ainsi, nous avons choisi de traiter les explants avec 7,5  $\mu\text{M}$  de PioGTZ et 1  $\mu\text{M}$  de RosiGTZ afin de respecter les doses thérapeutiques et les concentrations physiologiques (Chu et al., 2007; Wittayalertpanya et al., 2006).

Ce modèle permet de tester l'effet direct des GTZ sur des paramètres relatifs à l'oxydation et la lipogénèse. Les analyses portent principalement sur les paramètres morphologiques, biochimiques et moléculaires en relation avec le métabolisme des lipides : mesure d'activité et d'expression de protéines relatives à l'hydrolyse et à l'incorporation des acides gras provenant des lipoprotéines, à l'oxydation des acides gras, à la lipogénèse, à l'estérification des acides gras et à la sécrétion des lipoprotéines. Ce modèle a également été particulièrement exploité pour déterminer les mécanismes moléculaires de régulation induits par les 2 GTZ qui pourraient expliquer leurs effets propres sur le catabolisme des HDL et des VLDL, observés chez l'Homme (Djaouti et al., 2010)

### **1. Effet de la PioGTZ sur les paramètres lipidiques**

Nous avons tout d'abord testé l'impact du traitement PioGTZ sur le métabolisme des acides gras en comparaison avec la RosiGTZ et le control. Les résultats indiquent une réduction du contenu en TG dans les coupes traitées par la PioGTZ (**tableau 7**) alors que la capacité des coupes de foie à oxyder l'acide palmitique et à estérifier ce dernier en phospholipides et en TG n'est modifiée par aucun des traitements (**figure 39**). Le traitement par la PioGTZ ne semble pas non plus modifier la production de VLDL à en juger par les quantités d'apoB

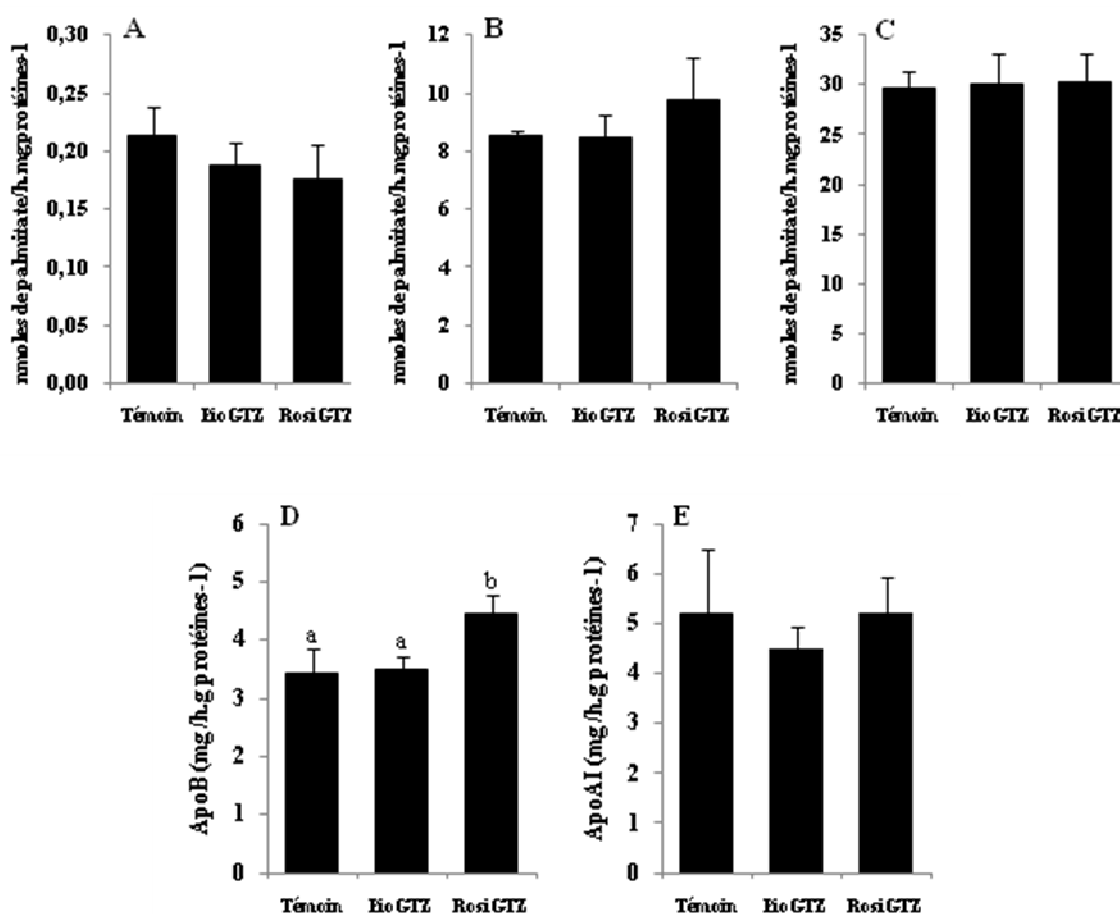
secrétées dans le milieu (**figure 39**). L'ensemble de ces données suggère que la baisse des TG intracellulaires induite par le traitement PioGTZ correspond à une réduction de l'activité lipogénique et non pas à une stimulation du catabolisme des acides gras ou de la sécrétion de lipides ni à une diminution de la prise en charge des AG circulants. Cette hypothèse est renforcée par les

résultats d'une étude récente démontrant l'effet inhibiteur de la PioGTZ sur la lipogénèse (Beysen et al., 2008) et le fait que la PioGTZ exerce un effet puissant sur l'AMPK (**figure 43**). En effet, il est bien démontré que l'activation par phosphorylation de l'AMPK s'accompagne de l'inhibition de l'activité de la voie lipogénique (Winder and Hardie, 1999). Dans notre cas, le traitement par la PioGTZ n'altère toutefois pas l'expression des gènes codant pour l'ACC et la FAS. L'AMPK stimule également l'activité CPT-I et à plus long terme son expression (Velasco et al., 1997). Les taux d'ARNm de la CPT-I sont d'ailleurs plus élevés dans les explants traités par les glitazones, ce qui ne semble pourtant pas influencer les capacités  $\beta$ -oxydatives mesurées à partir de l'acide palmitique.

**Tableau 7:** Effets de la RosiGTZ (1 mM) et la PoiGTZ (7,5 mM) sur le contenu en TG et CS des explants de foie de souris

	Témoïn	PioGTZ	RosiGTZ
<i>Explants de foie</i>			
Triglycérides (mg/g protéine)	132,4 ± 4,3 <sup>a</sup>	105,5 ± 8,4 <sup>b</sup>	139,6 ± 12,3 <sup>a</sup>
Cholestérol (mg/g protéine)	17,0 ± 1,8 <sup>a</sup>	13,5 ± 1,5 <sup>b</sup>	21,0 ± 4,2 <sup>a</sup>

*Les valeurs sont des moyennes ± SEM (n= 6). Les valeurs avec des lettres différentes en exposant (a,b) sont statistiquement différentes à p <0,05.*



**Figure 39:** Devenir métabolique de l'acide palmitique et la sécrétion de l'apolipoprotéine par les explants de foie.  $\beta$ -oxydation de l'acide palmitique (A), l'incorporation d'acide palmitique dans les phospholipides (B) et en triglycérides (C). Taux de sécrétion d'apolipoprotéine B (D) et apolipoprotéine A-1 (E) par explants de foie.

Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SEM ( $n=6$ ). Les valeurs avec des lettres différentes en exposant (a,b) sont statistiquement différentes à  $p < 0,05$ .

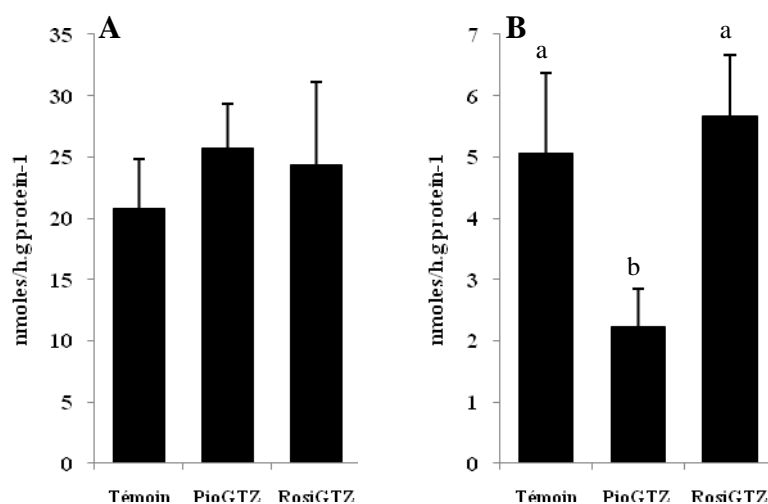
## 2. Effet de la PioGTZ sur le captage du HDL-C

Les coupes traitées par la PioGTZ présentent également une concentration en cholestérol plus faible que les coupes RosiGTZ et témoins. La capacité des glitazones à inhiber la synthèse du cholestérol a déjà été mise en évidence dans différents types cellulaires (Wang et al., 1999). Toutefois, il ressort de cette étude que la PioGTZ et la RosiGTZ constituent des inhibiteurs faibles par rapport aux autres glitazones testées. Nos résultats semblent en accord avec ces

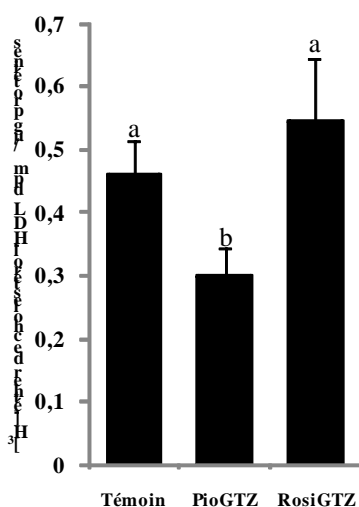


observations puisque les deux molécules exercent le même effet inhibiteur modéré sur l'expression de l'HMG-CoA réductase. Ceci suggère que les mécanismes responsables de la diminution de cholestérol induite par le traitement PioGTZ ne sont pas relatifs à une diminution de synthèse mais plutôt à une diminution de captage du cholestérol. Ce concept est supporté à la fois par la diminution de l'activité de la LH et par la diminution des capacités de captage des HDL (**figure 40**). La LH est capable d'hydrolyser les TG et les PL présents au sein des HDL, ce qui conduit à un remodelage des particules favorables à la prise en charge du cholestérol par les hépatocytes (Jansen et al., 1980; Kadowaki et al., 1992). Il est donc possible d'émettre l'hypothèse selon laquelle la baisse de l'activité de la LH induite par la PioGTZ provoque une réduction du pool de cholestérol intracellulaire. La mesure des taux d'ARNm de la LH révèle au contraire une surexpression du gène dans les explants traités par la PioGTZ en accord avec le fait qu'il existe une relation inverse entre l'expression de la LH et le cholestérol intracellulaire (Perret et al., 2002). En parallèle à son activité lipolytique, il a été démontré que la LH facilite l'interaction des HDL avec le récepteur aux HDL, SR-B1 et favorise ainsi le captage du cholestérol (Bengtsson and Olivecrona, 1980; Lambert et al., 1999). Dans notre étude, nous observons, sous l'effet du traitement par la PioGTZ, une diminution de l'expression de SR-B1 qui pourrait par conséquent également être à l'origine de la diminution du cholestérol intracellulaire.

L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que la PioGTZ est capable d'exercer un effet direct sur les hépatocytes impliquant la LH et SR-B1 avec pour conséquence une diminution du captage du HDL-C et du pool de cholestérol intracellulaire. Il est alors concevable de supposer, en extrapolant ces résultats à l'Homme, qu'un tel effet direct de la PioGTZ sur le foie puisse participer à l'augmentation du HDL-C.



**Figure 40:** Activité de la lipase hépatique estimée à partir de la radioactivité portée par l'acide oléique ( $[3H]$  oléate) incorporée dans les explants de foie (A) et retrouvée par la suite dans le milieu (B).  
 Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SEM ( $n=6$ ). Les valeurs avec des lettres différentes en exposant (a,b) sont statistiquement différentes à  $p < 0,05$ .

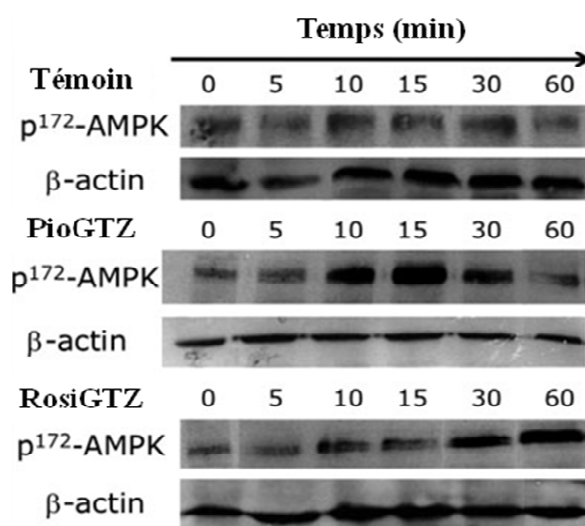


**Figure 41:** Captage des HDL-C par les explants de foie de souris C57BL/6.  
 Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SEM ( $n=6$ ). Les valeurs avec des lettres différentes en exposant (a,b) sont statistiquement différentes à  $p < 0,05$ .

### 3. Effets de la PioGTZ sur l'expression de PPAR $\gamma$

Il est à noter que la RosiGTZ n'exerce aucun effet sur les paramètres relatifs au captage du HDL-C suggérant l'intervention de voies de régulation distinctes entre la PioGTZ et la RosiGTZ. Les glitazones étant des activateurs puissants de PPAR $\gamma$ , il est possible que l'activation de ces facteurs de transcription soit à l'origine de certains effets observés sur les explants. PPAR $\gamma$  est faiblement exprimé dans le foie sain mais il a été démontré que son expression est inductible. Elle s'accompagne alors de l'activation transcriptionnelle des gènes de la lipogenèse et de l'adipogenèse et favorise l'apparition d'une stéatose (Gavrilova et al., 2003; Schadinger et al., 2005; Yu et al., 2003).

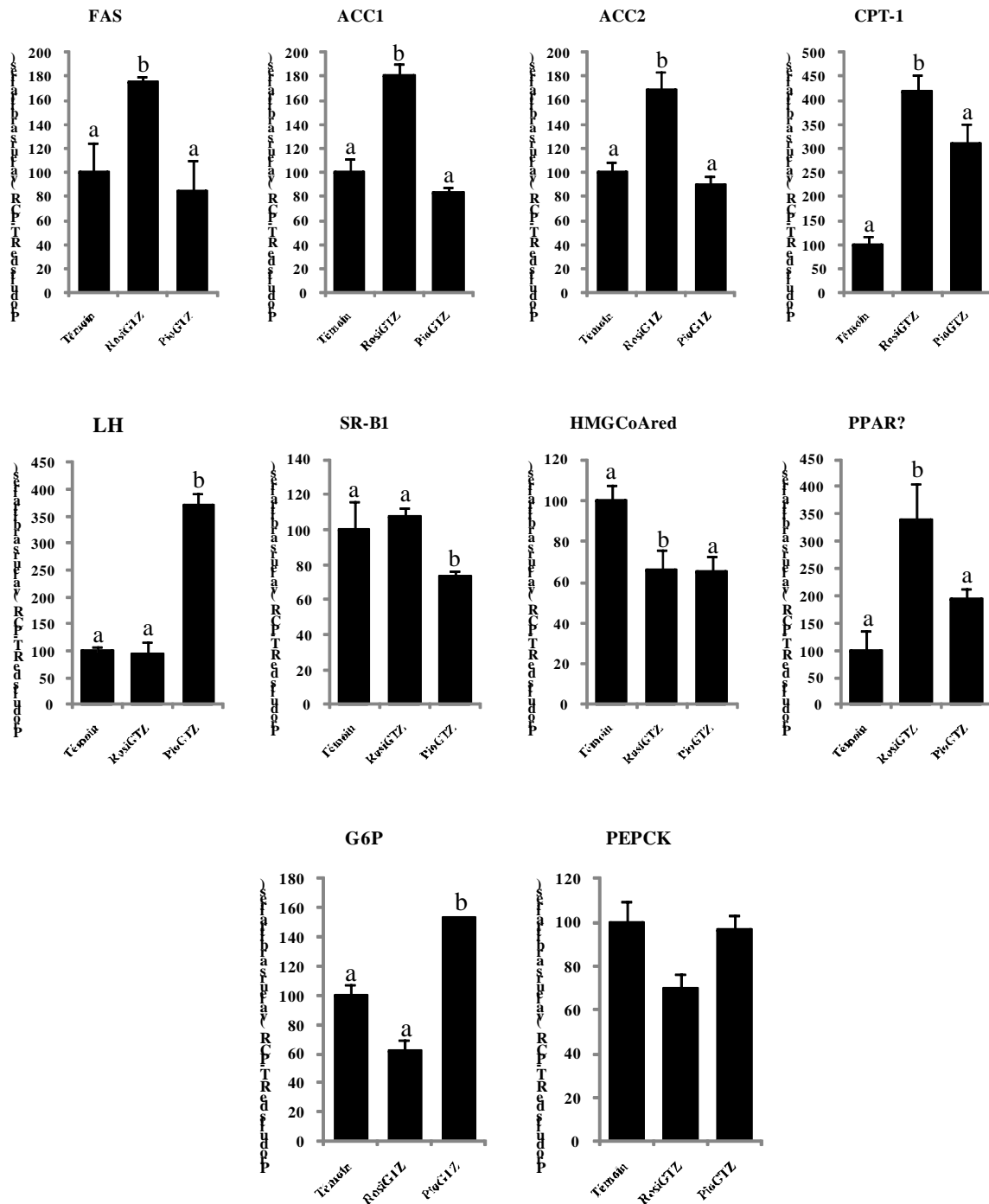
Dans notre étude, seule la RosiGTZ conduit à une augmentation significative des ARNm de PPAR $\gamma$  qui en plus est associée à l'induction de l'expression des gènes de la lipogenèse ACC1 et 2 et FAS (**figure 43**). Ainsi, les effets de la PioGTZ ne semblent pas dépendre de l'activation de PPAR $\gamma$  puisque le traitement ne modifie ni son expression ni celle de ses gènes cibles. Même si les mécanismes mis en jeu restent à déterminer, une part des régulations géniques et métaboliques induites par la PioGTZ pourrait être la conséquence de l'effet puissant qu'exerce cette drogue sur l'AMPK (**figure 42**).



**Figure 42:** Immunoblot de la phospho-AMPK $\alpha$  (p-AMPK $\alpha$ ) à partir d'explants de foie de souris C57/BL6. Les spots de la phospho (p)-AMPK $\alpha$  et de la  $\beta$ -actine sont issus de deux expériences indépendantes.

#### 4. Effets de la PioGTZ sur le métabolisme du glucose

Les effets directs de la PioGTZ sont également mis en évidence à travers l'étude du métabolisme du glucose. En effet, l'activation de l'AMPK, en plus de ses effets sur la lipogenèse, est associée à une inhibition de la néoglucogenèse (Lochhead et al., 2000; Yamauchi et al., 2002). C'est ce que nous observons dans notre étude puisque le traitement par la PioGTZ diminue l'expression de la PEPCCK, diminue l'expression et l'activité de la G6Pase et s'accompagne d'une réduction de la production de glucose par le foie (**figure 43**). Ces résultats sont encore une fois à mettre en opposition avec ceux correspondant au traitement RosiGTZ qui ne révèlent aucune modification de la voie de la néoglucogenèse.



**Figure 43:** Expression des ARNm des gènes ACC1, ACC2, FAS, CPT-1, LH, SR-B1, HMGCored, PPAR $\gamma$ , G6P et PEPCK dans les explants de foie de souris C57/B16 témoins ou soumises au régime HSHF en présence ou en absence d'insuline. Les résultats sont des moyennes  $\pm$  E.S.M. (n=5). Les valeurs avec des lettres différentes en exposant (a,b) sont statistiquement différentes à  $p < 0,05$ .

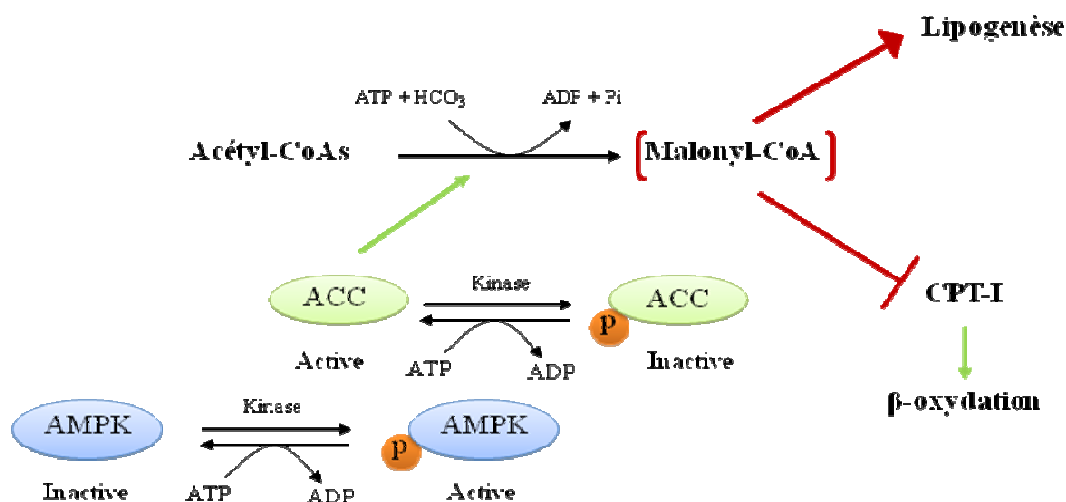
L'ensemble de ces données plaide en faveur d'un effet direct de la PioGTZ sur le foie qui s'exercerait via l'activation de l'AMPK et conduirait à une amélioration du métabolisme glucido-lipidique. Par conséquent, il est envisageable que les effets de la PioGTZ observés dans l'expérimentation « in vivo » soient au moins en partie directs et donc indépendants du fait que les taux d'ApN circulante aient été augmentés.

## *CONCLUSION & PERSPECTIVES*

Les résultats de cette étude ont permis de démontrer, à travers l'utilisation de divers traitements provoquant des variations de la masse adipeuse, que la production d'ApN n'est pas strictement dépendante de la masse grasse. Nos données, ajoutées à celles de la littérature, suggèrent que l'état inflammatoire des adipocytes constitue le facteur déterminant. Parallèlement, nous avons mis en évidence par une approche *in vitro* l'existence d'effets directs de l'ApN sur le foie, qui, même s'ils ne sont pas directement transposables à l'organisme entier, ne doivent pas être négligés.

Dans la littérature, il est admis que l'ApN exerce des effets insulino-sensibilisateurs et stimule la  $\beta$ -oxydation. Plusieurs études menées sur des cellules musculaires suggèrent que l'ApN active l'AMPK dans plusieurs tissus différents et que c'est par cette voie qu'elle exerce son action. Ainsi, en 2002, Yamauchi et al. démontrent qu'en parallèle à l'activation de l'AMPK, l'ApN stimule la phosphorylation de ACC, l'oxydation des AG, l'uptake du glucose et la production de lactate dans des myocytes en culture. Il a également été démontré par Li et al. en 2007 dans un modèle de cardiomyocytes en culture que l'effet de l'ApN sur la  $\beta$ -oxydation est la conséquence d'une stimulation de l'AMPK conduisant à la phosphorylation de l'ACC et finalement à la stimulation de l'activité de la CPT-I (Li et al., 2007). L'effet de l'ApN sur la  $\beta$ -oxydation dépendrait donc en grande partie de la moindre production de malonyl-CoA, puissant inhibiteur de l'activité CPT-I, dont la production est réduite lorsque que l'activité de l'ACC est inhibée (**figure 44**). De la même façon, il a été clairement mis en évidence *in vivo* que l'administration d'ApN conduit rapidement à une diminution des AGL circulants associée à une augmentation de l'activité  $\beta$ -oxydative dans les muscles (Fruebis et al., 2001; Yamauchi et al., 2002).





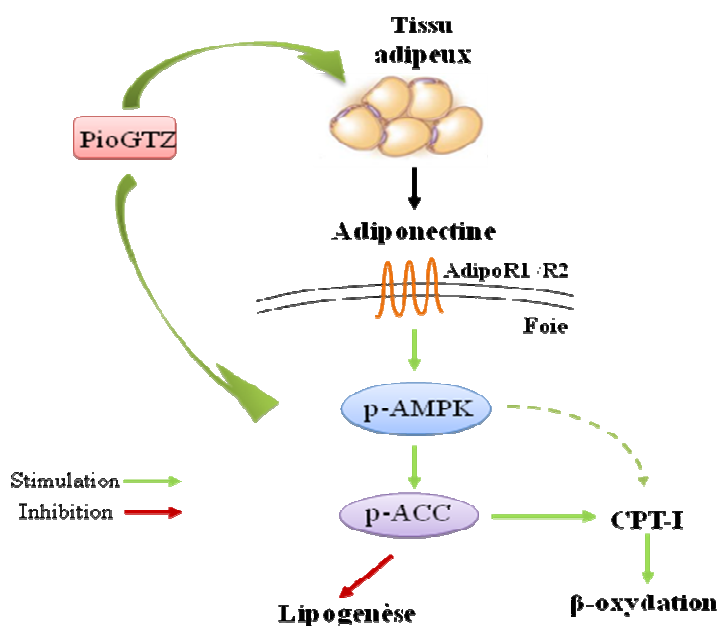
**Figure 44:** Rôle de l'AMPK dans la régulation de l'activité  $\beta$ -oxydative

Si les effets de l'ApN sur la  $\beta$ -oxydation semblent assez bien décrits dans les cellules musculaires, ils sont beaucoup moins bien décrits dans les hépatocytes. Dans l'étude de Yamauchi en 2002, les résultats mettent également en évidence des effets de l'ApN sur AMPK, l'ACC et sur les paramètres relatifs à la néoglucogénèse dans des hépatocytes sans toutefois présenter de résultats concernant la mesure de l'activité  $\beta$ -oxydative pour ce modèle (Yamauchi et al., 2002). Dans une autre étude menée *in vivo*, seul un effet inhibiteur de l'ApN sur la néoglucogénèse dépendant de l'activation de l'AMPK a bien été démontré dans le foie alors qu'aucune action de l'ApN sur l'oxydation des acides gras n'est décrite (Yamauchi et al., 2001). Pourtant, cette étude sert de référence à de nombreux auteurs pour illustrer des effets activateurs de l'ApN sur la  $\beta$ -oxydation dans le foie.

Les résultats de notre étude sur des coupes fines de foie apparaissent donc importants puisqu'ils montrent d'une part un effet activateur de l'ApN sur l'AMPK après 45 min de traitement et d'autre part une augmentation des capacités de  $\beta$ -oxydation des AG. Toutefois, il semble peu probable que ce résultat soit la conséquence d'une variation de la production de malonyl-CoA comme proposé dans le muscle. En effet, il est clairement démontré que l'isoforme hépatique de la CPT-I (CPT-Ia) présente une sensibilité au malonyl-CoA beaucoup

plus faible que l'isoforme musculaire (CPT-1B) (Mynatt et al., 1992). Par conséquent les variations de production de malonyl-CoA dépendantes de l'activité AMPK pourraient conduire à des effets très modérés sur l'activité CPT-1 dans les hépatocytes. De plus, dans notre modèle, l'activité  $\beta$ -oxydative est mesurée dans un milieu dépourvu d'insuline, c'est à dire dans des conditions peu favorables à la synthèse de malonyl-CoA. Le fait qu'aucun effet de l'ApN n'ait pu être mis en évidence après un traitement plus long suggère pourtant que le mode d'action dépend bien de voies de signalisation rapides comme c'est le cas de la cascade impliquant la p-AMPK. Il est alors possible d'envisager qu'une régulation de l'activité CPT-1 indépendante du malonyl-CoA intervienne dans le foie comme cela a déjà été suggéré par (Guzman et al., 2000). Quoi qu'il en soit, les résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle les effets bénéfiques exercés par l'ApN sur les paramètres lipidiques dépendent d'une stimulation de l'activité  $\beta$ -oxydative dans le muscle et le foie.

Les GTZ améliorent la sensibilité à l'insuline en favorisant le captage des acides gras par le tissu adipeux, en stimulant la production d'ApN et en réduisant les taux de facteurs inflammatoires (Goldberg et al., 2005). Puisque qu'un traitement par les GTZ (PioGTZ et RosiGTZ) conduit à l'augmentation des concentrations plasmatiques d'ApN, il est suggéré par de nombreux auteurs qu'une part des effets bénéfiques des GTZ sur le métabolisme glucido-lipidique dépend de l'ApN. Toutefois, seule la PioGTZ conduit à une amélioration significative des paramètres lipidiques (Goldberg et al., 2005). En démontrant dans cette étude que la PioGTZ peut exercer des effets directs bénéfiques sur le métabolisme hépatique et sachant qu'il est bien décrit dans la littérature que les GTZ stimulent la production d'ApN par le tissu adipeux, nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle une partie des effets exercés par le traitement PioGTZ sur le métabolisme des lipides chez les souris (étude *in vivo*) voire chez l'Homme, est due à l'action combinée de ces molécules sur les hépatocytes (**figure 45**). De plus, il convient de considérer que, *in vivo*, une augmentation des concentrations plasmatiques d'ApN induite par un traitement médicamenteux ou un régime hypocalorique correspond généralement à une amélioration du métabolisme adipocytaire avec pour conséquence une réduction de la production d'AGL et de cytokines inflammatoires. Ensemble, ces facteurs peuvent exercer des effets importants sur le foie et contribuer à l'amélioration du métabolisme lipidique, en particulier dans des situations pathologiques telles que l'obésité et le diabète.



**Figure 45 :** Schéma hypothétique représentant les effets combinés de la PioGTZ et de l'ApN sur l'activité  $\beta$ -oxydative des AG dans le foie

Les effets directs de l'ApN sur le foie, mis en évidence par l'approche *in vitro*, même s'ils ne sont pas directement transposables à l'organisme entier, ne doivent pas être négligés. En effet, il est intéressant de noter que les effets de l'ApN sur les explants sont proches de ceux exercés par la PioGTZ dans des conditions similaires et les effets bénéfiques de la PioGTZ sur les paramètres lipidiques sont bien démontrés chez l'Homme (Goldberg et al., 2005). En démontrant précédemment que la PioGTZ pouvait exercer des effets directs bénéfiques sur le métabolisme hépatique et sachant qu'il est bien décrit dans la littérature que les GTZ stimulent la production d'ApN par le tissu adipeux, nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle une partie des effets exercés par le traitement PioGTZ sur le métabolisme des lipides chez les souris (étude *in vivo*) voire chez l'Homme est due à l'action combinée de ces molécules sur les hépatocytes.

Même si certains effets bénéfiques de l'ApN n'ont pas été retrouvés sur les explants de foie issus de souris obèses, il convient de considérer que, *in vivo*, une augmentation des concentrations plasmatiques d'ApN induite par un traitement médicamenteux ou un régime hypocalorique correspond généralement à une amélioration du métabolisme adipocytaire qui a pour conséquence de réduire la production d'AGL et des cytokines inflammatoires. Ces

facteurs peuvent exercer des effets indirects importants sur le foie et contribuer à l'amélioration du métabolisme lipidique en particulier dans des situations pathologiques telles que l'obésité et le diabète.

Les mécanismes conduisant à l'association entre l'ApN et les paramètres lipidiques ne sont donc pas clairs et une question reste en suspens : **les effets bénéfiques de l'ApN sur les paramètres lipidiques sont-ils dépendants d'une induction de l'activité  $\beta$ -oxydative ?**

L'accumulation de lipides dans les cellules musculaires et hépatiques semble être un facteur déterminant dans l'établissement de la résistance à l'insuline associée à l'obésité et au diabète (Zhang et al. 2009). Par exemple, la sur-expression dans les cellules hépatiques de la malonyl-CoA décarboxylase qui catalyse la dégradation du malonyl-CoA (puissant inhibiteur du catabolisme des acides gras à longue chaîne) protège le rat de la résistance à l'insuline (An et al. 2004). Par conséquent, les facteurs stimulant l'activité béta-oxydative pourraient s'avérer bénéfiques en réduisant les lipides et leurs métabolites cytoplasmiques. Plusieurs études suggèrent que les effets de l'ApN conduisant à une amélioration du métabolisme glucido-lipidique sont liés à une induction des capacités béta-oxydatives (Yamauchi and Kadowaki, 2001). Cependant, à notre connaissance, aucune relation entre une augmentation du catabolisme des acides gras induite par l'ApN et l'amélioration des paramètres lipidiques n'a encore été clairement établie. Pourtant cette question revêt une importance particulière puisque la voie de dégradation des acides gras est directement liée à celle de la lipogenèse conduisant à la formation de TG puis à la sécrétion de lipoprotéines ; ce qui peut, à terme, modifier l'homéostasie lipidique de l'organisme entier.

**Afin d'explorer cette hypothèse il serait probant de développer un modèle animal présentant un déficit béta-oxydatif qui permettra de déterminer si l'effet qu'exerce l'ApN sur le métabolisme des lipides est la conséquence d'une augmentation du catabolisme béta-oxydatif des acides gras dans les tissus et d'en préciser les mécanismes.**

### Description du projet

#### - Etablissement d'un modèle animal présentant un déficit béta-oxydatif

Une partie du projet consistera, dans un premier temps, à déterminer les conditions du traitement qui permettront d'induire une diminution mesurée de la voie  $\beta$ -oxydative chez la souris. Nous pourrions utiliser une drogue le mildronate, connue pour ses capacités à inhiber la synthèse de la carnitine, molécule clé de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale (Degrace *et al.* 2007).

Les paramètres doses et temps de traitement seront à définir pour établir un modèle animal présentant une altération modérée de la  $\beta$ -oxydation. Il conviendra alors de déterminer les conséquences du déficit  $\beta$ -oxydatif induit par le mildronate et d'en apprécier les conséquences sur les paramètres glucido-lipidiques et sur les taux d'ApN circulante.

#### - Effets de l'ApN

Les effets bénéfiques de l'ApN sur le métabolisme lipidique seront mis en évidence chez la souris préalablement soumise à un régime riche en sucres et en graisses (HSHF) jusqu'à ce qu'elles deviennent à la fois obèses et hyperinsulinémiques. Ensuite, nous déterminerons si l'administration d'ApN (à l'aide de pompes osmotiques) est toujours capable d'améliorer les paramètres chez les animaux présentant un déficit oxydatif (**figure 46**).

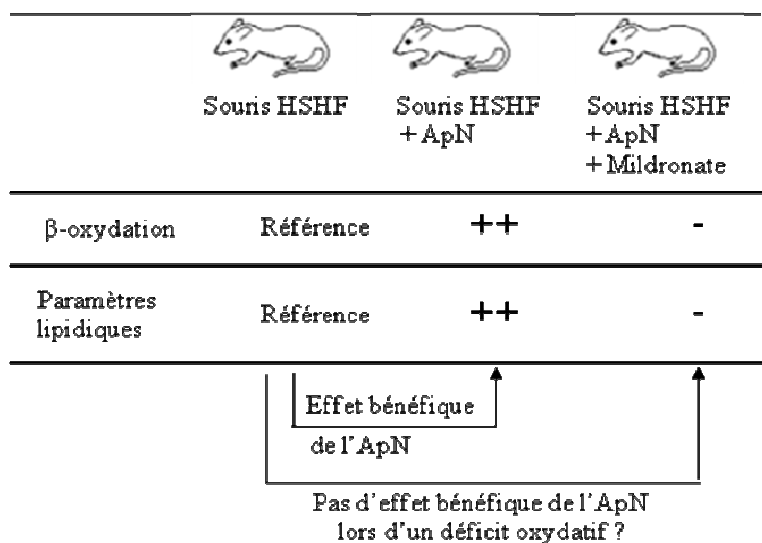


Figure 46: Schéma expérimental

L'injection d'ApN chez des souris traitées par le mildronate devrait permettre de répondre à notre question sur la relation entre l'activité  $\beta$ -oxydative et le métabolisme lipidique. En effet, si cette relation existe, l'injection d'ApN exogène devrait être beaucoup moins efficace chez des animaux traités par le mildronate, que chez des animaux sensibles à une augmentation des activités  $\beta$ -oxydatives dans le foie et le muscle. De plus, nous aurons également une approche dynamique de la modification du métabolisme des lipoprotéines par la mesure des capacités de sécrétion des VLDL et de l'uptake des HDL.

Les résultats de cette étude, associés à ceux obtenus *in vitro*, devraient permettre d'estimer si des corrélations existent entre ApN, activité  $\beta$ -oxydative et métabolisme des lipides et lipoprotéines.

# *MATERIEL & METHODES*

# I. ANIMAUX

## 1. Souris

Les animaux utilisés sont des souris mâles de souche C57BL/6 provenant de l'élevage Janvier (Le Genest Saint Isle, France). Avant traitement, les animaux sont répartis individuellement dans des cages en plastique et reçoivent à volonté l'eau et un régime commercial standard (AO4 de *l'Usine Alimentation Rationnelle*, Epinay-sur-Orge, France) sous forme de bouchons pendant une semaine afin de les acclimater à leur nouvel environnement. Ce régime représente une alimentation équilibrée qui contient 5% de lipides (composition en g par kg : 180, caséine; 460, amidon de maïs; 220, saccharose; 20, cellulose; 50, sels minéraux; 10, vitamines; 49, huile de tournesol; 1, huile de lin) et de l'eau.

## 2. Traitement des animaux

### 2.1. *Traitement des souris par la streptozotocine (STZ)*

Des souris C57BL/6 mâles âgées de 11 semaines reçoivent 5 injections intrapéritonéales de streptozotocine (STZ) (1 injection par jour à raison de 45 mg/kg de poids corporel véhiculé dans du citrate de sodium 0,05 M à pH 4,5). Le groupe témoin reçoit des injections de la solution véhicule seule. Des mesures de glycémie sont réalisées dans le but de sélectionner les souris manifestant un début de diabète. Durant 12 jours, 4 souris témoins et 4 souris diabétiques (STZ) ont ensuite libre accès à l'eau et à une alimentation standard.

### 2.2. *Traitement des souris par la Pioglitazone (PioGTZ)*

Six souris C57BL/6 mâles âgées de 11 semaines sont traitées à la Pioglitazone (PioGTZ) à raison de 10 mg/kg de poids corporel pendant 12 jours avec un libre accès à l'eau et au régime standard. Le médicament est administré *per os* après dilution dans environ 500 µL d'eau boisson.



### **2.3. Régime enrichi à l'acide linoléique conjugué (t10c12CLA)**

Durant 12 jours, 4 souris C57BL/6 mâles âgées de 11 semaines sont soumises à un régime enrichi avec 1 % de t10c12 CLA (Régime alimentaire de base enrichi avec 1% du trans-10, cis-12 18:2 (n-6) (pureté 90%) estérifiée sous forme de TG (Larodan Fine Chemicals)) sous forme de croquettes selon Degrace et al. (Degrace et al., 2004).

### **2.4. Régime hyperglucidique et hyperlipidique (HSHF)**

Des souris C57BL/6 mâles âgées de 4 semaines ont été réparties en 2 lots. Un lot de 5 animaux a été maintenu sous un régime standard tandis qu'un second lot de 30 animaux a été soumis à un régime riche en saccharose et en graisses (*High Sucrose High Fat*, HSHF) (235HF SAFE, Augy, France). Ce régime HSHF contient 20% de caséine, 13% d'amidon de maïs, 29,3% de saccharose, 5% de cellulose, 2,2 % de maltodextrine, 20% de saindoux, 2,5% d'huile de soja, 7% minéraux 205B SAFE et 1% de vitamine 200 SAFE. Après 19 semaines de régime, 22 souris HSHF présentant à la fois un surpoids et une hyperinsulinémie ont été retenues. Les animaux avaient libre accès à l'eau et au régime HSHF renouvelé quotidiennement.

## **3. Sacrifice des animaux**

Avant chaque sacrifice, Les animaux sont anesthésiés par injection intrapéritonéale d'un mélange kétamine / xylazine (7,5 mg/1 mg respectivement par 100 g de poids corporel). Le sang est récupéré en premier par ponction dans la veine cave. Un échantillon de foie frais est coupé et utilisé pour des mesures de  $\beta$ -oxydation et/ou d'incorporation des AG et le reste est congelé dans de l'azote liquide. Le muscle, le TA périépididymaire (viscéral) et inguinal (sous cutané) sont rapidement prélevés et congelés dans de l'azote liquide. Une fois le sang coagulé et centrifugé à 6000 tours pendant 5 min, le sérum est récupéré et congelé également dans de l'azote liquide. Tous les échantillons prélevés sont conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à analyse.

## II. ANALYSES BIOCHIMIQUES

### 1. Dosages sériques

#### *1.1. Dosage des protéines totales*

Les concentrations en protéines sont déterminées avec le kit BCA protein assay (Sigma) selon la méthode de Smith (Smith et al., 1985) basée sur la quantification le complexe soluble entre l'acide bicinchoninique (BCA) et les ions  $\text{Cu}^+$  formés par les protéines en présence d'ion  $\text{Cu}^{++}$ . L'albumine sérique bovine est utilisée comme étalon. La lecture est réalisée avec un lecteur de microplaque Bio-Rad (modèle 680) à 562 nm.

#### *1.2. Dosage du glucose*

La concentration du glucose est estimée par le kit « glucose-Trinder » (Sigma-Diagnostics) en utilisant la séquence glucose oxydase – peroxydase et chromogène. La mesure de la coloration (formation de quinonéimine) s'effectue à 505 nm en lecteur de microplaque.

#### *1.3. Dosage des acides gras libres (AGL)*

On utilise le kit " Non-esterified fatty acids " de chez *Wako Pure Chemical Industries* (Richmond, VA, USA). Le dosage est basé sur la mesure de  $\text{H}_2\text{O}_2$  produit lors de la formation d'un énoyl-CoA à partir d'un AGL. L'intensité du précipité pourpre, issu du dosage du peroxyde mesuré à 550 nm, est fonction de la concentration en AGL.

#### *1.4. Dosage des triglycérides totaux*

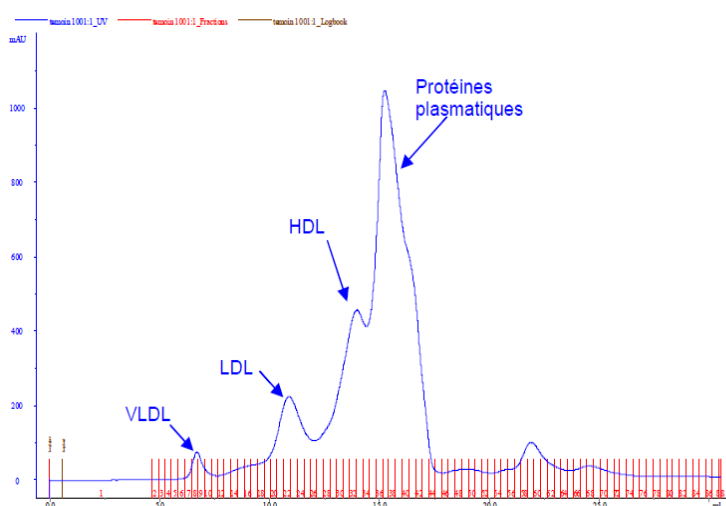
Leur concentration est quantifiée à l'aide du kit TG Enzymatique PAP150 (Biomérieux) basé sur la mesure spectrophotométrique à 505 nm de la quinoéimine formée à partir du glycérol libéré par une lipase (glycérokinase – glycérol-3-phosphate oxydase – peroxydase) et dont la coloration est proportionnelle à la quantité de TG présente dans l'échantillon.

#### *1.5. Dosage du cholestérol*

Le kit cholestérol RTU (Biomérieux) permet de doser le cholestérol en utilisant la séquence cholestérol estérase - cholestérol oxydase - peroxydase – chromogène. L'intensité de la coloration (formation de quinonéimine), mesurée à 500 nm, est proportionnelle à la quantité de cholestérol présente dans l'échantillon.

## 1.6. Profils lipoprotéiques

Les lipoprotéines totales du sérum sont séparées par Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) (ÄKTA ; Amersham Pharmacia Biotech). 200 µL de sérum sont injectés sur colonne superose 6 (Amersham Pharmacia Biotech) avec élution à raison de 0,3 mL/min d'un tampon TSE (Tris 50 mM, NaCl 9g/L, EDTA 1 mM, NaN<sub>3</sub> 0,2 g/L, pH 7,4). Les lipoprotéines sont détectées à 280 nm. A partir des profils UV obtenus (**figure 45**), le cholestérol total de chaque fraction de 0,3 mL est mesuré grâce au kit cholestérol RTU (Biomérieux), ce qui permet de déterminer la quantité de cholestérol de chaque pic de lipoprotéines selon leur profil en UV.



**Figure 45:** Exemple de profil UV (280 nm) obtenu par FPLC. L'axe des abscisses correspond au temps en minutes et l'axe des ordonnées en mAU (milli unités d'absorbance). Les espaces entre chaque trait rouge correspondent à une fraction de 0,3 mL utilisée pour le dosage du cholestérol total.

## 1.7. Apolipoprotéines A-1 et B100

Les concentrations des lipoprotéines A-1 et B100 sont déterminées par un dosage immunoturbidimétrique c'est-à-dire par immunoprécipitation en phase liquide via le kit *Orion diagnostica* (Espoo, Finlande). Le principe est basé sur la combinaison des apoA-1 ou apoB sériques avec un anticorps anti-apoA-1 ou anti-apoB100 présent dans le réactif, ce qui forme un complexe insoluble qui est mesuré par turbidimétrie. Cette turbidité est mesurée à 340 nm et la concentration des deux lipoprotéines de l'échantillon est déterminée à partir d'une courbe de calibration obtenue grâce aux standards fournis dans le kit.

### ***1.8. Dosage de l'insuline***

Ce dosage s'effectue grâce au kit « Mouse Insulin ELISA » (MercoDIA ou AbCys). La mesure est basée sur une technique immuno-enzymatique, la technique ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay), avec des anticorps anti-insuline liés à une peroxydase. Les anticorps anti-insuline liés à la microplaque réagissent avec le 3,3', 5,5'- tetramethylbenzidine. L'intensité de la réaction est mesurée par absorption à 450 nm.

### ***1.9. Dosage de l'ApN***

Les taux d'ApN sont déterminés *via* le kit « Mouse Adiponectin ELISA Kit » (AdipoGen ou AbCys). L'ApN est fixée par des anticorps spécifiques à l'adipokine murine, puis un couplage avec un substrat développe une coloration dont l'intensité est mesurée à 450 nm.

## **2. Dosages hépatiques**

### ***2.1. Intégrité des ARNs***

Les ARN totaux sont extraits des différents tissus par la technique du Tri-Reagent (Euromedex, Souffelweyersheim, France) adaptée de la procédure décrite par Chomczynski (Chomczynski and Mackey, 1995). Ensuite, une mesure au spectrophotomètre à 260 nm et à 280 nm est réalisée. La première mesure permet de quantifier les ARN totaux et la seconde mesure permet de déterminer en fonction du rapport des DO à 260 et à 280 nm la contamination protéique. Le rapport pour un "ARN" pur doit être compris entre 1,7 et 2. L'intégrité des ARN est ensuite vérifiée sur un gel agarose 1%, coloré au BET avec la présence de deux bandes (ARN ribosomiaux 28S et 18S). Après dénaturation des ARNs dans une solution dénaturante (500 µl MOPs 10X ; 500 µl formamide 50% ; 60 µl formaldéhyde 37%) à 60° C pendant 15 minutes, un mélange BET (Bromure d'Ethidium) dilué au 1/ 1000 du bleu de bromophénol et 4µg d'ARNs sont déposés sur un gel d'agarose à 1% dans une cuve remplie de MOPs 1X et mise sous tension (120 volts) pendant 45 min. Le gel est révélé par une exposition aux UV (GEL DOC 2000, Biorad).

## ***2.2. Dosage des protéines du foie***

A l'aide d'un mini broyeur à billes (Biospec Products), les échantillons de foie sont homogénéisés dans du tampon phosphate salin (PBS) (dilution 1/100 v/v). Ensuite, Les concentrations en protéines sont déterminées avec le kit BCA protein assay (Sigma) selon la méthode Smith *et al.*, (Smith *et al.*, 1985).

## ***2.3. Dosage des lipides totaux du foie***

Les lipides totaux sont extraits après broyage d'environ 200 mg de foie selon la méthode de Folch *et al.*, (1957) (Folch *et al.*, 1957) en présence d'un mélange de chloroforme, méthanol (2/1). Un aliquot de la phase chloroformique est mélangé pour moitié avec du Triton X-100 à 1% dans du chloroforme. Après évaporation du chloroforme et reprise dans de l'eau, les TG sont alors dosés grâce au kit TG PAP150 (Biomérieux).

## ***2.4. Dosage du glycogène***

La mesure du glycogène est réalisée après hydrolyse enzymatique selon (Bergmeyer *et al.*, 1974). Un homogénat de foie dilué dans 7 volumes de HClO<sub>4</sub> (0,4 M) est centrifugé à 13000 g pendant 5 min. Un volume de surnageant est neutralisé avec du K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,75 M), puis maintenu 10 min à 4 °C. Une partie de l'échantillon est mélangée à 4 volumes d'une solution d'amyloglucosidase à 10 mg/mL en milieu acétate de sodium (0,3 M ; pH 4,8). Les mélanges sont conservés à 37 °C pendant 2 h, puis centrifugés à 20000 g pendant 10 min à 4 °C. Un essai témoin est réalisé en absence d'amyloglucosidase. La quantité de glycogène correspond à la différence entre la quantité de glucose obtenu pour l'essai «amyloglucosidase» et l'essai témoin ne contenant que l'acétate de sodium. L'ensemble du protocole opératoire est également appliqué à des solutions de concentrations connues en glycogène. Le glucose est dosé selon la technique citée précédemment pour le sérum.

## ***2.5. Activité de la lipase hépatique***

L'activité de la lipase hépatique (LH) est mesurée à partir d'explants de foie frais selon la méthode décrite par Iverius *et Ostlund-Lindqvist* (Iverius *and Ostlund-Lindqvist*, 1986)

utilisant 1,67 mmol / L de trioléine émulsionnée dans du WME avec du Tri-9, 10 [3H] oléoyl-glycérol (22 kBq / essai; PerkinElmer) comme substrat. Après 2 h d'incubation à 37°C, l'activité de la LH est calculée à partir de la radioactivité libérée dans le milieu ou incorporée dans les explants de foie.

### ***2.6. Captage des lipoprotéines de haute densité (HDL)***

Dans un premier temps, une fraction HDL est isolée à partir du plasma humain par ultracentrifugation séquentielle par flottation selon la méthode décrit par Perségol *et al.* (Persegol *et al.*, 2006). Parallèlement, des molécules d'ester de cholestérol (CE) sont marquées au tritium [<sup>3</sup>H] et combinées avec La-phosphatidylcholine et butylhydroxytoluène dans un rapport molaire de 500: 1: 6, ensuite, traitées aux ultrasons pour former des liposomes. Le complexe HDL-[<sup>3</sup>H] CE a été obtenu par addition des liposomes à la fraction HDL en présence de lipoprotéines plasmatiques comme source de la protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP) après une incubation d'une nuit à 37° C sous une légère agitation. Les HDL radiomarquées ont été séparées du reste des liposomes par une seconde ultracentrifugation séquentielle et lavées deux fois dans KBr (densité de 1,21). Enfin, les HDL-[<sup>3</sup>H] CE ont été aliquotées et conservées à -80° C jusqu'à leur utilisation. Les mesures d'uptake sont réalisées par incubation de 2 explants de foie dans 1 mL de WME contenant 40 ug d'HDL-[<sup>3</sup>H] CE (0,3 mCi), à 37 ° C sous une légère agitation. Trois heures après, les explants sont retirés du milieu, lavés trois fois, et homogénéisés dans 400 ml de tampon phosphate salin (PBS) avec un mini-broyeur à billes (Biospec Products). La radioactivité retrouvée dans l'homogénat représente la quantité d'HDL captées par les cellules du foie.

### **III. EXPRESSION GENIQUE PAR RT-PCR (REVERSE TRANSCRIPTASE-POLYMERASE CHAIN REACTION) EN TEMPS REEL**

Les ARNm totaux sont extraits des différents tissus par la technique du Tri-Reagent (Euromedex, Souffelweyersheim, France) adapté de la procédure décrite par Chomczynski (Chomczynski and Mackey, 1995). L'expression des gènes est évaluée par RT-PCR semi-quantitative en temps réel. La synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc) est réalisée à partir à partir d'1 µg d'ARNm totaux grâce au kit Iscript cDNA (Bio-Rad, Marnes-La- Coquette, France). La transcription inverse et l'amplification des fragments d'ADNc sont réalisés dans

un thermocycleur 2720 thermal cycler (*Applied Biosystems*, France). Les PCR en temps réel sont réalisées sur des plaques de 96 puits à partir de 2,5 ng d'ADNc dans un volume final de 25 µL composé de 12,5 µL de Mix PCR contenant du Sybr-green (Bio-Rad S.A., France) et 300 mM de chaque amorce (sens et anti-sens). Les séquences des amorces sens et anti-sens ont été sélectionnées grâce au logiciel « Primers » et synthétisées par *MWG-Biotech AG* (Ebersberg, Allemagne). Pour chacun des gènes étudiés, les séquences des amorces sens et anti-sens ont été déterminées avec le logiciel Primers (**tableau 8**).

**Tableau 8:** séquences des différentes amorces utilisées.

Gènes	5'-sens primer-3'	5'-anti-sens primer-3'	Longueur de l'amplicon (pb)
18S	gtgtggggagtgaaatggtg	gcgagacagtcaaaccacg	60
ABCA1	ctcctgtggcttttgattc	accccgataccttgctct	66
ACC1	acaccatgttgggagttgtg	gctgttctcaggctcacat	64
ACC2	catggtagtggctttgaagga	cgtgtcgatatcgttgttctg	114
AdipoR2	gaacttctggccactctca	tccattgaaaagcacacacg	87
ApN	gccgcttatgtgtatcgctc	acattgggaacagtacgc	67
CPT-I	ggatctacaattcccctctgc	atcttaactgccgatccac	110
FAS	ggctgcagtgaatgaattg	ttcgtacctccttgcaaac	55
FAT/CD36	aattagtagaaccgggccac	ccaactcccagggtacaatca	67
G6P	tgccctggcttattgtacct	gtgctaagaggaagaccga	64
GK	actttccaggccacaaaca	tcccagaactgtaagccactc	78
Glut2	ctcttcaccaactggccct	cagcagataggccaagtagga	113
HL	gtgaatgtggggtagtggac	acttcgcagattcctccagc	129
HMGCoAred	gcctggatgggaaggagta	cttatggctctgcagcctct	90
LDLR	gattggctctgagtgccctgt	tctggctctgacactcgtc	89
LRP	gaccgactggcgaacaaat	ctgggtgttgctcctctgta	87
PEPCK	cagccagtccccattatt	ccaccaaagatgataccctca	77
PPARγ2	atcttaactgccgatccac	aggcacttctgaaaccgaca	69
SCD-1	ccggagacccttagatcga	tagcctgtaaaagatttctgcaaacc	100
SR-B1	tcccttctgcatcttctca	gttcatccaacaaacaggc	86
TNF-α	ggcctccctctcatcagtt	gatctgagtgtgagggtctgg	49
TPB	acggcacaggacttactcca	gctgtctttgtgcttctcaa	77

Les couples d'amorces ont été déterminés avec le logiciel Primers! puis ont été synthétisés par MWG-Biotech AG (Ebersberg, Allemagne). ACC, acetyl-CoA carboxylase; ABCA1, ATP-binding cassette transporter A 1; CPT-I, carnitine palmitoyltransferase I; FAS, fatty acid synthase; FAT/CD36, fatty acid translocase; G6P, glucose-6-phosphatase; Gk, glucokinase; HL, Hepatic lipase; HMG-CoA, 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase; LDLR, Low density lipoprotein receptor ; LRP, LDL receptor related protein; PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase; PPARγ2, peroxisome proliferator-activated receptor γ2; SCD-1, stearoyl-CoA desaturase-1; SR-BI, scavenger receptor class B type I; TNF-α, tumor necrosis factor-α; TBP, TATA box binding protein.

Les données sont analysées à l'aide du logiciel Bio-Rad et de Microsoft Excel. La semi quantification du nombre de copies d'ADN est calculée à partir de courbes standards pour chaque gène d'intérêt établies à l'aide de 4 dilutions (1/10 à 1/10000) d'un ADNc contrôle positif. Les résultats de chacun des gènes étudiés, sont standardisés avec une moyenne d'expression de deux gènes de référence 18S et TATA box et exprimés en unités arbitraires en choisissant la valeur 100 pour le témoin.

#### **IV. DOSAGE DE LA PHOSPHO-AMPK PAR WESTERN BLOT**

Le western blot est réalisé à partir d'explants de foie homogénéisés à l'aide d'un Potter-Elvehjem dans du PBS contenant des antiprotéases et des antiphosphatases (Roche Diagnostic) et diluée dans du tampon échantillon 2X (125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 20% de glycérol, SDS 4% , DTT, 5 mM DTT et 5% β-mercaptoéthanol). Des quantités égales de protéines ont été séparées par électrophorèse sur un gel à 8% polyacrylamide contenant 0,1% SDS et transférés sur des membranes de nitrocellulose (Hybond-ECL, Amersham Biosciences). Ces dernières sont fixées pendant 1 heure à température ambiante avec 5% de BSA dans du tampon TBST (Tris-buffered saline : 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 0,1% de Tween 20, pH 7,4). Ensuite, les membranes sont incubées, soit une nuit à 4 ° C avec un anticorps anti-phospho (p)-AMPKα (Thr172) (dilution 1:1000; signalisation cellulaire, Danvers, MA, USA), ou 1h à température ambiante avec un anticorps anti-β-actine (dilution 1:10.000; Sigma). Les membranes sont lavées avec du TBST pendant 1 h et incubées une dernière fois en présence d'un anticorps secondaire, l'anti-IgG liée à une peroxydase (dilution 1: 10 000) pendant 1 h. Les membranes sont lavées avec TBST et les spots sont révélés avec des réactifs ECL (GE Healthcare).

#### **V. MESURE DE LA CONSOMMATION D'OXYGENE DES EXPLANTS PAR OXYGRAPHIE**

La consommation d'oxygène est mesurée sur un oxygraphe (Hansatech, Norfolk, Angleterre) équipé d'une électrode de Clark. Les mesures sont réalisées 5 fois sur 1 explant placé dans une cuve thermostatée à 37°C contenant 1 ml de PBS sous agitation magnétique. L'électrode est reliée à un ordinateur *via* une interface et les signaux entrants sont détectés et analysés avec le logiciel « Oxygraph Plus V1.01 (Hansatech) ».



## VI. OXYDATION DES ACIDES GRAS

### 1. Sur les explants de foie

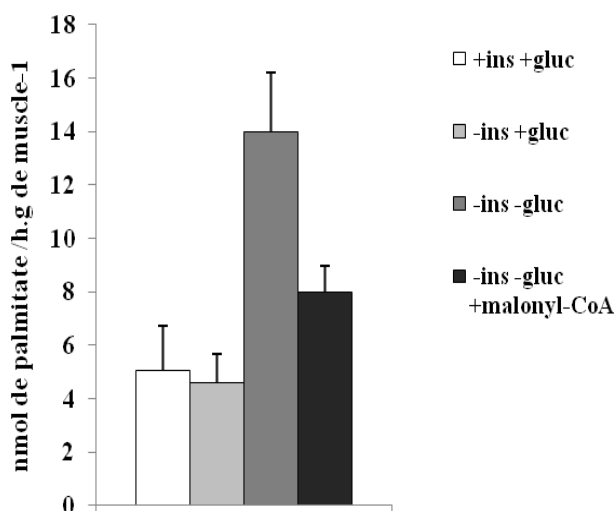
A l'issue de l'incubation, en présence d'acide palmitique marqué, les explants de foie sont rincés et broyés dans 1 mL de PBS à l'aide d'un mini broyeur à billes (Biospec Products). Cette homogénat sera réservé pour le dosage de protéines. Parallèlement, le milieu d'incubation est acidifié avec 1,5 mL d'acide perchlorique à 25%. L'acide provoque la libération du  $^{14}\text{CO}_2$  dissout dans le milieu qui est ensuite piégé par 0,4 mL d'hydroxyde de Hyamine (Packard) placée dans une louche en verre suspendue au centre du montage. La quantité de  $^{14}\text{CO}_2$  formé est estimée par scintigraphie (Tri-Carb 2900 TR). Deux heures plus tard, le milieu acidifié est filtré à travers une membrane Millipore (25 $\mu\text{m}$  de diamètre) sous léger vide de manière à retenir les AGL non réactifs et les protéines qui sont tous deux insolubles en milieu acide. Le comptage de la radioactivité du filtrat permet d'estimer la quantité de molécules d'AG dégradées jusqu'au stade des produits acido-solubles (principalement les corps cétoniques ainsi que l'acétyl-CoA, l'acétyl-carnitine). La quantité d'AG utilisée pour la  $\beta$ -oxydation est donc déterminée par la mesure de leurs produits de dégradation. Ainsi, l'oxydation totale correspond à la somme de la radioactivité portée par le  $\text{CO}_2$  libéré et les produits acido-solubles.

### 2. Sur muscle soléaire

La  $\beta$ -oxydation des AG a également été testée sur le muscle soléaire selon la méthode adaptée de Héron-Milhavet *et al.* (Heron-Milhavet et al., 2004). Le muscle soléaire fraîchement prélevé est entièrement pré-incubé 30 min à 37° C sous une forte agitation dans du milieu incubation DMEM supplémenté en glucose (5mM) et 2 % de BSA. Ensuite, le muscle est incubé pendant 2h à 37°C sous une légère agitation dans du DMEM supplémenté en cocktail d'antibiotiques-antifongiques (1%) et en L-carnitine (0,50 mM) et en présence de 0,2 mM d'acide palmitique [1- $^{14}\text{C}$ ] (55,5 GBq / mol, PerkinElmer, Courtaboeuf, France) fixés à l'albumine (Bovin Serum Albumin, BSA) dans un rapport molaire de 2,5 / 1.

Les conditions suivantes sont testées dans le but de déterminer les conditions les plus favorables à l'oxydation des AG et de valider notre modèle expérimental. Les muscles sont incubés soit en présence de glucose (5 mM) avec ou sans insuline (12.5 $\mu\text{M}$ ), soit en absence de glucose avec ou sans Malonyl-CoA (45.6  $\mu\text{M}$ ), un puissant inhibiteur de la  $\beta$ -oxydation.

Les résultats obtenus (**figure 48**) indiquent clairement que l'oxydation des AG dans le muscle soléaire est la plus élevée en absence de glucose et en absence d'insuline. De plus, dans ces mêmes conditions mais cette fois en présence de malonyl-CoA, la  $\beta$ -oxydation est inhibée quasiment de moitié. Compte tenu de ces résultats, nous retiendrons le milieu dépourvu de glucose et d'insuline pour les expérimentations ultérieures.



**Figure 48:**  $\beta$ -oxydation de l'acide palmitique dans le muscle soléaire entier de souris incubé en présence ou en absence d'insuline (12,5 $\mu$ M), de glucose (5 mM) et de malonyl-CoA (45.6  $\mu$ M).

Les résultats sont des moyennes  $\pm$  E.S.M. (n=3). Les animaux sont utilisés après un jeûne de 4 h.

## VII. CAPTAGE ET INCORPORATION DES ACIDES GRAS DANS LES DIFFERENTES CLASSES LIPIDIQUES

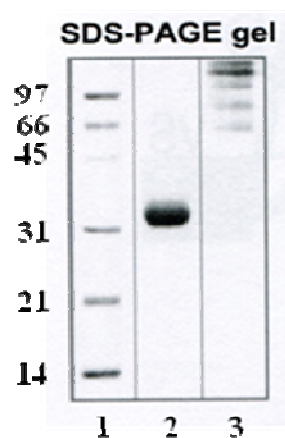
A la fin de la période d'incubation, en présence d'acide palmitique marqué, les explants de foie (environ 0,2 g) sont broyés dans 1 ml de PBS à l'aide d'un mini broyeur à billes (Biospec Products). Sur cet homogénat de foie, 0.1 mL sont réservés au dosage de protéines et le reste est mélangé à une solution de chloroforme/méthanol (1/2.25) afin d'arrêter les réactions enzymatiques et commencer l'extraction des lipides totaux qui sera réalisée selon la méthode de (Folch et al., 1957). Les différentes classes de lipides (PL : phospholipides, MG : monoglycérides, DG : diglycérides, AGL : acides gras libres TG : triacylglycérols et EC : ester de cholestérol) sont ensuite séparées par chromatographie sur couche mince de silice

dans un milieu de migration composé d'hexane / éther éthylique / acide acétique / méthanol (90/20/2/3, V/V). La radioactivité portée par ces différentes classes de lipides est mesurée en utilisant un scanner de plaque (AR-2000 imaging scanner instruction). L'analyse des radiochromatogrammes permettra de déterminer les pourcentages d'incorporation des AG dans les classes lipidiques.

## VIII. ADIPONECTINE

### 1. ApN recombinante HEK293 (AbCys)

Les différentes formes de l'ApN possèdent des effets métaboliques distincts, toutefois les formes hexamériques et la HMW-ApN sont les plus représentatives par rapport à la forme trimérique dans la circulation générale. De ce fait, nous avons choisi d'utiliser l'ApN recombinante issue de la lignée cellulaire HEK293 (human embryonic kidney 293) (AbCys, France) qui regroupe les trois formes de l'adipokine (Wang et al., 2005) (**figure 49**).



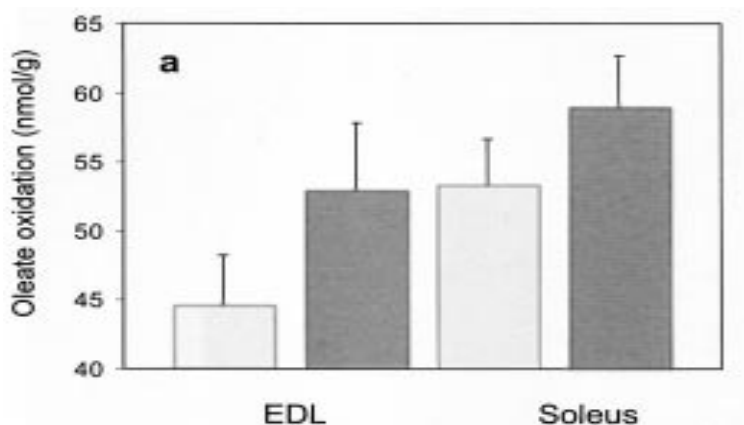
**Figure 49:** Gel SDS-PAGE à 12% d'ApN recombinante HEK29 (AbCys). Dépôt de 5µg/bande 1-Marquer de poids moléculaire. 2-Protéine dénaturée. 3-Protéine non dénaturée

L'ApN recombinante HEK293 se présente sous forme lyophilisée et est reprise dans 200 µl d'eau distillée juste avant d'être utilisée à une concentration finale de 8 µg/ml dans le milieu d'incubation.

### 2. Validation de l'efficacité biologique de l'ApN recombinante HEK293

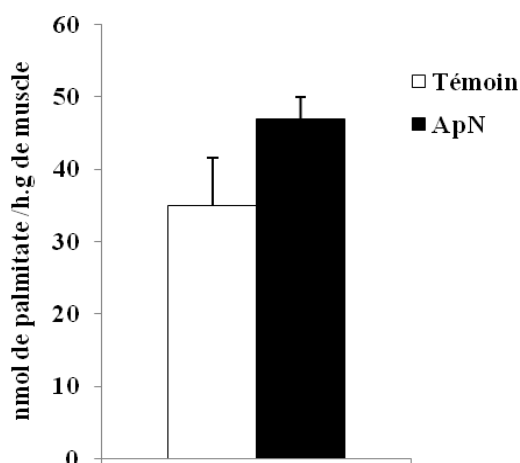
A l'heure actuelle, il est bien établi que l'ApN active la  $\beta$ -oxydation des AG dans le muscle squelettique. Les travaux de Fruebis *et al.* montrent, *in vitro*, une tendance à l'augmentation

de la  $\beta$ -oxydation dans le muscle soléaire entier incubé en présence d'ApN (2,5  $\mu\text{g/ml}$ ) pendant 90 min (Fruebis et al., 2001) (**figure 50**).



**Figure 50:**  $\beta$ -oxydation de l'acide oléique dans le muscle soléaire entier incubé en présence d'ApN (2,5  $\mu\text{g/ml}$ ) pendant 90 min selon les travaux de Fruebis et al. 2001.

Dans des conditions similaires, nous avons réalisé une mesure de  $\beta$ -oxydation du palmitate sur le muscle soléaire incubé en présence de l'ApN recombinante HEK293 (8  $\mu\text{g/ml}$ ) pendant 90 min. Les résultats obtenus indiquent que l'ApN stimule la  $\beta$ -oxydation dans le muscle soléaire ce qui prouve l'efficacité biologique de la protéine recombinante (**figure 51**).



**Figure 51 :**  $\beta$ -oxydation de l'acide palmitique dans le muscle soléaire entier de souris incubé en présence d'ApN (8  $\mu\text{g/ml}$ ) pendant 90 min. Les résultats sont des moyennes  $\pm$  E.S.M. ( $n=5$ ). Les animaux sont utilisés après un jeûne de 4 h.

### **3. Dosage de l'ApN adipocytaire**

Afin de déterminer la contenu du TA en ApN, les échantillons ont été homogénéisés grâce à un mini broyeur à billes (Biospec Products) dans 10 volumes de tampon phosphate salin (PBS). Après centrifugation à 12000 g pendant 10 min à 4 °C, les surnageants ont été recueillis avec soin à travers la couche de graisse en surface, dilués à 1/40000 dans le PBS et utilisés pour du dosage d'ApN via le kit « Mouse adiponectin ELISA kit » (AdipoGen ou AbCys).

## **IX. STATISTIQUES**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences entre les valeurs moyennes sont testées par le test non paramétrique de Mann et Whitney. Les différences significatives sont calculées pour une valeur  $p < 0.05$ .

# *BIBLIOGRAPHIE*

- Ailhaud, G., P. Grimaldi, and R. Negrel. 1992. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu Rev Nutr.* 12:207-33.
- Alberini, C.M., P. Bet, C. Milstein, and R. Sitia. 1990. Secretion of immunoglobulin M assembly intermediates in the presence of reducing agents. *Nature.* 347:485-7.
- Alvarez-Llamas, G., E. Szalowska, M.P. de Vries, D. Weening, K. Landman, A. Hoek, B.H. Wolffenbuttel, H. Roelofsen, and R.J. Vonk. 2007. Characterization of the human visceral adipose tissue secretome. *Mol Cell Proteomics.* 6:589-600.
- Andreelli, F., M. Foretz, C. Knauf, P.D. Cani, C. Perrin, M.A. Iglesias, B. Pillot, A. Bado, F. Tronche, G. Mithieux, S. Vaulont, R. Burcelin, and B. Viollet. 2006. Liver adenosine monophosphate-activated kinase- $\alpha$ 2 catalytic subunit is a key target for the control of hepatic glucose production by adiponectin and leptin but not insulin. *Endocrinology.* 147:2432-41.
- Anelli, T., M. Alessio, A. Bachi, L. Bergamelli, G. Bertoli, S. Camerini, A. Mezghrani, E. Ruffato, T. Simmen, and R. Sitia. 2003. Thiol-mediated protein retention in the endoplasmic reticulum: the role of ERp44. *EMBO J.* 22:5015-22.
- Argaud, D., T.L. Kirby, C.B. Newgard, and A.J. Lange. 1997. Stimulation of glucose-6-phosphatase gene expression by glucose and fructose-2,6-bisphosphate. *J Biol Chem.* 272:12854-61.
- Arita, Y., 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, and Y. Matsuzawa. 1999. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun.* 257:79-83.
- Arner, P. 2002. Insulin resistance in type 2 diabetes: role of fatty acids. *Diabetes Metab Res Rev.* 18 Suppl 2:S5-9.
- Arner, P. 2003. The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones. *Trends Endocrinol Metab.* 14:137-45.
- Bacci, S., C. Menzaghi, T. Ercolino, X. Ma, A. Rauseo, L. Salvemini, C. Vigna, R. Fanelli, U. Di Mario, A. Doria, and V. Trischitta. 2004. The +276 G/T single nucleotide polymorphism of the adiponectin gene is associated with coronary artery disease in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* 27:2015-20.
- Banga, A., R. Unal, P. Tripathi, I. Pokrovskaya, R.J. Owens, P.A. Kern, and G. Ranganathan. 2009. Adiponectin translation is increased by the PPAR $\gamma$  agonists pioglitazone and omega-3 fatty acids. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 296:E480-9.
- Banks, A.S., N. Kon, C. Knight, M. Matsumoto, R. Gutierrez-Juarez, L. Rossetti, W. Gu, and D. Accili. 2008. SirT1 gain of function increases energy efficiency and prevents diabetes in mice. *Cell Metab.* 8:333-41.
- Barth, N., T. Langmann, J. Scholmerich, G. Schmitz, and A. Schaffler. 2002. Identification of regulatory elements in the human adipose most abundant gene transcript-1 ( apM-1) promoter: role of SP1/SP3 and TNF- $\alpha$  as regulatory pathways. *Diabetologia.* 45:1425-33.
- Bastard, J.P., M. Maachi, J.T. Van Nhieu, C. Jardel, E. Bruckert, A. Grimaldi, J.J. Robert, J. Capeau, and B. Hainque. 2002. Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* 87:2084-9.

- Basu, R., U.B. Pajvani, R.A. Rizza, and P.E. Scherer. 2007. Selective downregulation of the high molecular weight form of adiponectin in hyperinsulinemia and in type 2 diabetes: differential regulation from nondiabetic subjects. *Diabetes*. 56:2174-7.
- Bauche, I.B., S. Ait El Mkaem, R. Rezsosazy, T. Funahashi, N. Maeda, L.M. Miranda, and S.M. Brichard. 2006. Adiponectin downregulates its own production and the expression of its AdipoR2 receptor in transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 345:1414-24.
- Bengtsson, G., and T. Olivecrona. 1980. The hepatic heparin releasable lipase binds to high density lipoproteins. *FEBS Lett*. 119:290-2.
- Berg, A.H., T.P. Combs, and P.E. Scherer. 2002. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 13:84-9.
- Berg, A.H., T.P. Combs, X. Du, M. Brownlee, and P.E. Scherer. 2001. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med*. 7:947-53.
- Berg, A.H., T.P. Combs, X. Du, M. Brownlee, and P.E. Scherer. 2001. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med*. 7:947-53.
- Berg, A.H., T.P. Combs, X. Du, M. Brownlee, and P.E. Scherer. 2001. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med*. 7:947-53.
- Berger, J., and D.E. Moller. 2002. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med*. 53:409-35.
- Berger, J., and J.A. Wagner. 2002. Physiological and therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptors. *Diabetes Technol Ther*. 4:163-74.
- Bergman, R.N., and S.D. Mittelman. 1998. Central role of the adipocyte in insulin resistance. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 9:205-21.
- Bergmeyer, H.U., D. Keppler, and K. Decker. 1974. glycogen, determination with amyloglucosidase. *Methods Enzymatic analysis*. 3:1128-1131.
- Berner, H.S., S.P. Lyngstadaas, A. Spahr, M. Monjo, L. Thommesen, C.A. Drevon, U. Syversen, and J.E. Reseland. 2004. Adiponectin and its receptors are expressed in bone-forming cells. *Bone*. 35:842-9.
- Beysen, C., E.J. Murphy, H. Nagaraja, M. Decaris, T. Riiff, A. Fong, M.K. Hellerstein, and P.J. Boyle. 2008. A pilot study of the effects of pioglitazone and rosiglitazone on de novo lipogenesis in type 2 diabetes. *J Lipid Res*. 49:2657-63.
- Bhatia, V., and P. Viswanathan. 2006. Insulin resistance and PPAR insulin sensitizers. *Curr Opin Investig Drugs*. 7:891-7.
- Bluher, M., C.J. Williams, N. Kloting, A. Hsi, K. Ruschke, A. Oberbach, M. Fasshauer, J. Berndt, M.R. Schon, A. Wolk, M. Stumvoll, and C.S. Mantzoros. 2007. Gene expression of adiponectin receptors in human visceral and subcutaneous adipose tissue is related to insulin resistance and metabolic parameters and is altered in response to physical training. *Diabetes Care*. 30:3110-5.



- Bluher, M., J.W. Bullen, Jr., J.H. Lee, S. Kralisch, M. Fasshauer, N. Klöting, J. Niebauer, M.R. Schon, C.J. Williams, and C.S. Mantzoros. 2006. Circulating adiponectin and expression of adiponectin receptors in human skeletal muscle: associations with metabolic parameters and insulin resistance and regulation by physical training. *J Clin Endocrinol Metab.* 91:2310-6.
- Bluher, M., M. Fasshauer, S. Kralisch, M.R. Schon, K. Krohn, and R. Paschke. 2005. Regulation of adiponectin receptor R1 and R2 gene expression in adipocytes of C57BL/6 mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 329:1127-32.
- Bobbert, T., H. Rochlitz, U. Wegewitz, S. Akpulat, K. Mai, M.O. Weickert, M. Mohlig, A.F. Pfeiffer, and J. Spranger. 2005. Changes of adiponectin oligomer composition by moderate weight reduction. *Diabetes.* 54:2712-9.
- Bowen, L., P.P. Stein, R. Stevenson, and G.I. Shulman. 1991. The effect of CP 68,722, a thiozolidinedione derivative, on insulin sensitivity in lean and obese Zucker rats. *Metabolism.* 40:1025-30.
- Bruce, C.R., V.A. Mertz, G.J. Heigenhauser, and D.J. Dyck. 2005. The stimulatory effect of globular adiponectin on insulin-stimulated glucose uptake and fatty acid oxidation is impaired in skeletal muscle from obese subjects. *Diabetes.* 54:3154-60.
- Bruun, J.M., A.S. Lihn, C. Verdich, S.B. Pedersen, S. Toubro, A. Astrup, and B. Richelsen. 2003. Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 285:E527-33.
- Bruun, J.M., A.S. Lihn, C. Verdich, S.B. Pedersen, S. Toubro, A. Astrup, and B. Richelsen. 2003. Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 285:E527-33.
- Bruun, J.M., A.S. Lihn, S.B. Pedersen, and B. Richelsen. 2005. Monocyte chemoattractant protein-1 release is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue (AT): implication of macrophages resident in the AT. *J Clin Endocrinol Metab.* 90:2282-9.
- Bujalska, I.J., E.A. Walker, M. Hewison, and P.M. Stewart. 2002. A switch in dehydrogenase to reductase activity of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 upon differentiation of human omental adipose stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 87:1205-10.
- Calvani, M., A. Scarfone, L. Granato, E.V. Mora, G. Nanni, M. Castagneto, A.V. Greco, M. Manco, and G. Mingrone. 2004. Restoration of adiponectin pulsatility in severely obese subjects after weight loss. *Diabetes.* 53:939-47.
- Caminos, J.E., R. Nogueiras, R. Gallego, S. Bravo, S. Tovar, T. Garcia-Caballero, F.F. Casanueva, and C. Dieguez. 2005. Expression and regulation of adiponectin and receptor in human and rat placenta. *J Clin Endocrinol Metab.* 90:4276-86.
- Cancello, R., C. Henegar, N. Viguerie, S. Taleb, C. Poitou, C. Rouault, M. Coupaye, V. Pelloux, D. Hugol, J.L. Bouillot, A. Bouloumie, G. Barbatelli, S. Cinti, P.A. Svensson, G.S. Barsh, J.D. Zucker, A. Basdevant, D. Langin, and K. Clement. 2005. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes.* 54:2277-86.

- Carr, M.C., and J.D. Brunzell. 2004. Abdominal obesity and dyslipidemia in the metabolic syndrome: importance of type 2 diabetes and familial combined hyperlipidemia in coronary artery disease risk. *J Clin Endocrinol Metab.* 89:2601-7.
- Castelein, H., T. Gulick, P.E. Declercq, G.P. Mannaerts, D.D. Moore, and M.I. Baes. 1994. The peroxisome proliferator activated receptor regulates malic enzyme gene expression. *J Biol Chem.* 269:26754-8.
- Ceddia, R.B., R. Somwar, A. Maida, X. Fang, G. Bikopoulos, and G. Sweeney. 2005. Globular adiponectin increases GLUT4 translocation and glucose uptake but reduces glycogen synthesis in rat skeletal muscle cells. *Diabetologia.* 48:132-9.
- Chandrasekar, B., D.N. Patel, S. Mummidi, J.W. Kim, R.A. Clark, and A.J. Valente. 2008. Interleukin-18 suppresses adiponectin expression in 3T3-L1 adipocytes via a novel signal transduction pathway involving ERK1/2-dependent NFATc4 phosphorylation. *J Biol Chem.* 283:4200-9.
- Chawla, A., E.J. Schwarz, D.D. Dimaculangan, and M.A. Lazar. 1994. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology.* 135:798-800.
- Chen, X., S.W. Cushman, L.K. Pannell, and S. Hess. 2005. Quantitative proteomic analysis of the secretory proteins from rat adipose cells using a 2D liquid chromatography-MS/MS approach. *J Proteome Res.* 4:570-7.
- Cheng, K.K., K.S. Lam, Y. Wang, Y. Huang, D. Carling, D. Wu, C. Wong, and A. Xu. 2007. Adiponectin-induced endothelial nitric oxide synthase activation and nitric oxide production are mediated by APPL1 in endothelial cells. *Diabetes.* 56:1387-94.
- Chiappe de Cingolani, G.E. 1986. Cyclic AMP, adenylate cyclase and cyclic AMP-phosphodiesterase activities in diabetic rat adipocytes. *Acta Physiol Pharmacol Latinoam.* 36:39-46.
- Chinetti, G., C. Zawadzki, J.C. Fruchart, and B. Staels. 2004. Expression of adiponectin receptors in human macrophages and regulation by agonists of the nuclear receptors PPARalpha, PPARgamma, and LXR. *Biochem Biophys Res Commun.* 314:151-8.
- Chomczynski, P., and K. Mackey. 1995. Short technical reports. Modification of the TRI reagent procedure for isolation of RNA from polysaccharide- and proteoglycan-rich sources. *Biotechniques.* 19:942-5.
- Chu, K.M., O.Y. Hu, L.H. Pao, and C.H. Hsiong. 2007. Pharmacokinetics of oral rosiglitazone in Taiwanese and post hoc comparisons with Caucasian, Japanese, Korean, and mainland Chinese subjects. *J Pharm Pharm Sci.* 10:411-9.
- Cinti, S., G. Mitchell, G. Barbatelli, I. Murano, E. Ceresi, E. Faloia, S. Wang, M. Fortier, A.S. Greenberg, and M.S. Obin. 2005. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res.* 46:2347-55.
- Civitaresse, A.E., C.P. Jenkinson, D. Richardson, M. Bajaj, K. Cusi, S. Kashyap, R. Berria, R. Belfort, R.A. DeFronzo, L.J. Mandarino, and E. Ravussin. 2004. Adiponectin receptors gene expression and insulin sensitivity in non-diabetic Mexican Americans with or without a family history of Type 2 diabetes. *Diabetologia.* 47:816-20.

- Cnop, M., P.J. Havel, K.M. Utzschneider, D.B. Carr, M.K. Sinha, E.J. Boyko, B.M. Retzlaff, R.H. Knopp, J.D. Brunzell, and S.E. Kahn. 2003. Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. *Diabetologia*. 46:459-69.
- Combs, T.P., A.H. Berg, M.W. Rajala, S. Klebanov, P. Iyengar, J.C. Jimenez-Chillaron, M.E. Patti, S.L. Klein, R.S. Weinstein, and P.E. Scherer. 2003. Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. *Diabetes*. 52:268-76.
- Combs, T.P., A.H. Berg, S. Obici, P.E. Scherer, and L. Rossetti. 2001. Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest*. 108:1875-81.
- Combs, T.P., U.B. Pajvani, A.H. Berg, Y. Lin, L.A. Jelicks, M. Laplante, A.R. Nawrocki, M.W. Rajala, A.F. Parlow, L. Cheeseboro, Y.Y. Ding, R.G. Russell, D. Lindemann, A. Hartley, G.R. Baker, S. Obici, Y. Deshaies, M. Ludgate, L. Rossetti, and P.E. Scherer. 2004. A transgenic mouse with a deletion in the collagenous domain of adiponectin displays elevated circulating adiponectin and improved insulin sensitivity. *Endocrinology*. 145:367-83.
- Comuzzie, A.G., T. Funahashi, G. Sonnenberg, L.J. Martin, H.J. Jacob, A.E. Black, D. Maas, M. Takahashi, S. Kihara, S. Tanaka, Y. Matsuzawa, J. Blangero, D. Cohen, and A. Kissebah. 2001. The genetic basis of plasma variation in adiponectin, a global endophenotype for obesity and the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 86:4321-5.
- Cottam, D.R., S.G. Mattar, E. Barinas-Mitchell, G. Eid, L. Kuller, D.E. Kelley, and P.R. Schauer. 2004. The chronic inflammatory hypothesis for the morbidity associated with morbid obesity: implications and effects of weight loss. *Obes Surg*. 14:589-600.
- Curat, C.A., A. Miranville, C. Sengenès, M. Diehl, C. Tonus, R. Busse, and A. Bouloumie. 2004. From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes*. 53:1285-92.
- Das, K., Y. Lin, E. Widen, Y. Zhang, and P.E. Scherer. 2001. Chromosomal localization, expression pattern, and promoter analysis of the mouse gene encoding adipocyte-specific secretory protein Acrp30. *Biochem Biophys Res Commun*. 280:1120-9.
- de Souza, C.J., M. Eckhardt, K. Gagen, M. Dong, W. Chen, D. Laurent, and B.F. Burkey. 2001. Effects of pioglitazone on adipose tissue remodeling within the setting of obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 50:1863-71.
- De Vos, P., A.M. Lefebvre, S.G. Miller, M. Guerre-Millo, K. Wong, R. Saladin, L.G. Hamann, B. Staels, M.R. Briggs, and J. Auwerx. 1996. Thiazolidinediones repress ob gene expression in rodents via activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Clin Invest*. 98:1004-9.
- Debard, C., M. Laville, V. Berbe, E. Loizon, C. Guillet, B. Morio-Liondore, Y. Boirie, and H. Vidal. 2004. Expression of key genes of fatty acid oxidation, including adiponectin receptors, in skeletal muscle of Type 2 diabetic patients. *Diabetologia*. 47:917-25.

- Degrace, P., B. Moindrot, I. Mohamed, J. Gresti, Z.Y. Du, J.M. Chardigny, J.L. Sebedio, and P. Clouet. 2006. Upregulation of liver VLDL receptor and FAT/CD36 expression in LDLR<sup>-/-</sup> apoB100/100 mice fed trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid. *J Lipid Res.* 47:2647-55.
- Degrace, P., L. Demizieux, J. Gresti, J.M. Chardigny, J.L. Sebedio, and P. Clouet. 2003. Association of liver steatosis with lipid oversecretion and hypotriglyceridaemia in C57BL/6j mice fed trans-10,cis-12-linoleic acid. *FEBS Lett.* 546:335-9.
- Degrace, P., L. Demizieux, J. Gresti, J.M. Chardigny, J.L. Sebedio, and P. Clouet. 2004. Hepatic steatosis is not due to impaired fatty acid oxidation capacities in C57BL/6J mice fed the conjugated trans-10,cis-12-isomer of linoleic acid. *J Nutr.* 134:861-7.
- Degrace, P., L. Demizieux, Z.Y. Du, J. Gresti, L. Caverot, L. Djaouti, T. Jourdan, B. Moindrot, J.C. Guillaud, J.F. Hocquette, and P. Clouet. 2007. Regulation of lipid flux between liver and adipose tissue during transient hepatic steatosis in carnitine-depleted rats. *J Biol Chem.* 282:20816-26.
- Delaigle, A.M., M. Senou, Y. Guiot, M.C. Many, and S.M. Brichard. 2006. Induction of adiponectin in skeletal muscle of type 2 diabetic mice: In vivo and in vitro studies. *Diabetologia.* 49:1311-23.
- Delaney, C.A., A. Dunger, M. Di Matteo, J.M. Cunningham, M.H. Green, and I.C. Green. 1995. Comparison of inhibition of glucose-stimulated insulin secretion in rat islets of Langerhans by streptozotocin and methyl and ethyl nitrosoureas and methanesulphonates. Lack of correlation with nitric oxide-releasing or O6-alkylating ability. *Biochem Pharmacol.* 50:2015-20.
- Delporte, M.L., S.A. El Mkaem, M. Quisquater, and S.M. Brichard. 2004. Leptin treatment markedly increased plasma adiponectin but barely decreased plasma resistin of ob/ob mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 287:E446-53.
- Delporte, M.L., S.M. Brichard, M.P. Hermans, C. Beguin, and M. Lambert. 2003. Hyperadiponectinaemia in anorexia nervosa. *Clin Endocrinol (Oxf).* 58:22-9.
- Delporte, M.L., T. Funahashi, M. Takahashi, Y. Matsuzawa, and S.M. Brichard. 2002. Pre- and post-translational negative effect of beta-adrenoceptor agonists on adiponectin secretion: in vitro and in vivo studies. *Biochem J.* 367:677-85.
- Despres, J.P., S. Moorjani, P.J. Lupien, A. Tremblay, A. Nadeau, and C. Bouchard. 1992. Genetic aspects of susceptibility to obesity and related dyslipidemias. *Mol Cell Biochem.* 113:151-69.
- Di Gregorio, G.B., L. Hensley, T. Lu, G. Ranganathan, and P.A. Kern. 2004. Lipid and carbohydrate metabolism in mice with a targeted mutation in the IL-6 gene: absence of development of age-related obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 287:E182-7.
- Dias-Gunasekara, S., and A.M. Benham. 2005. Defining the protein-protein interactions of the mammalian endoplasmic reticulum oxidoreductases (EROs). *Biochem Soc Trans.* 33:1382-4.
- Djaouti, L., T. Jourdan, L. Demizieux, M. Chevrot, J. Gresti, B. Verges, and P. Degrace. 2010. Different effects of pioglitazone and rosiglitazone on lipid metabolism in mouse cultured liver explants. *Diabetes Metab Res Rev.* 26:297-305.

- Doran, A.C., N. Meller, A. Cutchins, H. Deliri, R.P. Slayton, S.N. Oldham, J.B. Kim, S.R. Keller, and C.A. McNamara. 2008. The helix-loop-helix factors Id3 and E47 are novel regulators of adiponectin. *Circ Res.* 103:624-34.
- Ebinuma, H., T. Miida, T. Yamauchi, Y. Hada, K. Hara, N. Kubota, and T. Kadowaki. 2007. Improved ELISA for selective measurement of adiponectin multimers and identification of adiponectin in human cerebrospinal fluid. *Clin Chem.* 53:1541-4.
- Einstein, F.H., G. Atzmon, X.M. Yang, X.H. Ma, M. Rincon, E. Rudin, R. Muzumdar, and N. Barzilai. 2005. Differential responses of visceral and subcutaneous fat depots to nutrients. *Diabetes.* 54:672-8.
- Elbrecht, A., Y. Chen, C.A. Cullinan, N. Hayes, M. Leibowitz, D.E. Moller, and J. Berger. 1996. Molecular cloning, expression and characterization of human peroxisome proliferator activated receptors gamma 1 and gamma 2. *Biochem Biophys Res Commun.* 224:431-7.
- Esposito, K., A. Pontillo, M. Ciotola, C. Di Palo, E. Grella, G. Nicoletti, and D. Giugliano. 2002. Weight loss reduces interleukin-18 levels in obese women. *J Clin Endocrinol Metab.* 87:3864-6.
- Fain, J.N., A.K. Madan, M.L. Hiler, P. Cheema, and S.W. Bahouth. 2004. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology.* 145:2273-82.
- Fain, J.N., D.S. Tichansky, and A.K. Madan. 2006. Most of the interleukin 1 receptor antagonist, cathepsin S, macrophage migration inhibitory factor, nerve growth factor, and interleukin 18 release by explants of human adipose tissue is by the non-fat cells, not by the adipocytes. *Metabolism.* 55:1113-21.
- Fallo, F., A. Scarda, N. Sonino, A. Paoletta, M. Boscaro, C. Pagano, G. Federspil, and R. Vettor. 2004. Effect of glucocorticoids on adiponectin: a study in healthy subjects and in Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol.* 150:339-44.
- Fasshauer, M., J. Klein, S. Kralisch, M. Klier, U. Lossner, M. Bluher, and R. Paschke. 2004. Growth hormone is a positive regulator of adiponectin receptor 2 in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett.* 558:27-32.
- Fasshauer, M., J. Klein, S. Neumann, M. Eszlinger, and R. Paschke. 2002. Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 290:1084-9.
- Fasshauer, M., J. Klein, S. Neumann, M. Eszlinger, and R. Paschke. 2002. Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 290:1084-9.
- Fasshauer, M., J. Klein, S. Neumann, M. Eszlinger, and R. Paschke. 2001. Adiponectin gene expression is inhibited by beta-adrenergic stimulation via protein kinase A in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett.* 507:142-6.

- Fasshauer, M., S. Kralisch, M. Klier, U. Lossner, M. Bluher, J. Klein, and R. Paschke. 2003. Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 301:1045-50.
- Faust, I.M., P.R. Johnson, J.S. Stern, and J. Hirsch. 1978. Diet-induced adipocyte number increase in adult rats: a new model of obesity. *Am J Physiol.* 235:E279-86.
- Fernandez-Real, J.M., M. Vayreda, C. Richart, C. Gutierrez, M. Broch, J. Vendrell, and W. Ricart. 2001. Circulating interleukin 6 levels, blood pressure, and insulin sensitivity in apparently healthy men and women. *J Clin Endocrinol Metab.* 86:1154-9.
- Ferrannini, E. 1993. Syndrome X. *Horm Res.* 39 Suppl 3:107-11.
- Ferre, P. 2004. The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes.* 53 Suppl 1:S43-50.
- Finck, B.N., and R.W. Johnson. 2000. Tumor necrosis factor (TNF)-alpha induces leptin production through the p55 TNF receptor. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 278:R537-43.
- Fisher, F.M., P.G. McTernan, G. Valsamakis, R. Chetty, A.L. Harte, A.J. Anwar, J. Starcynski, J. Crocker, A.H. Barnett, C.L. McTernan, and S. Kumar. 2002. Differences in adiponectin protein expression: effect of fat depots and type 2 diabetic status. *Horm Metab Res.* 34:650-4.
- Flachs, P., V. Mohamed-Ali, O. Horakova, M. Rossmeisl, M.J. Hosseinzadeh-Attar, M. Hensler, J. Ruzickova, and J. Kopecky. 2006. Polyunsaturated fatty acids of marine origin induce adiponectin in mice fed a high-fat diet. *Diabetologia.* 49:394-7.
- Folch, J., M. Lees, and G.H. Sloane Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem.* 226:497-509.
- Folch, J., M. Lees, and G.H. Sloane Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem.* 226:497-509.
- Fox, C.S., J.M. Massaro, U. Hoffmann, K.M. Pou, P. Maurovich-Horvat, C.Y. Liu, R.S. Vasan, J.M. Murabito, J.B. Meigs, L.A. Cupples, R.B. D'Agostino, Sr., and C.J. O'Donnell. 2007. Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation.* 116:39-48.
- Frayn, K.N. 2000. Visceral fat and insulin resistance--causative or correlative? *Br J Nutr.* 83 Suppl 1:S71-7.
- Frescas, D., L. Valenti, and D. Accili. 2005. Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via Sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenetic genes. *J Biol Chem.* 280:20589-95.
- Fruebis, J., T.S. Tsao, S. Javorschi, D. Ebbets-Reed, M.R. Erickson, F.T. Yen, B.E. Bihain, and H.F. Lodish. 2001. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:2005-10.

- Fruebis, J., T.S. Tsao, S. Javorschi, D. Ebbets-Reed, M.R. Erickson, F.T. Yen, B.E. Bihain, and H.F. Lodish. 2001. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:2005-10.
- Fruebis, J., T.S. Tsao, S. Javorschi, D. Ebbets-Reed, M.R. Erickson, F.T. Yen, B.E. Bihain, and H.F. Lodish. 2001. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:2005-10.
- Fu, Y., N. Luo, R.L. Klein, and W.T. Garvey. 2005. Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. *J Lipid Res*. 46:1369-79.
- Gavrila, A., C.K. Peng, J.L. Chan, J.E. Mietus, A.L. Goldberger, and C.S. Mantzoros. 2003. Diurnal and ultradian dynamics of serum adiponectin in healthy men: comparison with leptin, circulating soluble leptin receptor, and cortisol patterns. *J Clin Endocrinol Metab*. 88:2838-43.
- Gavrilova, O., M. Haluzik, K. Matsusue, J.J. Cutson, L. Johnson, K.R. Dietz, C.J. Nicol, C. Vinson, F.J. Gonzalez, and M.L. Reitman. 2003. Liver peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass. *J Biol Chem*. 278:34268-76.
- Goldberg, R.B., D.M. Kendall, M.A. Deeg, J.B. Buse, A.J. Zagar, J.A. Pinaire, M.H. Tan, M.A. Khan, A.T. Perez, and S.J. Jacober. 2005. A comparison of lipid and glycemic effects of pioglitazone and rosiglitazone in patients with type 2 diabetes and dyslipidemia. *Diabetes Care*. 28:1547-54.
- Goldberg, R.B., D.M. Kendall, M.A. Deeg, J.B. Buse, A.J. Zagar, J.A. Pinaire, M.H. Tan, M.A. Khan, A.T. Perez, and S.J. Jacober. 2005. A comparison of lipid and glycemic effects of pioglitazone and rosiglitazone in patients with type 2 diabetes and dyslipidemia. *Diabetes Care*. 28:1547-54.
- Granlund, L., L.K. Juvet, J.I. Pedersen, and H.I. Nebb. 2003. Trans10, cis12-conjugated linoleic acid prevents triacylglycerol accumulation in adipocytes by acting as a PPARgamma modulator. *J Lipid Res*. 44:1441-52.
- Graulet, B., D. Gruffat, D. Durand, and D. Bauchart. 1998. Fatty acid metabolism and very low density lipoprotein secretion in liver slices from rats and preruminant calves. *J Biochem*. 124:1212-9.
- Groot, P.H., H. Jansen, and A. Van Tol. 1981. Selective degradation of the high density lipoprotein-2 subfraction by heparin-releasable liver lipase. *FEBS Lett*. 129:269-72.
- Guerre-Millo, M. 2008. Adiponectin: an update. *Diabetes Metab*. 34:12-8.
- Gurnell, M., J.M. Wentworth, M. Agostini, M. Adams, T.N. Collingwood, C. Provenzano, P.O. Browne, O. Rajanayagam, T.P. Burris, J.W. Schwabe, M.A. Lazar, and V.K. Chatterjee. 2000. A dominant-negative peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) mutant is a constitutive repressor and inhibits PPARgamma-mediated adipogenesis. *J Biol Chem*. 275:5754-9.

- Guzman, M., G. Velasco, and M.J. Geelen. 2000. Do cytoskeletal components control fatty acid translocation into liver mitochondria? *Trends Endocrinol Metab.* 11:49-53.
- Hada, Y., T. Yamauchi, H. Waki, A. Tsuchida, K. Hara, H. Yago, O. Miyazaki, H. Ebinuma, and T. Kadowaki. 2007. Selective purification and characterization of adiponectin multimer species from human plasma. *Biochem Biophys Res Commun.* 356:487-93.
- Haffner, S.M. 2002. Lipoprotein disorders associated with type 2 diabetes mellitus and insulin resistance. *Am J Cardiol.* 90:55i-61i.
- Halberg, N., T.D. Schraw, Z.V. Wang, J.Y. Kim, J. Yi, M.P. Hamilton, K. Luby-Phelps, and P.E. Scherer. 2009. Systemic fate of the adipocyte-derived factor adiponectin. *Diabetes.* 58:1961-70.
- Hallakou, S., L. Doare, F. Fougelle, M. Kergoat, M. Guerre-Millo, M.F. Berthault, I. Dugail, J. Morin, J. Auwerx, and P. Ferre. 1997. Pioglitazone induces in vivo adipocyte differentiation in the obese Zucker fa/fa rat. *Diabetes.* 46:1393-9.
- Halleux, C.M., M. Takahashi, M.L. Delporte, R. Detry, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, and S.M. Brichard. 2001. Secretion of adiponectin and regulation of apM1 gene expression in human visceral adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 288:1102-7.
- Haque, W.A., I. Shimomura, Y. Matsuzawa, and A. Garg. 2002. Serum adiponectin and leptin levels in patients with lipodystrophies. *J Clin Endocrinol Metab.* 87:2395.
- Hara, K., M. Horikoshi, T. Yamauchi, H. Yago, O. Miyazaki, H. Ebinuma, Y. Imai, R. Nagai, and T. Kadowaki. 2006. Measurement of the high-molecular weight form of adiponectin in plasma is useful for the prediction of insulin resistance and metabolic syndrome. *Diabetes Care.* 29:1357-62.
- Hara, K., P. Boutin, Y. Mori, K. Tobe, C. Dina, K. Yasuda, T. Yamauchi, S. Otabe, T. Okada, K. Eto, H. Kadowaki, R. Hagura, Y. Akanuma, Y. Yazaki, R. Nagai, M. Taniyama, K. Matsubara, M. Yoda, Y. Nakano, M. Tomita, S. Kimura, C. Ito, P. Froguel, and T. Kadowaki. 2002. Genetic variation in the gene encoding adiponectin is associated with an increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetes.* 51:536-40.
- Harman-Boehm, I., M. Bluher, H. Redel, N. Sion-Vardy, S. Ovadia, E. Avinoach, I. Shai, N. Kloting, M. Stumvoll, N. Bashan, and A. Rudich. 2007. Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 92:2240-7.
- Hawkins, M., N. Barzilai, R. Liu, M. Hu, W. Chen, and L. Rossetti. 1997. Role of the glucosamine pathway in fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest.* 99:2173-82.
- He, W., Y. Barak, A. Hevener, P. Olson, D. Liao, J. Le, M. Nelson, E. Ong, J.M. Olefsky, and R.M. Evans. 2003. Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:15712-7.



- Heller, B., A. Burkle, J. Radons, E. Fengler, A. Jalowy, M. Muller, V. Burkart, and H. Kolb. 1994. Analysis of oxygen radical toxicity in pancreatic islets at the single cell level. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 375:597-602.
- Hernandez-Diaz, G., A. Alexander-Aguilera, A. Arzaba-Villalba, I. Soto-Rodriguez, and H.S. Garcia. Effect of conjugated linoleic acid on body fat, tumor necrosis factor alpha and resistin secretion in spontaneously hypertensive rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 82:105-9.
- Heron-Milhavet, L., M. Haluzik, S. Yakar, O. Gavrilova, S. Pack, W.C. Jou, A. Ibrahimi, H. Kim, D. Hunt, D. Yau, Z. Asghar, J. Joseph, M.B. Wheeler, N.A. Abumrad, and D. LeRoith. 2004. Muscle-specific overexpression of CD36 reverses the insulin resistance and diabetes of MKR mice. *Endocrinology*. 145:4667-76.
- Hevener, A.L., W. He, Y. Barak, J. Le, G. Bandyopadhyay, P. Olson, J. Wilkes, R.M. Evans, and J. Olefsky. 2003. Muscle-specific Pparg deletion causes insulin resistance. *Nat Med*. 9:1491-7.
- Holst, D., and P.A. Grimaldi. 2002. New factors in the regulation of adipose differentiation and metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 13:241-5.
- Hotamisligil, G.S., N.S. Shargill, and B.M. Spiegelman. 1993. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 259:87-91.
- Hotta, K., T. Funahashi, N.L. Bodkin, H.K. Ortmeyer, Y. Arita, B.C. Hansen, and Y. Matsuzawa. 2001. Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes*. 50:1126-33.
- Hotta, K., 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, and Y. Matsuzawa. 2000. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 20:1595-9.
- Hu, E., P. Liang, and B.M. Spiegelman. 1996. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem*. 271:10697-703.
- Hug, C., J. Wang, N.S. Ahmad, J.S. Bogan, T.S. Tsao, and H.F. Lodish. 2004. T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:10308-13.
- Huypens, P. 2007. Leptin controls adiponectin production via the hypothalamus. *Med Hypotheses*. 68:87-90.
- Huypens, P., and E. Quartier. 2006. Adiponectin expression is paradoxically increased in gold-thioglucose-induced obesity. *Horm Metab Res*. 38:486-90.
- Im, J.A., S.H. Kim, J.W. Lee, J.Y. Shim, H.R. Lee, and D.C. Lee. 2006. Association between hypoadiponectinemia and cardiovascular risk factors in nonobese healthy adults. *Metabolism*. 55:1546-50.

- Imagawa, A., T. Funahashi, T. Nakamura, M. Moriwaki, S. Tanaka, H. Nishizawa, K. Sayama, S. Uno, H. Iwahashi, K. Yamagata, J. Miyagawa, and Y. Matsuzawa. 2002. Elevated serum concentration of adipose-derived factor, adiponectin, in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 25:1665-6.
- Iverius, P.H., and A.M. Ostlund-Lindqvist. 1986. Preparation, characterization, and measurement of lipoprotein lipase. *Methods Enzymol*. 129:691-704.
- Iwaki, M., M. Matsuda, N. Maeda, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, M. Makishima, and I. Shimomura. 2003. Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes*. 52:1655-63.
- Jansen, H., A. van Tol, and W.C. Hulsmann. 1980. On the metabolic function of heparin-releasable liver lipase. *Biochem Biophys Res Commun*. 92:53-9.
- Jourdan, T., L. Djaouti, L. Demizieux, J. Gresti, B. Verges, and P. Degrace. 2009. Liver carbohydrate and lipid metabolism of insulin-deficient mice is altered by trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid. *J Nutr*. 139:1901-7.
- Juge-Aubry, C.E., E. Henrichot, and C.A. Meier. 2005. Adipose tissue: a regulator of inflammation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 19:547-66.
- Kado, S., T. Nagase, and N. Nagata. 1999. Circulating levels of interleukin-6, its soluble receptor and interleukin-6/interleukin-6 receptor complexes in patients with type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol*. 36:67-72.
- Kadowaki, H., G.M. Patton, and S.J. Robins. 1992. Metabolism of high density lipoprotein lipids by the rat liver: evidence for participation of hepatic lipase in the uptake of cholesteryl ester. *J Lipid Res*. 33:1689-98.
- Kadowaki, T., and T. Yamauchi. 2005. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev*. 26:439-51.
- Kadowaki, T., T. Yamauchi, N. Kubota, K. Hara, K. Ueki, and K. Tobe. 2006. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 116:1784-92.
- Kahn, B.B., T. Alquier, D. Carling, and D.G. Hardie. 2005. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab*. 1:15-25.
- Kallen, C.B., and M.A. Lazar. 1996. Antidiabetic thiazolidinediones inhibit leptin (ob) gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:5793-6.
- Kappes, A., and G. Loffler. 2000. Influences of ionomycin, dibutyryl-cycloAMP and tumour necrosis factor-alpha on intracellular amount and secretion of apM1 in differentiating primary human preadipocytes. *Horm Metab Res*. 32:548-54.
- Kappes, A., and G. Loffler. 2000. Influences of ionomycin, dibutyryl-cycloAMP and tumour necrosis factor-alpha on intracellular amount and secretion of apM1 in differentiating primary human preadipocytes. *Horm Metab Res*. 32:548-54.

- Kelly, A.S., and A.J. Bank. 2007. The cardiovascular effects of the thiazolidinediones: a review of the clinical data. *J Diabetes Complications*. 21:326-34.
- Kershaw, E.E., N.M. Morton, H. Dhillon, L. Ramage, J.R. Seckl, and J.S. Flier. 2005. Adipocyte-specific glucocorticoid inactivation protects against diet-induced obesity. *Diabetes*. 54:1023-31.
- Kersten, S., S. Mandard, N.S. Tan, P. Escher, D. Metzger, P. Chambon, F.J. Gonzalez, B. Desvergne, and W. Wahli. 2000. Characterization of the fasting-induced adipose factor FIAF, a novel peroxisome proliferator-activated receptor target gene. *J Biol Chem*. 275:28488-93.
- Kharroubi, I., J. Rasschaert, D.L. Eizirik, and M. Cnop. 2003. Expression of adiponectin receptors in pancreatic beta cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 312:1118-22.
- Kim, H.B., M. Kong, T.M. Kim, Y.H. Suh, W.H. Kim, J.H. Lim, J.H. Song, and M.H. Jung. 2006. NFATc4 and ATF3 negatively regulate adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes*. 55:1342-52.
- Kim, J.Y., E. van de Wall, M. Laplante, A. Azzara, M.E. Trujillo, S.M. Hofmann, T. Schraw, J.L. Durand, H. Li, G. Li, L.A. Jelicks, M.F. Mehler, D.Y. Hui, Y. Deshaies, G.I. Shulman, G.J. Schwartz, and P.E. Scherer. 2007a. Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J Clin Invest*. 117:2621-37.
- Kim, K.Y., J.K. Kim, J.H. Jeon, S.R. Yoon, I. Choi, and Y. Yang. 2005. c-Jun N-terminal kinase is involved in the suppression of adiponectin expression by TNF-alpha in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 327:460-7.
- Kim, S.K., K.Y. Hur, H.J. Kim, W.S. Shim, C.W. Ahn, S.W. Park, Y.W. Cho, S.K. Lim, H.C. Lee, and B.S. Cha. 2007b. The increase in abdominal subcutaneous fat depot is an independent factor to determine the glycemic control after rosiglitazone treatment. *Eur J Endocrinol*. 157:167-74.
- Kita, A., H. Yamasaki, H. Kuwahara, A. Moriuchi, K. Fukushima, M. Kobayashi, T. Fukushima, R. Takahashi, N. Abiru, S. Uotani, E. Kawasaki, and K. Eguchi. 2005. Identification of the promoter region required for human adiponectin gene transcription: Association with CCAAT/enhancer binding protein-beta and tumor necrosis factor-alpha. *Biochem Biophys Res Commun*. 331:484-90.
- Kletzien, R.F., S.D. Clarke, and R.G. Ulrich. 1992. Enhancement of adipocyte differentiation by an insulin-sensitizing agent. *Mol Pharmacol*. 41:393-8.
- Kobayashi, H., N. Ouchi, S. Kihara, K. Walsh, M. Kumada, Y. Abe, T. Funahashi, and Y. Matsuzawa. 2004. Selective suppression of endothelial cell apoptosis by the high molecular weight form of adiponectin. *Circ Res*. 94:e27-31.
- Koenen, T.B., C.J. Tack, J.M. Kroese, A.R. Hermus, F.C. Sweep, J. van der Laak, A.F. Stalenhoef, J. de Graaf, L.J. van Tits, and R. Stienstra. 2009. Pioglitazone treatment enlarges subcutaneous adipocytes in insulin-resistant patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 94:4453-7.
- Kopp, H.P., K. Krzyzanowska, M. Mohlig, J. Spranger, A.F. Pfeiffer, and G. Schernthaner. 2005. Effects of marked weight loss on plasma levels of adiponectin, markers of chronic subclinical inflammation and insulin resistance in morbidly obese women. *Int J Obes (Lond)*. 29:766-71.

- Kozarsky, K.F., M.H. Donahee, A. Rigotti, S.N. Iqbal, E.R. Edelman, and M. Krieger. 1997. Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. *Nature*. 387:414-7.
- Krause, M.P., Y. Liu, V. Vu, L. Chan, A. Xu, M.C. Riddell, G. Sweeney, and T.J. Hawke. 2008. Adiponectin is expressed by skeletal muscle fibers and influences muscle phenotype and function. *Am J Physiol Cell Physiol*. 295:C203-12.
- Krebs, J.D., L.M. Browning, N.K. McLean, J.L. Rothwell, G.D. Mishra, C.S. Moore, and S.A. Jebb. 2006. Additive benefits of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and weight-loss in the management of cardiovascular disease risk in overweight hyperinsulinaemic women. *Int J Obes (Lond)*. 30:1535-44.
- Krogh-Madsen, R., P. Plomgaard, P. Keller, C. Keller, and B.K. Pedersen. 2004. Insulin stimulates interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha gene expression in human subcutaneous adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 286:E234-8.
- Krotkiewski, M., P. Bjorntorp, L. Sjostrom, and U. Smith. 1983. Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution. *J Clin Invest*. 72:1150-62.
- Kubota, N., W. Yano, T. Kubota, T. Yamauchi, S. Itoh, H. Kumagai, H. Kozono, I. Takamoto, S. Okamoto, T. Shiuchi, R. Suzuki, H. Satoh, A. Tsuchida, M. Moroi, K. Sugi, T. Noda, H. Ebinuma, Y. Ueta, T. Kondo, E. Araki, O. Ezaki, R. Nagai, K. Tobe, Y. Terauchi, K. Ueki, Y. Minokoshi, and T. Kadowaki. 2007. Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. *Cell Metab*. 6:55-68.
- Kubota, N., Y. Terauchi, T. Kubota, H. Kumagai, S. Itoh, H. Satoh, W. Yano, H. Ogata, K. Tokuyama, I. Takamoto, T. Mineyama, M. Ishikawa, M. Moroi, K. Sugi, T. Yamauchi, K. Ueki, K. Tobe, T. Noda, R. Nagai, and T. Kadowaki. 2006. Pioglitazone ameliorates insulin resistance and diabetes by both adiponectin-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem*. 281:8748-55.
- Kubota, N., Y. Terauchi, T. Yamauchi, T. Kubota, M. Moroi, J. Matsui, K. Eto, T. Yamashita, J. Kamon, H. Satoh, W. Yano, P. Froguel, R. Nagai, S. Kimura, T. Kadowaki, and T. Noda. 2002. Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J Biol Chem*. 277:25863-6.
- Kusminski, C.M., P.G. McTernan, T. Schraw, K. Kos, J.P. O'Hare, R. Ahima, S. Kumar, and P.E. Scherer. 2007. Adiponectin complexes in human cerebrospinal fluid: distinct complex distribution from serum. *Diabetologia*. 50:634-42.
- Kuusi, T., P. Saarinen, and E.A. Nikkila. 1980. Evidence for the role of hepatic endothelial lipase in the metabolism of plasma high density lipoprotein2 in man. *Atherosclerosis*. 36:589-93.
- Lafontan, M., L. Dang-Tran, and M. Berlan. 1979. Alpha-adrenergic antilipolytic effect of adrenaline in human fat cells of the thigh: comparison with adrenaline responsiveness of different fat deposits. *Eur J Clin Invest*. 9:261-6.
- Lambert, G., M.B. Chase, K. Dugi, A. Bensadoun, H.B. Brewer, Jr., and S. Santamarina-Fojo. 1999. Hepatic lipase promotes the selective uptake of high density lipoprotein-cholesteryl esters via the scavenger receptor B1. *J Lipid Res*. 40:1294-303.

- Lara-Castro, C., N. Luo, P. Wallace, R.L. Klein, and W.T. Garvey. 2006. Adiponectin multimeric complexes and the metabolic syndrome trait cluster. *Diabetes*. 55:249-59.
- Larsen, T.M., S. Toubro, and A. Astrup. 2003. PPARgamma agonists in the treatment of type II diabetes: is increased fatness commensurate with long-term efficacy? *Int J Obes Relat Metab Disord*. 27:147-61.
- Lau, D.C., B. Dhillon, H. Yan, P.E. Szmitko, and S. Verma. 2005. Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 288:H2031-41.
- Lefils, J., A. Geloën, H. Vidal, M. Lagarde, and N. Bernoud-Hubac. 2010. Dietary DHA: time course of tissue uptake and effects on cytokine secretion in mice. *Br J Nutr*:1-9.
- Lefils, J., A. Geloën, H. Vidal, M. Lagarde, and N. Bernoud-Hubac. 2010. Dietary DHA: time course of tissue uptake and effects on cytokine secretion in mice. *Br J Nutr*:1-9.
- Leyvraz, C., M. Suter, C. Verdumo, J.M. Calmes, A. Paroz, C. Darimont, R.C. Gaillard, F.P. Pralong, and V. Giusti. Selective effects of PPARgamma agonists and antagonists on human pre-adipocyte differentiation. *Diabetes Obes Metab*. 12:195-203.
- Leyvraz, C., M. Suter, C. Verdumo, J.M. Calmes, A. Paroz, C. Darimont, R.C. Gaillard, F.P. Pralong, and V. Giusti. 2010. Selective effects of PPARgamma agonists and antagonists on human pre-adipocyte differentiation. *Diabetes Obes Metab*. 12:195-203.
- Li, L., L. Wu, C. Wang, L. Liu, and Y. Zhao. 2007. Adiponectin modulates carnitine palmitoyltransferase-1 through AMPK signaling cascade in rat cardiomyocytes. *Regul Pept*. 139:72-9.
- Liang, F., S. Kume, and D. Koya. 2009. SIRT1 and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol*. 5:367-73.
- Lihn, A.S., J.M. Bruun, G. He, S.B. Pedersen, P.F. Jensen, and B. Richelsen. 2004. Lower expression of adiponectin mRNA in visceral adipose tissue in lean and obese subjects. *Mol Cell Endocrinol*. 219:9-15.
- Lihn, A.S., T. Ostergard, B. Nyholm, S.B. Pedersen, B. Richelsen, and O. Schmitz. 2003. Adiponectin expression in adipose tissue is reduced in first-degree relatives of type 2 diabetic patients. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 284:E443-8.
- Lim, J.Y., W.H. Kim, and S.I. Park. 2008. GO6976 prevents TNF-alpha-induced suppression of adiponectin expression in 3T3-L1 adipocytes: putative involvement of protein kinase C. *FEBS Lett*. 582:3473-8.
- Lin, Y., A. Kreeft, J.A. Schuurbiens, and R. Draijer. 2001. Different effects of conjugated linoleic acid isomers on lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes. *J Nutr Biochem*. 12:183-189.
- Lin, Y., A. Kreeft, J.A. Schuurbiens, and R. Draijer. 2001. Different effects of conjugated linoleic acid isomers on lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes. *J Nutr Biochem*. 12:183-189.

- Lindsay, R.S., T. Funahashi, R.L. Hanson, Y. Matsuzawa, S. Tanaka, P.A. Tataranni, W.C. Knowler, and J. Krakoff. 2002. Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. *Lancet*. 360:57-8.
- Liu, J., F. Yao, R. Wu, M. Morgan, A. Thorburn, R.L. Finley, Jr., and Y.Q. Chen. 2002. Mediation of the DCC apoptotic signal by DIP13 alpha. *J Biol Chem*. 277:26281-5.
- Liu, M., and F. Liu. 2010. Transcriptional and post-translational regulation of adiponectin. *Biochem J*. 425:41-52.
- Liu, Y., R. Retnakaran, A. Hanley, R. Tungtrongchitr, C. Shaw, and G. Sweeney. 2007. Total and high molecular weight but not trimeric or hexameric forms of adiponectin correlate with markers of the metabolic syndrome and liver injury in Thai subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 92:4313-8.
- Lochhead, P.A., I.P. Salt, K.S. Walker, D.G. Hardie, and C. Sutherland. 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*. 49:896-903.
- Loffreda, S., S.Q. Yang, H.Z. Lin, C.L. Karp, M.L. Brengman, D.J. Wang, A.S. Klein, G.B. Bulkley, C. Bao, P.W. Noble, M.D. Lane, and A.M. Diehl. 1998. Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J*. 12:57-65.
- Loffreda, S., S.Q. Yang, H.Z. Lin, C.L. Karp, M.L. Brengman, D.J. Wang, A.S. Klein, G.B. Bulkley, C. Bao, P.W. Noble, M.D. Lane, and A.M. Diehl. 1998. Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J*. 12:57-65.
- Lord, E., S. Ledoux, B.D. Murphy, D. Beaudry, and M.F. Palin. 2005. Expression of adiponectin and its receptors in swine. *J Anim Sci*. 83:565-78.
- Ma, K., A. Cabrero, P.K. Saha, H. Kojima, L. Li, B.H. Chang, A. Paul, and L. Chan. 2002. Increased beta -oxidation but no insulin resistance or glucose intolerance in mice lacking adiponectin. *J Biol Chem*. 277:34658-61.
- MacDougald, O.A., and M.D. Lane. 1995. Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu Rev Biochem*. 64:345-73.
- Maeda, K., K. Okubo, I. Shimomura, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, and K. Matsubara. 1996. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun*. 221:286-9.
- Maeda, N., I. Shimomura, K. Kishida, H. Nishizawa, M. Matsuda, H. Nagaretani, N. Furuyama, H. Kondo, M. Takahashi, Y. Arita, R. Komuro, N. Ouchi, S. Kihara, Y. Tochino, K. Okutomi, M. Horie, S. Takeda, T. Aoyama, T. Funahashi, and Y. Matsuzawa. 2002. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med*. 8:731-7.
- Maeda, N., I. Shimomura, K. Kishida, H. Nishizawa, M. Matsuda, H. Nagaretani, N. Furuyama, H. Kondo, M. Takahashi, Y. Arita, R. Komuro, N. Ouchi, S. Kihara, Y. Tochino, K. Okutomi, M. Horie, S. Takeda, T. Aoyama, T. Funahashi, and Y. Matsuzawa. 2002. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med*. 8:731-7.

- Maeda, N., M. Takahashi, T. Funahashi, S. Kihara, H. Nishizawa, K. Kishida, H. Nagaretani, M. Matsuda, R. Komuro, N. Ouchi, H. Kuriyama, K. Hotta, T. Nakamura, I. Shimomura, and Y. Matsuzawa. 2001. PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes*. 50:2094-9.
- Makimura, H., T.M. Mizuno, H. Bergen, and C.V. Mobbs. 2002. Adiponectin is stimulated by adrenalectomy in ob/ob mice and is highly correlated with resistin mRNA. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 283:E1266-71.
- Mao, X., C.K. Kikani, R.A. Riojas, P. Langlais, L. Wang, F.J. Ramos, Q. Fang, C.Y. Christ-Roberts, J.Y. Hong, R.Y. Kim, F. Liu, and L.Q. Dong. 2006. APPL1 binds to adiponectin receptors and mediates adiponectin signalling and function. *Nat Cell Biol*. 8:516-23.
- Marchlewska, A., P. Stenvinkel, B. Lindholm, A. Danielsson, R. Pecoits-Filho, F. Lonnqvist, M. Schalling, O. Heimbürger, and L. Nordfors. 2004. Reduced gene expression of adiponectin in fat tissue from patients with end-stage renal disease. *Kidney Int*. 66:46-50.
- Masaki, T., S. Chiba, T. Yasuda, T. Tsubone, T. Kakuma, I. Shimomura, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, and H. Yoshimatsu. 2003. Peripheral, but not central, administration of adiponectin reduces visceral adiposity and upregulates the expression of uncoupling protein in agouti yellow (Ay/a) obese mice. *Diabetes*. 52:2266-73.
- Massillon, D., N. Barzilai, W. Chen, M. Hu, and L. Rossetti. 1996. Glucose regulates in vivo glucose-6-phosphatase gene expression in the liver of diabetic rats. *J Biol Chem*. 271:9871-4.
- Masuzaki, H., J. Paterson, H. Shinyama, N.M. Morton, J.J. Mullins, J.R. Seckl, and J.S. Flier. 2001. A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science*. 294:2166-70.
- Matsubara, M., S. Maruoka, and S. Katayose. 2002. Inverse relationship between plasma adiponectin and leptin concentrations in normal-weight and obese women. *Eur J Endocrinol*. 147:173-80.
- Matsuura, F., H. Oku, M. Koseki, J.C. Sandoval, M. Yuasa-Kawase, K. Tsubakio-Yamamoto, D. Masuda, N. Maeda, K. Tsujii, M. Ishigami, M. Nishida, K. Hirano, S. Kihara, M. Hori, I. Shimomura, and S. Yamashita. 2007. Adiponectin accelerates reverse cholesterol transport by increasing high density lipoprotein assembly in the liver. *Biochem Biophys Res Commun*. 358:1091-5.
- McLaughlin, T.M., T. Liu, G. Yee, F. Abbasi, C. Lamendola, G. Reaven, P. Tsao, S. Cushman, and A. Sherman. 2009. Pioglitazone Increases the Proportion of Small Cells in Human Abdominal Subcutaneous Adipose Tissue. *Obesity (Silver Spring)*.
- Menzaghi, C., T. Ercolino, R. Di Paola, A.H. Berg, J.H. Warram, P.E. Scherer, V. Trischitta, and A. Doria. 2002. A haplotype at the adiponectin locus is associated with obesity and other features of the insulin resistance syndrome. *Diabetes*. 51:2306-12.
- Miaczynska, M., S. Christoforidis, A. Giner, A. Shevchenko, S. Uttenweiler-Joseph, B. Habermann, M. Wilm, R.G. Parton, and M. Zerial. 2004. APPL proteins link Rab5 to nuclear signal transduction via an endosomal compartment. *Cell*. 116:445-56.
- Moldes, M., M. Boizard, X.L. Liepvre, B. Feve, I. Dugail, and J. Pairault. 1999. Functional antagonism between inhibitor of DNA binding (Id) and adipocyte determination and differentiation factor

- 1/sterol regulatory element-binding protein-1c (ADD1/SREBP-1c) trans-factors for the regulation of fatty acid synthase promoter in adipocytes. *Biochem J.* 344 Pt 3:873-80.
- Mukherjee, R., L. Jow, G.E. Croston, and J.R. Paterniti, Jr. 1997. Identification, characterization, and tissue distribution of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) isoforms PPARgamma2 versus PPARgamma1 and activation with retinoid X receptor agonists and antagonists. *J Biol Chem.* 272:8071-6.
- Muller, S., S. Martin, W. Koenig, P. Hanifi-Moghaddam, W. Rathmann, B. Haastert, G. Giani, T. Illig, B. Thorand, and H. Kolb. 2002. Impaired glucose tolerance is associated with increased serum concentrations of interleukin 6 and co-regulated acute-phase proteins but not TNF-alpha or its receptors. *Diabetologia.* 45:805-12.
- Muoio, D.M., K. Seefeld, L.A. Witters, and R.A. Coleman. 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):783-91.
- Mynatt, R.L., M.D. Lappi, and G.A. Cook. 1992. Myocardial carnitine palmitoyltransferase of the mitochondrial outer membrane is not altered by fasting. *Biochim Biophys Acta.* 1128:105-11.
- Nakano, Y., T. Tobe, N.H. Choi-Miura, T. Mazda, and M. Tomita. 1996. Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem.* 120:803-12.
- Nakashima, R., N. Kamei, K. Yamane, S. Nakanishi, A. Nakashima, and N. Kohno. 2006. Decreased total and high molecular weight adiponectin are independent risk factors for the development of type 2 diabetes in Japanese-Americans. *J Clin Endocrinol Metab.* 91:3873-7.
- Nepokroeff, C.M., M.R. Lakshmanan, and J.W. Porter. 1975. Fatty-acid synthase from rat liver. *Methods Enzymol.* 35:37-44.
- Neschen, S., K. Morino, J.C. Rossbacher, R.L. Pongratz, G.W. Cline, S. Sono, M. Gillum, and G.I. Shulman. 2006. Fish oil regulates adiponectin secretion by a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-dependent mechanism in mice. *Diabetes.* 55:924-8.
- Nesovic, M., J. Ciric, S. Radojkovic, M. Zarkovic, and M. Durovic. 1992. Improvement of metastatic endocrine tumors of the pancreas by hepatic artery chemoembolization. *J Endocrinol Invest.* 15:543-7.
- Nishizawa, H., I. Shimomura, K. Kishida, N. Maeda, H. Kuriyama, H. Nagaretani, M. Matsuda, H. Kondo, N. Furuyama, S. Kihara, T. Nakamura, Y. Tochino, T. Funahashi, and Y. Matsuzawa. 2002. Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein. *Diabetes.* 51:2734-41.
- Nolan, J.J., B. Ludvik, P. Beerdsen, M. Joyce, and J. Olefsky. 1994. Improvement in glucose tolerance and insulin resistance in obese subjects treated with troglitazone. *N Engl J Med.* 331:1188-93.



- Norris, A.W., L. Chen, S.J. Fisher, I. Szanto, M. Ristow, A.C. Jozsi, M.F. Hirshman, E.D. Rosen, L.J. Goodyear, F.J. Gonzalez, B.M. Spiegelman, and C.R. Kahn. 2003. Muscle-specific PPARgamma-deficient mice develop increased adiposity and insulin resistance but respond to thiazolidinediones. *J Clin Invest.* 112:608-18.
- Nukatsuka, M., Y. Yoshimura, M. Nishida, and J. Kawada. 1990. Importance of the concentration of ATP in rat pancreatic beta cells in the mechanism of streptozotocin-induced cytotoxicity. *J Endocrinol.* 127:161-5.
- Ohashi, A., Y. Matsushita, K. Kimura, K. Miyashita, and M. Saito. 2004. Conjugated linoleic acid deteriorates insulin resistance in obese/diabetic mice in association with decreased production of adiponectin and leptin. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 50:416-21.
- Ohshima, S., Y. Saeki, T. Mima, M. Sasai, K. Nishioka, S. Nomura, M. Kopf, Y. Katada, T. Tanaka, M. Suemura, and T. Kishimoto. 1998. Interleukin 6 plays a key role in the development of antigen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:8222-6.
- Okamoto, Y., S. Kihara, N. Ouchi, M. Nishida, Y. Arita, M. Kumada, K. Ohashi, N. Sakai, I. Shimomura, H. Kobayashi, N. Terasaka, T. Inaba, T. Funahashi, and Y. Matsuzawa. 2002. Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation.* 106:2767-70.
- Ouchi, N., S. Kihara, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, and K. Walsh. 2003. Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. *Curr Opin Lipidol.* 14:561-6.
- Pajvani, U.B., and P.E. Scherer. 2003. Adiponectin: systemic contributor to insulin sensitivity. *Curr Diab Rep.* 3:207-13.
- Pajvani, U.B., M. Hawkins, T.P. Combs, M.W. Rajala, T. Doebber, J.P. Berger, J.A. Wagner, M. Wu, A. Knopps, A.H. Xiang, K.M. Utzschneider, S.E. Kahn, J.M. Olefsky, T.A. Buchanan, and P.E. Scherer. 2004. Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. *J Biol Chem.* 279:12152-62.
- Pajvani, U.B., X. Du, T.P. Combs, A.H. Berg, M.W. Rajala, T. Schulthess, J. Engel, M. Brownlee, and P.E. Scherer. 2003. Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. *J Biol Chem.* 278:9073-85.
- Pannacciulli, N., R. Vettor, G. Milan, M. Granzotto, A. Catucci, G. Federspil, P. De Giacomo, R. Giorgino, and G. De Pergola. 2003. Anorexia nervosa is characterized by increased adiponectin plasma levels and reduced nonoxidative glucose metabolism. *J Clin Endocrinol Metab.* 88:1748-52.
- Perret, B., L. Mabile, L. Martinez, F. Terce, R. Barbaras, and X. Collet. 2002. Hepatic lipase: structure/function relationship, synthesis, and regulation. *J Lipid Res.* 43:1163-9.
- Perseghin, G., G. Lattuada, M. Danna, L.P. Sereni, P. Maffi, F. De Cobelli, A. Battezzati, A. Secchi, A. Del Maschio, and L. Luzi. 2003. Insulin resistance, intramyocellular lipid content, and plasma adiponectin in patients with type 1 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 285:E1174-81.

- Persegol, L., B. Verges, M. Foissac, P. Gambert, and L. Duvillard. 2006. Inability of HDL from type 2 diabetic patients to counteract the inhibitory effect of oxidised LDL on endothelium-dependent vasorelaxation. *Diabetologia*. 49:1380-6.
- Phillips, S.A., T.P. Ciaraldi, A.P. Kong, R. Bandukwala, V. Aroda, L. Carter, S. Baxi, S.R. Mudaliar, and R.R. Henry. 2003. Modulation of circulating and adipose tissue adiponectin levels by antidiabetic therapy. *Diabetes*. 52:667-74.
- Phillips, S.A., T.P. Ciaraldi, D.K. Oh, M.K. Savu, and R.R. Henry. 2008. Adiponectin secretion and response to pioglitazone is depot dependent in cultured human adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 295:E842-50.
- Picard, F., and J. Auwerx. 2002. PPAR( $\gamma$ ) and glucose homeostasis. *Annu Rev Nutr*. 22:167-97.
- Pickup, J.C., M.B. Mattock, G.D. Chusney, and D. Burt. 1997. NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia*. 40:1286-92.
- Pineiro, R., M.J. Iglesias, R. Gallego, K. Raghay, S. Eiras, J. Rubio, C. Dieguez, O. Gualillo, J.R. Gonzalez-Juanatey, and F. Lago. 2005. Adiponectin is synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes. *FEBS Lett*. 579:5163-9.
- Pischon, T., G.S. Hotamisligil, and E.B. Rimm. 2003. Adiponectin: stability in plasma over 36 hours and within-person variation over 1 year. *Clin Chem*. 49:650-2.
- Poirier, H., J.S. Shapiro, R.J. Kim, and M.A. Lazar. 2006. Nutritional supplementation with trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid induces inflammation of white adipose tissue. *Diabetes*. 55:1634-41.
- Qi, Y., N. Takahashi, S.M. Hileman, H.R. Patel, A.H. Berg, U.B. Pajvani, P.E. Scherer, and R.S. Ahima. 2004. Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. *Nat Med*. 10:524-9.
- Qiang, L., H. Wang, and S.R. Farmer. 2007. Adiponectin secretion is regulated by SIRT1 and the endoplasmic reticulum oxidoreductase Ero1-L alpha. *Mol Cell Biol*. 27:4698-707.
- Qiao, L., and J. Shao. 2006. SIRT1 regulates adiponectin gene expression through Foxo1-C/enhancer-binding protein alpha transcriptional complex. *J Biol Chem*. 281:39915-24.
- Qiao, L., and J. Shao. 2006. SIRT1 regulates adiponectin gene expression through Foxo1-C/enhancer-binding protein alpha transcriptional complex. *J Biol Chem*. 281:39915-24.
- Qiao, L., P.S. Maclean, J. Schaack, D.J. Orlicky, C. Darimont, M. Pagliassotti, J.E. Friedman, and J. Shao. 2005. C/EBPalpha regulates human adiponectin gene transcription through an intronic enhancer. *Diabetes*. 54:1744-54.
- Quinn, L.S., L. Strait-Bodey, B.G. Anderson, J.M. Argiles, and P.J. Havel. 2005. Interleukin-15 stimulates adiponectin secretion by 3T3-L1 adipocytes: evidence for a skeletal muscle-to-fat signaling pathway. *Cell Biol Int*. 29:449-57.

- Raccach, D., B. Janand-Delenne, and P. Vague. 1999. [Non-insulin-dependent diabetes]. *Rev Prat.* 49:629-34.
- Rasouli, N., A. Yao-Borengasser, L.M. Miles, S.C. Elbein, and P.A. Kern. 2006. Increased plasma adiponectin in response to pioglitazone does not result from increased gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 290:E42-E46.
- Reaven, G.M. 1988. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes.* 37:1595-607.
- Reginato, M.J., and M.A. Lazar. 1999. Mechanisms by which Thiazolidinediones Enhance Insulin Action. *Trends Endocrinol Metab.* 10:9-13.
- Reilly, M.P., and D.J. Rader. 2003. The metabolic syndrome: more than the sum of its parts? *Circulation.* 108:1546-51.
- Retnakaran, R., P.W. Connelly, G. Maguire, M. Sermer, B. Zinman, and A.J. Hanley. 2007. Decreased high-molecular-weight adiponectin in gestational diabetes: implications for the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabet Med.* 24:245-52.
- Rhinds, D., and L. Brissette. 2004. The role of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in lipid trafficking. defining the rules for lipid traders. *Int J Biochem Cell Biol.* 36:39-77.
- Richards, A.A., T. Stephens, H.K. Charlton, A. Jones, G.A. Macdonald, J.B. Prins, and J.P. Whitehead. 2006. Adiponectin multimerization is dependent on conserved lysines in the collagenous domain: evidence for regulation of multimerization by alterations in posttranslational modifications. *Mol Endocrinol.* 20:1673-87.
- Rodriguez-Pacheco, F., A.J. Martinez-Fuentes, S. Tovar, L. Pinilla, M. Tena-Sempere, C. Dieguez, J.P. Castano, and M.M. Malagon. 2007. Regulation of pituitary cell function by adiponectin. *Endocrinology.* 148:401-10.
- Ron, D., A.R. Brasier, R.E. McGehee, Jr., and J.F. Habener. 1992. Tumor necrosis factor-induced reversal of adipocytic phenotype of 3T3-L1 cells is preceded by a loss of nuclear CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP). *J Clin Invest.* 89:223-33.
- Ruan, H., N. Hacohen, T.R. Golub, L. Van Parijs, and H.F. Lodish. 2002. Tumor necrosis factor-alpha suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor-kappaB activation by TNF-alpha is obligatory. *Diabetes.* 51:1319-36.
- Ruzickova, J., M. Rossmeisl, T. Prazak, P. Flachs, J. Sponarova, M. Veck, E. Tvrzicka, M. Bryhn, and J. Kopecky. 2004. Omega-3 PUFA of marine origin limit diet-induced obesity in mice by reducing cellularity of adipose tissue. *Lipids.* 39:1177-85.
- Ryan, A.S., and B.J. Nicklas. 2004. Reductions in plasma cytokine levels with weight loss improve insulin sensitivity in overweight and obese postmenopausal women. *Diabetes Care.* 27:1699-705.

- Ryo, M., T. Nakamura, S. Kihara, M. Kumada, S. Shibazaki, M. Takahashi, M. Nagai, Y. Matsuzawa, and T. Funahashi. 2004. Adiponectin as a biomarker of the metabolic syndrome. *Circ J.* 68:975-81.
- Saggerson, D. 2008. Malonyl-CoA, a key signaling molecule in mammalian cells. *Annu Rev Nutr.* 28:253-72.
- Saltiel, A.R. 2001. New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell.* 104:517-29.
- Satoh, H., M.T. Nguyen, M. Trujillo, T. Imamura, I. Usui, P.E. Scherer, and J.M. Olefsky. 2005. Adenovirus-mediated adiponectin expression augments skeletal muscle insulin sensitivity in male Wistar rats. *Diabetes.* 54:1304-13.
- Schadinger, S.E., N.L. Bucher, B.M. Schreiber, and S.R. Farmer. 2005. PPARgamma2 regulates lipogenesis and lipid accumulation in steatotic hepatocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 288:E1195-205.
- Schaffler, A., E. Orso, K.D. Palitzsch, C. Buchler, W. Drobnik, A. Furst, J. Scholmerich, and G. Schmitz. 1999. The human apM-1, an adipocyte-specific gene linked to the family of TNF's and to genes expressed in activated T cells, is mapped to chromosome 1q21.3-q23, a susceptibility locus identified for familial combined hyperlipidaemia (FCH). *Biochem Biophys Res Commun.* 260:416-25.
- Schaffler, A., T. Langmann, K.D. Palitzsch, J. Scholmerich, and G. Schmitz. 1998. Identification and characterization of the human adipocyte apM-1 promoter. *Biochim Biophys Acta.* 1399:187-97.
- Schenck, A., L. Goto-Silva, C. Collinet, M. Rhinn, A. Giner, B. Habermann, M. Brand, and M. Zerial. 2008. The endosomal protein App11 mediates Akt substrate specificity and cell survival in vertebrate development. *Cell.* 133:486-97.
- Scherer, P.E., S. Williams, M. Fogliano, G. Baldini, and H.F. Lodish. 1995. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem.* 270:26746-9.
- Schoonjans, K., B. Staels, and J. Auwerx. 1996. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta.* 1302:93-109.
- Schulz, B., B. Hehmke, E. Zander, and B. Ziegler. 1990. Autoimmune reactions in a patient with malignant insulinoma treated by multiple low dose streptozotocin. *Exp Clin Endocrinol.* 95:77-82.
- Seimandi, M., G. Lemaire, A. Pillon, A. Perrin, I. Carlvann, J.J. Voegel, F. Vignon, J.C. Nicolas, and P. Balaguer. 2005. Differential responses of PPARalpha, PPARdelta, and PPARgamma reporter cell lines to selective PPAR synthetic ligands. *Anal Biochem.* 344:8-15.
- Seo, J.B., H.M. Moon, M.J. Noh, Y.S. Lee, H.W. Jeong, E.J. Yoo, W.S. Kim, J. Park, B.S. Youn, J.W. Kim, S.D. Park, and J.B. Kim. 2004. Adipocyte determination- and differentiation-dependent factor 1/sterol regulatory element-binding protein 1c regulates mouse adiponectin expression. *J Biol Chem.* 279:22108-17.

- Sewter, C., D. Berger, R.V. Considine, G. Medina, J. Rochford, T. Ciaraldi, R. Henry, L. Dohm, J.S. Flier, S. O'Rahilly, and A.J. Vidal-Puig. 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*. 51:1035-41.
- Shapiro, L., and P.E. Scherer. 1998. The crystal structure of a complement-1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor. *Curr Biol*. 8:335-8.
- Sharma, A.M., and B. Staels. 2007. Review: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and adipose tissue--understanding obesity-related changes in regulation of lipid and glucose metabolism. *J Clin Endocrinol Metab*. 92:386-95.
- Shen, W., Z. Wang, M. Punyanita, J. Lei, A. Sinav, J.G. Kral, C. Imielinska, R. Ross, and S.B. Heymsfield. 2003. Adipose tissue quantification by imaging methods: a proposed classification. *Obes Res*. 11:5-16.
- Shibata, R., N. Ouchi, M. Ito, S. Kihara, I. Shiojima, D.R. Pimentel, M. Kumada, K. Sato, S. Schiekofer, K. Ohashi, T. Funahashi, W.S. Colucci, and K. Walsh. 2004. Adiponectin-mediated modulation of hypertrophic signals in the heart. *Nat Med*. 10:1384-9.
- Shillabeer, G., and D.C. Lau. 1994. Regulation of new fat cell formation in rats: the role of dietary fats. *J Lipid Res*. 35:592-600.
- Shimabukuro, M., N. Higa, T. Asahi, Y. Oshiro, N. Takasu, T. Tagawa, S. Ueda, I. Shimomura, T. Funahashi, and Y. Matsuzawa. 2003. Hypoadiponectinemia is closely linked to endothelial dysfunction in man. *J Clin Endocrinol Metab*. 88:3236-40.
- Shimizu, A., T. Takamura, N. Matsuzawa, S. Nakamura, S. Nabemoto, Y. Takeshita, H. Misu, S. Kurita, M. Sakurai, M. Yokoyama, Y. Zen, M. Sasaki, Y. Nakanuma, and S. Kaneko. 2007. Regulation of adiponectin receptor expression in human liver and a hepatocyte cell line. *Metabolism*. 56:1478-85.
- Shinoda, Y., M. Yamaguchi, N. Ogata, T. Akune, N. Kubota, T. Yamauchi, Y. Terauchi, T. Kadowaki, Y. Takeuchi, S. Fukumoto, T. Ikeda, K. Hoshi, U.I. Chung, K. Nakamura, and H. Kawaguchi. 2006. Regulation of bone formation by adiponectin through autocrine/paracrine and endocrine pathways. *J Cell Biochem*. 99:196-208.
- Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, and D.C. Klenk. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 150:76-85.
- Spranger, J., A. Kroke, M. Mohlig, M.M. Bergmann, M. Ristow, H. Boeing, and A.F. Pfeiffer. 2003. Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet*. 361:226-8.
- Stefan, N., M. Stumvoll, B. Vozarova, C. Weyer, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, C. Bogardus, and P.A. Tataranni. 2003. Plasma adiponectin and endogenous glucose production in humans. *Diabetes Care*. 26:3315-9.
- Steiner, K.E., and E.L. Lien. 1987. Hypoglycaemic agents which do not release insulin. *Prog Med Chem*. 24:209-48.

- Straub, R.H., H.W. Hense, T. Andus, J. Scholmerich, G.A. Riegger, and H. Schunkert. 2000. Hormone replacement therapy and interrelation between serum interleukin-6 and body mass index in postmenopausal women: a population-based study. *J Clin Endocrinol Metab.* 85:1340-4.
- Stumvoll, M., O. Tschritter, A. Fritsche, H. Staiger, W. Renn, M. Weisser, F. Machicao, and H. Haring. 2002. Association of the T-G polymorphism in adiponectin (exon 2) with obesity and insulin sensitivity: interaction with family history of type 2 diabetes. *Diabetes.* 51:37-41.
- Suter, S.L., J.J. Nolan, P. Wallace, B. Gumbiner, and J.M. Olefsky. 1992. Metabolic effects of new oral hypoglycemic agent CS-045 in NIDDM subjects. *Diabetes Care.* 15:193-203.
- Swarbrick, M.M., I.T. Austrheim-Smith, K.L. Stanhope, M.D. Van Loan, M.R. Ali, B.M. Wolfe, and P.J. Havel. 2006. Circulating concentrations of high-molecular-weight adiponectin are increased following Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Diabetologia.* 49:2552-8.
- Syvanne, M., M. Ahola, S. Lahdenpera, J. Kahri, T. Kuusi, K.S. Virtanen, and M.R. Taskinen. 1995. High density lipoprotein subfractions in non-insulin-dependent diabetes mellitus and coronary artery disease. *J Lipid Res.* 36:573-82.
- Szkudelski, T. 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res.* 50:537-46.
- Sztalryd, C., and F.B. Kraemer. 1995. Regulation of hormone-sensitive lipase in streptozotocin-induced diabetic rats. *Metabolism.* 44:1391-6.
- Tasanen, K., J.A. Eble, M. Aumailley, H. Schumann, J. Baetge, H. Tu, P. Bruckner, and L. Bruckner-Tuderman. 2000. Collagen XVII is destabilized by a glycine substitution mutation in the cell adhesion domain Col15. *J Biol Chem.* 275:3093-9.
- Thompson, S.R., J. Sanders, J.W. Stephens, G.J. Miller, and S.E. Humphries. 2007. A common interleukin 18 haplotype is associated with higher body mass index in subjects with diabetes and coronary heart disease. *Metabolism.* 56:662-9.
- Tilg, H., E. Trehu, M.B. Atkins, C.A. Dinarello, and J.W. Mier. 1994. Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood.* 83:113-8.
- Tomas, E., T.S. Tsao, A.K. Saha, H.E. Murrey, C. Zhang Cc, S.I. Itani, H.F. Lodish, and N.B. Ruderman. 2002. Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:16309-13.
- Tomas, E., T.S. Tsao, A.K. Saha, H.E. Murrey, C. Zhang Cc, S.I. Itani, H.F. Lodish, and N.B. Ruderman. 2002. Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:16309-13.
- Tomita, K., G. Tamiya, S. Ando, N. Kitamura, H. Koizumi, S. Kato, Y. Horie, T. Kaneko, T. Azuma, H. Nagata, H. Ishii, and T. Hibi. 2005. AICAR, an AMPK activator, has protective effects on alcohol-induced fatty liver in rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 29:240S-5S.

- Tontonoz, P., E. Hu, and B.M. Spiegelman. 1994. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*. 79:1147-56.
- Tontonoz, P., E. Hu, and B.M. Spiegelman. 1995. Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor gamma. *Curr Opin Genet Dev*. 5:571-6.
- Trujillo, M.E., and P.E. Scherer. 2005. Adiponectin--journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome. *J Intern Med*. 257:167-75.
- Tsao, T.S., E. Tomas, H.E. Murrey, C. Hug, D.H. Lee, N.B. Ruderman, J.E. Heuser, and H.F. Lodish. 2003. Role of disulfide bonds in Acrp30/adiponectin structure and signaling specificity. Different oligomers activate different signal transduction pathways. *J Biol Chem*. 278:50810-7.
- Tsao, T.S., H.E. Murrey, C. Hug, D.H. Lee, and H.F. Lodish. 2002. Oligomerization state-dependent activation of NF-kappa B signaling pathway by adipocyte complement-related protein of 30 kDa (Acrp30). *J Biol Chem*. 277:29359-62.
- Tsubakio-Yamamoto, K., F. Matsuura, M. Koseki, H. Oku, J.C. Sandoval, M. Inagaki, K. Nakatani, H. Nakaoka, R. Kawase, M. Yuasa-Kawase, D. Masuda, T. Ohama, N. Maeda, Y. Nakagawa-Toyama, M. Ishigami, M. Nishida, S. Kihara, I. Shimomura, and S. Yamashita. 2008. Adiponectin prevents atherosclerosis by increasing cholesterol efflux from macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 375:390-4.
- Tsuboyama-Kasaoka, N., M. Takahashi, K. Tanemura, H.J. Kim, T. Tange, H. Okuyama, M. Kasai, S. Ikemoto, and O. Ezaki. 2000. Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice. *Diabetes*. 49:1534-42.
- Tsuchida, A., T. Yamauchi, Y. Ito, Y. Hada, T. Maki, S. Takekawa, J. Kamon, M. Kobayashi, R. Suzuki, K. Hara, N. Kubota, Y. Terauchi, P. Froguel, J. Nakae, M. Kasuga, D. Accili, K. Tobe, K. Ueki, R. Nagai, and T. Kadowaki. 2004. Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity. *J Biol Chem*. 279:30817-22.
- Tsukinoki, R., K. Morimoto, and K. Nakayama. 2005. Association between lifestyle factors and plasma adiponectin levels in Japanese men. *Lipids Health Dis*. 4:27.
- Tugwood, J.D., I. Issemann, R.G. Anderson, K.R. Bundell, W.L. McPheat, and S. Green. 1992. The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. *EMBO J*. 11:433-9.
- Uitto, J., and J.R. Lichtenstein. 1976. Defects in the biochemistry of collagen in diseases of connective tissue. *J Invest Dermatol*. 66:59-79.
- Ukkola, O., and C. Bouchard. 2001. Clustering of metabolic abnormalities in obese individuals: the role of genetic factors. *Ann Med*. 33:79-90.
- van Dielen, F.M., W.A. Buurman, M. Hadfoune, J. Nijhuis, and J.W. Greve. 2004. Macrophage inhibitory factor, plasminogen activator inhibitor-1, other acute phase proteins, and inflammatory mediators normalize as a result of weight loss in morbidly obese subjects treated with gastric restrictive surgery. *J Clin Endocrinol Metab*. 89:4062-8.

- Varsano, T., M.Q. Dong, I. Niesman, H. Gacula, X. Lou, T. Ma, J.R. Testa, J.R. Yates, 3rd, and M.G. Farquhar. 2006. GIPC is recruited by APPL to peripheral TrkA endosomes and regulates TrkA trafficking and signaling. *Mol Cell Biol.* 26:8942-52.
- Vasseur, F., N. Helbecque, C. Dina, S. Lobbens, V. Delannoy, S. Gaget, P. Boutin, M. Vaxillaire, F. Lepretre, S. Dupont, K. Hara, K. Clement, B. Bihain, T. Kadowaki, and P. Froguel. 2002. Single-nucleotide polymorphism haplotypes in the both proximal promoter and exon 3 of the APM1 gene modulate adipocyte-secreted adiponectin hormone levels and contribute to the genetic risk for type 2 diabetes in French Caucasians. *Hum Mol Genet.* 11:2607-14.
- Vasseur, F., N. Helbecque, S. Lobbens, V. Vasseur-Delannoy, C. Dina, K. Clement, P. Boutin, T. Kadowaki, P.E. Scherer, and P. Froguel. 2005. Hypoadiponectinaemia and high risk of type 2 diabetes are associated with adiponectin-encoding (ACDC) gene promoter variants in morbid obesity: evidence for a role of ACDC in diabetes. *Diabetologia.* 48:892-9.
- Velasco, G., M.J. Geelen, and M. Guzman. 1997. Control of hepatic fatty acid oxidation by 5'-AMP-activated protein kinase involves a malonyl-CoA-dependent and a malonyl-CoA-independent mechanism. *Arch Biochem Biophys.* 337:169-75.
- Verges, B., J.M. Petit, L. Duvillard, G. Dautin, E. Florentin, F. Galland, and P. Gamber. 2006. Adiponectin is an important determinant of apoA-I catabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26:1364-9.
- Vidal-Puig, A., M. Jimenez-Linan, B.B. Lowell, A. Hamann, E. Hu, B. Spiegelman, J.S. Flier, and D.E. Moller. 1996. Regulation of PPAR gamma gene expression by nutrition and obesity in rodents. *J Clin Invest.* 97:2553-61.
- Vionnet, N., E.H. Hani, S. Dupont, S. Gallina, S. Francke, S. Dotte, F. De Matos, E. Durand, F. Lepretre, C. Lecoeur, P. Gallina, L. Zekiri, C. Dina, and P. Froguel. 2000. Genomewide search for type 2 diabetes-susceptibility genes in French whites: evidence for a novel susceptibility locus for early-onset diabetes on chromosome 3q27-qter and independent replication of a type 2-diabetes locus on chromosome 1q21-q24. *Am J Hum Genet.* 67:1470-80.
- von Eynatten, M., A. Hamann, D. Twardella, P.P. Nawroth, H. Brenner, and D. Rothenbacher. 2006. Relationship of adiponectin with markers of systemic inflammation, atherogenic dyslipidemia, and heart failure in patients with coronary heart disease. *Clin Chem.* 52:853-9.
- von Eynatten, M., J.G. Schneider, P.M. Humpert, G. Rudofsky, N. Schmidt, P. Barosch, A. Hamann, M. Morcos, J. Kreuzer, A. Bierhaus, P.P. Nawroth, and K.A. Dugi. 2004. Decreased plasma lipoprotein lipase in hypoadiponectinemia: an association independent of systemic inflammation and insulin resistance. *Diabetes Care.* 27:2925-9.
- von Eynatten, M., J.G. Schneider, S. Hadziselimovic, A. Hamann, A. Bierhaus, P.P. Nawroth, and K.A. Dugi. 2005. Adipocytokines as a novel target for the anti-inflammatory effect of atorvastatin in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 28:754-5.
- Wahle, K.W., S.D. Heys, and D. Rotondo. 2004. Conjugated linoleic acids: are they beneficial or detrimental to health? *Prog Lipid Res.* 43:553-87.



- Wajchenberg, B.L. 2000. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev.* 21:697-738.
- Waki, H., T. Yamauchi, J. Kamon, S. Kita, Y. Ito, Y. Hada, S. Uchida, A. Tsuchida, S. Takekawa, and T. Kadowaki. 2005. Generation of globular fragment of adiponectin by leukocyte elastase secreted by monocytic cell line THP-1. *Endocrinology.* 146:790-6.
- Waki, H., T. Yamauchi, J. Kamon, Y. Ito, S. Uchida, S. Kita, K. Hara, Y. Hada, F. Vasseur, P. Froguel, S. Kimura, R. Nagai, and T. Kadowaki. 2003. Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *J Biol Chem.* 278:40352-63.
- Wang, M., S.C. Wise, T. Leff, and T.Z. Su. 1999. Troglitazone, an antidiabetic agent, inhibits cholesterol biosynthesis through a mechanism independent of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Diabetes.* 48:254-60.
- Wang, Y., A. Xu, C. Knight, L.Y. Xu, and G.J. Cooper. 2002. Hydroxylation and glycosylation of the four conserved lysine residues in the collagenous domain of adiponectin. Potential role in the modulation of its insulin-sensitizing activity. *J Biol Chem.* 277:19521-9.
- Wang, Y., K.S. Lam, J.Y. Xu, G. Lu, L.Y. Xu, G.J. Cooper, and A. Xu. 2005. Adiponectin inhibits cell proliferation by interacting with several growth factors in an oligomerization-dependent manner. *J Biol Chem.* 280:18341-7.
- Wang, Y., K.S. Lam, L. Chan, K.W. Chan, J.B. Lam, M.C. Lam, R.C. Hoo, W.W. Mak, G.J. Cooper, and A. Xu. 2006. Post-translational modifications of the four conserved lysine residues within the collagenous domain of adiponectin are required for the formation of its high molecular weight oligomeric complex. *J Biol Chem.* 281:16391-400.
- Wang, Y.W., and P.J. Jones. 2004. Conjugated linoleic acid and obesity control: efficacy and mechanisms. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 28:941-55.
- Weisberg, S.P., D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R.L. Leibel, and A.W. Ferrante, Jr. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* 112:1796-808.
- Weyer, C., T. Funahashi, S. Tanaka, K. Hotta, Y. Matsuzawa, R.E. Pratley, and P.A. Tataranni. 2001. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 86:1930-5.
- Winder, W.W., and D.G. Hardie. 1999. AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. *Am J Physiol.* 277:E1-10.
- Winder, W.W., and D.G. Hardie. 1999. AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. *Am J Physiol.* 277:E1-10.
- Wittayalertpanya, S., S. Chompootawee, and N. Thaworn. 2006. The pharmacokinetics of pioglitazone in Thai healthy subjects. *J Med Assoc Thai.* 89:2116-22.

- Woods, A., D. Azzout-Marniche, M. Foretz, S.C. Stein, P. Lemarchand, P. Ferre, F. Foufelle, and D. Carling. 2000. Characterization of the role of AMP-activated protein kinase in the regulation of glucose-activated gene expression using constitutively active and dominant negative forms of the kinase. *Mol Cell Biol.* 20:6704-11.
- Wu, X., H. Motoshima, K. Mahadev, T.J. Stalker, R. Scalia, and B.J. Goldstein. 2003. Involvement of AMP-activated protein kinase in glucose uptake stimulated by the globular domain of adiponectin in primary rat adipocytes. *Diabetes.* 52:1355-63.
- Xu, A., K.W. Chan, R.L. Hoo, Y. Wang, K.C. Tan, J. Zhang, B. Chen, M.C. Lam, C. Tse, G.J. Cooper, and K.S. Lam. 2005. Testosterone selectively reduces the high molecular weight form of adiponectin by inhibiting its secretion from adipocytes. *J Biol Chem.* 280:18073-80.
- Xu, A., Y. Wang, H. Keshaw, L.Y. Xu, K.S. Lam, and G.J. Cooper. 2003a. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest.* 112:91-100.
- Xu, A., Y. Wang, H. Keshaw, L.Y. Xu, K.S. Lam, and G.J. Cooper. 2003. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest.* 112:91-100.
- Xu, X., J. Storkson, S. Kim, K. Sugimoto, Y. Park, and M.W. Pariza. 2003b. Short-term intake of conjugated linoleic acid inhibits lipoprotein lipase and glucose metabolism but does not enhance lipolysis in mouse adipose tissue. *J Nutr.* 133:663-7.
- Xu, X., J. Storkson, S. Kim, K. Sugimoto, Y. Park, and M.W. Pariza. 2003. Short-term intake of conjugated linoleic acid inhibits lipoprotein lipase and glucose metabolism but does not enhance lipolysis in mouse adipose tissue. *J Nutr.* 133:663-7.
- Xydakis, A.M., C.C. Case, P.H. Jones, R.C. Hoogeveen, M.Y. Liu, E.O. Smith, K.W. Nelson, and C.M. Ballantyne. 2004. Adiponectin, inflammation, and the expression of the metabolic syndrome in obese individuals: the impact of rapid weight loss through caloric restriction. *J Clin Endocrinol Metab.* 89:2697-703.
- Yamauchi, T., and T. Kadowaki. 2001. [The molecular mechanisms by which PPAR gamma/RXR inhibitors improve insulin resistance]. *Nippon Rinsho.* 59:2245-54.
- Yamauchi, T., J. Kamon, H. Waki, Y. Imai, N. Shimozawa, K. Hioki, S. Uchida, Y. Ito, K. Takakuwa, J. Matsui, M. Takata, K. Eto, Y. Terauchi, K. Komeda, M. Tsunoda, K. Murakami, Y. Ohnishi, T. Naitoh, K. Yamamura, Y. Ueyama, P. Froguel, S. Kimura, R. Nagai, and T. Kadowaki. 2003b. Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis. *J Biol Chem.* 278:2461-8.
- Yamauchi, T., J. Kamon, H. Waki, Y. Terauchi, N. Kubota, K. Hara, Y. Mori, T. Ide, K. Murakami, N. Tsuboyama-Kasaoka, O. Ezaki, Y. Akanuma, O. Gavrilova, C. Vinson, M.L. Reitman, H. Kagechika, K. Shudo, M. Yoda, Y. Nakano, K. Tobe, R. Nagai, S. Kimura, M. Tomita, P. Froguel, and T. Kadowaki. 2001. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med.* 7:941-6.

- Yamauchi, T., J. Kamon, H. Waki, Y. Terauchi, N. Kubota, K. Hara, Y. Mori, T. Ide, K. Murakami, N. Tsuboyama-Kasaoka, O. Ezaki, Y. Akanuma, O. Gavrilova, C. Vinson, M.L. Reitman, H. Kagechika, K. Shudo, M. Yoda, Y. Nakano, K. Tobe, R. Nagai, S. Kimura, M. Tomita, P. Froguel, and T. Kadowaki. 2001. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med.* 7:941-6.
- Yamauchi, T., J. Kamon, Y. Ito, A. Tsuchida, T. Yokomizo, S. Kita, T. Sugiyama, M. Miyagishi, K. Hara, M. Tsunoda, K. Murakami, T. Ohteki, S. Uchida, S. Takekawa, H. Waki, N.H. Tsuno, Y. Shibata, Y. Terauchi, P. Froguel, K. Tobe, S. Koyasu, K. Taira, T. Kitamura, T. Shimizu, R. Nagai, and T. Kadowaki. 2003a. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature.* 423:762-9.
- Yamauchi, T., 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, and T. Kadowaki. 2002. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med.* 8:1288-95.
- Yamauchi, T., 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, and T. Kadowaki. 2002. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med.* 8:1288-95.
- Yamauchi, T., 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, and T. Kadowaki. 2002. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med.* 8:1288-95.
- Yamauchi, T., Y. Nio, T. Maki, M. Kobayashi, T. Takazawa, M. Iwabu, M. Okada-Iwabu, S. Kawamoto, N. Kubota, T. Kubota, Y. Ito, J. Kamon, A. Tsuchida, K. Kumagai, H. Kozono, Y. Hada, H. Ogata, K. Tokuyama, M. Tsunoda, T. Ide, K. Murakami, M. Awazawa, I. Takamoto, P. Froguel, K. Hara, K. Tobe, R. Nagai, K. Ueki, and T. Kadowaki. 2007. Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med.* 13:332-9.
- Yamauchi, T., Y. Nio, T. Maki, M. Kobayashi, T. Takazawa, M. Iwabu, M. Okada-Iwabu, S. Kawamoto, N. Kubota, T. Kubota, Y. Ito, J. Kamon, A. Tsuchida, K. Kumagai, H. Kozono, Y. Hada, H. Ogata, K. Tokuyama, M. Tsunoda, T. Ide, K. Murakami, M. Awazawa, I. Takamoto, P. Froguel, K. Hara, K. Tobe, R. Nagai, K. Ueki, and T. Kadowaki. 2007. Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med.* 13:332-9.
- Yang, W.S., C.Y. Jeng, T.J. Wu, S. Tanaka, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, J.P. Wang, C.L. Chen, T.Y. Tai, and L.M. Chuang. 2002. Synthetic peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, rosiglitazone, increases plasma levels of adiponectin in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* 25:376-80.

- Yang, W.S., W.J. Lee, T. Funahashi, S. Tanaka, Y. Matsuzawa, C.L. Chao, C.L. Chen, T.Y. Tai, and L.M. Chuang. 2001. Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab.* 86:3815-9.
- Yano, W., N. Kubota, S. Itoh, T. Kubota, M. Awazawa, M. Moroi, K. Sugi, I. Takamoto, H. Ogata, K. Tokuyama, T. Noda, Y. Terauchi, K. Ueki, and T. Kadowaki. 2008. Molecular mechanism of moderate insulin resistance in adiponectin-knockout mice. *Endocr J.* 55:515-22.
- Ye, J.M., G. Frangioudakis, M.A. Iglesias, S.M. Furler, B. Ellis, N. Dzamko, G.J. Cooney, and E.W. Kraegen. 2002. Prior thiazolidinedione treatment preserves insulin sensitivity in normal rats during acute fatty acid elevation: role of the liver. *Endocrinology.* 143:4527-35.
- Yildiz, B.O., M.A. Suchard, M.L. Wong, S.M. McCann, and J. Licinio. 2004. Alterations in the dynamics of circulating ghrelin, adiponectin, and leptin in human obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:10434-9.
- Yki-Jarvinen, H. 2004. Thiazolidinediones. *N Engl J Med.* 351:1106-18.
- Yokota, T., K. Oritani, I. Takahashi, J. Ishikawa, A. Matsuyama, N. Ouchi, S. Kihara, T. Funahashi, A.J. Tenner, Y. Tomiyama, and Y. Matsuzawa. 2000. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood.* 96:1723-32.
- Yu, J.G., S. Javorschi, A.L. Hevener, Y.T. Kruszynska, R.A. Norman, M. Sinha, and J.M. Olefsky. 2002. The effect of thiazolidinediones on plasma adiponectin levels in normal, obese, and type 2 diabetic subjects. *Diabetes.* 51:2968-74.
- Yu, S., K. Matsusue, P. Kashireddy, W.Q. Cao, V. Yeldandi, A.V. Yeldandi, M.S. Rao, F.J. Gonzalez, and J.K. Reddy. 2003. Adipocyte-specific gene expression and adipogenic steatosis in the mouse liver due to peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 (PPARgamma1) overexpression. *J Biol Chem.* 278:498-505.
- Zabala, A., I. Churrua, A. Fernandez-Quintela, V.M. Rodriguez, M.T. Macarulla, J.A. Martinez, and M.P. Portillo. 2006. trans-10,cis-12 Conjugated linoleic acid inhibits lipoprotein lipase but increases the activity of lipogenic enzymes in adipose tissue from hamsters fed an atherogenic diet. *Br J Nutr.* 95:1112-9.
- Zabala, A., I. Churrua, A. Fernandez-Quintela, V.M. Rodriguez, M.T. Macarulla, J.A. Martinez, and M.P. Portillo. 2006. trans-10,cis-12 Conjugated linoleic acid inhibits lipoprotein lipase but increases the activity of lipogenic enzymes in adipose tissue from hamsters fed an atherogenic diet. *Br J Nutr.* 95:1112-9.
- Zappala, G., and M.M. Rechler. 2009. IGFBP-3, hypoxia and TNF-alpha inhibit adiponectin transcription. *Biochem Biophys Res Commun.* 382:785-9.
- Zhai, J.J., Z.L. Liu, J.M. Li, J.P. Chen, L. Jiang, D.M. Wang, J. Yuan, J.G. Shen, D.P. Yang, and J.Q. Chen. Different mechanisms of cis-9,trans-11- and trans-10,cis-12- conjugated linoleic acid affecting lipid metabolism in 3T3-L1 cells. *J Nutr Biochem.*

- Zhai, J.J., Z.L. Liu, J.M. Li, J.P. Chen, L. Jiang, D.M. Wang, J. Yuan, J.G. Shen, D.P. Yang, and J.Q. Chen. 2010. Different mechanisms of cis-9,trans-11- and trans-10,cis-12-conjugated linoleic acid affecting lipid metabolism in 3T3-L1 cells. *J Nutr Biochem*.
- Zhang, B., J. Berger, E. Hu, D. Szalkowski, S. White-Carrington, B.M. Spiegelman, and D.E. Moller. 1996. Negative regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene expression contributes to the antiadipogenic effects of tumor necrosis factor-alpha. *Mol Endocrinol*. 10:1457-66.
- Zhang, Y., M. Matheny, S. Zolotukhin, N. Tumer, and P.J. Scarpace. 2002. Regulation of adiponectin and leptin gene expression in white and brown adipose tissues: influence of beta3-adrenergic agonists, retinoic acid, leptin and fasting. *Biochim Biophys Acta*. 1584:115-22.
- Zhao, T., M. Hou, M. Xia, Q. Wang, H. Zhu, Y. Xiao, Z. Tang, J. Ma, and W. Ling. 2005. Globular adiponectin decreases leptin-induced tumor necrosis factor-alpha expression by murine macrophages: involvement of cAMP-PKA and MAPK pathways. *Cell Immunol*. 238:19-30.
- Zhao, T., M. Hou, M. Xia, Q. Wang, H. Zhu, Y. Xiao, Z. Tang, J. Ma, and W. Ling. 2005. Globular adiponectin decreases leptin-induced tumor necrosis factor-alpha expression by murine macrophages: involvement of cAMP-PKA and MAPK pathways. *Cell Immunol*. 238:19-30.
- Zhou, H., X. Song, M. Briggs, B. Violand, W. Salsgiver, E.A. Gulve, and Y. Luo. 2005. Adiponectin represses gluconeogenesis independent of insulin in hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 338:793-9.
- Zhou, M., A. Xu, P.K. Tam, K.S. Lam, L. Chan, R.L. Hoo, J. Liu, K.H. Chow, and Y. Wang. 2008. Mitochondrial dysfunction contributes to the increased vulnerabilities of adiponectin knockout mice to liver injury. *Hepatology*. 48:1087-96.
- Zhu, M., J. Miura, L.X. Lu, M. Bernier, R. DeCabo, M.A. Lane, G.S. Roth, and D.K. Ingram. 2004. Circulating adiponectin levels increase in rats on caloric restriction: the potential for insulin sensitization. *Exp Gerontol*. 39:1049-59.
- Zoccali, C., F. Mallamaci, G. Tripepi, F.A. Benedetto, S. Cutrupi, S. Parlongo, L.S. Malatino, G. Bonanno, G. Seminara, F. Rapisarda, P. Fatuzzo, M. Buemi, G. Nicocia, S. Tanaka, N. Ouchi, S. Kihara, T. Funahashi, and Y. Matsuzawa. 2002. Adiponectin, metabolic risk factors, and cardiovascular events among patients with end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 13:134-41.

## ANNEXES

### PUBLICATIONS

#### Article issu de travaux de thèse

Djaouti, L., T. Jourdan, L. Demizieux, M. Chevrot, J. Gresti, B. Verges, and P. Degrace. (2010) Different effects of pioglitazone and rosiglitazone on lipid metabolism in mouse cultured liver explants. *Diabetes Metab Res Rev.* 26:297-305.

#### Articles issus de collaborations au cours de la thèse

Degrace, P., Demizieux, L., Du, Z-Y., Gresti, J., Caverot, L., Djaouti, L., Jourdan, T., Moindrot, B., Guiland, J-C., Hocquette, J-F. and Clouet, P. (2007) Regulation of lipid flux between liver and adipose tissue during transient hepatic steatosis in carnitine-depleted rats. *J Biol Chem.* 282:20816-26

Jourdan, T, Djaouti, L., Demizieux L, Gresti J, Verges B, and Degrace P. (2009) Liver carbohydrate and lipid metabolism of insulin-deficient mice is altered by trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid. *J Nutr.* 139:1901-7.

Jourdan, T., Djaouti, L., Demizieux, L., Gresti, J., Vergès, B., Degrace, P. (2010) CB1 antagonism exerts specific molecular effects on visceral and subcutaneous fat and reverses liver steatosis in diet-induced obese mice. *Diabetes.* 59(4):926-34.

#### Abstracts publiés

Djaouti L., Jourdan T., Demizieux L., Chevrot M., Gresti J., Vergès B. and Degrace P. (2009) Pioglitazone and Rosiglitazone have significantly different effects on lipid metabolims in mouse cultured liver explants. 45th European Association for the Study of Diabetes (EASD) Annual Meeting, Vienne, Autriche.

Jourdan, T., Djaouti, L., Demizieux, L., Gresti, J., Verges, B. and Degrace, P. (2010) CB1 antagonism exerts specific effects on visceral and subcutaneous fat and reverses

liver steatosis in diet-induced obese mice. XIth International Congress on Obesity (ICO), Stockholm, Suède (T2:OS2.5).

## **Communications**

### **Communication orales**

2009 : Communication orale lors au 15<sup>e</sup> forum des jeunes chercheurs à Dijon, France

### **Communication affichées**

2007 : Présentation d'un poster lors du 13<sup>e</sup> forum des jeunes chercheurs à Dijon, France

2008 : Présentation d'un poster lors du 4<sup>e</sup> congrès Goût-nutrition-santé à Dijon, France

2009 : Présentation d'un poster du 45<sup>e</sup> « European Association for the Study of Diabetes (EASD) Annual Meeting » à Vienne, Autriche.