

Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse III Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Discipline ou spécialité :

Physiopathologie

Présentée et soutenue par :

Chantal Bertrand

le : Mardi 26 Novembre 2013

Titre :

Rôles de l'Apeline et de l'EPA
sur le métabolisme énergétique
au cours de la résistance à l'insuline

Ecole doctorale :

Biologie, Santé, Biotechnologies (BSB)

Unité de recherche :

U1048 - I2MC - Equipe 3

Directeur(s) de Thèse :

Pr Isabelle Castan-Laurell

Rapporteurs :

Dr Catherine Postic (INSERM, Paris)

Dr Nathalie Bernoud-Hubac (INSERM, Lyon)

Membre(s) du jury :

Pr Pierre Gourdy (INSERM, Toulouse)

Dr Jacques Grober (INSERM, Dijon)

Dr Hervé Guillou (INRA, Toulouse)

The most exciting phrase to hear in science,
the one that heralds new discoveries,
is not “Eureka!”, but “That’s funny...”

Isaac Asimov
(1920-1992)
Professeur en Biochimie,
Auteur, Vulgarisateur scientifique.

Résumé

Face à l'épidémie grandissante de diabète de type II, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques est l'un des principaux enjeux de santé publique. Notre équipe s'intéresse à l'apeline, une adipokine qui, bien que surexprimée en condition d'obésité, est bénéfique, et améliore la sensibilité à l'insuline de souris obèses et résistantes à l'insuline, en agissant essentiellement sur le métabolisme énergétique musculaire. Or le rôle de l'apeline sur le foie dans ce contexte n'est pas connu.

Dans le but de le déterminer, nous avons étudié, chez des souris obèses et insulino-résistantes, les effets d'un traitement chronique à l'apeline sur les principales fonctions métaboliques du foie, et l'expression de son récepteur, APJ, dans différentes populations cellulaires hépatiques, ainsi que sa régulation au cours de l'insulino-résistance. Nous avons pu montrer que les taux de glycogène ne sont pas modifiés, mais que la stéatose hépatique est diminuée de 40% après 4 semaines de traitement à l'apeline. Cela est accompagné d'une diminution de l'expression de SREBP-1c et de la FAS, ce qui suggère que la lipogenèse *de novo* est réduite par ce traitement. Cela est associé à la diminution de l'oxydation des lipides et de leur sécrétion sous forme de VLDL. Ces effets semblent par contre être la conséquence du traitement à l'apeline sur l'amélioration globale de la sensibilité à l'insuline de l'organisme plutôt qu'un effet direct de l'apeline sur le foie. En effet, bien que l'expression génique d'APJ augmente dans le foie des souris obèses et insulino-résistantes, les études d'immunofluorescence n'ont pas permis de révéler la présence d'APJ dans les hépatocytes. Cependant la présence d'APJ sur un autre type cellulaire n'exclut pas des effets sur le métabolisme hépatique.

L'acide eicosapentaénoïque (EPA), un acide gras polyinsaturé de la famille des ω 3, est connu aussi pour améliorer la sensibilité à l'insuline et limiter la prise de poids chez le rongeur. De plus, l'EPA est capable d'augmenter l'expression de l'apeline par le tissu adipeux. Comme l'apeline exerce des effets bénéfiques sur le muscle, nous avons étudié la régulation du système apeline/APJ musculaire par l'EPA, chez les souris nourries avec un régime gras supplémenté en EPA (3,6% des lipides). Ce régime, après 10 semaines, freine l'apparition de l'obésité et de l'intolérance au glucose, augmente la capacité du muscle à oxyder les lipides, et augmente l'expression de l'apeline et d'APJ dans le muscle. *In vitro*, l'EPA induit l'expression mais aussi la sécrétion de l'apeline, ce qui suggère que l'apeline puisse être une myokine et un potentiel intermédiaire des effets bénéfiques de l'EPA en condition de résistance à l'insuline.

Abstract

Faced with the increasing prevalence of type II diabetes, the development of new therapeutic strategies is one of the major public health issues. Our research group studies focus on apelin, an adipokine overexpressed in obesity, that is beneficial and improves insulin sensitivity in obese and insulin resistant mice, by acting essentially on the muscle lipid metabolism. However, the role of apelin on liver metabolism has not been addressed yet.

We thus studied, in obese and insulin resistant mice, the effects of a chronic apelin treatment on the main hepatic metabolic functions, as well as the expression and the regulation of apelin receptor, named APJ, in different hepatic cell types. We have shown that glycogen stores were not modified, but hepatic steatosis was reduced by 40% after 4 weeks of apelin treatment. This was associated to a decreased gene expression of SREBP-1c and FAS, suggesting that *de novo* lipogenesis was reduced by this treatment. In addition, lipid oxidation and secretion of VLDL were decreased. These effects seem to be the consequence of the treatment on the global amelioration of insulin sensitivity, rather than a direct apelin effect on the liver. Indeed, even though APJ gene expression is increased in the liver of obese and insulin resistant mice, the immunofluorescence experiments did not reveal the presence of APJ in hepatocytes. However, the presence of APJ in another cell type doesn't rule out indirect effects on the hepatic metabolism.

Eicosapentaenoic acid (EPA), a polyunsaturated fatty acid from the ω 3 family, is also able to improve insulin sensitivity and to reduce weight gain. Moreover, EPA is able to increase apelin expression in the adipose tissue. As apelin exerts beneficial metabolic effects in the muscle, we studied the regulation of the muscle apelin/APJ system by EPA, in mice fed with a high fat diet supplemented with EPA (3.6% of total lipids). This diet, after 10 weeks, prevented the development of obesity, glucose intolerance, alterations in muscle metabolism, and increased apelin and APJ muscle expression. *In vitro*, EPA induced apelin expression but also its secretion, suggesting that apelin could be a myokine, and a potential mediator of EPA's beneficial effects in insulin resistance.

Sommaire

Avant-propos	7
Chapitre I : L'insulino-résistance.....	9
Chapitre II : Le foie, fonctions métaboliques et dysfonctions lors de l'insulino-résistance	21
I) Le foie : un organe hétérogène	21
II) Métabolisme énergétique du foie.....	28
1) La stéatose, et l'évolution vers les NAFLD plus sévères.....	29
2) Métabolisme glucidique du foie.....	33
A) L'entrée de glucose dans l'hépatocyte	33
B) La glycolyse	34
C) La glycogénogenèse	36
D) La glycogénolyse	37
E) La néoglucogenèse	38
3) Métabolisme lipidique	41
A) L'entrée d'acides gras dans l'hépatocyte.....	42
B) La lipogenèse <i>de novo</i> et la synthèse de triglycérides	43
a) La régulation de la lipogenèse de novo par l'insuline et SREBP-1c.....	44
b) La régulation de la lipogenèse de novo par le glucose et ChREBP.....	51
c) La régulation de la lipogenèse de novo par d'autres acteurs intracellulaires.....	52
C) La sécrétion des lipides : les VLDL.....	54
D) La β -oxydation	56
E) La cétogenèse.....	61
III) Le paradoxe de l'insulino-résistance hépatique.....	63
IV) La place du foie stéatosé dans le diabète de type II : cause ou conséquence ?	64
V) Les hépatokines.....	71
VI) La résistance à l'insuline dans les autres organes.....	83
1) Le tissu adipeux insulino-résistant	83
2) Le muscle insulino-résistant	87
VII) Effets des traitements antidiabétiques sur le métabolisme hépatique.....	89
Chapitre III: Le système Apeline/APJ : Une cible intéressante dans le traitement de l'insulino-résistance.....	95
I) Description de l'apeline et de son récepteur APJ.....	95
II) Rôles du système Apeline/APJ dans la physiopathologie	101

1) Rôle du système Apeline/APJ dans la sphère cardiovasculaire	101
2) Rôle du système Apeline/APJ dans le système nerveux central	102
3) Rôle du système Apeline/APJ dans la sphère gastrointestinale	104
4) Rôle du système Apeline/APJ dans le métabolisme énergétique.....	105
A) Régulation de la production et de la sécrétion de l'insuline	105
B) Effets de l'apeline sur la sensibilité à l'insuline et sur le métabolisme énergétique	106
a) Effets de traitements aigus à l'apeline.	106
b) Effets de traitements chroniques à l'apeline	109
III) Le système Apeline/APJ et le foie.....	114
1) Le système Apeline/APJ et les pathologies sévères du foie.....	114
A) Localisation de l'apeline et d'APJ dans le foie cirrhosé	114
B) Rôle du système Apeline/APJ dans la cirrhose	116
2) Rôle du système apeline/APJ dans la résistance à l'insuline hépatique	121
3) Taux d'apeline et pathologies hépatiques	123
Chapitre IV : L'EPA, un acide gras qui vous veut du bien.....	125
I) Les acides gras polyinsaturés, essentiels au fonctionnement de l'organisme.....	125
II) PUFAS et prévention de pathologies.....	130
1) PUFAs et maladies cardiovasculaires	130
2) PUFAs et stress oxydant	131
3) PUFAs et inflammation.....	132
4) PUFAs et dyslipidémie.....	133
III) Effets des PUFAS sur la résistance à l'insuline.....	134
1) Etudes épidémiologiques et cliniques.....	134
2) Modèles animaux et <i>in vitro</i>	136
IV) L'EPA et les adipokines.....	141
1) Effets de l'EPA sur les adipokines délétères.....	142
2) Effets de l'EPA sur les adipokines bénéfiques.....	143
3) Effets de l'EPA sur l'apeline.....	147
Objectifs de la thèse	149
Résultats.....	151
Conclusion générale	Erreur ! Signet non défini.

Abréviations

AA : Acide Arachidonique	DGAT : DG-acyltransférase
ACC : Acétyl-coA Carboxylase	DHA : acide docosahéxaénoïque
ACE2 : Angiotensine Converting Enzyme 2	DPA : Acide Docosapentaénoïque
AcylCN : Acylcarnitines	eIF2 α : Eukaryotic Initiation Factor 2 α
AGL : Acides Gras Libres	EPA : Acide Eicosapentaénoïque
ALAT : Alanine Aminotransférase	ET-1 : Endothéline 1
AMPc : AMP cyclique	FAS : Fatty Acid Synthase
AMPK: AMP-activated Protein Kinase	FAT : Fatty acid transporter (=CD36)
AngII : Angiotensine II	FGF : Fibroblast Growth Factor
Angpl : Angiopoietin-related protein	FOXO : Forkhead box O
Apo : Apolipoprotéine	FXR : Farnesoid X Receptor
AS160 : Akt Substrate of 160 kDa	G6P : Glucose-6-Phosphate
ASAT : Aspartate Aminotransférase	G-6-Pase : G6P phosphatase
α SMA : α -Smooth Muscle cell Actin	GK : Glucokinase
AT1 : récepteur de type 1 à l'Angiotensine II	GLP-1 : Glucagon Like Peptide
ATF4 : Activating Transcription Factor 4	GLUT : Glucose Transporter
ATGL : Adipose TG Lipase	GPAT : Glycérophosphate Acyltransférase
β HB : β -Hydroxybutyrate	HFD : High Fat Diet
bHLH-LZ : Basic Helix-Loop-Helix Leucine Zipper	HMG : 3-hydroxy-méthyl-glutaryl
BiP : Binding Immunoglobulin Protein	HOMA-IR : homeostasis model of assessment – insulin resistance
BPA : Bisphénol A	icv : intracérébroventriculaire
ChREBP : Carbohydrate-Responsive Element Binding Protein	I κ K : Inhibitor of κ B Kinase
coA : coenzyme A	IL : Interleukine
COX : Cyclo-oxygénase	IMC : Indice de Masse Corporelle
CREB : cAMP-Responsive Element Binding Protein	ip : intrapéritonéale
DAG : Di-Acyl Glycérol	IRE1 : Inositol-REquiring 1
	IRS-1 : Insulin Receptor Substrate 1
	Iv : intraveineuse

JNK : Jun NH2-terminal Kinase
 LA : Acide Linoléique
 LDN : lipogenèse de novo
 LOX : Lipo-oxygénase
 LPL : Lipoprotéine Lipase
 LPS : Lipopolysaccharides
 LT : Leucotriènes
 LXR : Liver-X-Receptor
 MAPK : Mitogen activated protein kinases
 MCP-1 : Macrophage Chemoattractant Protein-1
 MEC : Matrice Extracellulaire
 MTP : Microsomal TG Transfer Protein
 MUFA : acide gras monoinsaturé (Mono Unsaturated Fatty Acid)
 NAFLD : Non Alcoholic Fatty Liver Diseases
 NASH : Non Alcoholic Steatohepatitis
 NFκB : Nuclear Factor κB
 NO : monoxyde d'azote
 NOS : NO Synthase
 OAA : Oxalo-Acétate
 OMS : Organisation Mondiale de la Santé
 PDH : Pyruvate-Déshydrogénase
 PEP : Phosphoénol Pyruvate
 PEPCK : PEP Carboxykinase
 PERK : PKR-like ER-localized eIF2α Kinase
 PFK : Phosphofuctokinase
 PG : Prostaglandine
 PGC1α : PPARγ Coactivator 1α
 PGI : Prostacyclines
 PI3K : Phosphoinositol-3-Kinase
 PK : Protéine Kinase
 PPAR : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
 PUFA : acide gras polyinsaturé (Poly-Unsaturated Fatty Acid)
 RCPG : Récepteur Couplé aux Protéines G
 ROS : espèces actives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species)
 S1P : Site 1 Protease
 SCAP : SREBP Cleavage Activating Protein
 SFA : acide gras saturé (Saturated Fatty Acid)
 SGLT : Sodium/Glucose Transporter
 SNP : Single Nucleotide Polymorphism
 SREBP : Sterol Regulatory Element Binding Protein
 TG : Triglycéride
 TGF : Transforming Growth Factor
 TGIM : TG Intramusculaires
 TNFα : Tumor Necrosis Factor α
 TX : Thromboxanes
 TZD : Thiazolidinediones
 UCP : Uncoupling Protein
 VLCFA : Very Long Chain Fatty Acid
 VLDL : Very Low Density Lipoprotein
 Wt : wild-type
 ω3, ω6 : omega 3, omega 6

Table des illustrations

Figure 1. Signalisation de l'insuline et entrée du glucose.....	10
Figure 2. Organisation du foie.....	22
Figure 3. Evolution de la pathologie hépatique.....	30
Figure 4. Entrée du glucose dans l'hépatocyte.....	34
Figure 5. La glycolyse	36
Figure 6. La néoglucogenèse hépatique à partir du pyruvate.	39
Figure 7. La lipogenèse <i>de novo</i> et la synthèse de triglycérides.	44
Figure 8. Activation par l'insuline et effets transcriptionnels de SREBP-1c dans le foie.	46
Figure 9. La réponse UPR et l'activation de SREBP-1c.....	49
Figure 10. Formation d'une VLDL	55
Figure 11. Oxydation des lipides dans l'hépatocyte.	59
Figure 12. La céto-genèse hépatique.....	62
Figure 13. L'adipocyte, une cellule endocrine.	87
Figure 14. Maturation de l'apeline.	99
Figure 15. Les effets de traitements chroniques à l'apeline	113
Figure 16. Rôle pro-fibrosant de l'apeline dans le foie cirrhoté.....	118
Figure 17. La biosynthèse des acides gras poly-insaturés des familles $\omega 3$ et $\omega 6$	129
Figure 18. Récapitulatif des effets de la supplémentation en EPA sur le métabolisme énergétique de souris nourries avec un régime HFD.....	155
Figure 19. Récapitulatif des effets du traitement à l'apeline pendant 4 semaines sur le foie de souris obèses et résistantes à l'insuline.	200
Tableau 1. Les hépatokines.....	82
Tableau 2. Classification des acides gras saturés, mono-insaturés et poly-insaturés.....	126

Avant-propos

Les pathologies métaboliques telles que le diabète et l'obésité ont une prévalence en constante augmentation. Le diabète de type II est caractérisé par une résistance à l'insuline qui touche plusieurs organes, dont les muscles squelettiques et le foie. La résistance à l'insuline hépatique se traduit par une perte des effets de l'insuline sur l'inhibition de la production de glucose conduisant à une néoglucogenèse non contrôlée, et par un maintien des effets de l'insuline sur la lipogenèse *de novo* et l'accumulation de lipides, conduisant à une stéatose. A ce jour, aucun traitement n'existe pour traiter spécifiquement la stéatose hépatique, mais certains traitements antidiabétiques ont pour effet de la diminuer, parallèlement à l'amélioration de la sensibilité à l'insuline.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée, dans un contexte d'obésité et de résistance à l'insuline chez la souris, d'une part aux effets d'un traitement chronique à l'apeline, une adipokine dont les effets sur la sensibilité à l'insuline en condition de résistance à l'insuline ont été démontrés dans le muscle, sur le métabolisme hépatique ; et d'autre part aux effets d'un acide gras polyinsaturé, l'acide eicosapentaénoïque (EPA) sur la régulation de l'expression de l'apeline dans le muscle squelettique de souris, *in vivo* et *in vitro*.

Ainsi, la partie introductive de ce manuscrit, après avoir exposé les bases physiopathologiques de la résistance à l'insuline, sera focalisée sur les divers processus métaboliques qui ont lieu dans le foie, ainsi que sur les données bibliographiques décrivant leurs dérégulations en condition de résistance à l'insuline, afin de pouvoir appréhender les effets du traitement chronique à l'apeline sur le foie. La suite de l'introduction concerne l'apeline et l'EPA, leurs rôles connus dans la physiologie générale, leurs effets sur la sensibilité à l'insuline, et le lien qui a récemment été établi entre les deux.

Introduction

Chapitre I

L'insulino-résistance

I) Homéostasie glucidique

L'homéostasie glucidique est essentielle au fonctionnement de l'organisme. En effet, la régulation de la glycémie est nécessaire, notamment pour le cerveau qui utilise le glucose comme source d'énergie quasi-exclusive et ne peut pas le stocker. Il a donc besoin d'une perfusion glucidique constante. Or, au cours de la journée, la glycémie d'une personne saine oscille autour d'une valeur moyenne d'1g/L (5mM). L'existence de systèmes de régulation permet d'assurer un retour rapide de la glycémie à une valeur physiologique.

A la suite d'un repas, la glycémie augmente à la suite de l'absorption intestinale du glucose, puis l'insuline est rapidement sécrétée par les cellules β du pancréas. C'est cette hormone qui dirige les opérations en ce qui concerne l'entrée du glucose principalement dans les muscles squelettiques, le tissu adipeux et le cœur, via les transporteurs de glucose GLUT4 (Glucose transporter 4). La famille des GLUT comporte 14 isoformes, certaines d'entre elles pouvant transporter d'autres composés tels que le fructose (GLUT2 et GLUT5) ou l'acide urique (GLUT9) [Thorens, et al. 2010].

La spécificité de GLUT4 est que sa présence dans la membrane plasmique des cellules est dépendante de l'insuline : il est présent dans des vésicules intracellulaires, qui fusionnent avec la membrane plasmique en réponse à l'insuline [Larance, et al. 2008]. La liaison de l'insuline avec les unités α extracellulaires de son récepteur à tyrosine-kinase entraîne son autophosphorylation sur des résidus tyrosine de ses deux sous-unités β intracellulaires. Cela entraîne la phosphorylation d'IRS-1 (insulin receptor substrate 1) sur des résidus tyrosine également. Suite à la phosphorylation d'IRS-1, diverses protéines sont recrutées, et parmi elles, la PI3K (phosphoinositol-3-kinase), dont la sous-unité catalytique, après son activation par phosphorylation, va générer un PiP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate) à partir de PiP2 (phosphatidylinositol-4,5-biphosphate). Des protéines kinases (PK) sont alors recrutées à la

membrane plasmique et activées par phosphorylation, et parmi elles la PDK-1 (3-phosphoinositide dependent kinase 1), la PKB (Akt), et les PKC λ et ζ (PKC λ/ζ). Une fois activée, Akt peut phosphoryler et inactiver la protéine AS160 (Akt substrate of 160kDa), ce qui induit le trafic des vésicules contenant GLUT4 vers la membrane plasmique, en activant les protéines Rab-GTPase présentes sur la membrane des vésicules ; et la PKC promeut la translocation en agissant sur le cytosquelette de la cellule [Liu, et al. 2007]. Les processus de docking et de fusion des vésicules avec la membrane plasmique sont permis grâce au complexe protéique SNARE, présent à la fois sur les vésicules et sur la membrane plasmique. Les transporteurs GLUT4, alors à la surface de la cellule, peuvent ainsi faire entrer le glucose circulant en plus grande quantité (Figure 1).

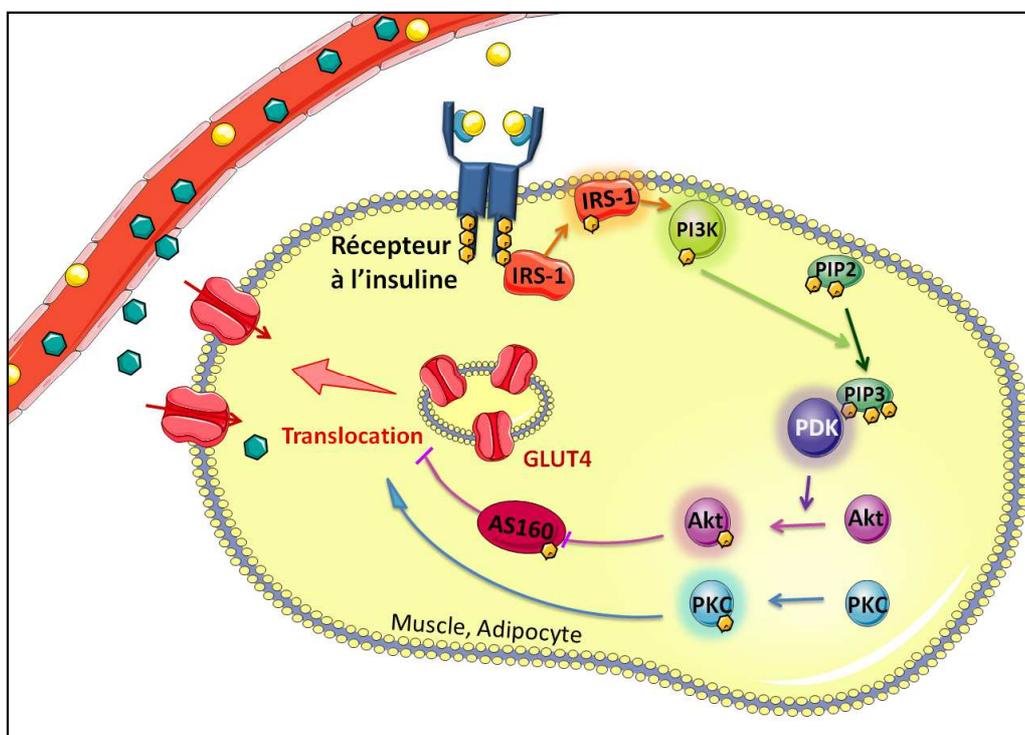


Figure 1. Signalisation de l'insuline et entrée du glucose.

La liaison de l'insuline (en jaune) avec les unités α extracellulaires de son récepteur entraîne l'autophosphorylation des résidus tyrosine des deux sous-unités β intracellulaires. IRS-1 phosphorylé sur des résidus tyrosines permet le recrutement de la PI3K qui génère du PIP3. Celui-ci active la PDK qui phosphoryle Akt et inhibe AS160. Ceci permet la translocation des transporteurs GLUT4 à la membrane plasmique. L'activation de la PKC permet elle aussi la translocation en agissant sur le cytosquelette. Une fois à la surface de la cellule, les transporteurs GLUT4, plus nombreux, augmentent le transport de glucose (en vert). IRS-1 (insulin receptor substrate 1), PI3K (phosphoinositidokinase), PIP3 (phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate), PDK (3-phosphoinositide dependent kinase), AS160 (Akt substrate of 160kDa), PKC: protéine kinase C.

Le glucose absorbé lors d'un repas entre également dans le foie, mais de façon indépendante de l'insuline via GLUT2. Sous l'action de l'insuline, la néo-synthèse de glucose (néoglucogenèse) est inhibée, et le glucose capté est stocké sous forme de glycogène dans le foie et les muscles (glycogénogenèse), ou sous forme de lipides dans le tissu adipeux (lipogenèse *de novo*). Le glucose peut également être catabolisé pour générer de l'énergie, en particulier dans les muscles. Les effets de l'insuline sur le métabolisme glucidique du foie seront détaillés dans le chapitre II.

L'insuline a également des effets sur le métabolisme lipidique. Par exemple, dans le tissu adipeux, outre l'externalisation des GLUT-4, elle inhibe la lipolyse adipocytaire. L'activation d'Akt permet d'activer la phosphodiesterase PDE3B, ce qui entraîne la dégradation de l'AMP cyclique (AMPC) intracellulaire, et empêche l'activation de la PKA. La PKA pouvant activer la LHS (lipase hormonosensible), la lipolyse est ainsi inhibée. La régulation du métabolisme lipidique dans le foie sera également détaillée dans le chapitre II.

L'entrée de glucose dans les organes permet une diminution de la glycémie, et lorsqu'elle rejoint sa valeur physiologique, la sécrétion de l'insuline diminue.

En période de jeûne, lorsque la glycémie est basse, des régulations hormonales et nerveuses vont activer les voies productrices de glucose afin d'élever la glycémie, en ciblant principalement le foie. Au court terme, le glucagon, une hormone sécrétée par les cellules α du pancréas, et l'adrénaline, une neuro-hormone du système nerveux sympathique, induisent la dégradation du glycogène en glucose (glycogénolyse) et la néoglucogenèse. Lors d'un jeûne prolongé, ce sont les glucocorticoïdes qui induisent la néoglucogenèse. La production hépatique de glucose est responsable de 80% du glucose libéré dans la circulation, le reste provenant des reins et de l'intestin. Au cours du jeûne, alors que le stock de glycogène hépatique diminue, la néoglucogenèse prend une part croissante dans la production du glucose [Landau, et al. 1996]. Lors d'un jeûne prolongé, le glucose est orienté préférentiellement vers le cerveau, les autres organes pouvant utiliser les lipides, relargués dans la circulation suite à la lipolyse dans le tissu adipeux, comme source d'énergie. Les corps cétoniques produits principalement par le foie (cétogenèse) en condition de jeûne prolongé peuvent également être utilisés par le cerveau.

Ainsi, une régulation fine de la glycémie est rendue possible par la coordination de ces systèmes, et une dérégulation chronique de la glycémie peut mener à l'apparition d'une résistance à l'insuline, puis d'un diabète de type II, qui seront définis dans le prochain paragraphe.

II) Insulino-résistance et diabète de type II

1) Définitions

La résistance à l'insuline est la condition dans laquelle les organes habituellement sensibles à l'insuline n'y répondent plus. L'organisme se retrouve alors dans une situation où le glucose circulant après un repas n'est pas suffisamment transporté dans les organes, et où la production endogène de glucose n'est pas correctement inhibée, résultant en une glycémie anormalement élevée. Le taux d'acides gras circulants est également élevé, dû à un défaut d'inhibition de la lipolyse adipocytaire.

Dans un premier temps, le pancréas va s'adapter en sécrétant plus d'insuline, ce qui permet de stabiliser la glycémie à une valeur physiologique. On est alors dans une situation d'hyperinsulinémie, mais de glycémie normale, caractéristique d'un pré-diabète.

Au long terme, l'organisme devenant plus insulino-résistant, l'hyperinsulinémie ne parvient plus à maintenir une glycémie stable, et on se retrouve dans une situation d'hyperinsulinémie couplée à une hyperglycémie, qui est caractéristique du diabète de type II. Une personne hyperglycémique est définie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme ayant une glycémie à jeun supérieure à 1,26 g/l (7mM).

Dans un stade plus avancé de cette pathologie, les cellules β du pancréas étant surchargées par la demande en insuline, elles entrent en apoptose suite à leur dysfonctionnement, notamment via l'induction d'un stress du réticulum endoplasmique (RE) trop important et chronique [Scheuner, et al. 2008]. Cela mène à l'effondrement de l'insulinémie, et à une situation similaire à un diabète de type I, avec une hyperglycémie associée à une insulinopénie.

2) Mécanismes cellulaires de la résistance à l'insuline

La perturbation de la signalisation insulinique peut avoir lieu à plusieurs niveaux. La quantité de récepteurs à l'insuline présents à la surface des cellules peut être diminuée par un phénomène d'internalisation. Ce phénomène est physiologique, mais en condition d'hyperinsulinémie chronique, les récepteurs seront moins renouvelés à la surface des cellules.

La cascade d'activations intracellulaires suite à la liaison de l'insuline sur son récepteur est rendue possible par la phosphorylation des acteurs intracellulaires sur des résidus tyrosine. Cependant le récepteur à l'insuline et IRS-1 possède aussi des sites de phosphorylation sur des résidus sérine, qui, lorsqu'ils sont phosphorylés, ne leur permettent plus de reconnaître leurs substrats respectifs ni de les activer. Lorsque le ratio Ser-phosphorylation/Tyr-phosphorylation est élevé, l'insuline est moins efficace. Cette phosphorylation sur les résidus sérines est rendue possible par l'activation de certaines protéine-kinases comme les PKC atypiques telle que la PKC θ , ou encore les kinases liées aux réponses de stress comme les JNK et I κ K [Schmitz-Peiffer, et al. 2008]. La protéine mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) est également capable de phosphoryler IRS-1 sur des résidus sérine inhibiteurs, soit directement sous la forme du complexe mTORC1, soit par l'action de son substrat S6K1 [Howell, et al. 2011]. Son action est transitoire, et est considérée comme essentielle pour assurer que les effets de l'insuline ne persistent pas dans le temps plus que nécessaire. Cependant, une activation chronique de mTOR peut mener à une résistance à l'insuline : une augmentation de l'activité de mTORC1 a été observée dans le foie et les muscles de modèles murins d'obésité et d'hyperinsulinémie. Le complexe mTORC2 peut lui aussi interférer avec la signalisation insulinique en atténuant la phosphorylation d'Akt, et en phosphorylant la sérine 473 [Howell and Manning 2011], [Sarbassov, et al. 2005].

La quantité d'IRS-1 peut elle-aussi réguler la sensibilité à l'insuline des cellules : les protéines SOCS1 et 3 sont capables de se fixer à IRS1 et d'induire sa dégradation par le protéasome. Une étude *in vivo* a montré que la surexpression adénovirale de SOCS1 dans le foie induit cette dégradation, et provoque une intolérance à l'insuline chez les souris [Rui, et al. 2002].

Des protéines tyrosine phosphatases (PTPases) peuvent également inhiber la signalisation insulinique en déphosphorylant les tyrosines du récepteur à l'insuline et d'IRS-1

[Basciano, et al. 2009] [Byon, et al. 1998], et elles semblent être plus actives dans le tissu adipeux [Ahmad, et al. 1995] et les muscles de patients diabétiques [Ahmad, et al. 1997].

III) Etiologie de l'insulino-résistance et du diabète de type II

Selon l'OMS, le diabète de type II atteint désormais des proportions épidémiques, parallèlement à l'obésité. De nombreux efforts ont été fournis ces dernières années pour tenter de comprendre les causes de l'apparition de l'obésité, ainsi que pour trouver des moyens de limiter d'une part l'apparition d'une obésité morbide, et d'autre part pour limiter les "dommages collatéraux" de l'obésité, dont la résistance à l'insuline et le diabète de type II.

L'étiologie de l'obésité et de la résistance à l'insuline est aujourd'hui encore soumise à controverse. Il est évident qu'un déséquilibre entre la prise alimentaire et la dépense physique entraîne une prise de poids, cependant ces pathologies ne résulteraient pas d'une cause unique, mais plutôt d'un ensemble de facteurs génétiques et environnementaux.

Tout d'abord, les sociétés occidentales sont confrontées à une abondance de nourriture sans précédent dans l'histoire de l'humanité. La nourriture est omniprésente dans notre société, l'essor de l'industrie agro-alimentaire permettant un accès quasi-permanent à des plats prêts-à-consommer, et bien souvent très caloriques. Nous sommes également moins actifs physiquement : les travaux de manutention et d'extérieur sont moins représentés qu'avant, la plupart des gens se retrouve donc dans une situation de fort apport calorique pour une dépense énergétique faible. Cela amène rapidement à une prise de poids, qui peut, si elle n'est pas contrôlée, entraîner une obésité, définie par un indice de masse corporel (IMC) égal ou supérieur à 30 kg/m^2 , pouvant évoluer vers une obésité morbide ($\text{IMC} > 40 \text{ kg/m}^2$) et un diabète de type II. Cependant des prédispositions génétiques ou environnementales peuvent également jouer un rôle dans l'apparition de ces pathologies.

1) Une maladie génétique ?

Chaque individu possédant son propre patrimoine génétique unique, il répondra différemment à un mode de vie donné. L'idée d'une prédisposition génétique à l'obésité était présente dans les esprits bien avant la découverte des chromosomes : en 1852, le Dr Hufeland parlait déjà dans un traité de médecine générale [Hufeland, 1852] d'une forme familiale

d'obésité : "En général, une disposition congénitale a une grande influence ; ainsi certaines personnes restent maigres malgré la nourriture la plus riche, et d'autres deviennent obèses alors qu'elles sont soumises à restriction", et c'est en 1923 que le Dr Davenport démontre la concentration de l'obésité au sein de familles [Davenport 1923].

L'avènement de la génétique et le séquençage de l'ADN ont permis de confirmer ces observations. De simples mutations dans la séquence de gènes impliqués dans la signalisation insulinique ou dans le métabolisme énergétique peuvent avoir un impact sur le devenir des nutriments, et donc sur le développement d'une obésité et d'un diabète de type II [O'Rahilly 2009].

Un défaut d'expression, ou des mutations dans certains gènes peuvent provoquer une obésité qui peut évoluer vers une résistance à l'insuline. Parmi eux on retrouve le gène de la leptine, de la pro-opiomélanocortine (POMC), et du récepteur de l' α MSH (melanocyte-stimulating hormone), qui régulent la prise alimentaire, mais aussi celui de la PCSK1, une proprotéine convertase qui permet la maturation de l'insuline [O'Rahilly 2009].

De nombreux variants génétiques ont été retrouvés spécifiquement chez les personnes obèses, comparées avec des personnes de poids normal [Walley, et al. 2009] mais ils peuvent aussi avoir un rôle dans le développement de l'insulino-résistance. Un variant génétique est une séquence d'ADN qui est différente de celle portée par la majorité de la population, pour un gène donné. Cela peut être une différence d'un seul nucléotide, appelée SNP, pour "single nucleotide polymorphism". Les SNP associés à l'insulino-résistance se trouvent dans la plupart des cas dans des gènes ou dans des séquences voisines de gènes codant pour des protéines impliquées entre autres dans le métabolisme énergétique, le fonctionnement de la cellule β , la fonction adipocytaire, ce qui expliquerait la susceptibilité de certaines personnes à développer cette pathologie. Par exemple, plusieurs polymorphismes et SNPs dans le gène du transporteur d'acides gras FAT (Fatty Acid Transporter) ont été associés à des caractéristiques du syndrome métabolique, dont la sensibilité à l'insuline [Koonen, et al. 2011]. Un autre SNP localisé à proximité du gène *irs-1*, qui a pour effet une moindre expression et activation d'IRS-1, est associé à l'apparition d'une insulino-résistance, d'une hyper insulinémie et d'un diabète de type II [Rung, et al. 2009]. Au niveau de la cellule β , un SNP situé dans le gène d'un transporteur de zinc a été associé avec le diabète de type II [Sladek, et al. 2007], et on sait aujourd'hui que la délétion de ce gène résulte en une diminution de la sécrétion de l'insuline stimulée par le

glucose chez la souris [Pound, et al. 2009]. La fonction mitochondriale peut également être modifiée et entraîner une résistance à l'insuline: une mutation dans le génome mitochondrial est impliquée dans une forme de diabète de type II transmis par la mère [van den Ouweland, et al. 1992].

Selon l'hypothèse de J.V. Neel en 1962, [Neel 1999], la nature aurait sélectionné les individus qui ont la meilleure aptitude à résister à de longues périodes de privation de nourriture, donc la meilleure capacité à stocker les graisses, au temps des chasseurs-cueilleurs, grâce à leurs "thrifty genes", ou gènes d'épargne. De façon assez ironique, ce patrimoine génétique dont nous avons hérité est aujourd'hui plus un inconvénient qu'un avantage sélectif, face à l'abondance de nourriture à laquelle nous sommes désormais confrontés.

Cette hypothèse des gènes d'épargne a été remise en cause par J.R. Speakman en 2008 [Speakman 2008], qui a postulé que les gènes qui prédisposent certains personnes à développer une obésité et un diabète de type II auraient été conservés par un phénomène de dérive génétique plutôt que par sélection naturelle, lançant sa théorie des "drifty genes", ou gènes de dérive. Son hypothèse est basée sur le fait que la sélection naturelle décrite par J.V. Neel aurait eu pour résultat que nous serions tous porteurs des allèles (ou variants) d'épargne, or la totalité de la population mondiale n'est pas obèse. Néanmoins, l'environnement jouant un rôle important dans le développement de l'obésité, l'hypothèse de Neel garde toujours un certain crédit.

Si l'on considère l'hypothèse de Neel, ce phénomène de sélection va-t-il être inversé ? Les personnes obèses et résistantes à l'insuline ayant un risque de morbidité élevé dû à l'apparition de maladies métaboliques et cardiovasculaires, et une fertilité réduite [Sermondade, et al. 2012], [Cabler, et al. 2010], cela constituera-t-il une pression sélective positive pour les individus qui ne possèdent pas ces gènes d'épargne?

L'épigénétique joue elle aussi un rôle dans le développement de l'obésité et l'apparition du diabète de type II. Elle représente les modifications transmissibles et réversibles de l'expression des gènes sans changement des séquences nucléotidiques. Concernant principalement les micro-ARN et les phénomènes de méthylation de l'ADN et d'acétylation des histones, des modifications épigénétiques ont été incriminées dans diverses formes d'obésités [Herrera, et al. 2011], mais un possible rôle dans le développement du diabète de type II a

également été proposé. Dans les îlots de Langerhans de patients diabétiques, plus de 200 gènes sont méthylés différemment de ceux de sujets sains. Cela est associé à une modulation de leur expression, et certains d'entre eux ont un rôle dans l'inflammation, et dans la survie et le stress du RE des cellules β [Volkmar, et al. 2012]. L'identification de modifications épigénétiques de gènes impliqués dans le métabolisme énergétique, et de leur impact sur la sensibilité à l'insuline est en cours et représente un enjeu important dans la compréhension et dans la prise en charge de l'obésité et du diabète de type II.

La métagénomique, ou génomique du microbiote intestinal, a elle aussi de beaux jours devant elle. Notre système digestif abrite un véritable écosystème bactérien, majoritairement localisé dans le côlon, qui permet, entre autres, la digestion de certaines fibres végétales pour lesquelles notre organisme n'est pas équipé. C'est une relation de symbiose car chaque partie tire un bénéfice de l'autre. Le microbiote se nourrit et se maintient grâce aux nutriments présents dans notre tube digestif et aux sécrétions de la muqueuse intestinale. En contrepartie, ce microbiote assure le bon fonctionnement de notre système immunitaire, la conversion de certains acides biliaires, le développement des villosités intestinales et l'intégrité de la barrière intestinale [Nicholson, et al. 2005]. Le séquençage du génome bactérien a permis d'identifier les populations de bactéries présentes dans notre tube digestif, et de mettre en évidence des différences entre des patients obèses ou diabétiques et des sujets sains [Tilg, et al. 2011], [Delzenne, et al. 2011]. Les deux phyla les plus représentés sont les Bacteroidetes et les Firmicutes. En 2005, il a été montré que le microbiote de souris ob/ob contient moins de Bacteroidetes et plus de Firmicutes que celui de souris db/m [Ley, et al. 2005]. Une année plus tard, le même déséquilibre est retrouvé dans le microbiote de personnes obèses [Ley, et al. 2006]. Le fait marquant de cette étude est qu'une perte de poids suite à un régime pauvre en lipides ou en glucides permet de rétablir les populations bactériennes initialement présentes, ce qui lie la composition du microbiote au statut métabolique des patients obèses. Les patients diabétiques possèdent également un microbiote différent de celui de non-diabétiques [Wu, et al. 2010], et une étude animale a récemment démontré que la composition du microbiote peut conditionner la réponse de l'organisme à un régime riche en lipides et donc conditionner l'apparition ou non d'une obésité accompagnée d'une résistance à l'insuline [Le Roy, et al. 2012], ce qui rend la manipulation du microbiote intéressante dans le traitement de la résistance à l'insuline.

2) Une maladie environnementale ?

Les études de séquençage à grande échelle ont paradoxalement confirmé l'importance de l'influence de l'environnement sur le risque de développer une obésité et une insulino-résistance: la présence d'un variant génétique donné ne se traduira pas forcément par une obésité ou un diabète de type II, surtout si l'individu concerné n'évolue pas dans un environnement dit "obésogène".

Les facteurs environnementaux pouvant engendrer une obésité puis une résistance à l'insuline sont d'ordre socio-culturel, psychologique, ou concernent des substances non alimentaires contenues dans la nourriture.

Les polluants alimentaires joueraient un rôle potentiel dans l'apparition de l'obésité et de la résistance à l'insuline. Lorsque nous nous alimentons, nous n'ingérons que très rarement l'aliment pur : viennent souvent s'ajouter à l'aliment originel des polluants issus de sa préparation, qu'elle soit industrielle ou non. Hormis les résidus d'engrais ou de pesticides utilisés sur les végétaux, et les résidus de médicaments ou d'additifs ajoutés à l'alimentation animale que l'on retrouve dans la viande, les aliments peuvent aussi contenir des composés qui proviennent de leur emballage. Une étude menée en France en 2010, "Menus Toxiques", a analysé les contaminants contenus dans des repas types d'une journée d'un enfant d'une dizaine d'années. Bien que menée sur un faible échantillon d'aliments, cette étude a montré que, chaque jour, nous pouvons ingérer jusqu'à 81 substances étrangères (xénobiotiques) différentes. Ces résidus ne sont pas tous présents en quantités supérieures aux limites de sécurité fixées par les instances nationales et internationales, et ne présentent pas tous un risque avéré pour notre santé. Néanmoins, ces substances xénobiotiques se retrouvent dans notre organisme, et certaines ont été incriminées dans l'augmentation du risque de développer certains cancers, des troubles neurologiques ou des troubles de la reproduction [Li, et al. 2011a], et certaines sont désormais reconnues comme des perturbateurs endocriniens, pouvant altérer le métabolisme, et participer à l'étiologie de l'obésité et de la résistance à l'insuline. L'un de ces perturbateurs endocriniens ayant fait le plus de vagues récemment, et aussi le plus étudié, est le Bisphénol A (BPA), aujourd'hui reconnu comme néfaste pour l'organisme. Des études menées depuis les années 2000 ont montré une corrélation positive entre les taux de BPA urinaire et le risque d'obésité abdominale, d'insulino-résistance, de diabète de type II et de maladies cardiovasculaires [Lang, et al. 2008], [Wang, et al. 2012].

Parmi ses nombreux effets métaboliques, on retiendra surtout une augmentation du poids des tissus adipeux et du stockage de triglycérides (TG) dans le foie [Marmugi, et al. 2012], une diminution de la phosphorylation d'Akt stimulée par l'insuline dans les muscles et le foie [Alonso-Magdalena, et al. 2010], [Indumathi, et al. 2013], [Jayashree, et al. 2013], et une perturbation de la libération d'adipokines par le tissu adipeux [Hugo, et al. 2008], [Ben-Jonathan, et al. 2009]. Les études animales ont également permis de révéler l'importance de l'exposition in utero dans les effets du BPA sur l'augmentation du poids des animaux adultes.

D'autres perturbateurs endocriniens sont retrouvés dans l'alimentation, comme les POP (polluants organiques persistants), et sont à prendre en compte lorsque l'on veut déterminer les causes de l'apparition de l'obésité et du diabète de type II [Lee, et al. 2006b] chez une personne donnée : toutes les populations n'y sont pas exposées de la même façon.

Chapitre II

Le foie : fonctions métaboliques et dysfonctions lors de l'insulino-résistance

I) Le foie : un organe hétérogène

Le foie est un organe complexe, aussi bien dans sa composition cellulaire que dans sa structure microscopique. C'est le premier organe que le sang, provenant du tube digestif, traverse, et c'est en cela qu'il est le premier rempart de l'organisme contre les molécules xénobiotiques ingérées. Il est également très actif énergétiquement, et capable de sécréter des facteurs circulants appelés hépatokines, qui agissent sur le métabolisme d'autres organes, ce qui fait du foie un organe endocrine.

Après une description de la morphologie du foie, cette partie se focalisera sur ses fonctions énergétiques en condition physiologique et leurs dérégulations en condition de résistance à l'insuline et de diabète de type II.

1) Organisation du foie

Le foie est organisé en lobes, dont le nombre dépend de l'espèce considérée, eux-mêmes organisés en lobules. Le lobule est l'unité anatomique du foie, de forme hexagonale. Le foie humain ou murin ne présente pas de cloisonnement net de ces lobules en condition physiologique. Cependant, on peut distinguer les structures qui les délimitent : à chaque angle des lobules, on retrouve une triade portale, aussi appelée espace porte, qui présente un conduit biliaire récupérant les acides biliaires élaborés par les hépatocytes, une artère hépatique qui transporte du sang riche en oxygène en provenance du cœur, et une veine porte qui transporte le sang provenant du tube digestif et qui apporte les nutriments au foie (Figure 2). Les prolongements de l'artère hépatique et la veine porte fusionnent dans le lobule pour déverser le sang dans les sinusoides. On retrouve également dans cette triade un vaisseau lymphatique, souvent difficile à observer en histologie classique.

Chaque lobule est constitué en son centre d'une veine centro-lobulaire, autour de laquelle les hépatocytes sont organisés en travées de Remak, de façon radiale jusqu'aux bords

du lobule (Figure 2). Elle draine de façon centripète le sang qui provient des triades portales. Ce sang se déverse alors dans la veine cave inférieure pour retourner vers le cœur.

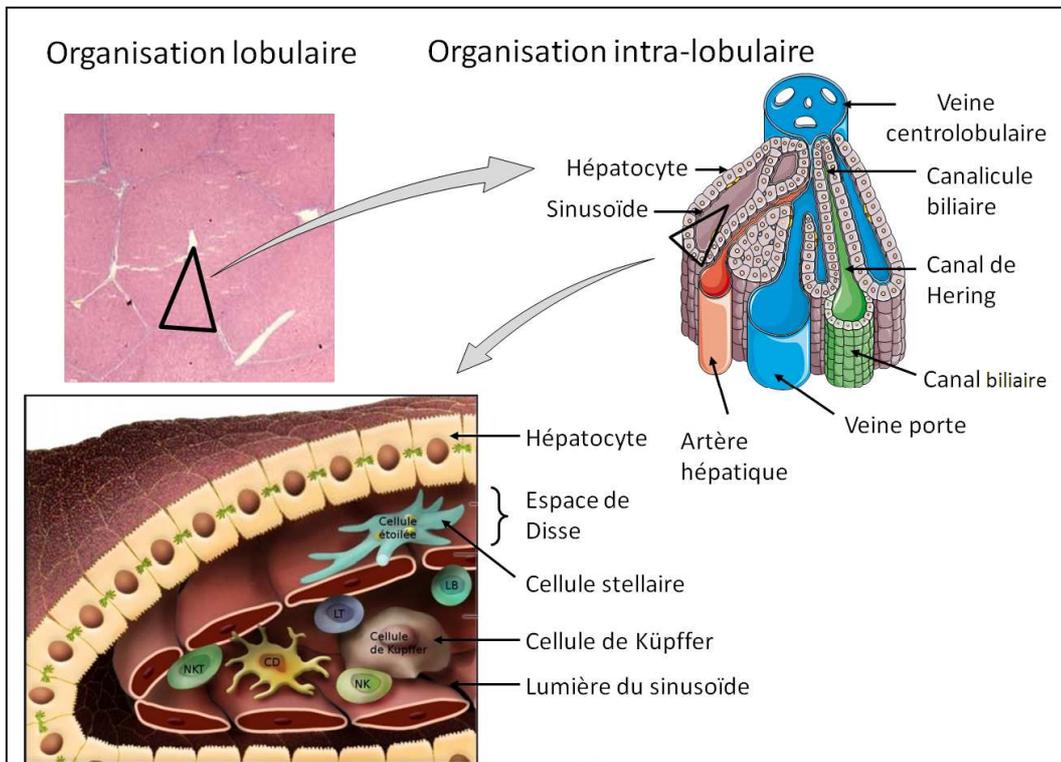


Figure 2. Organisation du foie.

Chaque lobule possède une veine centrolobulaire et plusieurs espaces portes à sa périphérie. Le sang circule de façon centripète dans les sinusoides pour rejoindre la veine centrolobulaire, et la bile élaborée par les hépatocytes circule de façon centrifuge pour rejoindre le canal biliaire. Les cellules immunitaires, notamment les cellules de Küpffer, sont localisées dans les sinusoides, et les cellules stellaires dans l'espace de Disse.

2) Différents types cellulaires

A) Les hépatocytes

Ce sont les cellules les plus représentées dans le foie, représentant de 60 à 80% du nombre de cellules [Racanelli, et al. 2006]. Ils ont une taille approximative de 20 μ m, sont polyédriques, et ont un ou plusieurs noyaux, ronds, situés au centre de la cellule. Ils ont la capacité de proliférer en cas d'agression (infection virale, hépatectomie partielle, exposition à des produits toxiques), ce qui confère au foie un fort pouvoir d'auto-régénération [Michalopoulos, et al. 1997]. Ce phénomène de prolifération est sous le contrôle de nombreux

facteurs, tels que l'HGF (hepatocyte growth factor), l'EGF (epidermal growth factor), le TGF α (Transforming growth factor α), l'IL-6 (interleukine 6), le TNF α (tumor necrosis factor α), l'insuline et la noradrénaline [Michalopoulos and DeFrances 1997].

Les hépatocytes sont des cellules polarisées : ils ont une surface basale, en contact avec un sinusoïde, ce qui permet les échanges avec le sang, et une surface apicale, en contact avec un canalicule biliaire.

Les hépatocytes sont de véritables usines du métabolisme énergétique, ce que l'on peut constater en les observant au microscope : elles possèdent de nombreuses mitochondries, peroxysomes, réticulum endoplasmique rugueux et lisses (RER et REL), et membranes de Golgi. C'est dans ces cellules qu'a lieu la majorité des événements métaboliques attribués au foie. Notamment le stockage et le relargage des nutriments circulants, la synthèse de facteurs de coagulation, la production de bile, mais également le métabolisme de certaines hormones et de la plupart des médicaments et xénobiotiques.

En fonction de leur proximité d'une veine centrale ou d'un espace porte, les hépatocytes sont spécialisés dans différentes voies métaboliques. C'est la zonation métabolique, qui est à l'origine d'une autre façon de compartimenter le foie : alors que le lobule est l'unité anatomique du foie, l'acinus en est l'unité fonctionnelle. Son axe central est formé par les cloisons virtuelles qui relient les espaces portes, où les hépatocytes sont spécialisés dans l'entrée et le catabolisme des acides gras, des acides aminés, et dans la néoglucogénèse. Les hépatocytes localisés en périphérie des acini, eux, sont spécialisés dans la lipogénèse, la glycolyse, la glycogénolyse, la céto-génèse, ainsi que dans la biotransformation des xénobiotiques et le métabolisme de l'alcool [Katz 1992]. Cette zonation est due en partie au gradient d'oxygène, d'hormones et de nutriments présents dans le sang, qui diminue à proximité de la veine centro-lobulaire.

➤ Les hépatocytes, lieu de synthèse du cholestérol et des acides biliaires

Les hépatocytes sont le lieu de synthèse de la bile, qui est constituée majoritairement d'acides biliaires, élaborés à partir de cholestérol dans le peroxysome. Le cholestérol est le

précurseur des acides biliaires mais aussi de la vitamine D, et des hormones stéroïdes. Le cholestérol circulant provient pour moitié de l'alimentation, l'autre moitié est biosynthétisée par l'organisme, par le foie, mais aussi par les intestins et la peau.

La biosynthèse du cholestérol se déroule de la façon suivante : deux molécules d'acétyl-coA dérivé du métabolisme glucidique et lipidique sont condensées en une molécule d'acétoacétyl-coA, qui est alors converti en HMG-coA (3-hydroxy-méthyl-glutaryl-coenzyme A) par la HMGcoA synthase, grâce à l'ajout d'un troisième acétyl-coA. Ce HMGcoA est distinct de celui formé lors de la cétogenèse car il est situé hors de la mitochondrie. Puis la HMGcoA réductase, enzyme limitante de la synthèse du cholestérol, forme une molécule de mévalonate, qui est alors transformé en isopentenyl-pyrophosphate (I-PP) en perdant un CO₂. La polymérisation de six molécules d'IPP génère une molécule contenant 30 atomes de carbone, le squalène, grâce à la squalène synthase, liée au RE. Le squalène, après sa cyclisation en lanostérol, subira une vingtaine de réactions notamment de réarrangement de double-liaisons, pour enfin aboutir à une molécule de cholestérol.

La synthèse du cholestérol dépend de l'activité de la HMGcoA-cholestérol acetyltransferase qui est régulée soit par les concentrations en cholestérol, soit par son activation par déphosphorylation, via la signalisation insulinique par exemple, et elle est négativement régulée par l'AMPc et l'AMPK (AMP-activated Kinase). L'AMPK est une kinase impliquée dans l'équilibre énergétique de la cellule, elle est qualifiée de senseur énergétique. Cet hétérotrimère est activé par phosphorylation de sa sous-unité α lorsque le niveau d'énergie intracellulaire est bas, c'est-à-dire lorsque le ratio ATP/AMP est diminué. Elle est alors capable d'activer les voies cataboliques et d'inhiber les voies anaboliques afin de rétablir le taux d'ATP intracellulaire [Hardie, et al. 1997]. L'HMGcoA réductase (HMGCR) est elle aussi activée par déphosphorylation par l'insuline, et inactivée par le glucagon ou l'AMPK [Clarke, et al. 1990].

Le cholestérol est libéré dans la circulation sanguine sous forme liée, dans des lipoprotéines, ou est utilisé par l'hépatocyte pour synthétiser les acides biliaires.

La synthèse des acides biliaires est sous le contrôle de la cholestérol-7 α -hydroxylase (Cyp7a1) qui transforme le cholestérol en 7 α -hydroxycholestérol. Ce composé donnera, après une suite de déshydrogénations et d'hydroxylations, un cholate ou un chénodésoxycholate, qui sont des acides biliaires primaires. Ces composés, une fois conjugués à la taurine ou le glycolle, génèreront d'autres acides biliaires primaires tels que le glycocholate, le

glycochénodésoxycholate, le taurocholate et le taurochénodésoxycholate. Les acides biliaires primaires sont sécrétés au pôle apical des hépatocytes, par des transporteurs BSEP (Bile Salt Export Pump), pour rejoindre le canalicule biliaire, puis la vésicule biliaire pour être excrétés dans le duodénum lors de la digestion. Cette excrétion par le sphincter d'Oddi est sous le contrôle de la cholécystokinine [Shaffer 2000]. Les acides biliaires secondaires tels que l'acide désoxycholique et l'acide lithocholique sont formés dans l'iléon, sous l'action de bactéries intestinales. Les acides biliaires facilitent l'absorption des graisses par l'épithélium digestif, ainsi que des vitamines [Shaffer 2000]. Une partie des acides biliaires est réabsorbée par les entérocytes et se retrouve dans la circulation au sein des LDL (low-density lipoproteins).

Parallèlement à ce rôle dans la digestion, les acides biliaires ont été décrits récemment comme de nouveaux facteurs capables de réguler le métabolisme énergétique [Hylemon, et al. 2009], [Lefebvre, et al. 2009], [Watanabe, et al. 2006], [Thomas, et al. 2009], [Li, et al. 2012]. En effet, ce sont aussi des molécules signalisantes, via le récepteur nucléaire FXR (Farnesoid X Receptor), ou le récepteur membranaire TGR5, qui est un RCPG. Le traitement de souris avec des acides biliaires augmente la dépense énergétique du tissu adipeux brun, et empêche la prise de poids et le développement d'une intolérance au glucose, ces effets étant médiés par l'activation de TGR5 [Watanabe, et al. 2006]. Au niveau du métabolisme glucidique hépatique, les études sont contradictoires : une étude a montré que l'activation de FXR par un agoniste induit la production de glucose et l'expression d'enzymes impliquées dans la néoglucogenèse dans des hépatocytes primaires de rats et humains [Stayrook, et al. 2005], alors que d'autres études observent l'effet inverse suite à des traitements *in vitro* sur des cellules hépatiques utilisant des acides biliaires activant le liver X receptor (LXR) [Yamagata, et al. 2004], [Cao, et al. 2010]. Il est donc difficile aujourd'hui de déterminer l'effet des acides biliaires sur la production hépatique de glucose, d'autant plus que l'injection d'un agoniste de FXR n'a pas d'effet sur la glycémie de souris [Stayrook, et al. 2005].

B) Les cellules biliaires intrahépatiques

Ces cellules, aussi appelées cholangiocytes, sont les cellules qui composent le canal biliaire dans l'espace porte, qui récupère la bile provenant des canalicules biliaires, et l'achemine dans le conduit hépatique pour être stockée dans la vésicule biliaire.

C) Les cellules endothéliales

On retrouve ces cellules au niveau des espaces portes et de la veine centrolobulaire, et parsemées le long des sinusoides. Les sinusoides ne possèdent pas de membrane basale, et sont des capillaires fenestrés, il est donc fréquent d'observer en histologie des espaces entre les hépatocytes dépourvus de ces cellules. Les sinusoides transportent le sang dans le lobule de façon centripète, des espaces portes à la veine centrolobulaire, et sont le lieu de résidence de cellules du système immunitaire. Les veines portes et centro-lobulaires sont encerclées par des cellules musculaires lisses, qui permettent leur vasodilatation ou vasoconstriction, ce qui n'est pas le cas des sinusoides.

Entre les sinusoides et les hépatocytes se trouve l'espace de Disse (Figure 2). C'est dans cet espace péri-sinusoïdal que l'on retrouve les cellules stellaires [Sawitza, et al. 2009].

D) Les cellules stellaires

Ces cellules mésenchymateuses, situées dans l'espace de Disse, sont aussi appelées cellules étoilées ou cellules de Ito. Elles sont dites "quiescentes" en condition physiologique, et stockent la vitamine A. Les cellules stellaires ne sont pas présentes uniquement dans le foie : on en retrouve également autour des acini du pancréas [Senoo, et al. 2010]. Elles ont la capacité de s'activer en cellules myofibroblastiques, qui participent à la réparation d'éventuelles lésions du foie. En effet les hépatocytes peuvent activer les cellules stellaires de façon paracrine, qui vont réagir en sécrétant de la matrice extracellulaire (MEC) qui participe à la cicatrisation. Ceci est un phénomène physiologique de cicatrisation.

En condition de stéatose et d'insulino-résistance, elles peuvent être suractivées sous l'action de facteurs proinflammatoires sécrétés par les cellules immunitaires [Moreira 2007], [Vanni, et al. 2010]. En effet, une activation excessive de ces cellules mène à un excès de MEC par une rupture de l'équilibre entre sa production et sa dégradation, et donc à l'apparition d'une fibrose [Lee, et al. 2011], qui entraîne une altération de la fonction hépatique. Elles peuvent également être activées par un excès d'espèces moléculaires réactives de l'oxygène (ROS) et de lipides peroxydés [Koek, et al. 2011], et la prise en charge des corps apoptotiques d'hépatocytes par les cellules immunitaires et les cellules stellaires elles-mêmes peut induire la production de TGF β , qui est un activateur des cellules stellaires [Canbay, et al. 2003], [Fadok, et al. 1998].

E) Les cellules de Küpffer

Ce sont les macrophages résidents du foie, issus de l'immunité innée, localisés dans les sinusoides. Les cellules de Küpffer sont surnommées "cellules sentinelles" car elles phagocytent la majorité des particules étrangères qui proviennent du tube digestif, les empêchant ainsi de gagner la circulation générale. La meilleure illustration de cette aptitude est la technique classiquement utilisée pour les visualiser en histologie : l'injection *in vivo* d'encre de chine dans la circulation [Ferri, et al. 1981], après laquelle on peut clairement visualiser ces cellules qui ont un noyau aplati, ce qui les différencie des hépatocytes. En condition physiologique, ces macrophages ont un phénotype dit M2 ou alternatif : cela signifie que leur sécrétome est anti-inflammatoire, contrairement à la majorité des macrophages de l'organisme qui sont recrutés sur les sites d'inflammation. Cependant, ils sont capables de recruter des acteurs du système immunitaire acquis comme les lymphocytes T, les Natural Killer, ou encore des monocytes [Baffy 2009], et de changer leur phénotype en M1, dit classique, et proinflammatoire.

L'implication des cellules de Küpffer dans la mise en place de la résistance à l'insuline induite par un régime hypercalorique a été clairement démontrée chez le rongeur : la suppression des cellules de Küpffer par le Clodronate [Lanthier, et al. 2010] et leur inactivation par le Gadolinium [Huang, et al. 2010] ont pour effet d'améliorer la sensibilité à l'insuline de rongeurs nourris avec un régime hyperlipidique. L'activation M1 des cellules de Küpffer est impliquée dans le développement de l'insulino-résistance [Baffy 2009], en plus de l'augmentation de leur nombre. En effet, elles sont capables de communiquer avec les cellules environnantes (hépatocytes et cellules stellaires) en libérant des médiateurs bioactifs tels que des cytokines, des chemokines, des eicosanoïdes, des enzymes protéolytiques, des ROS (espèces actives de l'oxygène) ou encore du monoxyde d'azote (NO), qui peuvent mener à une stéatose puis à une insulino-résistance [Baffy 2009].

Dans un foie insulino-résistant, les cellules de Küpffer peuvent être activées par plusieurs mécanismes :

- L'excès d'acides gras circulants et la présence de lipopolysaccharides (LPS) peuvent activer les récepteurs membranaires des cellules de Küpffer, comme le TLR4 par exemple, qui, via l'activation du facteur de transcription NFκB, peut induire l'expression de l'interféron γ .

- La pression exercée par les hépatocytes gorgés de lipides sur les sinusoides entraîne un défaut de perfusion du foie, et les leucocytes présents peuvent engager les cellules de Küpffer dans une réponse inflammatoire [Baffy 2009].

- Ces hépatocytes saturés en lipides peuvent également avoir une composition membranaire lipidique modifiée, et être reconnus par les cellules de Küpffer comme une menace, et induire une réponse inflammatoire [Baffy 2009].

La polarisation M2 des cellules de Küpffer permet la résolution de la réponse inflammatoire, mais une infiltration excessive de cellules de Küpffer ou leur polarisation M1 peut mener à une sur-inflammation du foie. Chez l'Homme, le nombre de cellules de Küpffer (CD68+) est corrélé au degré de sévérité de la pathologie hépatique [Park, et al. 2007], et un régime riche en lipides de 12 semaines a pour effet d'augmenter leur nombre dans le foie de rats [Kiki, et al. 2007].

F) Les cellules ovaies

Ce sont les cellules souches du foie, elles sont associées aux canaux de Hering [Theise, et al. 1999] et leur différenciation en hépatocytes dans le foie adulte est rare. Lors d'une lésion (hépatectomie partielle, infection virale), lorsque les hépatocytes ne peuvent plus proliférer pour enrayer la lésion, ces cellules ovaies vont proliférer et se différencier en de nouveaux hépatocytes. Elles ont été isolées pour la première fois en 1997 [Yasui, et al. 1997], et ce n'est que récemment que la stéatose hépatique associée à la résistance à l'insuline a été décrite comme une condition présentant un nombre élevé de cellules ovaies [Tolosa, et al. 2011]. Il est possible que les hépatocytes gorgés de lipides, ne pouvant plus assurer leur fonction de régénération du tissu, secrètent des signaux paracrines qui activent ces cellules ovaies, qui seraient un support pour assurer le bon fonctionnement du foie, mais les signaux et mécanismes menant à leur prolifération dans la stéatose et l'insulino-résistance sont inconnus à ce jour.

II) Métabolisme énergétique du foie

Le foie est au centre du métabolisme énergétique, car il est capable de répondre rapidement aux besoins de l'organisme en fonction de son état nutritionnel. Il est capable de stocker le glucose (glycogénogenèse), de le relarguer dans la circulation (glycogénolyse) et d'en

néo-synthétiser (néoglucogenèse), ou de produire de l'énergie avec (glycolyse). Il peut également fournir l'organisme en lipides, en les ayant stockés ou néo-synthétisés (lipogenèse *de novo*) au préalable, afin de les sécréter sous forme de VLDL (very low density lipoprotein). Les acides gras peuvent aussi être utilisés pour produire de l'énergie (β -oxydation).

1) La stéatose, et l'évolution vers les NAFLD plus sévères

En condition de résistance à l'insuline, ces processus sont altérés, et la manifestation histologique de cette insulino-résistance est l'accumulation de lipides dans les hépatocytes, appelée stéatose. C'est la maladie hépatique la plus répandue dans les sociétés occidentales. Les différents aspects de sa mise en place seront détaillés dans la partie II.3 de ce chapitre. Plusieurs formes de stéatose existent : la stéatose microvésiculaire présente un grand nombre de petites gouttelettes lipidiques disposées autour du noyau, qui est central ; et la stéatose macrovésiculaire présente de grosses gouttelettes plus grandes que le noyau, qui se retrouve repoussé à la périphérie de la cellule.

Cette pathologie, réversible, peut néanmoins évoluer en stéatohépatite (NASH, non-alcoholic steatohepatitis), et dans des stades plus avancés, une fibrose puis une cirrhose peuvent apparaître, le dernier stade de la maladie hépatique étant le carcinome hépatocellulaire (Figure3). Ces pathologies sont regroupées sous le nom de pathologies hépatiques non alcooliques, ou NAFLD pour Non-Alcoholic Fatty Liver Diseases, et sont également associées à des taux plasmatiques élevés d'alanine aminotransférase (ALAT) ou d'aspartate aminotransférase (ASAT), des transaminases hépatiques qui sont des marqueurs de la dysfonction hépatique.

Pour tenter d'expliquer l'évolution de la stéatose non alcoolique vers la NASH, Day et al avaient proposé en 1998 l'hypothèse des "two-hits" [Day, et al. 1998], selon laquelle la stéatose représente le 1^{er} "hit", en sensibilisant le foie à l'inflammation, et le deuxième "hit" est la promotion du stress oxydant par cette inflammation, qui est une caractéristique de la NASH.

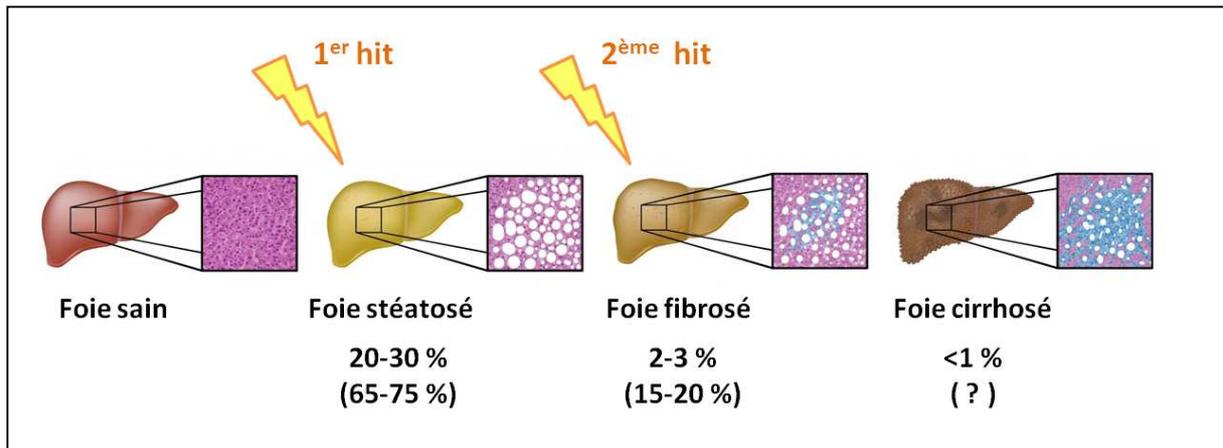


Figure 3. Evolution de la pathologie hépatique.

Le foie stéatosé présente d'importantes inclusions lipidiques dans les hépatocytes. Le foie fibrosé (NASH) présente une accumulation de matrice extracellulaire, et l'organisation intra-lobulaire est perturbée dans le foie cirrósé. La stéatose représente le premier "hit" de la NAFLD, et le deuxième "hit" induit le développement de la fibrose [Day and James 1998]. Le pourcentage indiqué représente les personnes touchées dans la population générale, et celui entre parenthèses représente celui des personnes obèses (IMC > 30), d'après [Buechler, et al. 2011].

Depuis, ce deuxième "hit" semble être une combinaison de plusieurs événements, environnementaux et génétiques, qui seront détaillés ici avant d'aborder le métabolisme hépatique et ses dysfonctions en condition d'insulino-résistance.

➤ L'inflammation

Les cytokines proinflammatoires telles que le $TNF\alpha$, l'IL-12, l'IL-18 et l'interféron γ sont plus fortement exprimées dans le foie de patients ayant une stéatose, ce qui participe à l'inflammation du tissu, qui peut mener à l'activation des cellules stellaires [Pagadala, et al. 2012], reconnue comme un élément du second "hit".

➤ La lipotoxicité

Le terme lipotoxicité regroupe les phénomènes de toxicité causés par des espèces lipidiques délétères pour le fonctionnement de la cellule. Le tissu adipeux est le seul tissu dont la fonction principale est le stockage des lipides. Or, en condition d'insulino-résistance, la lipolyse excessive de ce tissu entraîne une élévation des lipides circulants, qui sont alors stockés ectopiquement dans d'autres organes tels que le foie, les muscles squelettiques, le cœur, et le pancréas. L'augmentation de lipides intracellulaires dans le foie est liée à l'augmentation

d'intermédiaires délétères pouvant induire l'apparition de la NASH dans le foie stéatosé comme les céramides et les acylcarnitines.

Les céramides sont capables d'activer les JNK et IκK, qui inactivent IRS-1 par phosphorylation de résidus sérines, et peuvent également activer les PKC atypiques qui inactivent Akt. Enfin, ils activent la protéine phosphatase 2A (PP2A) qui déphosphoryle Akt, empêchant sa translocation à la membrane plasmique [Stratford, et al. 2004], [Holland, et al. 2008]. Les céramides dérivés d'acides gras saturés semblent être particulièrement délétères pour la signalisation insulinique. Bien qu'augmentés dans le foie de modèles animaux d'insulino-résistance, ils ne semblent pas jouer un rôle important dans la mise en place de l'insulino-résistance hépatique, certaines études animales et épidémiologiques ne retrouvant pas d'association entre les céramides hépatiques et l'insulino-résistance [Samuel, et al. 2012], [Jornayvaz, et al. 2012]. En revanche, leur présence dans les hépatocytes est associée à une production de TNFα et d'IL-6, ce qui induit une inflammation du foie, qui peut induire l'activation des cellules stellaires, et ainsi mener à une fibrose [Pagadala, et al. 2012].

L'afflux d'acides gras dans la mitochondrie et leur β-oxydation incomplète mènent à une augmentation des acylcarnitines (acylCN). Les acylCN peuvent quitter la mitochondrie et rejoindre la circulation sanguine. Le dosage des acylCN plasmatiques a permis de mettre en évidence qu'ils sont plus élevés chez les patients diabétiques [Adams, et al. 2009], [Huffman, et al. 2009]. Ces espèces lipidiques peuvent interagir avec les kinases JNK et IκK via l'activation de NFκB [Muoio, et al. 2008], mais aucune étude à ce jour n'a établi de lien entre les acylCN et la signalisation insulinique hépatique. La NASH étant associée avec une augmentation des acylCN intrahépatiques [Perez-Carreras, et al. 2003], cela laisse penser que les acylCN seraient des médiateurs du second "hit" menant au développement de la NASH.

➤ La dysfonction mitochondriale

Tout dysfonctionnement mitochondrial mène à un défaut de production d'énergie qui se traduit par un ratio ATP/ADP cellulaire diminué, et à l'accumulation d'espèces lipidiques délétères ainsi que de ROS. Suite à un afflux d'acides gras dans la cellule, lorsque l'oxydation des lipides dépasse la capacité du cycle de Krebs, l'oxydation des lipides est incomplète, et conduit à l'accumulation d'espèces lipidiques intermédiaires comme les acylCN. En situation de stéatose simple, la β-oxydation hépatique est augmentée en réponse à l'afflux d'acides gras (cf partie II.3 de ce chapitre). En revanche, lorsque la stéatose évolue en NASH, les mitochondries

présentent des lésions structurales. Une étude comparant la fonction mitochondriale hépatique de patients insulino-résistants ayant soit une stéatose soit une stéatohépatite, a montré que la β -oxydation et le stress oxydant sont augmentés dans les deux cas, mais qu'une altération des mitochondries n'est observée que chez les patients ayant une NASH [Sanyal, et al. 2001]. Par microscopie électronique, les auteurs ont observé que les mitochondries des patients ayant une NASH sont gonflées, arrondies, et possèdent des inclusions paracrystallines intramitochondriales, avec une perte des crêtes. Une diminution de l'activité des quatre complexes de la chaîne respiratoire a été reportée dans le foie de patients ayant une NASH, et leur activité est corrélée négativement avec le TNF α circulant [Perez-Carreras, et al. 2003], 23770462 [Koliaki, et al. 2013]. La dysfonction mitochondriale hépatique semble être un critère discriminant la stéatose de la NASH, faisant donc aussi partie du second "hit".

➤ Le stress oxydant

Le Stress oxydant est un phénomène intracellulaire médié par les ROS, et fait également partie des phénomènes participants au second "hit". La chaîne respiratoire de la mitochondrie génère des électrons qui, lorsqu'ils sont produits en trop grande quantité, sont dissipés et peuvent interagir avec l'oxygène et ainsi former l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ puis l' H_2O_2 , ou encore des radicaux HO^{\bullet} . Ces ROS, bien que nécessaires à certaines fonctions physiologiques, ont néanmoins un effet délétère pour la cellule en altérant l'ADN ou la structure des protéines et des lipides, lorsque leur production dépasse la capacité anti-oxydante de la cellule [Pessayre 2007], [Levene, et al. 2012]. Une étude sur des rats nourris avec un régime déficient en choline montre une augmentation du stress oxydant dans le foie sévèrement stéatosé [Grattagliano, et al. 2008], état précédant la stéatohépatite. Le stress oxydant mène également à la formation de lipides peroxydés, qui génèrent des aldéhydes toxiques, tels que le malondialdéhyde et l'hydroxynonanal, qui altèrent les membranes des organelles et entraînent la mort cellulaire. Ces composés peuvent activer directement les cellules stellaires et recruter des cellules immunitaires dans le foie [Levene and Goldin 2012], phénomènes caractéristiques de la NASH.

2) Métabolisme glucidique du foie

Le foie est capable de s'adapter rapidement aux variations de la glycémie. En condition post-prandiale, la régulation des processus de stockage du glucose dans le foie est majoritairement accomplie par l'insuline, dont la signalisation fait intervenir plusieurs acteurs intracellulaires, que sont, à court terme, des phosphatases, et à long terme, des facteurs de transcription et récepteurs nucléaires, mais ces processus sont aussi régulés de façon indépendante de l'insuline. En condition de jeûne, les processus de libération de glucose sont initiés par la libération du glucagon par le pancréas, mais l'expression et l'activation des enzymes impliquées dans ces processus de production de glucose sont également sous le contrôle d'autres régulateurs.

A) L'entrée du glucose dans l'hépatocyte

Les hépatocytes expriment de façon constitutive le transporteur GLUT-2, qui permet l'entrée passive du glucose en fonction du gradient de part et d'autre de la membrane plasmique. Ainsi, dès que la glycémie augmente, le glucose entre dans les hépatocytes. La glucokinase (GK) va phosphoryler, de façon irréversible, le glucose sur son sixième carbone après son entrée dans l'hépatocyte, et le Glucose-6-Phosphate (G6P) ne peut pas ressortir de façon passive. L'expression de la GK est sous le contrôle positif de l'insuline [Iynedjian, et al. 1989] et de nombreux facteurs de transcription et récepteurs nucléaires dont SREBP-1c (Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c), LXR α (Liver X Receptor α), PPAR γ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ), ou LRH1 (Liver Receptor Homolog 1) [Kim, et al. 2009], [Oosterveer, et al. 2012]. Dans le muscle squelettique et le tissu adipeux, le glucose est phosphorylé par l'hexokinase II, qui est rétro-contrôlée par son produit le G6P, mais ce n'est pas le cas de la glucokinase dans le foie. La GCKR (Glucokinase Regulatory Protein), en condition de jeûne, interagit avec la GK et la retient dans le noyau. En condition nourrie, l'augmentation du glucose et la signalisation insulinique ont pour effet de les dissocier, ce qui se traduit par la translocation de la GK dans le cytoplasme [Bechmann, et al. 2012] (Figure 4). C'est pourquoi l'entrée du glucose dans l'hépatocyte est passive : tant que la concentration en glucose est plus élevée dans la circulation que dans l'hépatocyte, il entrera dans l'hépatocyte et sera phosphorylé. Cette phosphorylation lui permet d'être pris en charge par les enzymes des différentes voies métaboliques qui sont mises en place dans la cellule hépatique.

Au niveau du foie, le glucose peut suivre plusieurs voies, que ce soit son utilisation pour la production d'énergie (glycolyse) ou de pentose-phosphates, son stockage (glycogénogenèse) en vue d'une libération ultérieure lorsque les réserves de l'organisme s'appauvrissent (glycogénolyse), ou encore sa conversion en lipides (lipogenèse *de novo*) (Figure 4).

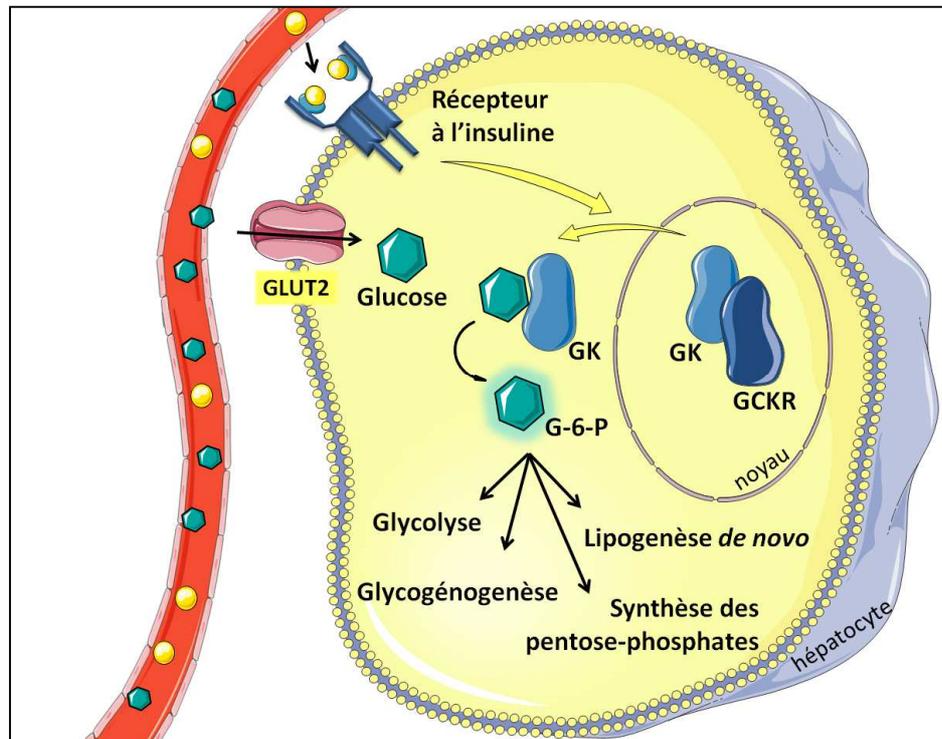


Figure 4. Entrée du glucose dans l'hépatocyte

Le glucose entre dans les hépatocytes par le transporteur GLUT2. En condition de jeûne, la GCKR (glucocorticoid-inducible kinase regulatory protein) interagit avec la glucokinase (GK) et la retient dans le noyau. En condition nourrie, l'augmentation du glucose et la signalisation insulinique ont pour effet de les dissocier, ce qui se traduit par la translocation de la GK dans le cytoplasme. La GK phosphoryle le glucose en glucose-6-phosphate, qui suivra la/les voies métaboliques activées dans l'hépatocyte.

B) La production d'énergie à partir du glucose : la glycolyse

Le glucose peut être oxydé par la majorité des organes pour générer des molécules de pyruvate et d'ATP. Après la formation de G6P dans le cytoplasme, la phosphoglucose-isomérase génère un Fructose-6-P (F-6-P), qui va devenir F-1,6-P après action de la phosphofructokinase (PFK). Ce F-1,6-P est alors scindé en deux molécules à 3 carbones : le G3P (3-phosphoglycéraldéhyde) et le DHAP (dihydroxyacétone phosphate) qui est isomérisé en un autre G3P. Après une oxydation suivie d'une phosphorylation, chaque G3P devient un 1,3-

diphosphoglycérate. Une molécule de 3-phosphoglycérate est générée par la phosphoglycérate kinase. Après déplacement de son groupement phosphate par la phosphoglycératemutase pour donner un 2-phosphoglycérate, le phosphoénol-pyruvate (PEP) est formé grâce à l'énolase. Ce sont ces deux molécules de PEP qui, après action de la pyruvate-kinase, donneront deux molécules de pyruvate (Figure 5).

La suite de la glycolyse a lieu dans la mitochondrie, qui est considérée comme la centrale énergétique de la cellule car c'est le principal lieu de production d'ATP. Cette organelle mesure entre 1 et 10 μm de long et possède deux membranes lipidiques, entre lesquelles on retrouve l'espace inter membranaire, et la membrane interne renferme la matrice mitochondriale. La membrane interne a une surface plus importante que la membrane externe, ce qui résulte en la présence de crêtes bien visibles en microscopie et c'est sur cette membrane qu'a lieu la chaîne respiratoire.

Le pyruvate entre alors dans la mitochondrie, où il est oxydé et décarboxylé en acétyl-coA par la pyruvate-déshydrogénase (PDH), et entre dans le cycle de Krebs. La citrate synthase produit un acide citrique par la condensation d'un oxalo-acétate (OAA) avec un acétyl-coA. Le cycle de Krebs fournit la majorité de l'énergie nécessaire à l'organisme. Pour une molécule d'acétyl-coA, le cycle de Krebs génère deux molécules de CO_2 , une molécule d'ATP, et des coenzymes réduits : trois NADH et un FADH_2 . Ces coenzymes réduits, après avoir été oxydés dans la chaîne respiratoire, permettent la formation d'ATP. La chaîne respiratoire est composée de cinq complexes protéiques, les complexes I à IV qui vont emprunter les électrons issus des coenzymes réduits, en présence d'oxygène, et le complexe V qui est une ATP synthase. Par une succession d'oxydations phosphorylatives, les complexes I, II, et IV créent un gradient de protons dans la membrane mitochondriale interne. Lorsque ce gradient est élevé, les protons présents dans l'espace intermembranaire ne peuvent entrer dans la matrice mitochondriale que par le complexe V de la chaîne respiratoire, générant de l'ATP en phosphorylant l'ADP. Chaque molécule de NADH, H^+ permet ainsi la génération de trois molécules d'ATP ; et un FADH_2 de deux molécules d'ATP. Cependant, les protons ont d'autres moyens de retourner dans la matrice mitochondriale, par un processus appelé fuite de protons, grâce aux protéines découplantes (UCP). Ces protéines permettent de transférer les protons dans la matrice, sans production d'ATP [Sluse, et al. 2006].

Ce processus catabolique est contrôlé par la signalisation insulinique, qui, en déphosphorylant la PFK, la PK et la PDH, accélère la glycolyse, alors que le glucagon la ralentit en les phosphorylant.

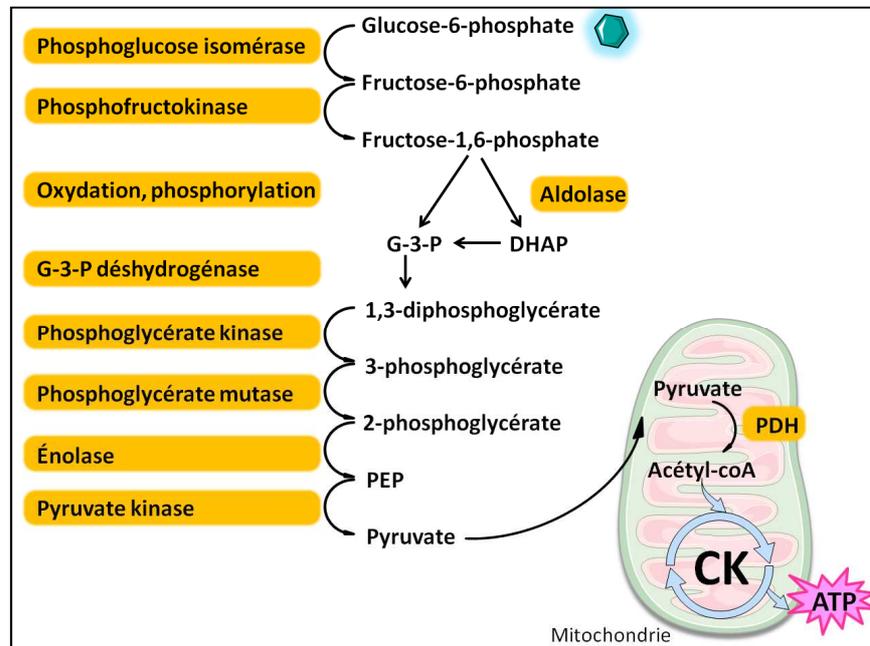


Figure 5. La glycolyse

Après la formation de glucose-6-phosphate dans le cytoplasme, la phosphoglucose-isomérase génère un Fructose-6-P, qui va devenir, après une succession de réactions enzymatiques, une molécule de pyruvate. Il est alors transformé en acétyl-coA dans la mitochondrie par la pyruvate déshydrogénase (PDH), où il génère la formation d'ATP grâce au cycle de Krebs (CK) et à la chaîne respiratoire. G-3-P: glycéro-3-phosphate, DHAP: dihydroxyacétone phosphate, PEP: phosphoénol-pyruvate.

C) L'utilisation du glucose pour le stockage d'énergie : La glycogénogenèse

Cette réaction anabolique fait intervenir plusieurs enzymes qui vont synthétiser le glycogène. Le G6P, après action de la phosphoglucomutase, est transformé en glucose-1-phosphate, qui est lui-même transformé en UDP (uridine diphosphate)-glucose grâce à l'UDP-glucose-pyrophosphorylase qui utilise un UTP (uridine triphosphate) pour réaliser cette réaction. La glycogène synthase entre alors en jeu et va fixer l'UDP-glucose sur le groupement OH d'une tyrosine de la Glycogénine, protéine à l'origine de toute molécule de glycogène [Whelan 2009], ou sur le carbone 4 d'une chaîne de glycogène préexistante, formant ainsi une liaison glycosidique α -1,4. Cette dernière étape libère un UDP. La glycogène-synthase est considérée comme limitante pour ce processus de stockage. Le glycogène est un polymère

ramifié, et c'est la glycosyl-4,6-transférase qui permet la fixation de polymères de 7 à 10 unités en position 6 d'une unité glucose, formant ainsi une liaison glycosidique α -1,6.

L'insuline active cette voie métabolique en activant la protéine phosphatase 1 qui va activer la glycogène synthase en la déphosphorylant. A l'inverse, ce processus est inhibé en condition de jeûne, de façon rapide, par le glucagon. La signalisation de son récepteur RCPG couplé à une adénylate cyclase mène à l'augmentation de l'AMPc intracellulaire, qui conduit à l'activation de la PKA qui va phosphoryler, et donc inhiber la glycogène synthase. L'adrénaline, en se fixant sur son récepteur, peut elle aussi inhiber la glycogénogenèse en induisant une augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc. La glycogénogenèse est aussi régulée par des acteurs intracellulaires, comme les Glycogène Synthase Kinases (GSK). L'AMPK est aussi capable d'inhiber la Glycogène Synthase en la phosphorylant [Bultot, et al. 2012].

En condition de résistance à l'insuline, le foie va moins stocker le glucose sous forme de glycogène, ce qui été montré dans des modèles animaux de diabète induits par des régimes hypercaloriques [Muthulakshmi, et al. 2013], [Sundaresan, et al. 2012], qui présentent également une diminution de l'activité de la GK. Chez l'Homme, les patients diabétiques de type II synthétisent moins de glycogène que des sujets sains après un repas, lors d'un clamp hyperglycémique-hyperinsulinémique, ou après une charge orale de glucose [Krssak, et al. 2004], et leur capacité de stockage est inversement corrélée à leur glycémie à jeun [Tomiyasu, et al. 2010].

D) L'utilisation des stocks de glucides : la glycogénolyse

La glycogénolyse a lieu notamment via la signalisation du glucagon, qui mène à l'activation par phosphorylation de la glycogène-phosphorylase, première enzyme entrant en jeu dans ce processus. Elle agit sur les extrémités du glycogène, en phosphorylant une unité glucose à la fois, pour donner une molécule de glucose-1-phosphate qui est transformé en un G6P par la phosphoglucomutase. La G-6-Pase génère alors une molécule de glucose qui sera libéré dans la circulation, en sortant de l'hépatocyte par un transporteur GLUT2. Ce processus permet le maintien de la glycémie à un niveau physiologique, et évite ainsi une hypoglycémie.

De façon logique, l'insuline inhibe l'activité de la glycogène-phosphorylase, via l'action de phosphatases. L'expression de la G-6-Pase est induite lors d'un jeûne, notamment grâce à l'activation du coactivateur PGC1 α (PPAR γ coactivator 1 α) [Yoon, et al. 2001]. En ce qui concerne la régulation de la sortie du glucose de l'hépatocyte, l'activité de la G-6-Pase est régulée négativement notamment par l'AMPK qui inhibe son expression [Lochhead, et al. 2000], et par les acides gras. En effet, les acyl-coA peuvent inhiber l'activité de la G-6-Pase dans le foie de rat, plus ou moins fortement selon la longueur de leur chaîne hydrocarbonée [Mithieux, et al. 1996].

E) La synthèse de glucose à partir de composés non glucidiques : la néoglucogenèse

La néoglucogenèse n'a pas lieu uniquement dans le foie, elle prend aussi place dans les reins et l'intestin, néanmoins la majorité du glucose néoformé dans l'organisme provient du foie. Elle est très importante en condition de jeûne prolongé, lorsque les réserves en glycogène du foie ont été épuisées et que la glycémie est trop basse. Elle permet la production de glucose dans le cytoplasme à partir de composés non glucidiques, tels que des acides aminés, dits "acides aminés glucogéniques" apportés en grand nombre par la veine porte ; le pyruvate ou le lactate (qui proviennent majoritairement des muscles) ; le glycérol circulant (produit de la lipolyse du tissu adipeux) ou le propionate (provenant du catabolisme des acides gras à nombre impair de carbones).

Prenons l'exemple du pyruvate. La pyruvate-carboxylase va produire un OAA, qui sera transformé en PEP grâce à la PEP CarboxyKinase (PEPCK). Puis plusieurs enzymes, principalement des phosphatases, vont produire les réactions inverses de celles décrites dans la glycolyse, pour obtenir une molécule de G6P. Après action de la G-6-Pase, le glucose sera libéré dans la circulation (Figure 6).

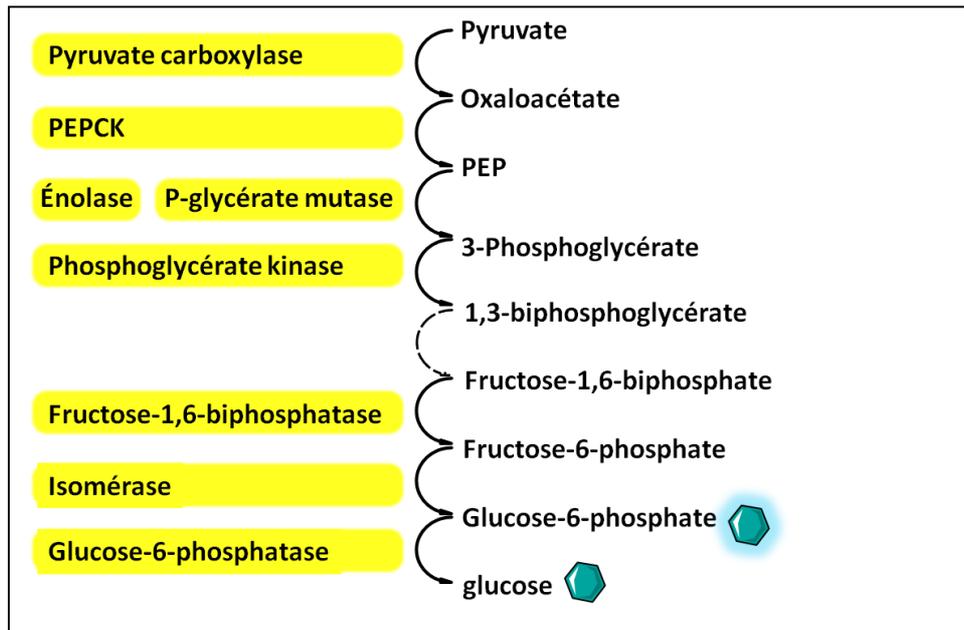


Figure 6. La néoglucogénèse hépatique à partir du pyruvate.

Le pyruvate est transformé en oxaloacétate, pris en charge par la PEPCK pour former une molécule de PEP. Plusieurs réactions enzymatiques (en pointillés) aboutissent à la formation d'un fructose-1,6-biphosphate qui, après l'action de la F-1,6-biphosphatase et d'une isomérase, devient un glucose-6-phosphate, puis un glucose après l'action de la G-6-Pase. PEP: phosphoénol-pyruvate, PEPCK: PEP carboxykinase.

Ce processus est appréciable *in vivo* grâce au test de tolérance au pyruvate : lorsque l'on administre du pyruvate par injection intra péritonéale à des animaux à jeun, leur glycémie augmente, ce qui est le reflet de l'activité néoglucogénique du foie, puis la glycémie revient à sa valeur de départ, suite au captage du glucose néoformé par les organes.

Ce processus est initié en période de jeûne prolongé par le glucagon et les glucocorticoïdes, qui vont, via la PKA, activer la fructose-1,6-biphosphatase. La PKA, en plus d'activer directement les enzymes impliquées dans la néoglucogénèse, active également le facteur de transcription CREBP (cAMP Response Element Binding Protein), qui va induire l'expression de la PEPCK, directement en se liant à son promoteur, ou indirectement, en induisant l'expression de PGC1 α qui possède aussi un site de liaison dans le promoteur du gène de la PEPCK. PGC1 α peut aussi avoir un effet indirect en agissant sur les récepteurs aux glucocorticoïdes, qui induisent eux-mêmes l'expression de la PEPCK [Herzig, et al. 2001]. Le facteur de transcription FOXO1 est également un inducteur de la néoglucogénèse car il possède lui aussi un site de liaison sur le promoteur du gène de la PEPCK et de la G-6-Pase.

En condition post-prandiale, cette voie est inhibée par l'insuline, qui inhibe l'expression de la PEPCK en excluant FOXO1 du noyau et en induisant sa dégradation par le protéasome [Matsuzaki, et al. 2003]. Le facteur de transcription SREBP-1c inhibe aussi la voie néoglucogénique, en empêchant HFN-4 α (hepatic nuclear factor 4 α) d'induire la transcription de PGC1 α [Yamamoto, et al. 2004]. L'activation de l'AMPK inhibe également cette voie métabolique en agissant sur FOXO1, HFN-4a, et PGC1 α , soit en les excluant du noyau, en induisant leur dégradation, ou encore en les redirigeant sur les promoteurs de gènes non néoglucogéniques [Canto, et al. 2010].

Longtemps considérée comme seul facteur limitant, l'activité de la PEPCK ne contrôle pas totalement le flux néoglucogénique dans le foie : il dépend aussi de la disponibilité des substrats. L'OAA, par exemple, est un produit de la β -oxydation des acides gras. Une augmentation de la β -oxydation dans l'hépatocyte va donc augmenter le flux néoglucogénique [Burgess, et al. 2007], et inversement, l'inhibition de la β -oxydation mitochondriale réprime la néoglucogénèse [Conti, et al. 2011].

La néoglucogénèse hépatique en condition d'insulino-résistance est activée de façon quasi-constante, car la PEPCK n'est plus inhibée par l'insuline, malgré l'hyperinsulinémie. De plus, l'augmentation des acides gras disponibles pour la β -oxydation génère de l'OAA, ce qui participe à l'augmentation de l'activité néoglucogénique du foie [Conti, et al. 2011]. Cela participe et aggrave l'hyperglycémie observée chez les patients insulino-résistants et diabétiques.

L'implication des facteurs de transcription FOXO dans l'hyperglycémie associée au diabète de type II a été démontrée récemment : leur invalidation spécifiquement dans le foie a pour effet de diminuer la glycémie, aussi bien chez des souris normopondérales que dans le modèle db/db [Zhang, et al. 2012b], [Estall 2012].

Au niveau de la libération hépatique du glucose, des études menées sur des souris diabétiques ont montré une augmentation de l'activité G-6-Pase [Muthulakshmi and Saravanan 2013], [Sundaresan, et al. 2012]. Cependant, chez l'Homme, ces effets ne sont pas aussi nets. Une étude menée sur des patients obèses et diabétiques [Belfiore, et al. 1989] n'a pas montré de différence d'activité de la G-6-Pase hépatique chez les patients diabétiques par rapport à des

patients contrôles, mais une augmentation de l'activité de la GK, qui reflète l'entrée du glucose dans les hépatocytes. Les auteurs suggéraient alors que l'hyperglycémie était plus liée à l'insulino-résistance périphérique qu'à une production non contrôlée du glucose par le foie [Belfiore, et al. 1974]. Cependant cette étude a été menée sur des biopsies après un jeûne sur la nuit, on ne peut donc pas exclure qu'en condition nourrie, l'activité de la G-6-Pase ne soit pas augmentée.

L'idée d'inhiber la G-6-Pase pour traiter l'hyperglycémie a été émise, et dans le foie de rats, son inhibition redirige le glucose vers la glycogénogenèse [van Dijk, et al. 2001] et non pas vers la lipogenèse *de novo*. Ainsi, la G-6-Pase peut être une cible intéressante dans le traitement du diabète de type II.

3) Métabolisme lipidique

Après un repas, les lipides sont absorbés par les entérocytes et sont transportés dans la circulation sous la forme de chylomicrons. Ainsi, la lipidémie augmente en condition post-prandiale, et diminue graduellement au fur et à mesure que les lipides sont pris en charge par les organes, principalement le tissu adipeux. La lipoprotéine lipase (LPL) est une enzyme présente à la surface des cellules endothéliales du tissu adipeux, du cœur, des muscles, et du foie, qui permet l'hydrolyse des TG en acides gras libres (AGL) qui peuvent alors entrer dans les cellules. En condition de jeûne, l'insulinémie diminue, et n'inhibe plus la lipolyse adipocytaire. Le tissu adipeux relargue donc des AGL, et le foie sécrète des VLDL, riches en TG, qui apportent l'énergie aux organes utilisateurs de lipides.

En condition physiologique, le foie ne stocke pas de lipides à long terme : lorsqu'il en capte de la circulation ou qu'il en synthétise, c'est soit pour les oxyder soit pour les sécréter ultérieurement.

La stéatose résulte d'une absorption accrue du glucose et des lipides circulants, d'une lipogenèse *de novo* exacerbée, couplée à une β -oxydation des lipides et une sécrétion de VLDL augmentées mais insuffisantes, aboutissant à une accumulation de lipides dans les hépatocytes. L'étude de Donnelly et al a montré que dans un foie stéatosé de patients insulino-résistants, ces lipides proviennent en majorité des lipides circulants (60%), provenant de la lipolyse accrue dans les adipocytes en condition d'insulino-résistance, 30% proviendraient de la

lipogénèse *de novo*, et le reste des lipides serait apporté par un régime riche en graisses [Donnelly, et al. 2005].

Il est important de noter que chez le rongeur, une stéatose passagère peut aussi être observée à la suite d'un jeûne [Hashimoto, et al. 2000], [den Boer, et al. 2004], mais les mécanismes décrits dans ce manuscrit concernent uniquement la stéatose associée à l'obésité et à la résistance à l'insuline.

A) L'entrée d'acides gras dans l'hépatocyte

Contrairement au glucose, l'entrée des acides gras dans les hépatocytes n'est pas seulement le résultat d'un transport passif en fonction du gradient. Les acides gras circulant sous forme libre (AGL) ou dans les chylomicrons provenant de la veine porte peuvent être transportés dans l'hépatocyte par simple diffusion, ou par des transporteurs protéiques membranaires : FAT (Fatty Acid Transporter), FATP (Fatty Acid Transport Protein) et FABP (Fatty Acid Binding Protein) [Nguyen, et al. 2008].

Une fois dans l'hépatocyte, les acides gras à chaîne longue, de 14 atomes de carbone ou plus, sont pris en charge par la FABP ou par des acyl-coA synthétases associées à la membrane mitochondriale. Ceux qui sont liés à la FABP seront dirigés soit vers des organelles pour y être métabolisés (oxydés ou estérifiés et intégrés dans les VLDL), soit vers le noyau où ils interagiront avec des récepteurs nucléaires et facteurs de transcription. Les acides gras qui ne suivent aucune de ces voies seront intégrés dans les membranes sous forme de phospholipides [Nguyen, et al. 2008].

➤ Implication de FAT dans la NAFLD et le diabète de type II

FAT est un récepteur "scavenger", ancré dans la membrane plasmique des hépatocytes par deux domaines transmembranaires, préférentiellement dans des radeaux lipidiques riches en cavéoline [Koonen, et al. 2011]. Bien que faiblement exprimé dans le foie en condition physiologique [Stahl, et al. 2001], son expression est augmentée dans le foie de souris obèses et résistantes à l'insuline [Memon, et al. 1999], [Koonen, et al. 2007] et de patients atteints de NAFLD [Greco, et al. 2008]. La surexpression de FAT par un adénovirus double la quantité de TG hépatiques [Koonen, et al. 2007], ce qui confirme un rôle critique de ce transporteur d'acides gras dans le développement de la stéatose. Son invalidation totale mène à une meilleure

tolérance au glucose et à l'insuline chez des souris nourries avec un régime normal, mais de façon surprenante, lorsque les souris $FAT^{-/-}$ sont nourries avec un régime riche en fructose ou en lipides, elles présentent une plus forte stéatose et développent une insulino-résistance [Hajri, et al. 2002]. Une autre étude a montré que cette invalidation induit une insulino-résistance hépatique sous régime normal, avec une accumulation de TG dans les hépatocytes [Goudriaan, et al. 2003], les auteurs proposant que l'afflux d'acides gras dans le foie serait le résultat d'une moindre incorporation des lipides circulants dans les muscles et le TA.

B) La lipogenèse *de novo* et la synthèse de triglycérides

La lipogenèse *de novo* (LDN) est le processus qui permet au foie de synthétiser des lipides à partir de composés non lipidiques dans le cytoplasme. Ces lipides seront majoritairement exportés dans la circulation sous la forme de VLDL.

Le glucose transporté dans les hépatocytes après un repas est stocké sous forme de glycogène comme décrit précédemment, mais lorsque les hépatocytes sont saturés en glycogène, la GK n'étant pas rétrocontrôlée par le G6P, si la concentration de glucose est plus importante dans le sang que dans l'hépatocyte, le glucose continue d'entrer dans l'hépatocyte, et le citrate généré lors de la glycolyse est redirigé vers la LDN [Postic, et al. 2008].

Le citrate est transformé en acétyl-coA par l'ATP-citrate lyase, puis en malonyl-coA par l'acétyl-coA carboxylase 1 (ACC1). Dans le cytoplasme, la Fatty Acid Synthase (FAS) crée un acyl-coA, qui subit des réactions successives de condensations décarboxylatives dans le cycle de Wakil, pour aboutir à une molécule de palmitate. Cet acide gras saturé de 16 atomes de carbone pourra être modifié dans le RE, par ajout de groupements méthyles (élongations) grâce à des élongases (par exemple par l'Elovl6) et par ajout de double-liaisons (insaturations) grâce à des désaturases (par exemple par la SCD1), ce qui permet de fournir l'organisme avec une grande variété d'acides gras (Figure 7A).

L'acide gras à longue chaîne formé, avant d'être exporté dans les autres organes, doit être intégré dans une VLDL sous forme de TG. Pour former un TG, la GPAT (glycérophosphate acyltransférase) va transférer un acide gras sur une molécule de glycérophosphate par estérification, pour donner un lysophosphatidate (1-acylglycérol 3-P). Un autre AG est ajouté par la lysophosphatidate acyltransferase, aussi appelée 1-acyl-glycérol-3-phosphate acyltransférase (AGPAT) pour donner un DG, puis un troisième AG est ajouté par la DG-

acyltransférase (DGAT) pour aboutir à un TG. Ces processus d'estérification prennent place sur la face cytosolique des membranes microsomales (Figure 7B).

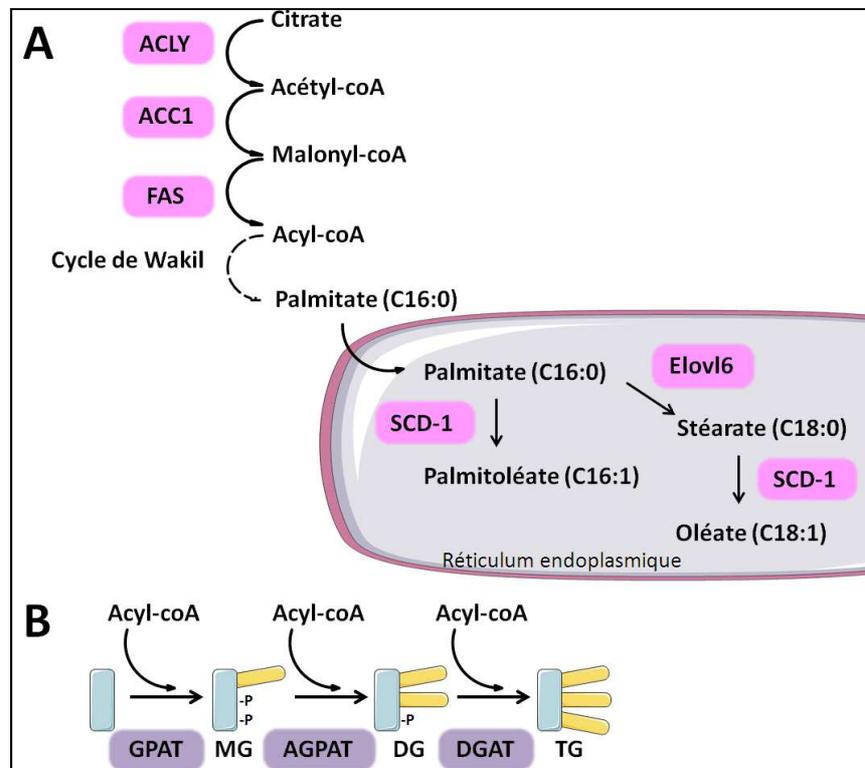


Figure 7. La lipogenèse *de novo* et la synthèse de triglycérides.

A: Le citrate issu de la glycolyse est transformé en acétyl-coA par l'ATP-citrate lyase (ACLY), puis en malonyl-coA par l'acétyl-coA carboxylase 1 (ACC1). La Fatty Acid Synthase (FAS) crée un acyl-coA, qui subit des réactions successives de condensations décarboxylatives dans le cycle de Wakil (en pointillé), pour aboutir à une molécule de palmitate. Le palmitate est élongué et désaturé dans le réticulum endoplasmique, par exemple par l'Elovl6 et la SCD1. **B:** Pour former un TG, la GPAT (glycérophosphate acyltransférase) transfère un acyl-coA sur une molécule de glycérophosphate (en bleu) par estérification et génère un monoglycéride (MG). Un autre acyl-coA est ajouté par la 1-acyl-glycérol-3-phosphate acyltransférase (AGPAT) pour donner un diglycéride (DG), puis un 3^e acyl-coA est ajouté par la DG-acyltransférase (DGAT) pour aboutir à un triglycéride (TG).

Le processus de LDN est finement régulé par des facteurs hormonaux et nutritionnels.

a) La régulation de la lipogenèse *de novo* par l'insuline et SREBP-1c

Le principal régulateur de cette voie est l'insuline. Elle induit l'activité du promoteur de la FAS [Sul, et al. 2000], et ses effets sur la LDN sont en partie médiés par l'action du facteur de transcription SREBP-1c, qu'elle active en condition nourrie [Horton, et al. 1998]. Il fait partie de la famille des SREBP, dont 3 membres ont été décrits à ce jour : SREBP-1a et SREBP-1c, qui sont

codés par un même gène et sont le résultat d'un épissage alternatif, et SREBP-2, codé par un autre gène, qui possède une forte homologie avec les SREBP-1 [Hua, et al. 1995]. SREBP-1a induit principalement l'expression de gènes impliqués dans la synthèse du cholestérol et de lipides, et il est surtout exprimé dans l'intestin. SREBP-2 est lui aussi impliqué dans la synthèse de cholestérol, et est exprimé de façon ubiquitaire. SREBP-1c, lui, est spécialisé dans la régulation transcriptionnelle de la LDN. Aussi bien chez l'Homme que chez la souris, c'est la forme majoritaire de SREBP-1 dans le tissu adipeux, les muscles et le foie.

C'est un facteur de transcription, c'est-à-dire qu'après sa translocation dans le noyau, il se lie à des séquences d'ADN spécifiques situées dans le promoteur de séquences codantes, grâce à sa structure bHLH-LZ (basic helix-loop-helix leucine-zipper), et induit leur transcription. Dans le cas de SREBP-1c, ce sont les séquences SRE-1 (Sterol Responsive Elements), d'une dizaine de paires de bases, qui sont situées dans le promoteur de gènes impliqués principalement dans la LDN, dont l'ATP-citrate lyase, la FAS, l'ACC, la SCD1, l'Elovl6, et la GPAT [Horton, et al. 2002], [Postic and Girard 2008].

La particularité des SREBPs est que leurs précurseurs sont liés à la membrane du RE. Le précurseur de SREBP-1c doit donc être transporté jusqu'à la membrane de l'appareil de Golgi où il est clivé, pour accéder au noyau. Comme son nom l'indique, SREBP-1c est aussi régulé par les stéroïdes, et plus précisément par leur absence. Lorsque leur concentration intracellulaire chute, les protéines de rétention insig1 et 2 (insulin induced genes), qui retiennent SREBP-1c dans la membrane du RE, sont ubiquitinées et adressées vers le protéasome [Sever, et al. 2003] où elles seront dégradées, permettant le transfert de SREBP-1c vers la membrane du Golgi grâce à la protéine cargo SCAP (SREBP Cleavage-Activating Protein). L'insuline induit le transfert de SREBP-1c vers le Golgi en diminuant l'affinité d'Insig2 pour SCAP. Les protéases S1P et S2P (site-1 ou 2-protéase) clivent alors l'extrémité N-terminale du précurseur, et la forme mature de SREBP-1c migre dans le noyau [Rawson 2003] (Figure 8).

SREBP-1c promeut aussi la LDN de façon indirecte : il active les promoteurs de gènes impliqués dans la glycolyse [Foufelle, et al. 2005], [Foretz, et al. 1999], permettant ainsi à la cellule d'être fournie en substrats nécessaires à la LDN.

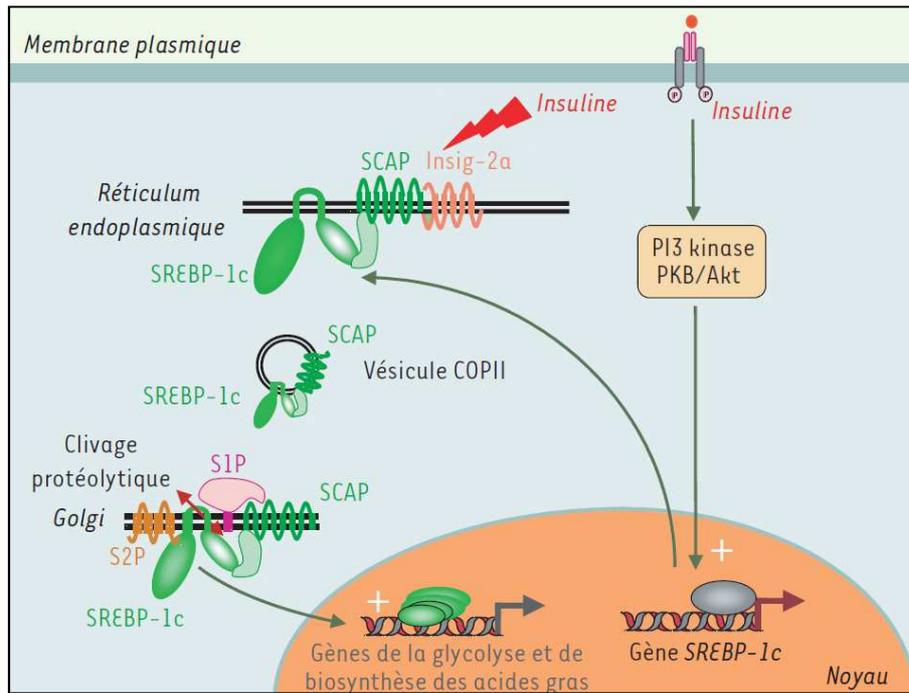


Figure 8. Activation par l'insuline et effets transcriptionnels de SREBP-1c dans le foie.

D'après [Foufelle, et al. 2005]. L'insuline permet la dissociation de SCAP et de la protéine de rétention Insig-2a, ce qui induit la migration de SREBP-1c dans l'appareil de Golgi. SREBP-1c est clivé par les protéases S1P et S2P, et sa partie N-terminale entre dans le noyau, où l'expression des gènes impliqués dans la lipogenèse *de novo*, mais aussi dans la glycolyse, est stimulée. SCAP: SREBP Cleavage-Activating Protein, Insig : Insulin induced gene, S1P: site 1 protease.

En condition physiologique, lors d'un jeûne, le glucagon peut inhiber SREBP-1c par l'intermédiaire de l'AMPc : la PKA peut phosphoryler la partie N-terminale de SREBP-1c, ce qui va atténuer sa capacité à s'activer. L'activation de l'AMPK peut directement phosphoryler sa sérine 372, ce qui empêche son clivage par les protéines S1P et S2P et sa libération de la membrane du Golgi [Li, et al. 2011b], [Yuan, et al. 2010]. En condition de jeûne, FOXO peut également réprimer l'activation de SREBP-1c et ainsi inhiber la lipogenèse, ce qui a pour conséquence une redirection des substrats vers la production de glucose plutôt que vers celle de lipides [Bechmann, et al. 2012].

En condition de stéatose et de résistance à l'insuline, l'expression et la translocation de SREBP-1c est augmentée dans le foie, et 30% des lipides présents dans les hépatocytes proviennent de ce processus [Donnelly, et al. 2005]. Ainsi, sur un foie insulino-résistant, l'insuline ne parvient plus à bloquer les processus producteurs de glucose, mais elle semble conserver ses effets sur la LDN, qui est toujours sur-activée. A ce paradoxe apparent, plusieurs explications possibles coexistent, comme l'hypothèse d'une insulino-résistance sélective, qui

sera développée dans la partie III de ce chapitre, ou alors la possibilité que l'expression des enzymes de la LDN soit induite par des voies indépendantes de l'insuline.

Par exemple, il a été montré qu'une activation du récepteur au TNF α par infusion de TNF α est capable d'induire la transcription de SREBP-1c, ceci faisant le lien entre la stéatose et l'inflammation de bas grade observée en condition d'obésité et de résistance à l'insuline [Endo, et al. 2007].

Une autre régulation de SREBP-1c en condition de résistance à l'insuline, largement documentée aujourd'hui, est celle du stress du RE.

➤ Le stress du réticulum endoplasmique, un activateur de la lipogenèse *de novo*

Le stress du RE est un phénomène physiologique vital pour la plupart des cellules de l'organisme, et plus particulièrement pour les cellules sécrétrices, qui sont capables de produire une grande quantité de protéines en réponse à un stimulus, comme les cellules β du pancréas, ou les hépatocytes [Fu, et al. 2012]. Le stress du RE a lieu lorsque la demande en protéines est accrue et dépasse la capacité du réticulum endoplasmique : une synthèse excessive de protéines mène à un plus grand nombre de protéines mal repliées, ce qui déclenche l'activation de la réponse UPR (Unfolded Protein Response), qui met en place divers processus destinés à rétablir l'homéostasie du RE. Le foie étant un organe sécréteur majeur de l'organisme (sécrétion des acides biliaires, des VLDL, des protéines plasmatiques et facteurs de coagulation), la réponse UPR est régulièrement activée de façon physiologique dans l'hépatocyte, et permet un retour à la normale du fonctionnement du réticulum endoplasmique.

Plusieurs protéines de la membrane RE sont impliquées dans cette réponse : PERK, IRE1 et ATF6 [Ron, et al. 2007], [Cnop, et al. 2012], [Flamment, et al. 2012]. En condition normale, ces trois protéines sont inactives et retenues dans la membrane du RE grâce à l'action de la protéine chaperonne BiP (Binding immunoglobulin Protein, ou HSP70). Lorsque les protéines mal repliées sont trop nombreuses dans la lumière du réticulum endoplasmique, cette chaperonne va interagir avec elles, et ainsi libérer PERK, IRE1 et ATF6, qui sont alors activées (Figure 9).

L'activation de la kinase **PERK** (PKR-like ER-localized eIF2 α Kinase) résulte de sa dimérisation et de son autophosphorylation. Cela mène à la phosphorylation du facteur

d'initiation eIF2 α (eukaryotic initiation factor 2 α), ce qui le rend inactif, et qui mène au freinage de la traduction protéique globale dans la cellule ; et à l'activation du facteur de transcription ATF4 (activating transcription factor 4), ce qui induit l'expression de gènes codant impliqués dans la synthèse de transporteurs d'acides aminés et dans la réponse anti-oxydante [Flamment, et al. 2012]. L'endoribonucléase **IRE1** (inositol-requiring 1) est elle aussi activée par dimérisation et autophosphorylation. L'une de ses cibles est le facteur de transcription XBP1s, qu'elle active : cela induit l'expression de gènes codant pour des chaperonnes et des protéines impliquées dans la dégradation protéique associée au réticulum (ERAD, ER-Associated Degradation), ce qui permet de limiter le nombre de protéines mal repliées. **ATF6** est lui-même un facteur de transcription. Il est activé après son clivage protéolytique par S1P et S2P dans le Golgi, et son domaine N-terminal entre dans le noyau où il active la transcription de gènes semblables à ceux étant sous le contrôle d'XBP1s [Flamment, et al. 2012].

➤ Stress du RE, stéatose et insulino-résistance

Le précurseur de SREBP-1c étant présent dans la membrane du réticulum endoplasmique et lié à la protéine BiP, une activation du stress du RE va induire son activation, et donc l'expression des gènes impliqués dans la LDN (Figure 9).

Le stress du RE est activé en condition de résistance à l'insuline :

- Il existe plusieurs facteurs pouvant induire un stress du RE en condition de résistance à l'insuline : les acides gras, principalement les acides gras saturés [Wei, et al. 2006], [Achard, et al. 2012], en s'intégrant dans la membrane du réticulum endoplasmique, diminuent sa fluidité, et peuvent induire ce stress.

- Une augmentation de l'activité de la voie de biosynthèse des hexosamines peut induire un stress du RE dans des hépatocytes [Sage, et al. 2010]. Les auteurs de cette étude proposent que l'hyperglycémie mène à une sur-activation de cette voie de biosynthèse dans le foie, et donc à une augmentation de son produit, l'UDP-GlcNAc, qui peut interférer avec la N-glycosylation des protéines dans le RE, menant à une activation de la réponse UPR.

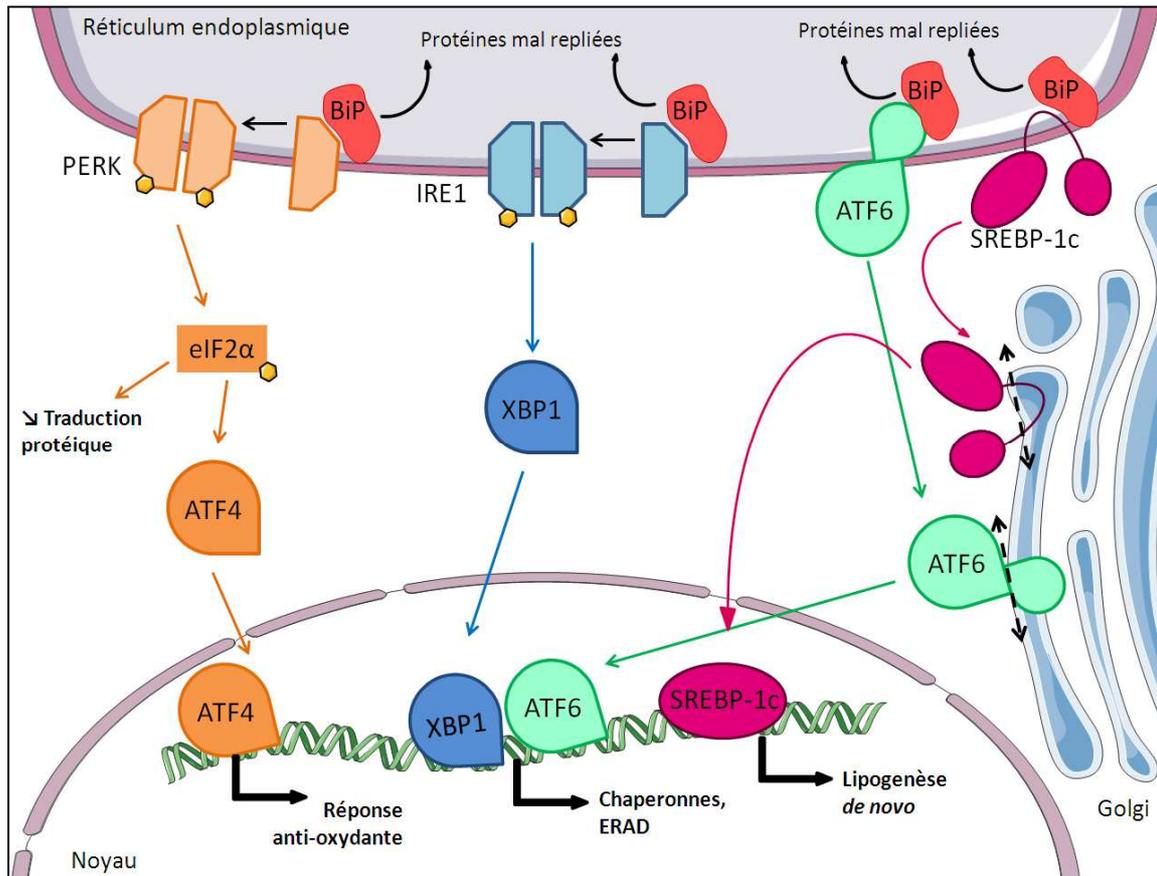


Figure 9. La réponse UPR et l'activation de SREBP-1c.

D'après [Flamment, et al. 2012]. PERK, IRE1 et ATF6 sont liés à la chaperonne BiP, qui les libère lorsqu'elle se lie aux protéines mal repliées trop nombreuses lors d'un stress du RE. PERK et IRE1 se dimérisent et s'autophosphorylent. Une fois activé, PERK active eIF2 α qui freine la traduction protéique, et active le facteur de transcription ATF4, qui induit une réponse anti-oxydante. IRE1 active le facteur de transcription XBP1 qui induit l'expression de chaperonnes et de protéines de l'ERAD (ER-associated degradation). ATF6 migre dans le Golgi où il est clivé par les protéases S1P et S2P (flèche en pointillés), et induit l'expression des gènes de chaperonnes et de membres de l'ERAD également. SREBP-1c est également retenu dans la membrane de RE par BiP, et il est clivé dans le Golgi par S1P et S2P.

Le stress du réticulum endoplasmique peut induire une résistance à l'insuline :

Le stress du RE peut mener à une l'apparition de la stéatose et de l'insulino-résistance: une activation chronique de la réponse UPR peut induire une activation chronique de SREBP-1c, indépendamment de l'état nutritionnel, de l'insulinémie ou des autres facteurs de régulation connus de SREBP-1c. Cela mène à une induction de la LDN, et le stress du RE ayant aussi pour conséquence une diminution de la sécrétion de VLDL par la dégradation et l'inhibition de la synthèse d'apolipoprotéine B100 via PERK [Flamment, et al. 2012], il en résulte une accumulation de lipides dans les hépatocytes, menant à une stéatose. Le rôle potentiel du stress du RE dans l'apparition de la résistance à l'insuline a été démontré par plusieurs études

in vivo. La délétion d'XBP1 spécifiquement dans le foie mène à une réduction de la LDN [Lee, et al. 2008], et une inactivation d'eIF2 α réduit la stéatose et l'hyperglycémie d'animaux nourris avec un régime riche en lipides [Oyadomari, et al. 2008]. De même, le traitement d'animaux résistants à l'insuline avec des chaperonnes rétablit leur glycémie et leur sensibilité à l'insuline [Ozcan, et al. 2006]. Il est donc possible, en manipulant le stress du RE, de limiter l'accumulation de lipides dans le foie.

Les mécanismes par lesquels une insulino-résistance peut être provoquée par le stress du RE sont multiples [Flamment, et al. 2012]. Tout d'abord, les gènes régulés par les facteurs de transcription impliqués dans la réponse UPR peuvent coder pour des enzymes de la néoglucogenèse et de la lipogenèse, participant ainsi à la mise en place d'une hyperglycémie et d'une stéatose. Ensuite, en bloquant la sécrétion de VLDL, le stress du RE participe à l'accumulation de lipides dans l'hépatocyte, ce qui peut entraîner un phénomène de lipotoxicité. Une activation des kinases de stress telles que JNK et I κ K est rendue possible par la voie d'IRE1 [Hotamisligil 2005], ce qui peut mener à une altération du message insulinique en phosphorylant IRS-1 sur des résidus sérine, bien que la part des JNK activées par IRE1 ne semble pas être prépondérante dans leurs effets sur la sensibilité à l'insuline. Le facteur de transcription ATF4 induit l'expression de TRB3 (tribbles-related protein 3), qui semble inhiber la phosphorylation d'Akt par l'insuline dans le foie, bien que ces résultats aient été contestés dans une étude utilisant des hépatocytes primaires [Flamment, et al. 2012].

Un déséquilibre calcique dans le réticulum endoplasmique peut induire un stress du RE et une résistance à l'insuline. Le calcium est nécessaire au bon fonctionnement des protéines chaperonnes dans le réticulum endoplasmique, et SERCA (SarcoEndoplasmic Reticulum Calcium transport ATPase) permet de maintenir une homéostasie calcique dans le réticulum endoplasmique. Hotamisligil et ses collaborateurs ont récemment étudié le lipidome et le protéome de réticulum endoplasmiques provenant de foies de souris normales et de souris ob/ob, et ont montré que l'homéostasie calcique joue un rôle dans le stress du RE [Fu, et al. 2011]. Ils ont tout d'abord observé que dans les RE des souris ob/ob, la synthèse de protéines était diminuée, mais que la transcription de gènes impliqués dans la LDN était activée, confirmant un déplacement de la synthèse protéique vers la synthèse et le métabolisme des lipides. Les microsomes issus des souris ob/ob ont une capacité de transport de calcium plus faible que ceux des souris ob/+, alors que la protéine SERCA y est plus représentée, suggérant une altération de sa fonction due au stress du RE. Le rétablissement du transport de calcium

dans le réticulum endoplasmique *in vivo* mène à une atténuation du stress du RE et à la diminution de l'expression de gènes impliqués dans la lipogenèse et la néoglucogenèse, résultant en une diminution de la stéatose et de l'hyperglycémie, et à une amélioration de la sensibilité à l'insuline. Dans cette étude, les mêmes résultats ont été obtenus chez des souris rendues insulino-résistantes par un régime hyperlipidique, soulignant l'importance de l'homéostasie calcique dans le stress du réticulum endoplasmique, et la résistance à l'insuline qu'il peut engendrer. Plus récemment, un groupe français a confirmé l'importance des flux de calcium dans la sensibilité à l'insuline, en montrant qu'un défaut du flux de calcium entre le RE et la mitochondrie, induit par l'inactivation d'une chaperonne mitochondriale, la cyclophiline D, mène à un stress du RE, à une augmentation des TG hépatiques et à une insulino-résistance hépatique *in vivo* et *in vitro* [Rieusset, et al. 2012].

Au-delà de la résistance à l'insuline, une activation chronique du stress du RE peut également mener à une induction de la mort cellulaire, car les voies de signalisation de PERK, IRE1 et ATF6 sont interconnectées avec les voies de signalisation de l'apoptose [Ron and Walter 2007].

L'inactivation de SREBP-1c induit une diminution de moitié seulement de l'expression des gènes de la LDN dans le foie de souris [Liang, et al. 2002], ce qui sous-entend que d'autres facteurs sont capables de réguler ce processus.

b) La régulation de la lipogenèse *de novo* par le glucose et ChREBP

Parmi les autres régulateurs de la LDN, on retrouve ChREBP (Carbohydrate-Responsive Element-Binding Protein). Comme SREBP-1c, c'est un facteur de transcription à motif bHLH-LZ, qui lui permet de se fixer aux promoteurs de ses gènes cibles qui contiennent un "carbohydrate responsive element" (ChoRE). Ces éléments sont retrouvés par deux, séparés par quelques paires de bases, ce qui fait que ChREBP, à la différence de SREBP-1c, doit être hétérodimérisé avec un autre facteur de transcription à motif bHLH-LZ, pour pouvoir induire l'expression de ses gènes cibles. Le facteur de transcription MLX (max-like protein) lui permet d'induire une grande partie de ses gènes-cibles [Ma, et al. 2006].

ChREBP est activé par l'augmentation du glucose intracellulaire [Yamashita, et al. 2001] et possède des gènes cibles en commun avec SREBP-1c en ce qui concerne la LDN : ACC, FAS, SCD1, Elovl6. Il est lui aussi capable d'activer la transcription de gènes impliqués dans la glycolyse, comme la pyruvate kinase [Poupeau, et al. 2011]. La GPAT possède un site de liaison de ChREBP sur son promoteur. Cependant, l'inactivation de ChREBP n'a pas d'effet sur la transcription de la GPAT [Cha, et al. 2007], ce qui suggère que son expression est plus régulée par SREBP-1c, donc que la synthèse de TG serait plus régulée par l'insuline que par le glucose. L'activation de l'AMPK, en phosphorylant la sérine 568 de ChREBP, empêche sa liaison à l'ADN [Kawaguchi, et al. 2002] et inhibe ainsi la LDN.

En condition d'insulino-résistance et de diabète de type II, la glycémie à jeun étant élevée, le glucose entrant dans les hépatocytes active ChREBP de façon non régulée. En effet, ChREBP est plus abondant dans le noyau des hépatocytes de souris ob/ob que des souris ob/+, et participe à l'installation de leur résistance à l'insuline [Dentin, et al. 2006]. Une diminution de l'expression de ChREBP par ARN interférant permet de diminuer de moitié la stéatose hépatique de ces animaux [Dentin, et al. 2006] ce qui en fait une cible intéressante dans le traitement de la stéatose, d'autant plus que cette inhibition de l'expression de ChREBP a aussi pour effet de diminuer la concentration intracellulaire de malonyl-coA, composé qui sera décrit plus tard comme un inhibiteur du catabolisme des lipides.

c) La régulation de la lipogenèse *de novo* par d'autres acteurs intracellulaires

➤ Les Liver X Receptors (LXR)

Les récepteurs nucléaires LXR α et LXR β sont d'autres acteurs importants dans la régulation de la LDN puisqu'ils régulent l'expression des gènes de la FAS, d'ACC et de la SCD1 [Schultz, et al. 2000] de façon directe, ou indirecte en induisant l'expression de SREBP-1c [Repa, et al. 2000] et de ChREBP [Cha and Repa 2007]. Ce sont des récepteurs nucléaires qui s'hétérodimérisent avec un RXR (retinoid X receptor) pour exercer leurs effets. En l'absence de ligand, ils répriment la transcription de leurs gènes cibles en faisant intervenir des corépresseurs, alors qu'en présence d'un ligand, ces mêmes hétérodimères vont induire l'expression de leurs gènes cibles en recrutant des coactivateurs. Ils peuvent également "trans-réprimer" l'expression de gènes suite à l'activation par un ligand [Li, et al. 2004]. Leurs ligands

sont divers, incluant les acides gras et les hydroxy-cholestérols [Lehmann, et al. 1997], le glucose et le G6P [Mitro, et al. 2007].

L'activation pharmacologique des LXR, que ce soit chez des souris minces ou ob/ob [Grefhorst, et al. 2005b], induit une stéatose, mais ne modifie pas la sensibilité à l'insuline.

➤ Les Peroxisome Proliferator Activated Receptors (PPAR)

Les PPARs, d'abord décrits comme des régulateurs de la β -oxydation, peuvent aussi réguler la LDN [Latruffe, et al. 1997]. Ces récepteurs nucléaires sont actifs sous forme d'homodimères PPAR-RXR. Tout comme les dimères LXR-RXR, les dimères PPAR-RXR activent ou répriment la transcription de leurs gènes cibles en faisant intervenir des co-activateurs ou des co-represseurs, selon que leur ligand est présent ou pas [Li and Glass 2004]. Ils reconnaissent les séquences PPRE (PPAR Response Elements) dans les promoteurs de leurs gènes-cibles. La forme la plus représentée dans le foie est PPAR α , qui promeut la β -oxydation des lipides, tandis que la forme PPAR γ a pour gènes cibles l'ACC, la FAS, SREBP-1c [Nguyen, et al. 2008], la GPAT et aussi la FATP (Fatty Acid Transport Protein), ainsi que LXR [Nguyen, et al. 2008]. PPAR γ est surtout exprimé dans les adipocytes, où il promeut l'adipogenèse, et son expression dans le foie est très faible en condition physiologique. Cependant, l'expression de PPAR γ est induite dans le foie de patients [Pettinelli, et al. 2011] et de souris diabétiques [Bedoucha, et al. 2001], [Memon, et al. 2000]. Dans les modèles murins d'insulino-résistance ob/ob et db/db, l'expression de PPAR α est également augmentée dans le foie, mais dans une moindre mesure que PPAR γ [Memon, et al. 2000], la faible augmentation de la β -oxydation qui en résulterait ne suffirait donc pas à empêcher le développement d'une stéatose.

L'implication de PPAR γ dans les NAFLD est controversée car, bien que les foies stéatosés le sur-expriment [Pettinelli and Videla 2011], le traitement de patients ayant une stéatose avec des thiazolidinediones, qui sont des agonistes de PPAR γ , mène à une réduction de la stéatose [Ratziu, et al. 2008], [Ratziu, et al. 2010]. Afin de déterminer l'implication du PPAR γ hépatique, une étude a évalué les effets d'une délétion spécifique de PPAR γ dans le foie de souris nourries avec un régime hyperlipidique [Moran-Salvador, et al. 2011]. Ces souris sont plus tolérantes au glucose, et l'expression de la plupart des enzymes de la LDN est diminuée dans leurs hépatocytes, conférant un rôle non négligeable à ce récepteur nucléaire dans le développement de la stéatose.

➤ Le Farnesoid X Receptor (FXR)

Le FXR, récepteur des acides biliaires, contrôle également la LDN. Son activité est augmentée par l'AMPc *in vitro* et *in vivo* [Teodoro, et al. 2011], et il régule négativement la LDN, en réprimant l'expression de SREBP-1 et de la SCD1 dans le foie [Teodoro, et al. 2011].

Les patients ayant une stéatose expriment moins le FXR (en ARN et en protéine) dans le foie, en fonction de la sévérité de la stéatose [Yang, et al. 2010]. De plus, la diminution de FXR est corrélée à l'augmentation de l'expression de SREBP-1c. Comme expliqué précédemment, l'effet des acides biliaires sur le métabolisme glucidique est encore controversé, mais des rats obèses Zucker fa/fa traités avec un agoniste de FXR, l'acide 6-éthyl-chénodésoxycholique, sont protégés contre l'obésité, la résistance à l'insuline et la stéatose [Cipriani, et al. 2010], ce qui confère au FXR un rôle dans le métabolisme énergétique du foie.

➤ L'AMP-activated protein Kinase (AMPK)

Au niveau des enzymes impliquées dans la LDN, la phosphorylation d'ACC1 par l'AMPK a un effet inhibiteur sur la LDN. ACC1 a un rôle majeur dans la LDN : l'inactivation spécifique d'ACC1 dans le foie entraîne une diminution de la LDN stimulée par l'insuline, menant à une diminution de 40% des lipides hépatiques et de 70% du malonyl-coA [Mao, et al. 2006]. En revanche, l'inactivation de la FAS dans le foie n'a pas le même effet : l'augmentation des taux de malonyl-coA qui en résulte inhibe la β -oxydation, et ce modèle d'inactivation présente une stéatose accentuée [Chakravarthy, et al. 2005]. Cela montre l'importance et la spécificité des enzymes de chaque étape de la lipogénèse dans les autres réactions cataboliques et anaboliques qui ont lieu dans le foie, et souligne les précautions qu'il faut prendre lorsque l'on souhaite inhiber l'activité d'une enzyme d'une voie métabolique.

Au niveau de la synthèse des TG, la GPAT est inhibée par l'AMPK, qui va acheminer les nouveaux acides gras vers la β -oxydation plutôt que vers la synthèse de TG.

C) La sécrétion des lipides : les VLDL

Les lipides, pour être sécrétés par le foie, doivent être conditionnés dans les VLDL. Ces lipoprotéines sont composées de 55% de TG, 18% de phospholipodes, 12% d'EC, 7% de cholestérol et de 8% de protéines (Apolipoprotéines (Apo) B, ApoC et ApoE), et cette composition varie au fur et à mesure qu'elles sont prises en charge par les lipases plasmatiques.

Dans l'hépatocyte, ce processus est permis par la synthèse de l'ApoB100, qui est prise en charge par la protéine chaperonne MTP (microsomal TG transfer protein) dans le RE, et mise en contact avec les lipides, au cours de son élongation [White, et al. 1998] (Figure 10). Après leur passage dans le Golgi, les VLDL sont glycosylées, puis sécrétées à partir de vésicules sécrétoires, dans les sinusoides du foie pour rejoindre la circulation [Sparks, et al. 2012].

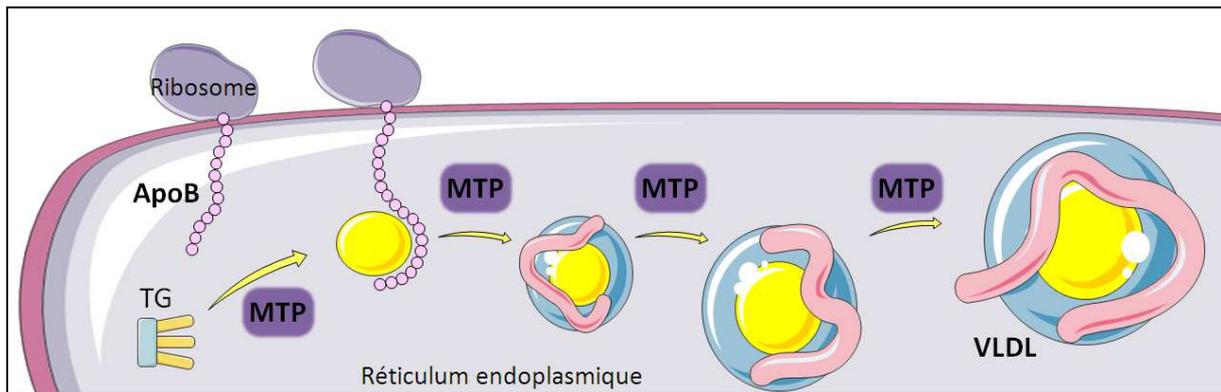


Figure 10. Formation d'une VLDL.

D'après [White, et al. 1998]. L'apolipoprotéine B100, au cours de son élongation dans le réticulum endoplasmique, est prise en charge par la chaperonne MTP (microsomal TG transfer protein), et mise en contact avec les lipides, formant une VLDL qui sera sécrétée dans les sinusoides.

La disponibilité des acides gras est un facteur limitant du taux de production de VLDL [Zhang, et al. 2004], mais ce n'est pas le seul. L'expression de la MTP est sous le contrôle de FOXO1 et l'effet inhibiteur de l'insuline sur la production de VLDL passe par l'inactivation de FOXO1, qui ne peut plus être transloqué dans le noyau [Kamagate, et al. 2008b]. Chez la souris, l'invalidation ou l'inhibition de la MTP mène à un arrêt de la production de VLDL, et à l'accumulation de lipides dans les hépatocytes [Liao, et al. 2003], ce qui confère à la MTP un rôle important dans la régulation de la production et la sécrétion de VLDL.

Il semble que la capacité de sécrétion de VLDL soit également liée à la capacité de lipogenèse *de novo* [Nguyen, et al. 2008] : chez les espèces dont le foie n'est pas spécialisé dans la lipogenèse, comme le porc ou le bétail, la sécrétion de VLDL est très faible, alors que chez les volailles, le foie est le principal site de lipogenèse, et on y observe un fort taux de sécrétion de VLDL. Pour les rongeurs, la lipogenèse ayant lieu à la fois dans le foie et dans le tissu adipeux, le taux de sécrétion de VLDL est intermédiaire. En condition pathologique, une augmentation de la LDN peut induire la sécrétion de VLDL, mais pas dans tous les cas : une LDN induite par l'inhibition de la G-6-Pase n'a pas d'effet sur la production de VLDL [Bandsma, et al. 2001], alors

qu'une LDN induite par un régime riche en fructose induit une augmentation de la sécrétion de VLDL [Avramoglu, et al. 2003]. Pourtant, les acides gras conditionnés dans les VLDL proviennent préférentiellement des NEFAs plasmatiques plutôt que de ceux formés par la LDN, ce qui indique que le lien entre la LDN et la production de VLDL se situe probablement au niveau de leurs régulateurs communs.

En condition de résistance à l'insuline, la sécrétion de VLDL par le foie est augmentée [Kamagate, et al. 2008a] car l'insuline ne peut plus l'inhiber [Sparks, et al. 2012]. On observe également une augmentation de la stabilité de l'ApoB, tous ces événements menant à une sécrétion excessive de VLDL, se traduisant par une hypertriglycéridémie [Kamagate and Dong 2008a]. Chez les patients diabétiques de type II, l'étude d'Adiels et al montre que cette surproduction de VLDL est associée à l'hyperglycémie, et les auteurs proposent que le glucose entrant en excès dans les hépatocytes est dirigé vers la lipogenèse *de novo*, fournissant ainsi les VLDL en TG [Adiels, et al. 2005].

D) La production d'énergie à partir de lipides : la β -oxydation

Le foie n'est pas le lieu principal de création d'énergie à partir d'acides gras, comparé aux muscles, mais il est capable de les oxyder, surtout en condition de jeûne. En condition nourrie ou lors d'un jeûne de courte durée, les produits de la β -oxydation sont dirigés vers le cycle de Krebs puis vers la chaîne respiratoire, qui génère de l'ATP, alors qu'en condition de jeûne prolongé ils seront dirigés vers la cétogenèse, qui génère des corps cétoniques.

La β -oxydation hépatique des acides gras a lieu soit dans les peroxysomes, soit dans les mitochondries, selon la nature des acides gras considérés [Nguyen, et al. 2008]. Les acides gras à très longues chaînes (VLCFA, Very Long Chain Fatty Acids) possédant 20 atomes de carbones et plus, ou branchés, ne peuvent être oxydés que dans les peroxysomes, alors que les acides gras long et médium, de 10 à 20 atomes de carbones, peuvent être oxydés aussi bien dans les peroxysomes que dans les mitochondries. Dans les deux cas, les acides gras doivent être "activés" en acyl-coA par l'acyl-coA synthase afin d'être oxydés.

➤ La β -oxydation peroxysomale

Le peroxysome est un organite présent dans toutes les cellules nucléées de l'organisme, possédant une membrane lipidique, riche en enzymes, qui est spécialisé dans l'oxydation aérobie. Les peroxysomes ont une taille de 0,2 à 1 μm , ils sont particulièrement abondants dans les hépatocytes, et leur nombre peut changer car ils sont capables de s'auto-répliquer.

L'entrée des VLCFA-coA dans le peroxysome se fait grâce à une carnitine acyltransférase peroxysomale. La première étape d'oxydation est catalysée par l'acyl-coA oxydase et les autres enzymes clé de cette β -oxydation sont une enzyme bifonctionnelle, comprenant une activité enoyl-coA hydratase et une activité 3-hydroxylacyl-coA-déshydrogénase, et une beta-kéthiolase. La β -oxydation peroxysomale n'est pas couplée à la production d'ATP : l'énergie produite est convertie en chaleur. La β -oxydation peroxysomale génère des molécules d' H_2O_2 qui sont prises en charge et dégradées directement par la catalase.

La β -oxydation peroxysomale est induite par certains traitements hypolipidémiques, mais aussi par un régime hyperlipidique chez le rat [Horie, et al. 1981], ce qui indique que le peroxysome peut s'adapter à une affluence d'acides gras dans l'hépatocyte. PPAR α induit l'expression de gènes codant pour les enzymes impliquées dans la β -oxydation peroxysomale [Chamouton, et al. 2012] et les acides gras étant des ligands naturels de PPAR α , cela peut expliquer l'induction de cette β -oxydation sous régime hyperlipidique.

➤ La β -oxydation mitochondriale

La β -oxydation a lieu dans la matrice mitochondriale, ainsi que le cycle de Krebs. Les enzymes impliquées dans la β -oxydation mitochondriale sont distinctes de celles présentes dans le peroxysome. Lorsqu'un acyl-coA entre en contact avec la CPT1a (ou L-CPT1) à la surface de la membrane mitochondriale externe, il est transformé en acyl-carnitine, qui peut alors entrer dans l'espace inter membranaire. Il existe deux autres isoformes de CPT1, la CPT1b et la CPT1c, qui ne sont pas ou très peu exprimées dans le foie. L'acyl-carnitine est alors transporté dans la matrice mitochondriale par le transporteur CACT (carnitine-acylcarnitine transferase), où il est retransformé en acyl-coA. Il va alors subir des cycles d'oxydation (4 réactions par cycle) au cours desquels il va perdre 2 carbones, chaque cycle générant une molécule d'acétyl-coA (Figure 11).

Les acétyl-coA générés vont alors entrer soit dans le cycle de Krebs, où ils seront complètement oxydés, générant des coenzymes, qui, une fois passés par la chaîne respiratoire, génèrent des molécules d'ATP (cf partie II.2.B de ce chapitre), soit dans la voie de la céto-genèse en condition de jeûne prolongé. Les acétyl-coA peuvent également entrer dans la voie de la lipogenèse *de novo*, comme décrit précédemment.

La régulation de la β -oxydation mitochondriale se fait principalement par la régulation de l'activité de la CPT1a, considérée comme l'enzyme limitante de ce processus. Elle est inhibée par le malonyl-coA synthétisé par l'ACC2.

En condition de jeûne, l'AMPK est activée suite à une diminution du ratio ATP/AMP, et phosphoryle l'ACC2, ce qui diminue les taux intracellulaires de malonyl-coA, et permet l'induction de la β -oxydation [Davies, et al. 1992], [Velasco, et al. 1997]. De plus, l'AMPK induit la dégradation du malonyl-coA en activant la malonyl-coA décarboxylase [Saha, et al. 2003]. Les facteurs circulants qui sont capables d'activer l'AMPK vont naturellement induire la β -oxydation hépatique, comme l'adiponectine par exemple [Shehzad, et al. 2012], 12368907 [Yamauchi, et al. 2002].

Dans l'hépatocyte, le malonyl-coA est synthétisé par l'ACC1 et l'ACC2, mais les deux pools de malonyl-coA semblent être bien distincts dans l'hépatocyte. En effet, l'invalidation d'ACC2 entraîne une augmentation de la β -oxydation sans pour autant modifier le taux de malonyl-coA total dans les hépatocytes des souris invalidées [Abu-Elheiga, et al. 2003]. Ce modèle de compartimentation est consolidé par le fait qu'une forte augmentation de la malonyl-coA décarboxylase dans le cytoplasme n'a qu'un faible effet sur la β -oxydation dans des hépatocytes isolés [An, et al. 2004], suggérant que le pool cytoplasmique de malonyl-coA formé par l'ACC1 n'a pas accès à la CPT1, mitochondriale.

Le malonyl-coA est également un intermédiaire de la lipogenèse *de novo*, et il semble que le pool synthétisé par l'ACC1 serait destiné à cette lipogenèse, alors que celui synthétisé par l'ACC2 est disponible et peut donc inhiber la CPT1a [Abu-Elheiga, et al. 2005]. Bien que codées par deux gènes distincts, ces deux enzymes possèdent une forte homologie au niveau de leurs sites de phosphorylation, il est donc probable qu'elles soient régulées de la même façon, ce qui permet à la cellule d'éviter l'activation simultanée de la synthèse et de l'oxydation des acides gras. Ce modèle a été proposé par McGarry en 1977 [McGarry, et al. 1977] et est

considéré comme la réciproque du cycle de Randle [Randle, et al. 1963] qui, lui, concerne l'inhibition de l'oxydation du glucose par les lipides, notamment via une inhibition de la pyruvate déshydrogénase (PDH) et de la PFK [Hue, et al. 2009].

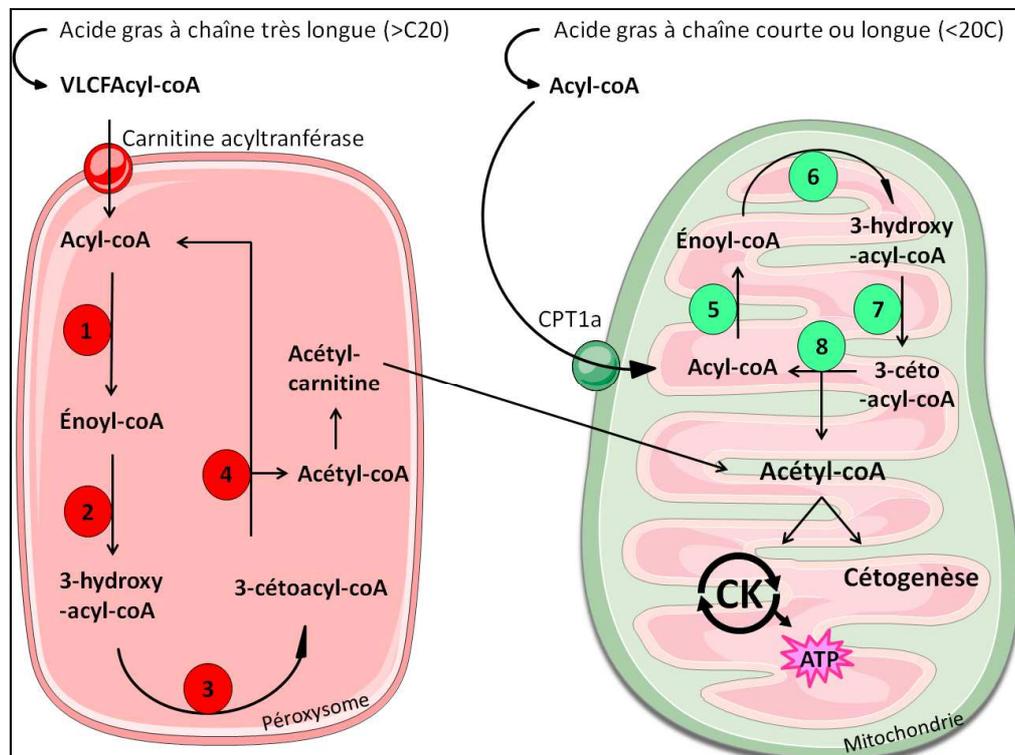


Figure 11. Oxydation des lipides dans l'hépatocyte.

Dans le peroxysoxe, l'entrée des acyl-coA à très longue chaîne (VLCFA-coA) se fait grâce à la carnitine acyltransférase peroxysoxale. L'acyl-coA oxydase (1) génère un énoyl-coA, pris en charge par une énoyl-coA hydratase (2) qui génère un 3-hydroxyacyl-coA. Une molécule de 3-cétoacyl-coA est produite après l'action d'une 3-hydroxyacyl-coA déshydrogénase (3), puis la céthiolase (4) génère un acyl-coA, réduit de deux carbones, qui subit les mêmes réactions, et un acétyl-coA qui est transformé en acétyl-carnitine. Cet acétyl-carnitine peut entrer dans la mitochondrie pour générer de l'énergie en entrant dans le cycle de Krebs puis dans la chaîne respiratoire. Les acyl-coA possédant moins de 20 carbones entrent dans la mitochondrie par la CPT1a après être passés par l'état "acyl-carnitine" grâce à la CPT1a, et arrivent dans la matrice mitochondriale. L'acyl-coA déshydrogénase (5) génère un énoyl-coA, qui est transformé par l'énoyl-coA oxydase (6) en un 3-hydroxyacyl-coA. L'hydroxyacyl-coA déshydrogénase (7) génère un 3-cétoacyl-coA. La céthiolase (8) génère alors un acyl-coA réduit de deux carbones, et un acétyl-coA, qui entre dans le cycle de Krebs puis dans la chaîne respiratoire où l'ATP est formée. L'acétyl-coA est également le substrat de la cétogenèse en condition de jeûne prolongé.

PPAR α régule la β -oxydation mitochondriale, en induisant l'expression de l'acyl-coA-déshydrogénase [Gulick, et al. 1994]. Il induit également l'expression d'un ensemble de gènes impliqués dans le transport et le catabolisme des acides gras (FAT, FABP, CPT1), que ce soit pour la β -oxydation mitochondriale ou peroxysoxale.

Le catabolisme des lipides dans le foie est modifié en condition de résistance à l'insuline. Nous avons vu que l'arrivée de lipides dans l'hépatocyte induit la β -oxydation peroxysomale et mitochondriale, et cela a été confirmé par une étude comparant des sujets minces avec des obèses insulino-résistants, mesurant de façon directe la β -oxydation hépatique, qui est doublée chez les obèses, et associée à l'HOMA-IR [Iozzo, et al. 2010]. Cependant, suite à une exposition chronique à un excès de lipides, l'augmentation de la β -oxydation ne suffit pas à limiter le stockage de lipides, des phénomènes de lipotoxicité et de stress oxydant peuvent alors se mettre en place, et la dysfonction mitochondriale qui y est associée peut mener à l'évolution de la stéatose vers la NASH, comme décrit précédemment.

Il a été montré qu'une augmentation de la capacité oxydative du foie par la surexpression de la CPT1a permet non seulement de diminuer la stéatose de souris nourries avec un régime hyperlipidique ou db/db, mais aussi de freiner leur prise de poids, et d'empêcher le développement de l'hyperglycémie et de l'hyperinsulinémie [Orellana-Gavaldà, et al. 2011]. L'augmentation de la β -oxydation des lipides par le foie est donc considérée comme une cible potentielle dans le traitement de l'insulino-résistance induite par un régime gras. Il faut cependant rester prudent lorsque l'on augmente la β -oxydation car, d'une part cela augmente l'approvisionnement en substrats de la néoglucogenèse, et d'autre part une augmentation des espèces lipidiques intermédiaires de la β -oxydation, qui sont délétères, peut avoir lieu, et interférer avec la voie insulinaire. Inversement, l'inhibition pharmacologique de CPT1a mène à une augmentation des TG hépatiques [Conti, et al. 2011]. Une étude cinétique a montré qu'après 8 semaines de régime gras, l'expression de gènes impliqués dans la β -oxydation n'est pas augmentée dans le foie de souris, mais qu'elle l'est après 16 semaines [Sunny, et al. 2010].

➤ La mitochondriogenèse

La quantité de mitochondries va évidemment avoir un impact sur la capacité oxydative d'une cellule. La mitochondriogenèse est le processus par lequel de nouvelles mitochondries sont formées. La régulation de la mitochondriogenèse fait intervenir l'expression de nombreux gènes, appartenant au génome nucléaire mais aussi au génome mitochondrial [Scarpulla, et al. 2012]. L'expression de ces gènes est régulée par des facteurs et cofacteurs de transcription

comme PPAR α , LXR, PGC1 β , CREB, ... Le facteur de transcription PGC1 α est souvent cité comme régulateur clé de la mitochondriogenèse, et sa régulation transcriptionnelle est aussi induite par CREB [Than, et al. 2011].

Dans le muscle, l'exercice augmente la mitochondriogenèse via l'activation de l'AMPK, et dans le foie, l'AMPK est aussi impliquée dans ce processus. Ceci a été montré grâce à un modèle murin de délétion des sous-unités catalytiques de l'AMPK, spécifiquement dans le foie, chez qui les hépatocytes contiennent moins de mitochondries, ce qui conduit à une moindre capacité oxydative, et à l'accumulation de lipides dans le foie [Viollet, et al. 2009].

E) La cétogenèse

La particularité de la β -oxydation hépatique est qu'elle permet la production de corps cétoniques à partir de l'acétyl-coA. En effet lors d'un jeûne prolongé, le cycle de Krebs est ralenti car son substrat, l'OAA, est consommé par la néoglucogenèse. Lorsque les ressources de glucose (glycogène) de l'organisme ont été épuisées, les corps cétoniques sont la seule source d'énergie utilisable par le cerveau, dont le cycle de Krebs est toujours actif à jeun. Le foie est également capable de cétogenèse à partir d'acides aminés dits cétogéniques.

Parmi les corps cétoniques, on retrouve l'acétoacétate, le beta-hydroxybutyrate, et l'acétone. Les enzymes impliquées dans la cétogenèse sont associées à la mitochondrie. Deux molécules d'acétyl-coA sont prises en charge par la Thiolase et génèrent une molécule d'acétoacétyl-coA. La HMG-coA Synthase permet la formation d'un HMG-coA qui, après l'action de la HMG-coA Lyase, est transformé en un acétoacétate, le premier corps cétonique de la cétogenèse. Cet acétoacétate peut être transformé en acétone ou en β -hydroxybutyrate (β HB), selon qu'il est décarboxylé ou déshydrogéné (Figure 12).

Ce processus génère cinq fois moins d'ATP que la β -oxydation mitochondriale si l'on considère une molécule de palmitate, mais permet la conversion d'acides gras en molécules hydrosolubles, et donc une redistribution rapide et efficace d'énergie dans l'organisme, sans nécessiter des protéines de transport, ce qui est un avantage par rapport au transport des acides gras. La cétogenèse permet également d'épargner le glucose pour les cellules qui sont exclusivement dépendantes du glucose, et de limiter la protéolyse musculaire qui a lieu pendant un jeûne. Une fois dans les cellules nerveuses, les corps cétoniques vont être oxydés via le processus de cétolyse : la thiophorase convertit un acétoacétate en acétoacétyl-coA, qui

va subir la β -oxydation, puis le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire génèrent de l'énergie sous forme d'ATP.

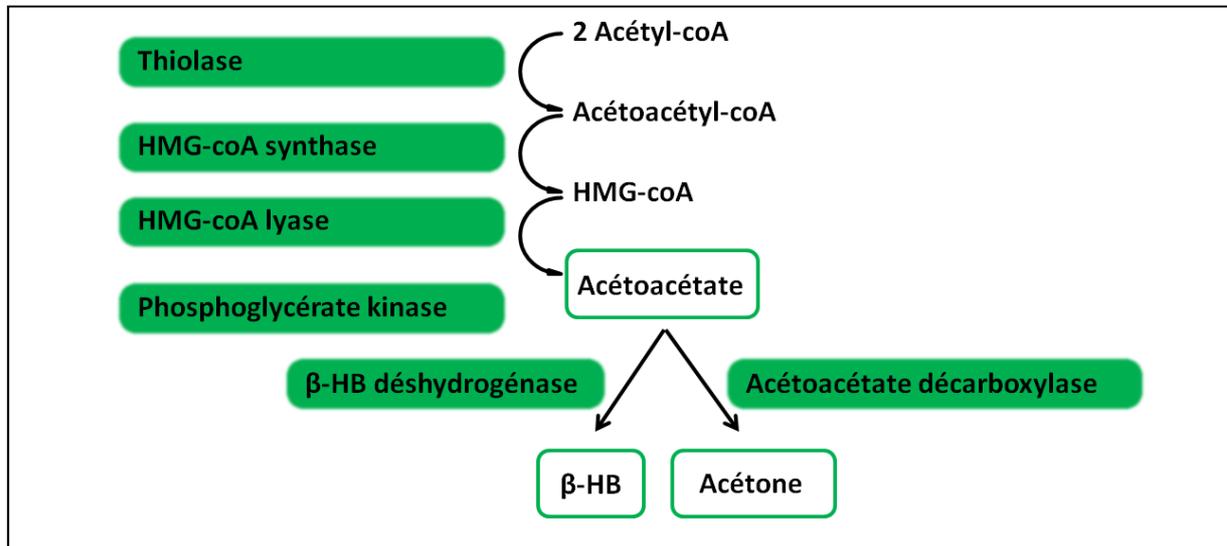


Figure 12. La cétogenèse hépatique

Deux molécules d'acétyl-coA sont prises en charge par la Thiolase et génèrent une molécule d'acétoacétyl-coA. La HMG-coA Synthase génère un β -hydroxy- β -méthylglutaryl-coA (HMG-coA) qui, après l'action de la HMG-coA Lyase est transformé en acétoacétate. Cet acétoacétate peut être transformé en acétone ou en β -hydroxybutyrate (β HB), selon qu'il est décarboxylé, ou pris en charge par la β HB-déshydrogénase.

La disponibilité des acides gras est le premier facteur limitant de la cétogenèse, et ils proviennent en grande partie du tissu adipeux, où la lipolyse est activée lors d'un jeûne.

La cétogenèse est activée par le glucagon de façon indirecte par l'activation de la CPT1a, et cet effet est inhibé par l'insuline [Harano, et al. 1982]. Les corps cétoniques exercent un rétrocontrôle sur leur propre synthèse, en induisant la sécrétion d'insuline [Boden, et al. 1999], qui va à la fois inhiber cette voie dans l'hépatocyte, et limiter la lipolyse du tissu adipeux.

Elle est également régulée de façon directe par la HMG-coA-synthase. Cette enzyme est inactive lorsqu'elle est succinylée, et le glucagon participe à son activation en diminuant la concentration intracellulaire de succinyl-coA [Quant, et al. 1990]. Son expression est elle aussi régulée, par le glucagon et certains acides gras via PPAR α . En effet le récepteur nucléaire PPAR α peut se fixer sur le promoteur de la HMG-coA-synthase qui possède un motif PPRE

(PPAR Response Elements). La HMGcoA-Synthase elle-même, suite à sa palmitoylation, peut interagir directement avec PPAR α , induisant ainsi sa propre expression [Kostiuk, et al. 2010].

La lipogénèse *de novo* inhibe la cétogénèse, par compétition pour l'acétyl-coA, leur substrat commun. Ces deux voies métaboliques s'inhibent donc mutuellement, d'autant que la lipogénèse *de novo* produit du malonyl-coA, qui peut inhiber la CPT1a, l'enzyme limitante de la β -oxydation, précédant la cétogénèse.

En ce qui concerne la cétogénèse en condition de résistance à l'insuline, l'étude de Sunny et al [Sunny, et al. 2010] a montré qu'après 16 semaines de régime contenant 60% de lipides, la cétogénèse à jeun est augmentée, et c'est une caractéristique du diabète de type II.

III) Le paradoxe de l'insulino-résistance hépatique

En condition de résistance à l'insuline, les effets de l'insuline sont donc abolis en ce qui concerne le métabolisme glucidique, alors que la lipogénèse *de novo* n'est pas diminuée, bien au contraire. Ce paradoxe apparent suscite énormément d'intérêt, et plusieurs hypothèses ont été avancées afin de tenter de l'expliquer.

Tout d'abord l'hypothèse d'une insulino-résistance sélective au sein de l'hépatocyte a été proposée par Brown et Goldstein [Brown, et al. 2008] : la signalisation insulinique serait altérée au niveau d'effecteurs impliqués dans le métabolisme glucidique, mais pas au niveau d'effecteurs impliqués dans la lipogénèse *de novo*, en évoquant notamment mTORC, FOXO1 et les PKC λ/ζ [Brown and Goldstein 2008], [Hijmans, et al. 2013], [Li, et al. 2010], [Taniguchi, et al. 2006]. Une hypothèse proposant IRS-1 comme régulateur des effets de l'insuline sur le métabolisme lipidique et IRS-2 du métabolisme glucidique, pouvait expliquer la sélectivité de la résistance à l'insuline [Haeusler, et al. 2008]. Cependant, des études d'inactivation d'IRS1 et IRS2 dans le foie ont montré qu'ils sont tous les deux impliqués dans ces deux processus [Kubota, et al. 2008], [Dong, et al. 2008].

L'hypothèse d'une insulino-résistance sélective au sein de l'acinus a été avancée par Hijmans et al [Hijmans, et al. 2013], proposant l'implication de la zonation hépatique dans l'hétérogénéité de la résistance à l'insuline hépatique. L'afflux excessif d'acides gras provenant de la lipolyse du tissu adipeux résistant à l'insuline toucherait en premier lieu les hépatocytes périportaux, sur le principe du "first pass", où leurs métabolites délétères, comme les

céramides ou les acylCN, induiraient une résistance à l'insuline. Dans ces hépatocytes, spécialisés dans la néoglucogénèse, la production de glucose n'est donc plus inhibée par l'insuline, ce qui a pour conséquence une élévation de la glycémie. L'hyperinsulinémie qui s'ensuit induit donc la lipogenèse *de novo* dans les hépatocytes péricentraux, qui eux, moins exposés aux acides gras, auraient conservé une sensibilité à l'insuline. Selon Hijmans, cela expliquerait pourquoi l'accumulation de lipides dans le foie débute dans la zone péricentrale en condition de résistance à l'insuline chez les souris ob/ob ou nourries avec un régime gras.

Une autre explication à l'activation de la lipogenèse *de novo* en condition d'insulino-résistance est celle d'une activation des facteurs de transcription lipogéniques indépendamment de l'insuline, comme le stress du RE pour SREBP-1c, ou l'hyperglycémie pour ChREBP, dont les rôles dans la lipogenèse *de novo* ont été détaillés dans la partie II.3.B de ce chapitre.

IV) La place du foie stéatosé dans le diabète de type II : cause ou conséquence ?

L'association stéatose/obésité-insulino-résistance ne fait plus aucun doute [Cortez-Pinto, et al. 1999a]. La stéatose est d'ailleurs considérée comme la manifestation hépatique du syndrome métabolique, mais il est toujours difficile de déterminer quelle pathologie induit l'autre, certaines études animales rapportent même que la stéatose ne serait pas associée à l'insulino-résistance, et pourrait même l'améliorer.

Ce paragraphe regroupe ces différentes études pour tenter d'y voir plus clair.

1) La stéatose : conséquence de l'insulino-résistance

Nous avons vu que le stockage de lipides dans le foie est le résultat d'une augmentation des acides gras plasmatiques, d'une augmentation de la lipogenèse *de novo* (en réponse à, ou indépendamment de l'hyperinsulinémie), et d'une β -oxydation insuffisante pour les cataboliser.

En condition de résistance à l'insuline, le tissu adipeux relargue des acides gras de façon excessive, qui se retrouvent dans les muscles, le pancréas, le myocarde, et le foie, ce qui est un élément suggérant que l'insulino-résistance peut induire une stéatose.

Le stade prédiabétique consiste en une glycémie maintenue à une valeur physiologique, malgré une insulino-résistance, grâce à l'hyperinsulinémie. Ainsi, si l'on considère que la

résistance à l'insuline hépatique est sélective, l'insuline sécrétée peut induire de façon excessive la lipogenèse *de novo*, qui participe à la mise en place d'une stéatose. Une étude cinétique des effets d'un régime riche en lipides et en cholestérol sur des souris [Stanton, et al. 2011] a montré que l'inflammation du foie se déclare après celle du tissu adipeux, on peut donc supposer que la résistance à l'insuline du foie serait elle aussi secondaire à celle du tissu adipeux.

2) La stéatose : protection contre l'insulino-résistance

Le stockage de lipides dans les organes autres que le tissu adipeux aboutit souvent à un phénomène de lipotoxicité, entraînant leur dysfonctionnement. Cependant deux théories proposent de considérer l'accumulation de TG dans le foie comme une protection du reste de l'organisme, ou du foie.

➤ Accumuler les acides gras sous forme de TG pour préserver la fonction cellulaire de l'hépatocyte

Selon cette théorie, la stéatose est un phénomène d'adaptation du foie, qui, face à un stress induit par une augmentation de lipides délétères (diacyl-glycérol (DAG), AGL, acylCN), répondrait en redirigeant ces lipides lipotoxiques vers la synthèse de TG qui, stockés dans les vacuoles de façon stable, sont inoffensifs pour la cellule [Grattagliano, et al. 2012]. Cela a été illustré par la diminution de l'expression de la DGAT2 dans un modèle murin de NASH qui, en limitant la transformation de DAG en TG, diminue la stéatose mais augmente les dommages cellulaires par une augmentation d'AGL et de lipides peroxydés [Yamaguchi, et al. 2007].

Pour ce qui est de la sensibilité à l'insuline, on observe, dans un modèle de souris surexprimant une CPT1a insensible au malonyl-coA, une meilleure sensibilité à l'insuline globale et hépatique, sans aucun effet sur les TG hépatiques, mais avec une réduction des céramides, des DAG et des AGL [Monsenego, et al. 2012], en accord avec un rôle inoffensif des TG en comparaison avec les DAG et autres espèces lipidiques délétères.

Une étude menée chez des patients atteints de NASH montre une corrélation positive de l'expression hépatique de ChREBP avec le degré de stéatose, mais inverse avec la sévérité de l'insulino-résistance [Benhamed, et al. 2012]. Cette étude montre que la surexpression de ChREBP entraîne une augmentation de la lipogenèse *de novo* et l'apparition d'une stéatose

chez des souris nourries avec un régime standard, mais que la sensibilité à l'insuline du foie n'est pas altérée. De plus, les souris nourries avec un régime hyperlipidique qui surexpriment ChREBP ont une glycémie et une insulïnémie diminuées, et une meilleure sensibilité hépatique à l'insuline, malgré une stéatose exacerbée. Cette étude montre également que la surexpression de ChREBP induit l'expression de gènes de la lipogénèse *de novo*, y compris la désaturase SCD1 et l'élongase Elovl6, ce qui résulte en une augmentation des acides gras mono-insaturés aux dépens des lipides saturés. Cela signifie que les acides gras accumulés dans le foie de ces souris ne sont pas forcément délétères pour la signalisation insulïnique.

➤ Accumuler les lipides pour protéger le reste de l'organisme

Cette théorie propose que le stockage de lipides dans le foie empêche leur stockage dans les muscles et autres organes, et de ce fait, les protègerait d'un stockage ectopique délétère, et donc de l'insulino-résistance.

Par exemple, la diminution de l'expression de CGI-58 [Brown, et al. 2010], une co-lipase de l'ATGL (Adipose TG Lipase), chez des souris nourries avec un régime gras, a pour effet d'empêcher la prise de poids et de masse grasse, l'hyper-insulïnémie et l'hyperglycémie induites par le régime gras. De façon surprenante, les foies sont stéatosés, et le taux de DAG y est augmenté. Cela suggérerait que la quantité totale de DAG intracellulaires ne serait pas aussi importante que leur localisation subcellulaire, en ce qui concerne leurs effets sur la signalisation insulïnique. Dans ce modèle, cela a récemment été confirmé, puisque le même groupe de recherche a mis en évidence que le régime gras a pour effet d'augmenter la quantité de DAG dans les membranes, ce qui mène à une activation de la PKC ϵ , alors que la diminution de CGI-58 a pour effet de rediriger les DAG vers les vacuoles lipidiques [Cantley, et al. 2013]. Cette "mise à l'écart" des DAG de la membrane plasmique, où l'activation de la PKC ϵ bloquerait la signalisation insulïnique, est une hypothèse séduisante pour expliquer la préservation de la sensibilité à l'insuline malgré une forte accumulation de TG et de DAG dans le foie de ces souris.

Une des données épidémiologiques disponibles les plus convaincantes à ce sujet est l'association d'un SNP dans le gène de la PNPLA3 (patatin-like phospholipase domain-containing protein 3) avec la stéatose et une augmentation de la sévérité de la stéatohépatite, fibrose et cirrhose, mais pas avec l'insulino-résistance, la dyslipidémie ou l'inflammation. Au contraire, ce SNP est associé à un moindre risque de développer un diabète de type II et une

hypertension [Speliotes, et al. 2010], ce qui ferait de la stéatose un facteur protecteur envers l'insulino-résistance. L'inactivation de la PNPLA3 ne provoque pas de stéatose chez la souris [Basantani, et al. 2011], [Chen, et al. 2010], mais la surexpression d'un allèle associé au risque de NAFLD, oui [He, et al. 2010]. Une recherche d'effets de la présence de cet allèle sur la sensibilité à l'insuline de ces animaux permettrait de confirmer cet effet "protecteur" de la stéatose associée à ce SNP.

L'utilisation "préférentielle" des substrats énergétiques pour la lipogenèse *de novo* plutôt que pour la néoglucogenèse fait partie des arguments qui peuvent expliquer le rôle protecteur de la stéatose.

L'inactivation de l'histone déacétylase 3 (HDAC3) spécifiquement dans le foie [Sun, et al. 2012] entraîne le développement d'une stéatose, par l'augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la lipogenèse *de novo* et dans la séquestration de lipides dans les vacuoles. Malgré une accumulation de DAG, les souris sont hypoglycémiques et présentent une hypersensibilité à l'insuline. Dans ce cas, l'augmentation de la lipogenèse monopolisant les substrats énergétiques, le flux néoglucogénique serait ralenti. En résulterait une moins forte production endogène de glucose par le foie, évitant ainsi l'hyperglycémie. Une autre étude va aussi dans le sens d'une "privation" de la néoglucogenèse, en montrant que des souris invalidées pour le gène de PPAR α , régulateur du catabolisme lipidique, qui ont une stéatose aggravée sous régime hyperlipidique [Kersten, et al. 1999], présentent une hypoglycémie et une sensibilité à l'insuline augmentée, par une diminution de la néoglucogenèse. Dans ce modèle, la diminution de la β -oxydation se traduit certes par l'apparition d'une stéatose, mais aussi par une diminution de substrats néoglucogéniques, protégeant donc l'organisme d'une hyperglycémie.

D'autres modèles animaux renforcent l'idée qu'une accumulation de TG dans le foie peut améliorer la sensibilité à l'insuline de l'organisme, comme la surexpression de ChREBP dans le foie de souris [Benhamed, et al. 2012], l'inactivation de la FAS [Chakravarthy, et al. 2005], d'Elovl6 [Matsuzaka, et al. 2007], de la CPT1a [Nyman, et al. 2011], de la PEPCCK [Gomez-Valades, et al. 2008] ou encore de la G-6-Pase [Mutel, et al. 2011].

Le concept de "lipoexpediency", proposé par Lodhi en 2011, est un autre exemple d'un effet bénéfique de la lipogenèse *de novo* sur la sensibilité à l'insuline. C'est le concept inverse

de la lipotoxicité, qui consiste à considérer la lipogenèse *de novo* comme productrice d'espèces lipidiques bénéfiques. Cela peut être des lipokines qui améliorent la sensibilité à l'insuline, ou des lipides qui peuvent diminuer la prise alimentaire et activer les voies d'utilisation des lipides [Lodhi, et al. 2011], et ce phénomène est applicable au foie. En effet, la FAS y génère le palmitate qui est intégré dans une molécule de 1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycérol-3-phosphocholine (16:0/18:1-GPC), qui est un ligand de PPAR α [Chakravarthy, et al. 2009], et active donc le catabolisme des lipides. Dans d'autres types cellulaires, la présence de la FAS est nécessaire à l'activation de PPAR α , ce qui montre que la lipogenèse *de novo* est essentielle pour le déclenchement du catabolisme lipidique.

Ainsi, que ce soit en redirigeant les espèces lipidiques délétères vers des compartiments subcellulaires, en privilégiant la synthèse de TG, ou encore en utilisant les substrats pour la lipogenèse *de novo* plutôt que pour la néoglucogenèse, le développement d'une stéatose peut améliorer la sensibilité à l'insuline, ce qui nous pousse à repenser le lien entre stéatose, résistance et diabète de type II. Ce lien a d'ailleurs été remis en cause à la suite d'études qui, au lieu de montrer une association positive ou négative entre la stéatose et l'insulino-résistance, ont montré une dissociation totale entre ces deux pathologies.

3) La stéatose : dissociable de l'insulino-résistance.

L'idée d'une dissociation entre la stéatose et l'insulino-résistance émerge de plusieurs considérations [Sun, et al. 2013]:

Premièrement, la lipotoxicité altérant les premiers acteurs de la signalisation insulinique (le récepteur à l'insuline, IRS-1, Akt) est en opposition avec la théorie de la résistance à l'insuline sélective proposée par Brown et Goldstein [Brown and Goldstein 2008], qui agirait sur le métabolisme glucidique uniquement, via FOXO1, considéré comme un point de bifurcation dans la signalisation insulinique. Ensuite, de nombreuses études épidémiologiques menées sur la stéatose hépatique ont révélé que, bien que l'accumulation de graisse intrahépatique soit inversement corrélée à la sensibilité à l'insuline, des individus présentant un même degré de stéatose pouvaient avoir une sensibilité à l'insuline extrêmement variable [Stefan, et al. 2008], et qu'aucun variant génétique n'a été associé avec la stéatose et la résistance à l'insuline à la

fois [Agius 2013]. De plus, la réversion de l'insulino-résistance dans des modèles animaux [Sun and Lazar 2013], [Mao, et al. 2006] et lors d'études cliniques [Lonardo, et al. 2011] n'est pas toujours associée à une diminution de la stéatose, et vice-versa [Wendel, et al. 2010].

De nombreux modèles animaux d'inactivation ou de surexpression de gènes impliqués dans le métabolisme énergétique mettent en évidence une claire dissociation entre la stéatose et l'insulino-résistance. Ces études concernent les gènes codant pour le récepteur à l'insuline [Biddinger, et al. 2008], l'ACC1 [Mao, et al. 2006], la GPAT1 [Wendel, et al. 2010], la MTP [Minehira, et al. 2008], l'ATGL [Turpin, et al. 2011], 21465509 [Wu, et al. 2011], la CPT1a [Nyman, et al. 2011], la PEPCK [Gomez-Valades, et al. 2008], et la G-6-Pase [Mutel, et al. 2011].

Par exemple, la surexpression de la DGAT2 dans le foie mène à l'accumulation de TG, mais aussi de DAG et de céramides dans le foie, sans pour autant altérer la sensibilité à l'insuline [Monetti, et al. 2007]. De même, l'inhibition de CPT1a dans le foie [Grefhorst, et al. 2005a], et l'activation de LXR α/β [Grefhorst, et al. 2005b] par des traitements pharmacologiques, induisent une stéatose sans modifier la sensibilité à l'insuline.

Le fait que la présence de stéatose ne soit pas systématiquement associée à une insulino-résistance, et soit parfois même associée à une meilleure sensibilité à l'insuline, indique que les causes de l'apparition de la stéatose sont multiples. L'identification et la compréhension de ces causes pourrait amener à classer les stéatoses d'une autre façon que "non-alcoolique" et "alcoolique", mais plutôt en fonction de leur cause, afin de permettre une prise en charge personnalisée des patients ayant une stéatose, qu'ils soient diabétiques ou non, pour éviter une évolution vers la NASH.

4) La stéatose : cause de l'insulino-résistance généralisée.

Le premier argument en faveur de cette hypothèse émane du concept de lipotoxicité, introduit précédemment. Une étude a mis en évidence que les DAG hépatiques sont corrélés positivement avec, et expliquent 64% de la variabilité de l'insulino-résistance chez des individus obèses non diabétiques, et sont directement corrélés à une activation de la PKC ϵ dans le foie des patients [Kumashiro, et al. 2011], ce qui est également observé dans des études *in vitro* [Samuel, et al. 2010] et animales [Samuel, et al. 2004], [Samuel, et al. 2007], où l'apparition de

la stéatose cause une inactivation de la glycogène synthase et une augmentation de la néoglucogenèse.

Le taux intracellulaire de DAG est augmenté par l'afflux d'acides gras provenant de l'alimentation et de la lipolyse du tissu adipeux, ou d'un ralentissement de l'activité mitochondriale musculaire, mais il n'est pas établi que l'augmentation des DAG hépatiques soit due à une activité mitochondriale réduite dans le foie. Bien que certaines études montrent une moindre activité mitochondriale dans le foie stéatosé [Cortez-Pinto, et al. 1999b] et le foie de patients diabétiques [Schmid, et al. 2011], une autre étude sur des patients atteints de stéatose a montré une augmentation de la fonction oxydative des mitochondries du foie [Sunny, et al. 2011]. Dans ce cas-là, l'activité augmentée de la mitochondrie mènerait à une augmentation de la production de ROS. Il est donc possible d'envisager une augmentation de la fonction mitochondriale dans un premier temps, en réponse à l'afflux de lipides, puis son effondrement à la suite de la surcharge lipidique et de son endommagement par les ROS.

Un modèle animal d'inhibition de la β -oxydation hépatique induit une stéatose et une insulino-résistance chez des rats via l'augmentation de DAG [Zhang, et al. 2007], ce qui consolide plutôt les études montrant une diminution de l'activité mitochondriale à l'origine de l'insulino-résistance.

Une étude prospective de 7 ans sur des patients sains ou atteints de stéatose non alcoolique sans état pré-diabétique a montré que la présence de stéatose prédit l'apparition d'un pré-diabète (déterminé dans cette étude par une hyperglycémie ou une hémoglobine glyquée élevée), indépendamment de l'IMC, de l'insulinémie, de la glycémie et de l'adiponectinémie de départ, de l'âge, des antécédents familiaux de diabète, de l'activité physique et de la prise alimentaire [Zelber-Sagi, et al. 2013]. Une autre étude prospective a aussi montré une incidence de diabète de type II multipliée par 2 chez des patients ayant une stéatose, et par 4 lorsque la stéatose est associée à un taux élevé d'ALAT plasmatique [Choi, et al. 2013b].

Ainsi, un foie stéatosé pourrait conduire à une insulino-résistance généralisée, menant à un diabète de type II. Nous avons vu dans les paragraphes précédents que la simple présence de lipides dans le foie ne peut pas expliquer à elle seule l'apparition d'une résistance à l'insuline. Il est important de connaître les mécanismes qui lient, ou au contraire dissocient la stéatose et l'insulino-résistance, cependant pour beaucoup d'études épidémiologiques et

interventionnelles, la stéatose reste fortement associée à l'insulino-résistance et reste une manifestation majeure du syndrome métabolique, et doit, en tant que telle, être considérée comme un élément à traiter.

L'un des arguments renforçant un rôle du foie dans l'apparition de l'insulino-résistance concerne la sécrétion d'hépatokines par le foie, qui sera détaillée dans la prochaine partie.

V) Les hépatokines

Les hépatocytes sont capables de sécréter des facteurs qui ont un effet paracrine sur les autres types cellulaires du foie, mais ils sont aussi capables de sécréter des molécules qui vont rejoindre la circulation générale et agir sur le métabolisme énergétique des autres organes, comme des hormones, ce sont les hépatokines.

La différence entre les hépatokines et les autres facteurs sécrétés par le foie tels que les facteurs de coagulation, est qu'elles sont impliquées dans des processus métaboliques, et qu'elles ont un rôle supposé dans la pathologie de l'insulino-résistance et du développement du diabète de type II, que ce soit un rôle bénéfique ou délétère. Bien que certaines de ces molécules soient identifiées depuis de nombreuses années concernant d'autres aspects qu'une action métabolique, le concept d'hépatokines est récent, la plus ancienne publication l'évoquant datant de 2009 [Bahr, et al. 2009].

1) Les hépatokines délétères pour la sensibilité à l'insuline.

La fétuine A

La fétuine A est la première hépatokine à avoir été décrite, en 1989, en tant qu'inhibiteur naturel du récepteur de l'insuline dans le foie et le muscle [Auberger, et al. 1989]. C'est une glycoprotéine qui a une forte affinité pour le calcium et promeut l'endocytose, et elle est également capable de se lier aux acides gras. Elle est exprimée et sécrétée majoritairement par le foie, et très peu par les autres organes.

Un SNP dans le gène de la fétuine A est associé avec le diabète de type II, et ses taux circulants sont corrélés positivement avec l'IMC, les TG plasmatiques, le tour de taille, l'HOMA-IR [Siddiq, et al. 2005], [Andersen, et al. 2008a], et avec la protéine C-réactive plasmatique [Hennige, et al. 2008]. Deux études épidémiologiques associent les taux plasmatiques de

fétuine A avec l'intolérance au glucose, et avec le diabète de type II [Ou, et al. 2011], [Ix, et al. 2012]. Les taux de fétuine A plasmatique sont corrélés à l'HOMA-IR chez des individus non diabétiques alors que chez des diabétiques, aucune corrélation n'est retrouvée [Mori, et al. 2006], ce qui sous-entend que chez des patients qui ont développé un diabète de type II, d'autres facteurs seraient responsables de l'aggravation de l'insulino-résistance.

Le foie stéatosé humain et de rat exprime plus la fétuine A [Stefan, et al. 2006], [Lin, et al. 1998]. De plus, un stress du RE induit son expression dans la lignée cellulaire d'hépatocytes HepG2 [Ou, et al. 2012], ce qui indique qu'une surproduction de fétuine A par le foie serait un reflet de son dysfonctionnement. Sa concentration plasmatique ne semble pas être modifiée par l'exercice chez des patientes obèses non diabétiques [Schultes, et al. 2010], mais chez des patients obèses et résistants à l'insuline, une semaine d'exercice suffit à la réduire, et cette réduction des taux de fétuine A est corrélée à l'amélioration de la sensibilité à l'insuline des patients [Malin, et al. 2013]. La restriction calorique diminue également sa concentration plasmatique chez des patients diabétiques de type II [Choi, et al. 2013c].

Les souris dont le gène de la fétuine A a été totalement invalidé ont une meilleure signalisation insulinique dans le foie et dans les muscles, et lorsqu'elles sont soumises à un régime gras, elles ne développent pas d'obésité et leur HOMA-IR est plus bas que les souris wt, proche de celui des souris nourries avec un régime normal [Mathews, et al. 2002]. Sur des myocytes en culture, la fétuine A diminue le transport de glucose induit par l'insuline, en limitant la translocation des transporteurs GLUT4 à la membrane plasmique et la phosphorylation d'Akt et d'AS160 [Malin, et al. 2013].

Le traitement de souris avec la fétuine A induit l'expression de TNF α et d'IL-6 par le tissu adipeux, et une diminution de l'expression et de la sécrétion d'adiponectine [Hennige, et al. 2008], confirmant son implication dans la perturbation du métabolisme. Les effets de la fétuine A sur le tissu adipeux passeraient par le récepteur TLR4, qui reconnaît les acides gras saturés. En effet, la fétuine A plasmatique liée à un acide gras peut se lier aux TLR4 des adipocytes, ce qui induit la transcription de gènes proinflammatoires comme l'IL-6 et le TNF α , en augmentant l'activité du facteur de transcription NF κ B [Pal, et al. 2012]. En effet, l'insulino-résistance induite par l'infusion de palmitate n'est pas observée chez les souris dont le gène de la fétuine A a été invalidé [Heinrichsdorff, et al. 2012]. Selon les auteurs de ces études, cette hépatokine serait le chaînon manquant entre l'hyperlipidémie (acides gras saturés) et l'insulino-résistance.

La sélénoprotéine P

Les protéines de la famille des sélénoprotéines sont de natures très variées (intra ou extracellulaires, activité enzymatique ou non, hydrogénases, glutathion peroxydases, désiodases, ...), leur seul point commun étant leur capacité à transporter le sélénium grâce à des résidus sélénocystéyls, mais leurs fonctions ne sont pas toutes décrites à ce jour.

La sélénoprotéine P (SepP) contient une dizaine de résidus sélénocystéyls et apporte le sélénium aux reins entre autres, en entrant dans les cellules par des récepteurs, dont le "Lrp2/megalin" ou le "Lrp8/ApoE receptor 2" où elle induit l'augmentation intracellulaire de l'activité glutathion peroxydase [Saito, et al. 2002].

Elle est synthétisée principalement dans le foie, néanmoins d'autres organes la sécrètent aussi, comme les reins, la thyroïde, l'intestin, et les poumons. Son expression est induite par le glucose [Speckmann, et al. 2009], et des études épidémiologiques montrent que sa concentration plasmatique est corrélée à la présence de NAFLD et d'adiposité viscérale [Choi, et al. 2013a], et avec une perturbation du métabolisme glucidique [Yang, et al. 2011]. D'autres études renforcent l'idée que cette hépatokine est délétère, en montrant que sa concentration plasmatique est plus élevée chez des patients diabétiques de type II [Misu, et al. 2010], et une corrélation positive avec la glycémie à jeun et négative avec les taux d'adiponectine chez des patients diabétiques de type II [Misu, et al. 2012]. Les effets de la SepP sur le métabolisme énergétique ont pu être établis *in vitro* et *in vivo*. Le traitement d'hépatocytes ou de myocytes avec la SepP induit une insulino-résistance, notamment en induisant la phosphorylation de la Serine 307 d'IRS-1 [Misu, et al. 2010]. *In vivo*, l'administration de SepP induit une résistance à l'insuline chez la souris, et son inhibition par ARN interférant l'améliore. Dans le foie des souris, la phosphorylation de l'AMPK est diminuée après un traitement à la SepP, sans changement du ratio AMP/ATP, et l'AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribo-nucleoside), un analogue de l'AMP qui peut donc activer l'AMPK, permet de bloquer les effets délétères de la SepP sur la signalisation insulinique d'hépatocytes en culture [Misu, et al. 2010], faisant de l'AMPK une cible potentielle de la SepP dans ses effets métaboliques. Le traitement d'hépatocytes de rat en culture avec la Metformine, un biguanide utilisé comme traitement antidiabétique, diminue l'expression et la sécrétion de la SepP [Speckmann, et al. 2009], et cette diminution peut participer à l'amélioration de la sensibilité à l'insuline observée chez les patients traités avec la Metformine.

La RBP4 (retinol binding protein 4)

La RBP4, de la famille des lipocalines, est principalement synthétisée par les hépatocytes. Les RBPs transportent la vitamine A (rétinol) du foie vers la périphérie, et ont été identifiées comme telles dans les années 1960 [Kanai, et al. 1968]. La RBP4 a été identifiée en 2005 comme adipokine, participant à l'installation de la résistance à l'insuline [Yang, et al. 2005]. Etant principalement sécrétée par le foie, elle fait donc aussi partie des hépatokines.

Plusieurs études épidémiologiques mesurant les taux plasmatiques de RBP4 ont été menées. En 2006, une étude a montré que ses taux circulants sont plus élevés chez les patients diabétiques [Graham, et al. 2006]. En ce qui concerne l'association entre les taux de RBP4 et la stéatose, une étude menée sur des patients ayant une stéatose ne rapporte pas de corrélation entre les taux de RBP4 et le niveau de stéatose [Cengiz, et al. 2010]. Par contre, une étude comparant des femmes minces et obèses morbides avec ou sans NAFLD a montré, outre une augmentation des taux et de l'expression hépatique de RBP4 chez les obèses par rapport aux femmes minces, une plus forte augmentation dans le groupes des patientes ayant une stéatose [Terra, et al. 2013]. De façon intéressante, dans une étude évaluant la production de RBP4 par le foie de patients cirrhotiques, l'inverse est observé : la production hépatique de RBP4 diminue avec l'aggravation du statut de la cirrhose [Bahr, et al. 2009]. Il est donc possible qu'un foie stéatosé secrète plus de RBP4, et participe ainsi à l'insulino-résistance globale, mais que, dès lors que la pathologie évolue en cirrhose, le dysfonctionnement des hépatocytes ne leur permette plus de sécréter la RBP4. D'autant plus que les taux de RBP4 mesurés dans cette étude ne présentent aucune association avec l'IMC ou le statut d'insulino-résistance des individus.

Des interventions médicales ayant pour effet d'améliorer le profil métabolique des patients, telles que des régimes alimentaires, de l'exercice, des traitements antidiabétiques et agents antilipidémiques ont pour effet de réduire la concentration de RBP4 plasmatique [Christou, et al. 2012], [Yang, et al. 2005].

Dans des cellules HepG2, un traitement avec la RBP4 induit la translocation de SREBP-1c dans le noyau, via la transcription de PGC1 β , et l'expression de la FAS et d'ACC1 [Xia, et al. 2013]. De façon étonnante, une étude montre que l'expression de RBP4 est réduite par le TNF α et augmentée par l'adiponectine dans des cellules HepG2, ce qui semble en désaccord avec une plus forte concentration plasmatique en condition d'obésité et d'insulino-résistance [Terra, et al. 2013].

La RBP4 possède deux récepteurs, STRA6 étant le premier à avoir été identifié. Il permet l'entrée de la vitamine A dans les cellules des nombreux organes qui l'expriment [Sun, et al. 2011]. Le foie n'exprime pas STRA6, mais un autre récepteur structuralement similaire, le RBPR2, identifié cette année. Ce deuxième récepteur est également exprimé dans l'intestin, le colon et la rate, mais dans le tissu adipeux de souris obèses seulement [Alapatt, et al. 2013]. Des SNP dans le gène de la RBP4 ou dans son promoteur ont été associés avec un risque de diabète de type II plus élevé [Munkhtulga, et al. 2007], et trois SNP dans le gène de STRA6 ont été associés avec le diabète de type II [Nair, et al. 2010], conférant à cette hépatokine un rôle important dans le développement de l'insulino-résistance. Une régulation de l'expression hépatique de RBPR2 par l'insulino-résistance n'a cependant pas été mesurée, mais il est probable que les effets délétères de RBP4 soient aussi médiés par ce récepteur.

L'hépassocine

La dernière hépatokine à avoir été décrite est l'hépassocine, et elle semble être délétère pour le métabolisme énergétique. Bien qu'identifiée en 2000, ce facteur exclusivement exprimé dans le foie, induisant la prolifération des hépatocytes [Hara, et al. 2000], a seulement été étudié dans des pathologies sévères du foie jusqu'à cette année. L'étude de Wu et al lui attribue un nouveau rôle potentiel dans le développement des NAFLD [Wu, et al. 2013]. Tout d'abord les taux plasmatiques d'hépassocine sont plus élevés chez les patients atteints de stéatose, et sa surexpression dans le foie des souris induit une stéatose, par l'induction du programme de lipogenèse *de novo*, et une élévation plasmatique des transaminases ALAT et ASAT. De façon attendue, la down-régulation de l'hépassocine dans le foie par ARN interférant a l'effet inverse chez des souris nourries avec un régime riche en lipide, en diminuant la stéatose. Des études plus précises permettront de déterminer le ou les mécanismes impliqués dans les effets de l'hépassocine.

2) Les hépatokines bénéfiques pour la sensibilité à l'insuline

Le FGF21 (Fibroblast Growth Factor 21)

Les FGFs (fibroblast growth factors) sont exprimés par de nombreux organes, ce sont des facteurs de croissance qui sont impliqués dans de nombreux processus biologiques tels que l'angiogenèse, la cicatrisation, la survie cellulaire, ce qui leur vaut d'être qualifiés de facteurs

pluripotents. Leur effet sur la prolifération de fibroblastes a été démontré en 1974 [Gospodarowicz 1974] et depuis, la famille des FGF s'est agrandie, comportant aujourd'hui plus de 20 membres. Le FGF21 est un membre atypique de la famille des FGFs par son incapacité à se lier à l'héparine. Il est principalement exprimé par le foie [Nishimura, et al. 2000], mais aussi par le pancréas, les muscles, le duodénum, les testicules, et le tissu adipeux.

Les taux circulants de FGF21 sont plus élevés chez les patients qui présentent une obésité, une NAFLD, une insulino-résistance ou un diabète de type II [Stefan, et al. 2013]. Une étude sur des jumeaux a montré que les individus avec les taux de FGF21 les plus hauts sont ceux qui ont les triglycéridémies, insuliniémies, HOMA-IR et aires sous la courbe (AUC) de test de tolérance au glucose les plus élevés, mais lorsque l'on compare les jumeaux hétérozygotes, on constate que les taux de FGF21 sont associés à la graisse hépatique plutôt qu'à la graisse sous-cutanée ou viscérale [Tynismaa, et al. 2011], ce qui relie le FGF21 à la stéatose, plutôt qu'à l'obésité globale.

Malgré les associations mises en évidence par les études épidémiologiques, les études menées sur les animaux montrent que FGF21 est une hépatokine bénéfique pour le métabolisme énergétique. L'idée d'une résistance au FGF21 a donc été proposée suite à une étude menée sur des souris obèses [Fisher, et al. 2010] et une autre menée sur des patients et des souris diabétiques [Samson, et al. 2011], mais cela est remis en cause par d'autres études. Deux études animales ont rapporté une augmentation du FGF21 plasmatique, parallèlement à son expression hépatique, chez des souris diabétiques [Chartoumpakis, et al. 2011]. Les différences sur la régulation du FGF21 lors de la résistance à l'insuline peuvent s'expliquer par les différences de composition des régimes induisant le diabète, et la durée des régimes. L'argument le plus convaincant contre une résistance au FGF21 est apporté par une étude menée sur 3 modèles animaux d'insulino-résistance, où le FGF21 est toujours efficace : des souris ob/ob et db/db et des rats Zucker traités avec du FGF21 voient leur stéatose, triglycéridémie, insulino-résistance et leur prise de poids diminuées, et leur dépense énergétique augmentée [Kharitonkov, et al. 2005].

Les effets du FGF21 sont rendus possibles grâce à l'hétérodimérisation de deux récepteurs membranaires que sont le β -Klotho et un FGFR (FGF-receptor 1-4) à activité tyrosine kinase [Ogawa, et al. 2007], [Suzuki, et al. 2008], [Ding, et al. 2012]. Ces deux récepteurs étant abondamment exprimés dans le tissu adipeux blanc, ce tissu semble être la première cible de cette hépatokine. Les premiers effets métaboliques du FGF21 ont été montrés dans les

adipocytes 3T3-L1, dans lesquels il stimule le transport de glucose [Kharitononkov, et al. 2005], en induisant la phosphorylation d'ERK1 et 2 [Ge, et al. 2011]. Dans le tissu adipeux, l'expression de PGC1 α et la lipolyse sont augmentées [Arafat, et al. 2013], [Coskun, et al. 2008]. Dans le foie, le FGF21 induit une augmentation de la β -oxydation et de la cétogenèse [Badman, et al. 2007], [Inagaki, et al. 2007] et une diminution de la lipogenèse [Xu, et al. 2009]. Le FGF21 a également un effet bénéfique au niveau du tissu adipeux brun où la thermogenèse est induite [Hondares, et al. 2010], et du système nerveux central, puisqu'une infusion intracérébroventriculaire (icv) induit une augmentation de la sensibilité à l'insuline globale de rats résistants à l'insuline [Sarruf, et al. 2010].

L'expression hépatique de FGF21 est induite par le jeûne via une activation de PPAR α [Badman, et al. 2007] alors que son expression adipocytaire est induite via une activation de PPAR γ [Muisse, et al. 2008], et il fait partie de la réponse adaptative au jeûne : il induit la néoglucogenèse et la cétogenèse. Ces données sont cohérentes avec le fait que chez l'Homme sain et diabétique de type I, le glucagon augmente son taux plasmatique, indépendamment des taux d'insuline. De même, l'expression de FGF21 est augmentée dans les hépatocytes isolés et les adipocytes isolés de rats rendus diabétiques avec la streptozotocine et traités au glucagon [Arafat, et al. 2013].

Le FGF21 plasmatique a été proposé comme marqueur du bon fonctionnement des hépatocytes, car d'une part les concentrations plasmatiques reflèteraient la production hépatique, et d'autre part les foies "malades" (stéatohépatite, cirrhose, hépatocarcinome) produisent le FGF21 en plus grande quantité [Yang, et al. 2013].

La SHBG (Sex Hormone-Binding Globulin)

Cette globuline, sécrétée principalement par le foie [Stefan and Haring 2013], se lie aux hormones sexuelles androgènes et estrogènes, et module leur action au sein des organes cibles. Son rôle a surtout été étudié dans certains cancers (prostate, sein), mais un rôle dans le métabolisme glucidique a aussi été mis en évidence ces dernières années.

Deux études épidémiologiques ont clairement montré que des taux circulants élevés de SHBG permettent de protéger contre le développement d'un diabète de type II [Ding, et al. 2009], [Perry, et al. 2010]. Les taux plasmatiques de SHBG diminuent en condition de stéatose chez l'Homme [Ding, et al. 2009], [Vassilatou, et al. 2010], et sa sécrétion par des cellules HepG2 est diminuée par un traitement avec du fructose et du glucose [Selva, et al. 2007], mais

pas par l'insuline. Son expression est également diminuée par l'IL1- β et par le TNF α [Simo, et al. 2012a], [Simo, et al. 2012b]. Une intervention dans le style de vie qui a pour effet de diminuer la stéatose peut augmenter les taux circulants de SHBG [Stefan, et al. 2009]. Les facteurs modulant l'expression de la SHBG sont assez bien connus, mais on ne peut pas en dire autant de son mode d'action.

L'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1)

Bien qu'identifié depuis longtemps, les effets sur le métabolisme énergétique de l'IGF-1, produit et sécrété principalement par le foie, font que sa présence dans la famille des hépatokines est légitime [Stefan and Haring 2013]. L'IGF-1 est un facteur de croissance qui a une structure similaire à celle de l'insuline. Il agit via son récepteur à tyrosine kinase IGF1R, présent à la surface de quasiment toutes les cellules de l'organisme, et active la voie Akt, qui stimule la croissance et la prolifération, et qui inhibe la sénescence.

Aucun lien n'a été montré entre les taux d'IGF-1 circulant et le diabète de type II, mais ils sont diminués dans le plasma de patients atteints de NAFLD [Arturi, et al. 2011]. L'action de l'IGF-1 est modulée par ses protéines de transport, nommées IGF-Binding Proteins (IGFBP 1-6), et les taux circulants d'IGFBP1 et d'IGFBP2 sont inversement associés à un risque de développer un diabète de type II [Stefan and Haring 2013]. L'IGFBP3, à l'inverse, est positivement associé à un risque de diabète de type II, et est augmenté chez les patients atteints de NAFLD [Stefan and Haring 2013]. Malgré l'absence de corrélation entre l'IGF-1 plasmatique et l'insulino-résistance, l'administration d'IGF-1 réduit la glycémie et améliore la sensibilité à l'insuline de patients diabétiques et de sujets sains [Boulware, et al. 1994], ce qui en fait une hépatokine bénéfique.

Les Angiopoietin-related growth factors (Angptl6 et RIFL)

Les Angptls sont impliqués dans le métabolisme énergétique, puisque l'Angptl2, en rendant les adipocytes plus sensibles à l'insuline, a un effet antidiabétique ; l'Angptl3 augmente la triglycémie [Koishi, et al. 2002], et a des niveaux plasmatiques élevés chez les patients ayant une stéatose. L'Angptl4 (fibrinogène hépatique) augmente également la triglycémie en inhibant l'activité de la LPL plasmatique [Koster, et al. 2005]. C'est un gène cible de PPAR γ [Yoon, et al. 2000], et elle améliore la sensibilité à l'insuline du foie au niveau de l'inhibition de la néoglucogénèse [Xu, et al. 2005]. Les membres de cette famille considérés comme des hépatokines sont l'Angptl6 et 8.

L'Angptl6

Le foie est l'organe qui l'exprime le plus, aussi bien chez la souris que chez l'Homme, et les taux circulants de l'Angptl6 sont le reflet de l'Angptl6 hépatique, c'est pourquoi elle est considérée comme une hépatokine [Stefan and Haring 2013].

La seule étude menée sur des sujets sains et diabétiques de type II a montré une plus forte concentration plasmatique d'Angptl6 chez les diabétiques [Ebert, et al. 2009], qui est corrélée avec la glycémie à jeun. Les souris invalidées pour le gène de l'Angptl6 développent une obésité, associée à une diminution de la dépense énergétique, à un stockage ectopique de lipides dans les muscles et dans le foie, et à une résistance à l'insuline [Oike, et al. 2005]. Une surexpression de ce gène dans le foie protège les souris contre l'obésité et la stéatose sous régime gras, et offre une meilleure sensibilité à l'insuline, associée à une dépense énergétique augmentée [Oike, et al. 2005]. On peut donc avancer que l'Angptl6 est une hépatokine bénéfique pour le métabolisme énergétique, ce qui est renforcé par le fait que le traitement d'hépatocytes isolés de rat avec de l'Angptl6 supprime la néoglucogenèse via l'exclusion de FOXO1 du noyau, par une voie dépendante de la PI3K [Kitazawa, et al. 2007]. A ce jour, il n'a pas été démontré que la résistance à l'insuline correspond à un état de résistance à l'Angptl6.

Angptl8, RIFL (Refeeding Induced in Fat and Liver), Lipasine, Bétatrophine.

Identifié par Ren et al en 2012 [Ren, et al. 2012] comme un acteur du métabolisme énergétique, on ne sait encore que très peu de choses sur l'Angptl8, qui est aussi appelé RIFL, Lipasine, ou β -trophine. Le foie est l'organe qui l'exprime le plus chez l'Homme [Ren, et al. 2012] et chez la souris, c'est le tissu adipeux brun [Yi, et al. 2013]. Son expression dans le foie, mais aussi dans le tissu adipeux blanc et brun, est diminuée pendant le jeûne et induite par la réalimentation, d'où son nom RIFL. Chez les souris ob/ob ou nourries avec un régime hyperlipidique, l'expression de RIFL est induite dans le foie et le tissu adipeux blanc [Stephens 2012], [Zhang 2012], [Zhang, et al. 2013].

Un rôle de l'Angptl8 dans l'adipogenèse a été montré : elle est plus exprimée dans les adipocytes matures que dans les préadipocytes, et le traitement avec un ARN interférant y atténue l'accumulation de lipides [Ren, et al. 2012].

L'Angptl8 est capable d'inhiber l'activité de la lipoprotéine lipase, d'où son autre nom Lipasine [Zhang and Abou-Samra 2013] et de façon logique, les souris Angptl8^{-/-} ont une activité

LPL plasmatique augmentée [Wang, et al. 2013]. Ces souris, qui n'expriment pas l'Angptl8, prennent moins de poids mais ne présentent pas de différence au niveau de la sensibilité à l'insuline par rapport aux souris wt. En condition nourrie et re-nourrie, leurs taux plasmatiques de TG et d'AGL sont diminués, mais le transport des lipides dans le tissu adipeux est limité. Cette étude a permis de montrer que l'Angptl8, en condition postprandiale, stimulerait le transport de lipides dans le tissu adipeux. La surexpression dans le foie de l'Angptl8, elle, améliore la tolérance au glucose des souris [Yi, et al. 2013]. Cette étude a pu dévoiler une particularité de cette hépatokine : son effet sur le pancréas. L'Angptl8 a un effet prolifératif sur les cellules β , d'où son nom bétatrophine, ce qui se traduit par l'augmentation du contenu en insuline des îlots de Langerhans.

Cette hépatokine semble donc être bénéfique pour le métabolisme énergétique, et pourrait être une piste thérapeutique aussi bien pour traiter le diabète de type I que de type II.

La follistatine

La follistatine est une glycoprotéine de la famille des TGF- β . Il existe 3 isoformes de cette hépatokine, la FS-288, la FS-300 et enfin la FS-315, obtenues par épissages alternatifs et clivages post traductionnels. Outre ses rôles dans le développement embryonnaire, son rôle le plus documenté est la croissance musculaire, via l'inhibition de la myostatine, un inhibiteur de croissance excessive du muscle [Lee, et al. 2001]. On sait depuis 1991 qu'elle est présente dans le foie, et un lien avec les pathologies hépatiques a été établi en 1996 lorsque des taux élevés ont été décrits chez des patients ayant une pathologie hépatique chronique [Sakamoto, et al. 1996]. La sécrétion de la follistatine par le foie est augmentée lors d'un exercice [Hansen, et al. 2011], ce qui montre l'existence d'un dialogue muscle-foie.

La follistatine a également été proposée comme adipokine en 2009 car elle est sécrétée par le tissu adipeux *in vitro*, cependant son expression est plus faible dans les adipocytes que dans la fraction stroma-vasculaire [Flanagan, et al. 2009]. Elle a un effet prolifératif sur les préadipocytes en inhibant la myostatine, ce qui en fait un acteur du métabolisme énergétique à part entière. Chez des patients diabétiques de type II, les taux circulants de follistatine sont corrélés à la glycémie à jeun, l'hémoglobine glyquée et le cholestérol, mais pas avec l'inflammation de bas grade [Hansen, et al. 2013]. Elle semble être régulée par une altération chronique du métabolisme glucidique car une hyperglycémie ou une hyperinsulinémie provoquée n'a pas d'effet [Hansen, et al. 2013].

On ne sait actuellement pas si les taux élevés de follistatine sont une cause ou une conséquence de l'apparition de dérégulations métaboliques. Tout comme RIFL, on ne sait pas à l'heure actuelle si les effets de cette hépatokine sont bénéfiques ou délétères pour le métabolisme énergétique.

Certaines hépatokines pouvant être des marqueurs du dysfonctionnement hépatique, de nombreux efforts ont été déployés ces dernières années pour identifier de nouvelles hépatokines, comprendre leur mode d'action et ainsi mieux définir l'implication du foie dans le développement de l'insulino-résistance et du diabète de type II.

Une étude parue cette année montre que la suppression de la signalisation du glucagon dans le foie induit une hypersensibilité à l'insuline, et une hyperplasie des cellules α , et cet effet est médié par un ou des facteurs sécrétés par le foie, non identifiés pour le moment [Longuet, et al. 2013]. De façon intéressante, la suppression de la signalisation insulinique dans le foie a aussi permis de mettre en évidence l'existence d'un ou plusieurs facteurs circulants sécrétés par le foie, agissant cette fois-ci sur l'hyperplasie des cellules β [El Ouaamari, et al. 2013]. Il ne reste plus qu'à identifier ces facteurs, qui agrandiront la famille en pleine expansion des hépatokines qui, en plus d'agir sur les organes sensibles à l'insuline, peuvent également agir directement sur le pancréas.

Tableau 1. Les hépatokines (page suivante)

Leurs effets, et la régulation de leur expression génique dans le foie (ARNm) et des taux circulants (entre crochets) avec l'obésité et la résistance à l'insuline, et les pathologies hépatiques. AG: acide gras, TLR4: Toll-Like Receptor 4, NAFLD: non alcoholic fatty liver disease, DTII: diabète de type II.

	Majoritairement hépatique ?	Effets / Mode d'action	Obésité/ Insulino-résistance	Pathologies hépatiques
Féтуine A	Oui	Inhibiteur du récepteur à l'insuline. Se lie aux AG puis au TLR4 des adipocytes →inflammation du tissu adipeux.	↗ [féтуine A], et corrélation avec HOMA-IR, IMC, tour de taille et [TG] (Homme).	↗ ARNm avec la stéatose (rats)
SepP (Sélénoprotéine P)	Oui	↘ de l'activation de l'AMPK sans modifier le ratio AMP/ATP (souris). In vitro : ↗ Ser-P-IRS-1 dans les hépatocytes et les myocytes.	↗ [SepP], et corrélation avec la glycémie à jeun. Inversement corrélée avec [adiponectine]. (Homme)	↗ [SepP] et corrélation avec NAFLD (Homme)
RBP4 (Retinol-Binding Protein 4)	Oui (et adipokine)	↗ lipogenèse <i>de novo</i> (HepG2)	↗ [RBP4] et ARNm chez les patients DTII. 3 SNP associés avec le DTII.	↗ ARNm avec la stéatose chez des obèses morbides. ↘ [RBP4] chez patients cirrhosés
Hépassocine	Oui	Surexpression dans le foie : ↗ lipogenèse <i>de novo</i> , [ALAT], [ASAT]. (souris)	?	↗[hépassocine] avec la stéatose
FGF-21 (Fibroblast Growth Factor 21)	Non	Foie : ↗ β-oxydation, ↘lipogenèse <i>de novo</i> . TA brun : ↗ thermogenèse. Tissu adipeux/Adipocytes : ↗ lipolyse, transport de glucose. (souris)	↗ [FGF-21] chez les patients obèses et les insulino-résistants.	[FGF-21] ↗ avec la stéatose
SHBG (Sex-Hormone Binding prot)	Oui	Se lie aux hormones sexuelles et module leur action.	[SHBG] élevé protège contre le DTII.	[SHBG] ↘ avec la stéatose (Homme)
IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1)	Oui	Active la voie Akt. Traitement chez sujets sains et DTII: ↘ glycémie ↗ sensibilité à l'insuline.	[IGFBP 1-2] inversement corrélés au risque de DTII, [IGFBP3] positivement.	[IGF-1] ↘ en condition de NAFLD (homme) [IGFBP3] ↗ chez NAFLD (Homme)
Angptl 6 (Angiopoietin Like protein 6)	Oui	Surexpression dans le foie (souris): ↗ dépense énergétique et sensibilité à l'insuline ; protection contre la stéatose.	↗ [Angptl6] chez les patients DTII.	?
Angptl 8 ou RIFL ou Lipasine	Oui	Particie à la réponse à la réalimentation ; Inhibe l'activité LPL ; Induit la prolifération des cellules β.	Homme : ? ↗ ARNm dans le foie de souris HFD et ob/ob.	Homme : ? Stéatose : ? ↗ expression dans les NAFLD plus avancées (homme, souris)
Follistatine	Non	Inhibe la myostatine, ↗ prolifération de préadipocytes.	[follistatine] corrélés avec la glycémie à jeun, l'HbA1c (Homme).	Stéatose : ? ↗ [follistatine] chez patients ayant une pathologie hépatique chronique

VI) La résistance à l'insuline dans les autres organes

La résistance à l'insuline ne touche pas que le foie : le tissu adipeux, les muscles squelettiques, mais aussi le pancréas et le cœur sont aussi touchés par cette pathologie. Cette partie résume les perturbations qui ont lieu dans les deux autres organes principalement impliqués dans le métabolisme : le tissu adipeux et le muscle squelettique.

1) Le tissu adipeux insulino-résistant

Le tissu adipeux blanc est le seul tissu ayant la capacité de se développer de façon excessive en fonction de l'apport de lipides. Ce tissu, outre son rôle de stockage des lipides, est indispensable au bon fonctionnement de l'organisme, notamment pour la production d'hormones stéroïdes, et pour les fonctions reproductrices [Bohler, et al. 2010].

Le tissu adipeux est constitué d'adipocytes en grande partie. En période post-prandiale, ils captent les lipides circulants grâce à des transporteurs membranaires comme FAT [Coburn, et al. 2000]. Ces acides gras provenant des lipoprotéines sont activés en acyl-coA et sont estérifiés pour former des TG. Les adipocytes peuvent aussi capter le glucose de façon dépendante de l'insuline, grâce aux transporteurs GLUT4. Lors d'un jeûne, la lipolyse permet la libération de ces lipides dans la circulation afin de fournir l'énergie dont l'organisme a besoin.

L'insuline étant la seule hormone anti-lipolytique, l'adipocyte insulino-résistant va relarguer des lipides et du glycérol dans la circulation de façon incontrôlée, ce qui contribue à l'hyperlipidémie. Il va également externaliser moins de transporteurs GLUT4 en réponse à l'insuline, ce qui va diminuer sa capacité à capter le glucose sanguin.

Si l'on considère une alimentation trop riche, les lipides apportés par chaque repas continueront d'être stockés dans le tissu adipeux tant qu'il peut s'étendre, que ce soit par hypertrophie ou par hyperplasie. L'hypothèse de l'expansion du tissu adipeux [Virtue, et al. 2008] laisse entendre que tant que le tissu adipeux peut stocker les graisses, on n'observera pas d'effet délétère sur la sensibilité à l'insuline générale. En revanche, lorsque le tissu adipeux arrive à "saturation", les lipides issus de sa lipolyse seront stockés de façon ectopique dans d'autres organes, non spécialisés dans le stockage de lipides. Ainsi on retrouvera des lipides dans les muscles, dans le foie, et même dans le pancréas. Ce phénomène de stockage ectopique est particulièrement délétère pour le fonctionnement de ces organes, car comme

détaillé plus haut, les espèces lipidiques dérivées de ces lipides peuvent induire une lipotoxicité, qui peut induire une insulino-résistance.

Les autres cellules du tissu adipeux font partie de la fraction stroma-vasculaire, qui est composée de préadipocytes, de cellules endothéliales, de cellules du système immunitaire (macrophages, lymphocytes T, natural killers, mastocytes), de fibroblastes et de fibres nerveuses. En condition de résistance à l'insuline, la proportion des cellules de la fraction stroma vasculaire peut être modifiée. Par exemple on observe souvent une inflammation du tissu adipeux en condition d'obésité et de résistance à l'insuline, résultant d'une infiltration du tissu adipeux par des cellules du système immunitaire. Le ratio de 5 à 10 macrophages pour 100 adipocytes en condition physiologique peut passer à 30 macrophages pour 100 adipocytes dans le tissu adipeux d'un obèse [Tordjman, "Physiologie et physiopathologie du tissu adipeux", Springer 2013]. Ce sont principalement des macrophages M1 proinflammatoires, ils sont particulièrement présents chez les sujets massivement obèses, et plus précisément dans le tissu adipeux profond [Aron-Wisnewsky, et al. 2009]. De même que dans le foie, un rôle de l'infiltration de macrophages dans le développement de l'insulino-résistance a été établi dans un modèle murin, le nombre de macrophages du tissu adipeux étant lié à l'homéostasie glucidique [Kanda, et al. 2006].

Ainsi, en condition d'obésité, la désorganisation du tissu adipeux peut être à l'origine de l'apparition de l'insulino-résistance. En plus de la modification de la population cellulaire du tissu adipeux, le phénotype des adipocytes change également, notamment leur sécrétome.

➤ Perturbation du sécrétome du tissu adipeux : les adipokines

Le tissu adipeux a la capacité de sécréter des facteurs circulants qui agissent sur le métabolisme. Lorsque ces facteurs sont produits et sécrétés par les adipocytes, on parle d'adipokines. Les adipokines exercent de nombreux effets sur les organes impliqués dans le métabolisme énergétique, ou directement sur le pancréas [Dunmore, et al. 2013], et des études utilisant des modèles animaux d'obésité et de résistance à l'insuline ont mis en évidence leur rôle bénéfique pour la signalisation insulinique ou, à l'inverse, leur implication dans l'installation de l'insulino-résistance [Falcao-Pires, et al. 2012].

La liste des adipokines identifiées s'allonge d'années en années et parmi les bénéfiques, on retrouve l'adiponectine, la leptine, la visfatine et l'apeline. D'autres adipokines sont délétères pour la sensibilité à l'insuline, comme la résistine, l'autotaxine, la MCP-1 (Macrophage Chemoattractant Protein-1), le TNF α , le PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1) ou des interleukines pro-inflammatoires comme l'IL-6 (Figure 13).

Dans le tissu adipeux d'une personne obèse et résistante à l'insuline, on observe une diminution de la sécrétion de l'adiponectine, proportionnellement à l'expansion de la masse grasse et à l'insulinémie [Arita, et al. 1999], [Hotta, et al. 2000]. Cette adipokine, lorsqu'elle se fixe à ses récepteurs, augmente le captage et l'oxydation du glucose, ainsi que la β -oxydation des lipides dans les muscles [Falcao-Pires, et al. 2012], et elle inhibe la néoglucogenèse hépatique [Yamauchi, et al. 2002]. Ces effets sont permis grâce à l'activation de l'AMPK et de PPAR α [Tishinsky, et al. 2012].

La leptine a pour rôle majeur la régulation de la prise alimentaire, son action sur l'hypothalamus ayant pour effet d'induire la sensation de satiété. Elle a aussi des effets sur le métabolisme, notamment en régulant la dépense énergétique : comme l'adiponectine, elle active l'AMPK dans le muscle [Minokoshi, et al. 2002]. En limitant directement le stockage ectopique des lipides, l'administration de leptine améliore la sensibilité à l'insuline d'animaux insulino-résistants [Shimabukuro, et al. 1997]. Sa concentration plasmatique est augmentée en condition d'obésité [Maffei, et al. 1995]. Son expression dans le tissu adipeux est proportionnelle à la masse grasse, et l'obésité est considérée comme un état de résistance centrale à la leptine [Hamilton, et al. 1995].

L'apeline, elle aussi, est plus exprimée en condition d'obésité et de résistance à l'insuline, mais contrairement à la leptine, elle conserve ses effets bénéfiques chez des animaux diabétiques, qui seront développés dans la 3^{ème} partie de l'introduction, ce qui exclut l'idée d'une résistance à l'apeline.

Le TNF α est l'exemple le plus marquant d'une adipokine délétère, pouvant induire une résistance à l'insuline [Hotamisligil, et al. 1993]. Dans le tissu adipeux, il est produit aussi bien par les adipocytes que par la fraction stroma vasculaire [Fain 2003]. Cette cytokine, avant d'être identifiée comme adipokine, a toujours été connue pour médier les processus inflammatoires, en se liant à son récepteur membranaire TNFR. La signalisation intracellulaire du TNF α fait

intervenir différentes Kinases comme les JNK, ce qui inhibe la signalisation de l'insuline. Le TNF α active également le facteur de transcription NF κ B qui peut moduler l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme énergétique. Les adipocytes, les myocytes et les hépatocytes expriment le récepteur au TNF α à leur surface, ce qui en fait des cibles de cette adipokine. De plus, la signalisation du TNF α dans l'adipocyte entraîne l'augmentation de l'expression de certaines adipokines délétères comme l'IL-6, MCP-1 [Wang, et al. 2005], et la diminution de l'expression d'adiponectine [Wang, et al. 2005], ce qui crée un cercle vicieux participant à la mise en place de la résistance à l'insuline.

Les taux de TNF α circulant de personnes obèses sont plus élevés que ceux de sujets minces, et il a été démontré que la neutralisation du TNF α avec un anticorps permet une meilleure réponse globale à l'insuline de rats fa/fa [Hotamisligil, et al. 1993]. Chez des souris ob/ob [Ventre, et al. 1997], la délétion du TNF α résulte en une insulino-résistance moins marquée, ce qui a confirmé son implication dans cette pathologie, mais montre que le TNF α n'est pas le seul facteur induisant une résistance à l'insuline.

L'augmentation de la production d'adipokines pro-inflammatoires par le tissu adipeux, associée à la diminution de la production ou de l'efficacité de certaines adipokines bénéfiques, constitue un cocktail délétère pour la signalisation insulinique dans les muscles, le foie mais aussi dans le tissu adipeux lui-même.

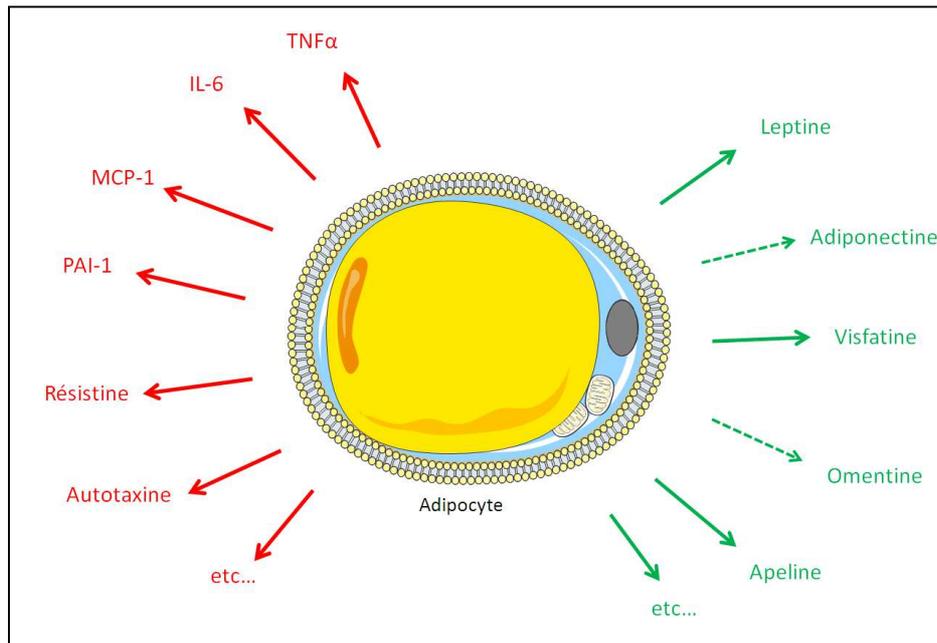


Figure 13. L'adipocyte, une cellule endocrine.

Les adipokines en vert sont bénéfiques pour le métabolisme, celles en rouge sont délétères et peuvent causer une résistance à l'insuline. Les flèches en pointillé représentent une diminution d'expression et/ou de la concentration plasmatique en condition d'insulino-résistance, et les flèches pleines, une augmentation.

2) Le muscle insulino-résistant

En condition physiologique, la majorité du glucose circulant après un repas est incorporée par les muscles squelettiques, sous l'action de l'insuline, grâce aux transporteurs GLUT4 (figure 1). Le muscle insulino-résistant ne va pas pouvoir l'incorporer correctement car les transporteurs GLUT4 ne sont pas suffisamment transloqués à la membrane plasmique [Zierath, et al. 1996], ce qui va ralentir le retour à la glycémie basale. De plus, le transporteur d'acide gras FAT est présent en plus grande quantité à la surface des cellules musculaires de rats résistants à l'insuline [Han, et al. 2007], ce qui favorise le stockage ectopique de lipides.

Les lipides arrivant en excès de la circulation sont pris en charge par les mitochondries, ou stockés sous forme de TG dans le muscle. Cependant, bien que chez les individus sédentaires, les TG intramusculaires (TGIM) soient corrélés à la résistance à l'insuline [Goodpaster, et al. 2001], le paradoxe de l'athlète, chez qui les TGIM sont corrélés avec la sensibilité à l'insuline, a permis de mettre en évidence que ce ne sont pas les TGIM qui sont délétères, mais les espèces lipidiques intermédiaires. En condition d'obésité et de résistance à l'insuline, les mitochondries se retrouvent surchargées en lipides, et si la β -oxydation

musculaire est augmentée dans un premier temps avec l'obésité, en condition de pré-diabète ou de diabète avéré, la capacité oxydative du muscle est diminuée [Schrauwen-Hinderling, et al. 2007], [Phielix, et al. 2008]. Cette baisse d'activité oxydative peut s'expliquer par la diminution du nombre et de la taille des mitochondries observée chez des patients diabétiques [Morino, et al. 2005], [Mogensen, et al. 2007], [Phielix, et al. 2008], [Kelley, et al. 1999], [Simoneau, et al. 1999], [Kim, et al. 2000], [Petersen, et al. 2004], [Ritov, et al. 2005]; [Kelley, et al. 2002], ainsi que par un dysfonctionnement mitochondrial. L'arrivée de lipides en excès de la circulation et la dysfonction mitochondriale mènent à une augmentation des DAG et à une oxydation incomplète des lipides, qui génèrera des espèces lipidiques intermédiaires comme les acylCN, délétères pour la signalisation insulinique [Adams, et al. 2004], [Koves, et al. 2008]. En effet, dans le muscle, les DAG activent la PKC θ [Samuel, et al. 2010]. Les DAG peuvent provenir d'une lipolyse incomplète des TG, et l'étude de Badin et al montre que l'augmentation de l'expression de CGI-G8 et la diminution de l'expression de l'ATGL dans le muscle de souris nourries avec un régime riche en lipides mène à l'accumulation de DAG et à une résistance à l'insuline globale et dans le muscle [Badin, et al. 2013]. La concentration intracellulaire de céramides est aussi augmentée dans le muscle de patients obèses et résistants à l'insuline et de nombreux modèles animaux d'insulino-résistance [Holland and Summers 2008]. Les acylCN, également augmentés lorsque la mitochondrie est surchargée, jouent un rôle dans l'apparition de la résistance à l'insuline dans le muscle [Muoio, et al. 2010].

Il est aussi possible qu'une dysfonction mitochondriale préexistante constitue un risque de développer une résistance à l'insuline, comme cela a été montré par une étude évaluant la dysfonction mitochondriale dans le muscle de sujets ayant des parents diabétiques [Petersen, et al. 2004].

Le stress oxydant résultant de la dysfonction mitochondriale peut aussi participer à la mise en place de l'insulino-résistance dans le muscle, en détériorant le signal insulinique, à plusieurs niveaux : sur la phosphorylation d'IRS-1 sur un résidu sérine, mais aussi plus en aval de la signalisation, comme la PI3K et la PKC ζ [Bloch-Damti, et al. 2005]. Une étude menée sur des rats nourris avec un régime hyperlipidique n'a pas montré d'augmentation du stress oxydant dans le muscle, mais une augmentation d'UCP3 dans le muscle [Catala-Niell, et al. 2008], ce qui peut être considéré comme une adaptation de l'organisme à l'excès de lipides apportés par le régime, dans un premier temps, avant que la mitochondrie ne dysfonctionne. L'effet bénéfique d'une surexpression d'UCP3 a été confirmé par la suite dans un modèle de

souris transgéniques surexprimant UCP3 spécifiquement dans le muscle, chez qui la production de ROS [Nabben, et al. 2008] et d'acylCN est diminuée, via une diminution de la β -oxydation incomplète [Aguer, et al. 2013].

VII) Effets des traitements antidiabétiques sur le métabolisme hépatique

Une étude mesurant la graisse viscérale et intra-hépatique, par IRM et par spectroscopie par résonance magnétique, de patients obèses et intolérants au glucose, a montré que la stéatose est un facteur qui est plus fortement associé aux complications métaboliques de l'obésité que la graisse viscérale [Fabbrini, et al. 2009]. Il est donc important de savoir quels sont les effets des antidiabétiques sur la graisse hépatique, mais aussi sur le métabolisme glucidique hépatique.

Etant donné qu'aucun traitement contre la stéatose n'existe, les seules options thérapeutiques actuelles sont le changement de mode de vie, ou la prescription de traitements contre l'insulino-résistance. C'est pourquoi il est crucial d'évaluer leurs effets sur le foie.

Certains traitements antidiabétiques, comme les sulfonylurées et les glinides, qui induisent la sécrétion d'insuline par le blocage des canaux potassiques ATP-dépendant des cellules β , ou les agonistes de GPR40 et GPR119 (G-protein coupled Fatty Acid Receptor), qui l'induisent en agissant sur les cellules β et en augmentant la sécrétion de GLP-1 (Glucagon-like peptide 1), n'ont aucun effet rapporté sur le métabolisme hépatique, utilisés en monothérapie.

D'autres traitements qui ont pour effet l'amélioration de la sensibilité à l'insuline, peuvent améliorer la stéatose, et d'autres agissent directement sur le foie pour diminuer la glycémie.

➤ La Metformine

La Metformine (1,1-diméthylbiguanide) est un agent normoglycémiant, c'est le traitement antidiabétique le plus largement prescrit depuis les années 50. En plus d'améliorer le transport de glucose et l'oxydation des lipides dans les muscles, d'inhiber la lipolyse dans le tissu adipeux et la lipogénèse dans le tissu adipeux et les muscles, elle a un fort impact sur le

foie : elle inhibe la néoglucogenèse et la glycogénolyse. Après son entrée dans la cellule, le ratio ATP/AMP est diminué, ce qui résulte en l'inhibition de la néoglucogenèse, qui est un processus énergivore. Ensuite, l'activation de LKB1 (liver kinase B1) mène à l'activation de l'AMPK [Shaw, et al. 2005], qui va inhiber l'expression de gènes impliqués dans la néoglucogenèse, dont celui de la PEPCCK et de la G-6-Pase [Kim, et al. 2008].

L'activation de l'AMPK par la Metformine induit l'inactivation d'ACC dans le foie de rat *in vivo*, une augmentation de la β -oxydation hépatique et une inhibition de l'expression de SREBP-1c ainsi que de sa translocation dans le noyau, dont il résulte une diminution de la stéatose hépatique [Zhou, et al. 2001]. Le traitement de souris ob/ob par la Metformine a un effet net sur l'accumulation de gras, sur les anomalies des aminotransférases, et sur la production de TNF α [Lin, et al. 2000]. Le traitement de souris nourries avec un régime gras a pour effet de diminuer la taille des vacuoles lipidiques dans les hépatocytes, d'augmenter le nombre de mitochondries, d'augmenter le nombre de noyaux PPAR α -positifs et de diminuer la quantité de SREBP-1c dans le foie [Souza-Mello, et al. 2010]. La Metformine peut également réduire l'expression et la production de marqueurs de fibrose hépatique [Kita, et al. 2012], elle pourrait donc ralentir la progression de la stéatose vers la NASH.

Tous ces effets de la Metformine sur le foie semblaient donc être le résultat de l'activation de l'AMPK, mais ce mécanisme d'action unique a été remis en cause par l'étude de Foretz et al, qui montre que les souris invalidées pour l'AMPK répondent quand même à la Metformine [Foretz, et al. 2010], suggérant l'existence d'un ou de plusieurs intermédiaires indépendants de l'AMPK. Effectivement, trois ans plus tard, les mêmes auteurs ont montré qu'un traitement à la Metformine inhibe la signalisation du glucagon en diminuant les taux d'AMPc dans les hépatocytes primaires de souris, provoquant une moindre production de glucose [Miller, et al. 2013]. Ainsi la Metformine joue au minimum sur deux fronts pour réguler la production endogène de glucose. La Metformine est aujourd'hui la meilleure stratégie clinique dans le traitement des NAFLD [Mazza, et al. 2012] étant donné ses effets métaboliques et les rares effets secondaires reportés.

➤ Les thiazolidinediones (TZD)

Les glitazones, ou TZD, sont des agonistes sélectifs de PPAR γ qui améliorent la sensibilité à l'insuline. Ils ont pour effet, en promouvant l'adipogenèse, d'augmenter la capacité de stockage du tissu adipeux sous-cutané principalement, ce qui se traduit par une redistribution

des acides gras du tissu adipeux viscéral vers le sous-cutané. Le tissu adipeux sous-cutané relargue moins d'acides gras dans la circulation, et sécrète plus d'adiponectine [Phielix, et al. 2011]. Au niveau du foie, ils inhibent la néoglucogenèse hépatique de patients diabétiques [Gastaldelli, et al. 2006a], [Gastaldelli, et al. 2006b] et, chez le rat, cela est la conséquence de l'activation de l'AMPK [LeBrasseur, et al. 2006]. Les TZD ont aussi un effet bénéfique sur les transaminases plasmatiques, la stéatose, le phénomène de ballooning, la sensibilité à l'insuline et l'inflammation du foie dans de nombreuses études cliniques [Ratziu, et al. 2008], [Ratziu, et al. 2010], [Sanyal, et al. 2004], [Belfort, et al. 2006], [Jonker, et al. 2010] et sur la fibrose hépatique [Mahady, et al. 2011]. Les effets bénéfiques des TZD sur la stéatose ne passeraient donc pas par l'activation hépatique de PPAR γ mais plutôt par leur action de sensibilisation à l'insuline du tissu adipeux. Cette idée est renforcée par le fait qu'un traitement à la Rosiglitazone agit de la même façon chez les souris dont PPAR γ a été invalidé spécifiquement dans le foie [Gavrilova, et al. 2003].

La Troglitazone et la Rosiglitazone ont été retirées du marché en 2000 et en 2010 car elles augmentaient respectivement les risques d'insuffisance hépatique mortelle, et d'infarctus du myocarde. La Pioglitazone a elle aussi été retirée du marché en 2011, car elle augmente le risque de développer un cancer de la vessie [Kermode-Scott 2012]. Bien que ces traitements ne soient plus disponibles pour traiter le diabète de type II, ils ont permis de comprendre le mécanisme par lequel la prise de masse adipeuse n'est pas forcément une menace pour la sensibilité à l'insuline.

➤ Les inhibiteurs des alphaglucosidases intestinales

Les inhibiteurs des alphaglucosidases intestinales, comme l'acarbose, agissent sur la sphère digestive pour limiter l'absorption des glucides. En résulte une diminution de la glycémie post-prandiale et à jeun, et de l'hémoglobine glyquée [Kihara, et al. 1997]. Leur effet sur la stéatose n'a pas été documenté lors des études cliniques, mais des études animales rapportent une moindre accumulation de lipides hépatiques lorsque l'acarbose est ajouté à l'alimentation de rats obèses [Inui, et al. 1990], [Lieber, et al. 2004].

➤ Les inhibiteurs de la dipeptidyl-peptidase (DPP-4)

Les gliptines sont des inhibiteurs de la dipeptidyl-peptidase 4 (DPP-4), l'enzyme responsable de la dégradation du GLP-1. Le GLP-1 est produit par les cellules L de l'intestin en

condition post-prandiale et, en tant qu'incrétine, il est capable de stimuler la sécrétion d'insuline. Il peut aussi inhiber la sécrétion de glucagon, de façon directe via son récepteur à la surface des cellules α , mais aussi de façon indirecte par l'action de l'insuline ou de la somatostatine sur les cellules α [Holst 2007]. Les gliptines permettent d'allonger la durée de vie du GLP1, et ont un effet anorexigène, ce qui entraîne une perte de poids. Ils sont bénéfiques pour le métabolisme du foie insulino-résistant : la Vildagliptine diminue la production hépatique de glucose chez l'Homme [Balas, et al. 2007], ce qui peut être expliqué par la diminution du glucagon plasmatique, et le traitement à la Linagliptine de souris obèses et insulino-résistantes réduit la stéatose de moitié [Kern, et al. 2012]. Ces agents ayant été mis sur le marché il y a une dizaine d'années, il est difficile d'apprécier le rapport bénéfices/effets indésirables, par manque de recul suffisant sur ces agents inhibiteurs de la DPP-4.

➤ Les agonistes doubles de PPARs

L'agonisme de PPAR γ permet la sensibilisation à l'insuline mais, comme décrit plus tôt, entraîne une prise de masse grasse. L'agonisme de PPAR α , par les fibrates par exemple, permet une baisse de l'hypertriglycéridémie, en promouvant la β -oxydation des acides gras dans les muscles et dans le foie de rongeurs [Fievet, et al. 2006]. PPAR δ est aussi impliqué dans la fonction mitochondriale et la β -oxydation, et régule le métabolisme glucidique [Lee, et al. 2006a]. C'est pourquoi des agonistes agissant sur plusieurs PPARs à la fois ont été développés.

Les agonistes de PPAR α/γ

Les études cliniques montrent que ces doubles agonistes entraînent une amélioration de la sensibilité à l'insuline, une diminution de l'hémoglobine glyquée, et de la triglycéridémie de patients insulino-résistants [Fievet, et al. 2006]. L'un de ces agonistes, le Ragaglitazar, a pour effet de diminuer la production hépatique de glucose et la stéatose chez des rats nourris avec un régime hyperlipidique [Ye, et al. 2003]. Le fait d'activer ces deux récepteurs nucléaires est bénéfique car si l'activation de PPAR γ entraîne une prise de poids, une activation concomitante de PPAR α peut l'empêcher [Carmona, et al. 2005]. Cependant, les études cliniques rapportent une légère prise de poids et de nombreux effets secondaires indésirables ont été observés (augmentation du risque cardiovasculaire, insuffisance rénale, leucopénie,...).

Les agonistes de PPAR α /PPAR δ

Une étude clinique rapporte une réduction de la triglycéridémie, de l'HOMA-IR, et de la glycémie à jeun après 35 jours de traitement au GFT505 de patients dyslipidémiques et pré-diabétiques, sans effets secondaires [Cariou, et al. 2011]. Une autre rapporte une amélioration de la sensibilité à l'insuline générale et hépatique après 8 semaines de traitement au GFT505 [Cariou, et al. 2013], et une étude animale confirme son effet bénéfique sur le foie, où la stéatose est diminuée chez des souris sous régime déficient en méthionine et choline [Staels, et al. 2013].

➤ Les inhibiteurs du transporteur de glucose SGLT2

La réabsorption du glucose par les reins est permise principalement par le transporteur SGLT2 (Sodium/Glucose Transporteur 2), dont l'inhibition induit l'élimination du glucose dans les urines, entraînant une diminution de la glycémie, sans risquer l'hypoglycémie [Nagata, et al. 2013]. Lorsque des animaux sont soumis à une infusion de Tofogliflozine ou de Phlorizine en condition euglycémique, leur production endogène de glucose est augmentée, ce qui s'explique par le fait que, le glucose étant éliminé dans les urines, le foie prend le relais pour conserver une glycémie constante, sans pour autant induire une hyperglycémie.

Les possibilités de traitement du diabète de type II sont très variées et, régulièrement, de nouvelles stratégies voient le jour, mais se retrouvent parfois stoppées en plein élan, du fait de fréquents effets secondaires indésirables. L'utilisation d'adipokines bénéfiques a été proposée, promettant peu d'effets secondaires, mais les essais cliniques de traitement à la leptine ou à l'adiponectine se sont révélés être des échecs. Aujourd'hui, une attention particulière est portée sur l'apeline, dont les effets sur le métabolisme énergétique seront développés dans la prochaine partie.

Les acides gras polyinsaturés de la famille des oméga-3 (ω 3) sont eux aussi au centre de l'attention depuis de nombreuses années : contrairement aux acides gras saturés, leurs effets sur le métabolisme énergétique sont bénéfiques dans de nombreux modèles animaux d'obésité et de résistance à l'insuline, et plus particulièrement l'EPA, dont les effets sur le métabolisme énergétique et sur les adipokines seront développés dans la dernière partie de cette introduction.

Chapitre III

Le système Apeline/APJ : Une cible intéressante dans le traitement de l'insulino-résistance

I) Description de l'apeline et de son récepteur APJ.

1) Le récepteur APJ

Le gène codant pour APJ est localisé chez l'Homme sur la bande q12 du chromosome 11, et il possède un exon unique [Kleinz, et al. 2005b]. Lorsqu'il est décrit pour la première fois en 1993 par O'Dowd et ses collaborateurs [O'Dowd, et al. 1993], c'est un récepteur orphelin et il faudra attendre 5 ans pour que son ligand soit découvert.

C'est un récepteur de type RCPG de 380 acides aminés qui présente une homologie globale de 30% avec AT1, le récepteur de type 1 à l'angiotensine II (AngII), et de 40 à 50% dans ses régions transmembranaires [O'Dowd, et al. 1993]. C'est pourquoi, avant la découverte de l'apeline, il était identifié par ses autres noms, "AG11 orphan receptor" ou "AGTRL1" (Angiotensine II receptor-like 1). Cependant l'AngII, membre du système rénine-angiotensine, ne l'active pas [Castan-Laurell, et al. 2012], et l'apeline n'active pas le récepteur AT1. De plus, l'activation de ces deux récepteurs engendre des réponses biologiques opposées [Barnes, et al. 2010].

En revanche, au cours de ces dernières années, les données se sont accumulées en faveur d'une inter-régulation entre les systèmes rénine-angiotensine et apeline/APJ. Tout d'abord, *in vivo*, l'apeline peut bloquer les effets de l'AngII sur la pression artérielle de souris [Chun, et al. 2008]. L'infusion d'AngII pendant 24h peut diminuer l'expression cardiaque de l'apeline chez le rat [Iwanaga, et al. 2006], et chez des rats hypertendus, l'inhibition d'AT1 augmente l'expression cardiaque d'apeline et d'APJ [Iwanaga, et al. 2006], [Zhong, et al. 2005]. *In vitro*, les récepteurs APJ et AT1 sont capables de former des hétérodimères, suite à la liaison de l'AngII à AT1, ce qui suggère que l'AngII, en se liant à son récepteur, peut modifier la conformation d'APJ et sa disponibilité pour l'apeline [Chun, et al. 2008]. Plus récemment, il a été démontré que la liaison de l'apeline à APJ peut également induire cette dimérisation, ce qui diminue l'affinité de l'AngII pour son récepteur par une inhibition allostérique d'AT1 [Siddiquee,

et al. 2013]. Celà pourrait expliquer l'antagonisme mutuel des systèmes rénine-angiotensine et apeline/APJ chez l'animal, mais cette hypothèse est à considérer avec précaution, cette dimérisation ayant été observée seulement *in vitro*.

La séquence en acides aminés d'APJ a été conservée au cours de l'évolution : le récepteur humain possède 89% d'homologie avec celui du rat et 91% avec celui de la souris [Pitkin, et al. 2010].

Sa distribution est généralisée : chez l'Homme, on retrouve APJ au niveau du système central, notamment dans l'hypothalamus [Lee, et al. 2000] et dans de nombreux organes périphériques, dont les poumons, le cœur, le tissu adipeux et le placenta [Habata, et al. 1999]. Chez la souris, APJ (ARNm et protéine) est également présent dans le cerveau, les poumons, le cœur, les reins, l'intestin, les ovaires et l'utérus [Pope, et al. 2012]. Bien que majoritairement localisé dans la membrane plasmique, APJ a déjà été localisé dans le noyau de cellules de l'hypothalamus [Lee, et al. 2004], ce qui suggère qu'il pourrait moduler l'expression génique des cellules.

2) L'apeline

En 1998, à la recherche d'un ligand pour APJ, Tatemoto et ses collaborateurs ont utilisé leur stratégie d'identification de ligands de récepteurs orphelins. Elle consiste à traiter des cellules en culture, exprimant le récepteur orphelin, avec des extraits de divers organes bovins et porcins (cerveau, intestin, estomac), et d'identifier les composés capables d'activer ce récepteur. Ils ont donc mesuré l'acidification du milieu de cellules CHO surexprimant APJ. L'extrait d'estomac bovin ayant été le plus efficace, après la purification du peptide responsable de cette acidification, l'apeline a pu être identifiée [Tatemoto, et al. 1998], et nommée en rapport avec son récepteur : APJ Endogenous Ligand.

➤ Distribution de l'apeline

Le gène de l'apeline est localisé sur le chromosome humain X, en position Xq25.26.1 [Lee, et al. 2000], et comporte 3 exons. La séquence peptidique de l'apeline a elle aussi été extrêmement bien conservée, les 23 derniers acides aminés étant identiques chez l'Homme, le bovin, le rat et la souris [Habata, et al. 1999]. Les 12 derniers acides aminés sont identiques à

ceux de l'apeline du poulet, du xénope et du poisson-zèbre [Moon, et al. 2007], et c'est cette partie qui se fixe sur le récepteur APJ.

L'apeline est un peptide exprimé dans quasiment tous les organes. Chez l'Homme, son ARN messager est très présent dans le système nerveux central, et on le retrouve également en périphérie dans les poumons, le cœur, le tissu adipeux, le pancréas, le duodénum, le colon, le placenta, les reins et les testicules. Que ce soit chez l'Homme, le rat ou la souris, l'apeline est fréquemment exprimée dans les organes qui expriment aussi APJ [Kleinz, et al. 2005a].

➤ Maturation de l'apeline

L'expression du gène *Ap/n* produit la pré-pro-apeline, un peptide de 77 acides aminés. Des endopeptidases clivent ce précurseur en pro-apeline, comportant 55 acides aminés. Cette pro-apeline, après une succession de clivages enzymatiques dans la partie C-terminale du peptide, génère plusieurs formes actives d'apeline, dont l'apeline 36, l'apeline 17, l'apeline 13, et l'apeline 13 pyroglutaminée (pyr-Ape13) [Tatemoto, et al. 1998] (Figure 14).

L'ajout du résidu glutamate à l'extrémité de la pyr-Ape13 lui apporte une plus grande stabilité [Kleinz and Davenport 2005a] en lui permettant de retarder la dégradation enzymatique que les autres formes subissent rapidement, la demi-vie de l'apeline 36 étant estimée à moins de cinq minutes [Japp, et al. 2010]. D'un point de vue évolutif, l'existence de ce processus post-traductionnel de protection suggère que l'apeline 13 est essentielle à l'organisme [Kleinz and Davenport 2005a].

La partie N-terminale de l'apeline est donc variable selon la forme d'apeline considérée. Des études *in vitro* ont montré que l'interaction entre l'apeline et APJ n'entraînera pas les mêmes effets selon la forme d'apeline utilisée. Les formes d'apeline 36, 17 et 13 entraînent toutes les trois l'internalisation d'APJ [Lee, et al. 2010], [El Messari, et al. 2004], mais son recyclage à la membrane plasmique dépend de la forme d'apeline liée : lorsqu'il est lié à l'apeline 13, il est rapidement recyclé, alors qu'avec l'apeline 36, il est séquestré dans la cellule [Lee, et al. 2010]. Ce phénomène peut faire penser à un mécanisme de désensibilisation, comme c'est le cas pour le récepteur à l'insuline.

Les différentes formes actives de l'apeline ont été étudiées aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, et ont chacune leur propre efficacité, selon la réponse biologique considérée. De façon intéressante, une étude comparant plusieurs formes d'apeline, dont l'apeline 17, a montré que les formes les plus actives sur la pression artérielle de rat sont celles qui sont les plus efficaces

pour induire une internalisation d'APJ *in vitro*, ce qui suggère que l'action de l'apeline peut dépendre de sa faculté à internaliser son récepteur, et non pas seulement à engendrer un signal intracellulaire [El Messari, et al. 2004]. Toutes les formes n'ayant pas été testées pour toutes ces études, il est impossible de définir la forme la plus efficace, mais il en ressort que la forme apeline 13 est la plus vasoactive, et que, de façon générale, les formes courtes sont les plus actives sur la sphère cardiovasculaire [Ladeiras-Lopes, et al. 2008].

Ces différentes formes sont présentes en proportions variables, selon les organes qui l'expriment : par un dosage ELISA, il a été montré que l'apeline 36 est la forme prédominante dans les poumons, les testicules et l'utérus de rat [Kawamata, et al. 2001], en accord avec la distribution de son ARN messenger ; et par HPLC, il a été montré que chez l'Homme, le cœur contient plus de pyr-Ape-13 que d'autres formes d'apeline [Maguire, et al. 2009].

Dans le plasma, lorsque les niveaux d'apeline sont détectables par les méthodes utilisées, de type ELISA ou HPLC, on retrouve surtout l'apeline 17 et, sans surprise, la pyr-Ape-13, chez l'Homme comme chez le rat [Azizi, et al. 2008], [Miettinen, et al. 2007], [De Mota, et al. 2004].

L'apeline est aussi retrouvée dans le lait bovin et humain [Aydin 2010], [Aydin 2013], et une technique couplant chromatographie et spectrométrie de masse a permis de révéler la présence de 46 formes d'apeline dans le colostrum et le lait de bovin, possédant de 12 à 55 acides aminés [Mesmin, et al. 2011], ce qui signifie que la pré-pro-apeline comporte de nombreux sites de clivages. Des endopeptidases contenues dans le lait, comme les protéases à sérine ciblant les arginines ou les lysines, les métalloendopeptidases et les aminopeptidases, peuvent être à l'origine de toutes ces formes d'apeline identifiées. Bien que cette technique apporte une précision quant à la quantité de formes d'apeline présentes dans les liquides biologiques, elle n'a pas permis de doser l'apeline dans le plasma humain. Ce n'est que tout récemment que Zhen et al ont réussi à mesurer les différentes formes d'apeline présentes dans le plasma humain, par la même technique, améliorée en diminuant le pH du plasma avant l'analyse afin de limiter la protéolyse [Zhen, et al. 2013]. Cette étude a confirmé d'une part que la pyr-Ape-13 est la forme prédominante dans le plasma humain, et d'autre part que les méthodes discriminant des différentes formes d'apeline donnent des valeurs de concentrations plasmatiques toujours inférieures à celles obtenues avec les dosages de type ELISA, qui, eux, dosent toutes les formes d'apeline présentes.

L'ACE2 (Angiotensin Converting Enzyme 2) est une carboxypeptidase capable de cliver la phénylalanine située à l'extrémité C-terminale de l'apeline [Vickers, et al. 2002]. Cette phénylalanine semble essentielle à l'apeline pour ses effets médiés par APJ, car une substitution par une alanine, abroge ses effets sur des cellules CHO [De Mota, et al. 2000] et ses effets hypotenseurs chez le rat et agit comme un antagoniste d'APJ *in vivo* [Lee, et al. 2005]. Cependant, cette forme mutée, appelée F13A (une apeline 13 dont la phénylalanine en position C-terminale a été remplacée par une alanine), ou d'autres formes d'apeline où ce résidu n'est pas présent, ne sont pas toujours inertes [Medhurst, et al. 2003], [El Messari, et al. 2004], et le F13A a parfois été décrit comme agoniste *in vitro* [Fan, et al. 2003], il est donc important de comprendre ces divergences.

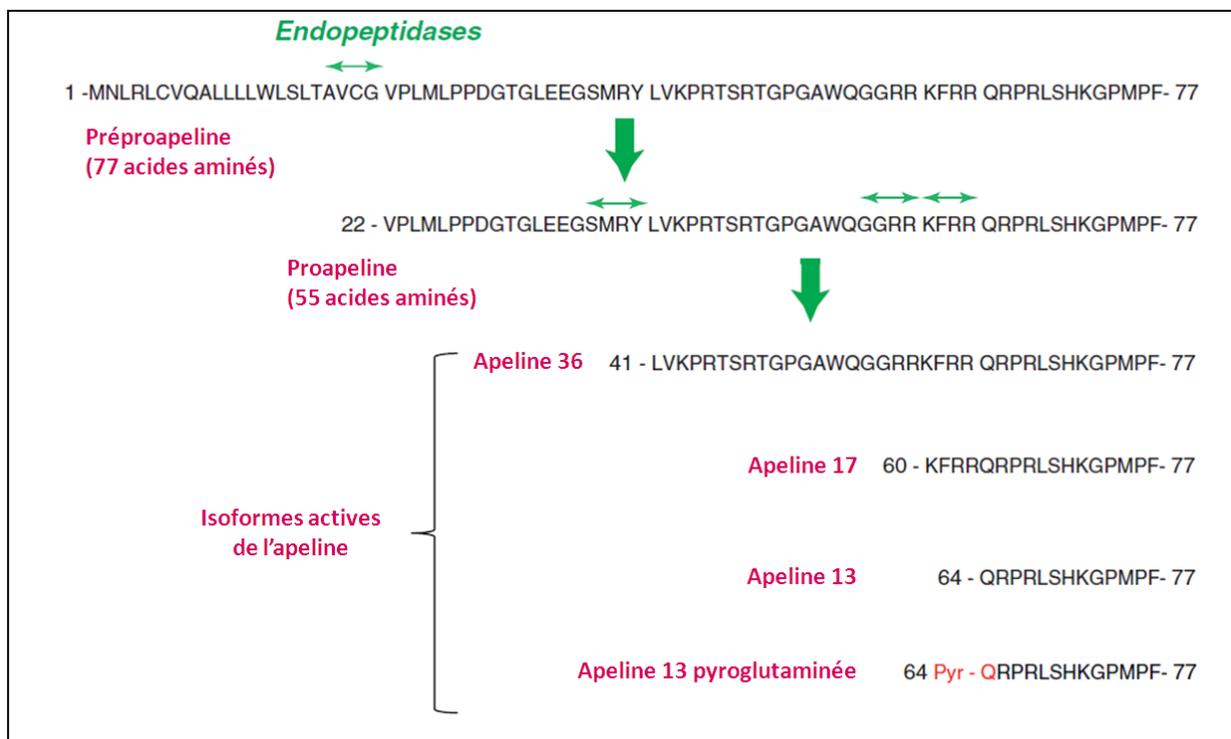


Figure 14. Maturation de l'apeline.

La préproapeline est clivée en proapeline par des endopeptidases (flèches vertes), préférentiellement sur des sites riches en acides aminés basiques. La proapeline est ensuite clivée en diverses formes biologiquement actives telles que l'apeline 36, l'apeline 17, l'apeline 13 et l'apeline 13 pyroglutaminée.

3) Les voies de signalisation activées par l'apeline

➤ Protéines G impliquées dans les effets de l'apeline

APJ est un RCPG, et il peut être lié à diverses protéines G. La diminution des taux intracellulaires d'AMPc entraînée par la liaison de l'apeline à APJ dans les CHO surexprimant APJ, et le fait que certains effets de l'apeline sont inhibés par la toxine pertussique [Hosoya, et al. 2000], [Masri, et al. 2002], [Yue, et al.], montrent l'implication de protéines Gi.

La modélisation tridimensionnelle d'APJ prédit une forte affinité pour la protéine Gq [Sgourakis, et al. 2005] et effectivement, l'inhibition d'acteurs de la signalisation de cette protéine G, comme la PLC, la PKC, ou les transporteurs sarcolemmaux Na^+/H^+ et Na^+/Ca^+ , abroge les effets contractiles de l'apeline sur le cœur isolé de rat [Szokodi, et al. 2002].

➤ Voies de signalisation

Les voies PI3K/Akt et ERK peuvent être impliquées dans les effets de l'apeline, comme cela a été montré dans un modèle de cellules endothéliales HUVEC, dans lequel l'apeline active la kinase P70S6K via ces deux voies [Masri, et al. 2004]. Cette voie de signalisation a été observée dans les cardiomyocytes [D'Aniello, et al. 2009], les neurones [O'Donnell, et al. 2007], et les cellules musculaires lisses vasculaires [Cui, et al.].

La NO Synthase endothéliale (eNOS) est elle aussi activée par l'apeline dans la sphère cardiovasculaire et métabolique [Tatemoto, et al. 2001], [Hashimoto, et al. 2007], [Dray, et al. 2008]. Son implication sera détaillée dans les parties II.1 et II.4.B et de ce chapitre.

Notre équipe a pu mettre en évidence que l'apeline, comme l'adiponectine et l'adrénaline [Xu, et al. 2011], est capable d'induire la phosphorylation de l'AMPK, un acteur clé dans la régulation du métabolisme énergétique [Dray, et al. 2008], [Attane, et al. 2011].

Récemment, une nouvelle voie de signalisation d'APJ a été mise en évidence. L'activation d'APJ mène à une augmentation de l'activation de MEF-2 (Myocyte Enhancer Factor 2) dans des cellules endothéliales HUVEC [Kang, et al. 2013]. Cette activation est indépendante de Gq et Gi, mais dépendante de $G\alpha_{13}$, qui est pour la première fois associée à

des effets de l'apeline. Il n'a cependant pas été déterminé si cet effet est dépendant de la liaison de l'apeline à APJ [Loot, et al. 2013].

II) Rôles du système Apeline/APJ dans la physiopathologie

L'apeline exerce des effets variés dans de nombreux organes, cette partie résume les effets connus sur la sphère cardiovasculaire, centrale, gastro-intestinale et métabolique.

1) Rôle du système Apeline/APJ dans la sphère cardiovasculaire

L'apeline joue un rôle dans la régulation de la pression artérielle et de la vasomotricité. Une injection intraveineuse d'apeline 13 diminue la pression artérielle chez des rats sains [Tatemoto, et al. 2001]. Cet effet hypotenseur est le résultat de l'activation de l'eNOS dans les cellules endothéliales. Le NO produit dans ces cellules diffuse dans les cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins et active la guanylyl cyclase, qui produit du GMPc. Cela entraîne une relaxation des cellules musculaires lisses, et donc une vasodilatation [Tatemoto, et al. 2001], [Ishida, et al. 2004]. Par contre, en se liant à APJ sur les cellules musculaires lisses, l'apeline a l'effet inverse : l'activation de la protéine Gi induit une vasoconstriction [Hashimoto, et al. 2006]. Cependant, l'effet de l'apeline sur les cellules endothéliales est prépondérant sur ce dernier lorsque l'endothélium est fonctionnel [Kleinz and Davenport 2005a].

L'apeline est à ce jour le plus puissant inotrope identifié *in vitro* et *in vivo* chez le rat [Szokodi, et al. 2002]. En activant la protéine Gq des cardiomyocytes, l'apeline induit l'activation de la PLC. Elle va produire des DAG et des IP₃, qui induisent l'augmentation du calcium intracellulaire permettant la contraction musculaire. Chez l'Homme, les taux d'apeline sont plus élevés chez les patients insuffisants cardiaques, et s'effondrent dans les stades tardifs de l'insuffisance cardiaque [Japp, et al. 2008b]. De façon intéressante, des études cliniques ont montré que l'amélioration de la fonction cardiaque est accompagnée d'une ré-augmentation des taux d'apeline [Francia, et al. 2007], [Chen, et al. 2003]. Ces dernières années, une équipe écossaise a pu mesurer les effets de l'apeline sur le système cardiovasculaire de sujets sains et atteints d'insuffisance cardiaque. Lorsqu'elle est injectée dans la veine de l'avant-bras de patients sains, l'apeline provoque une vasodilatation, qui est bloquée par un inhibiteur de la eNOS [Japp, et al. 2008a]. Lorsqu'elle est injectée en intra-coronaire, elle induit une augmentation du débit coronaire ; et une injection systémique augmente l'index cardiaque et

diminue la pression artérielle moyenne, la résistance vasculaire, et augmente la fréquence cardiaque. Hormis l'effet sur la fréquence cardiaque, tous ces effets sont conservés chez les insuffisants cardiaques, cela montre que l'agonisme d'APJ a un possible intérêt thérapeutique dans ces pathologies [Japp, et al. 2010].

L'apeline est capable d'induire la prolifération cellulaire dans plusieurs modèles de cellules endothéliales [Masri, et al. 2004], [Kasai, et al. 2004], [Cox, et al. 2006], et son fort pouvoir angiogénique est rendu possible grâce à la stimulation de la voie ERK [Masri, et al. 2004]. Lors de l'angiogenèse, APJ est fortement exprimé lors de la formation des vaisseaux, et son expression diminue lorsque la vasculature se stabilise [Saint-Geniez, et al. 2003]. Le rôle pro-angiogénique de l'apeline en fait un agent potentiellement pro-tumorigénique. L'expression de l'apeline et d'APJ dans les tumeurs est associée à l'issue clinique de certains cancers humains [Rayalam, et al. 2011], ce qui a mené à proposer l'antagonisme d'APJ comme une possible stratégie dans le traitement de cancers.

2) Rôle du système Apeline/APJ dans le système nerveux central

Par la présence des ARN messagers de l'apeline et d'APJ dans de nombreuses structures du système nerveux central, l'apeline a la double casquette de messenger endocrine et nerveux. Au sein du l'hypothalamus, la présence de l'apeline et d'APJ est concomitante dans le noyau paraventriculaire, le noyau supra-optique et le noyau arqué. Les neurones apelinergiques sont également, entre autres, vasopressinergiques [Lee, et al. 2000] et à pro-opiomélanocortine (POMC) [Reaux-Le Goazigo, et al. 2011], impliquant des effets sur le comportement alimentaire (prise hydrique et prise alimentaire).

A) Régulation des fluides corporels et de la prise hydrique

La colocalisation de l'apeline et de la vasopressine dans les neurones hypothalamiques [Reaux, et al. 2001], [De Mota, et al. 2004] a mis l'équipe de Catherine Llorens-Cortès sur la piste d'une possible inter-régulation entre ces deux hormones. La vasopressine est une neuro-hormone qui permet la réabsorption de l'eau par les reins, elle est donc antidiurétique. Cette équipe a montré qu'une injection intra-cérébroventriculaire (icv) d'apeline, ciblant l'hypothalamus, diminue les taux de vasopressine [Reaux, et al. 2001], ce qui entraîne une

diurèse [De Mota, et al. 2004], [Reaux, et al. 2001]. La vasopressine peut réguler la production d'apeline, car l'inhibition des récepteurs à la vasopressine bloque l'augmentation du contenu neuronal en apeline suite à une privation d'eau [Reaux-Le Goazigo, et al. 2004] et l'injection de vasopressine augmente son contenu.

Au niveau d'une régulation de la prise hydrique par l'apeline, certaines études ont montré que l'injection icv de pyr-Ape-13 réduit la prise hydrique de rats privés d'eau pendant 24h [Reaux, et al. 2001]. Par contre, chez des rats qui n'ont pas été privés d'eau, une injection icv d'apeline a l'effet inverse : la prise hydrique est augmentée [Taheri, et al. 2002], le même résultat ayant été obtenu chez des animaux chez qui l'apeline a été injectée en périphérie [Lee, et al. 2000].

B) Régulation de la prise alimentaire

L'injection icv d'apeline-13 n'a pas d'effet sur la prise alimentaire d'animaux en condition nourrie [Taheri, et al. 2002], [Duparc, et al. 2011]. Après un jeûne par contre, l'apeline augmente la prise alimentaire de façon dose-dépendante dans l'étude de Taheri et al [Taheri, et al. 2002], mais pas dans l'étude de Drougard et al provenant de notre équipe, utilisant une dose plus faible [Drougard, et al. 2013]. Une injection icv chronique d'apeline augmente la prise alimentaire après un jeûne à partir de 4 jours de traitement, et entraîne une prise de poids plus importante que les souris recevant la solution saline [Valle, et al. 2008]. A l'inverse, un effet inhibiteur de l'apeline sur la prise alimentaire a été décrit chez le rat nourri et à jeun [Sunter, et al. 2003], [Clarke, et al. 2009].

Toutes ces données montrent que l'apeline centrale semble jouer un rôle dans la régulation de la prise hydrique et alimentaire, cependant les données discordantes montrent bien que ses effets dépendent de la dose utilisée, du modèle animal, de la façon de délivrer l'apeline, et de l'état hydrique, nutritionnel et métabolique des animaux chez qui l'apeline est injectée. En effet, l'état métabolique est un paramètre important à prendre en compte : dans l'étude de Clarke et al, l'injection icv d'apeline chez des rats rendus obèses par un régime gras ne diminue pas la prise alimentaire comme c'est le cas chez des rats normaux [Clarke, et al. 2009]. Les auteurs ont observé une diminution de l'expression hypothalamique d'APJ suite à l'injection d'apeline chez les rats nourris avec le régime gras, ce qui expliquerait l'absence

d'effet de l'apeline [Clarke, et al. 2009]. L'injection périphérique d'apeline ne modifie pas non plus la prise alimentaire de souris obèses et résistantes à l'insuline, mesurée sur une période de 24h [Attane, et al. 2012].

Une attention particulière doit être portée aux effets de l'apeline centrale, et une étude comparative minutieuse, utilisant plusieurs doses d'apeline, sur des plages de temps de mesure identiques, permettrait de déterminer de façon claire si oui ou non, l'apeline centrale joue un rôle dans la régulation de la prise alimentaire, en condition physiologique mais aussi pathologique, telle que l'obésité et le diabète de type II.

3) Rôle du système Apeline/APJ dans la sphère gastrointestinale

L'apeline est exprimée par les cellules endocrines et exocrines de la muqueuse gastrique, et le long du tube digestif (duodénum, jéjunum et iléon) [Wang, et al. 2004]. Etant excrétée dans la lumière digestive, elle y a un effet paracrine. *In vitro*, le traitement d'une lignée cellulaire entéroendocrine avec l'apeline stimule la prolifération et la sécrétion de cholécystokinine par l'activation de la voie MAPK [Wang, et al. 2004]. Tout récemment, une étude a confirmé *in vivo* l'augmentation de la cholécystokinine, mais a également montré qu'une injection iv d'apeline pouvait augmenter la concentration plasmatique de GLP-1 [Wattez, et al. 2013], soulignant son rôle dans la régulation du métabolisme glucidique, qui sera détaillé dans la partie II.4.B de ce chapitre.

Une injection iv d'apeline induit aussi la sécrétion d'acide gastrique, dépendante de l'histamine chez le rat [Ohno, et al. 2012]. Sur des glandes gastriques de lapin *ex vivo*, l'apeline est capable d'inhiber la sécrétion d'acide gastrique induite par la gastrine, mais pas celle induite par l'histamine [Lambrecht, et al. 2006]. Cependant dans cette étude, l'apeline seule ne stimule pas la sécrétion d'acide gastrique.

La motilité gastro-intestinale peut elle aussi être modulée par l'apeline : une injection icv inhibe la vidange gastrique, et le transit intestinal et colique de souris [Lv, et al. 2013]. Par contre, une injection ip d'apeline n'a aucun effet sur la vidange gastrique [Lv, et al. 2013].

4) Rôle du système Apeline/APJ dans le métabolisme énergétique.

Depuis 2005, les travaux de notre équipe ont permis de démontrer que l'apeline fait partie de la famille des adipokines, puisqu'elle est exprimée et sécrétée par les adipocytes [Boucher, et al. 2005]. De plus, sa concentration plasmatique est augmentée en condition d'obésité, aussi bien chez l'Homme que chez les animaux [Boucher, et al. 2005]. Chez les sujets diabétiques, l'apelinémie est également augmentée [Dray, et al. 2010], [Li, et al. 2006], [Soriguer, et al. 2009], à l'exception des sujets diabétiques qui n'ont pas été traités par des antidiabétiques [Erdem, et al. 2008].

L'expression adipocytaire de l'apeline chez les souris db/db est corrélée à l'insulinémie, et l'insuline stimule l'expression de l'apeline dans les cellules 3T3-F442A [Boucher, et al. 2005].

D'autres facteurs circulants peuvent moduler l'expression de l'apeline adipocytaire, comme le TNF α [Daviaud, et al. 2006] qui l'augmente, et l'aldostérone [Jiang, et al. 2013], et la vitamine C [Garcia-Diaz, et al. 2007] qui la diminuent. L'activation du récepteur nucléaire PGC1 α [Mazzucotelli, et al. 2008] peut stimuler l'expression de l'apeline dans les adipocytes murins et humains, et le facteur de transcription HIF (hypoxia-inducible factor) l'augmente également dans les adipocytes murins [Glassford, et al. 2007] et humains [Geiger, et al. 2011]. Il a également été montré que l'acide lipoïque [Fernandez-Galilea, et al. 2011] et l'acide eicosapentaénoïque (EPA) [Lorente-Cebrian, et al. 2010], un acide gras polyinsaturé de la famille des ω 3, peuvent augmenter l'expression adipocytaire de l'apeline, et cette régulation sera détaillée dans le chapitre suivant.

A) Régulation de la production et de la sécrétion de l'insuline

L'apeline est capable de réguler la sécrétion d'insuline, via APJ, qui est présent sur les cellules β des îlots de Langerhans. L'apeline, elle, est présente dans les cellules α et β de nombreuses espèces [Ringstrom, et al. 2010], ce qui suggère un effet autocrine et paracrine de l'apeline dans le pancréas. Un modèle *in vitro* de cellules sécrétrices d'insuline, la lignée INS-1, a permis de mettre en évidence un effet direct de l'apeline sur la cellule β . En effet, la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose ou le GLP-1 est diminuée par l'apeline [Guo, et al. 2009] en activant la phosphodiesterase PDE3B, de façon dépendante de la PI3K. Des îlots de Langerhans isolés de souris et traités à l'apeline sécrètent moins d'insuline [Sorhede Winzell, et al. 2005], et

in vivo, une injection d'apeline limite la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose chez des souris normales et résistantes à l'insuline [Sorhede Winzell, et al. 2005]. La plus forte concentration d'apeline plasmatique chez les patients diabétiques peut sembler contradictoire avec ces résultats, cependant Guo et al ont montré que l'apeline peut avoir un effet biphasique : elle perd son effet sur la sécrétion d'insuline à de fortes concentrations, ce qui suggère que chez les patients diabétiques, l'apelinémie étant plus élevée, elle aurait un effet moindre sur la sécrétion d'insuline [Guo, et al. 2009]. De plus, les îlots de Langerhans d'animaux diabétiques de type II contiennent plus d'apeline que les animaux non diabétiques [Ringstrom, et al. 2010].

Dans le diabète de type I, caractérisé par l'apoptose des cellules β , l'apelinémie est augmentée chez des enfants [Meral, et al. 2010] et adultes diabétiques [Alexiadou, et al. 2012], et chez des rats traités avec de la streptozotocine, qui détruit les cellules β [Falcao-Pires, et al. 2010]. De façon intéressante, chez des souris Akita, un modèle murin de diabète de type I, un traitement chronique de 10 semaines à l'apeline augmente la production d'insuline, et cet effet passe par une atténuation du stress du RE dans les cellules β [Chen, et al. 2011], il est donc possible que l'augmentation de l'apelinémie chez les patients diabétiques de type I soit une réponse de l'organisme permettant de ralentir la destruction des cellules β .

B) Effets de l'apeline sur la sensibilité à l'insuline et sur le métabolisme énergétique

a) Effets de traitements aigus à l'apeline.

➤ Effets sur la sensibilité à l'insuline

Au niveau de l'organisme dans son ensemble, chez des souris normales, une injection iv d'apeline diminue la glycémie de souris normales. De plus, elle améliore la tolérance au glucose de ces souris, mais aussi de souris obèses et insulino-résistantes [Dray, et al. 2008]. Lors d'un clamp euglycémique-hyperinsulinémique, l'infusion continue d'apeline pendant le clamp induit une augmentation de l'entrée du glucose dans les organes périphériques tels que le tissu adipeux blanc et les muscles, aussi bien chez les souris normales qu'obèses et résistantes à l'insuline [Dray, et al. 2008].

Les muscles étant le principal lieu d'entrée du glucose, le mécanisme des effets de l'apeline y a été étudié. Comme dans les cellules endothéliales [Tatemoto, et al. 2001], les effets de l'apeline sur le muscle passent par une activation de l'eNOS, ce qui a été démontré en

traitant des souris eNOS^{-/-}, chez qui l'apeline perd son effet sur le transport de glucose dans le muscle soléaire [Dray, et al. 2008]. L'implication du NO dans le transport de glucose stimulé par l'insuline avait déjà été observée dans le muscle *in vivo* [Roy, et al. 1998]. Bien qu'il n'ait pas été déterminé si une éventuelle vasodilatation locale est à l'origine de la meilleure sensibilité à l'insuline des muscles, la dose d'apeline utilisée dans l'étude de Dray et al n'a pas d'effet sur la pression artérielle ni sur la fréquence cardiaque. L'implication d'une production de NO dans les effets de l'apeline sur le transport de glucose musculaire n'a pas été retrouvée dans des cellules C2C12 dans l'étude de Yue et al [Yue, et al. 2010], cependant il a déjà été montré que l'inhibiteur d'eNOS utilisé, le L-NAME, n'inhibe pas les effets sur le transport de glucose basal et induit par l'insuline *in vitro* [Roy, et al. 1998].

Les études *in vitro* et *ex vivo* sur le muscle montrent que le traitement avec l'apeline augmente également leur transport de glucose basal et ce, par une augmentation de la phosphorylation d'Akt [Dray, et al. 2008], [Yue, et al.], indépendamment de l'insuline mais tout de même dépendante de la protéine Gi, car inhibée par la toxine pertussique (19861585 [Yue, et al.]). Ainsi, l'apeline potentialise les effets de l'insuline en ce qui concerne le transport de glucose, mais elle a aussi un effet propre, ce qui suggérerait l'existence d'une voie de signalisation de l'apeline indépendant de l'insuline. Et en effet, l'apeline induit la phosphorylation de l'AMPK dans le muscle isolé [Dray, et al. 2008]. L'utilisation du composé C, un inhibiteur de l'AMPK, sur les myotubes [Yue, et al. 2010], et l'inefficacité de l'injection d'apeline chez des souris exprimant un mutant négatif dominant de l'AMPK spécifiquement dans le muscle (AMPK-DN) [Dray, et al. 2008], ont pu confirmer l'implication de l'activation de l'AMPK dans cet effet de l'apeline indépendant de l'insuline sur le muscle.

Au niveau du tissu adipeux, le transport du glucose en réponse à l'apeline sur adipocytes isolés de souris n'a pas été mesuré. Par contre, sur explant de tissu adipeux humain, l'apeline l'augmente, en activant l'AMPK [Attane, et al. 2011], et dans les adipocytes 3T3-L1 aussi, par un mécanisme dépendant de la voie PI3k/Akt [Zhu, et al. 2011]. De plus, dans des 3T3-L1 rendus insulino-résistants par le TNF α , l'apeline bloque l'augmentation de l'expression d'IL-6, et augmente le transport de glucose stimulé par l'insuline [Zhu, et al. 2011].

➤ Effet de l'apeline intestinale sur l'absorption de glucose

Notre équipe a récemment mis en évidence un rôle du système apeline/APJ dans l'absorption intestinale du glucose. Tout d'abord, l'apeline et APJ sont présents dans les

entérocytes. De plus, le glucose ingéré peut induire rapidement la sécrétion d'apeline dans la lumière intestinale chez la souris [Dray, et al. 2013]. Cette étude montre également que lorsque la pyr-Ape-13 est administrée *per os*, la quantité de transporteurs de glucose SGLT1 est diminuée dans les entérocytes, alors que celle de GLUT2 est augmentée via l'activation de l'AMPK. Cela se traduit par une augmentation de l'absorption intestinale de glucose. Ces résultats semblent indiquer que l'arrivée de glucose dans l'intestin entraîne sa propre absorption, en induisant la sécrétion d'apeline. On sait qu'une augmentation transitoire de la glycémie dans la veine porte induit la sécrétion rapide d'insuline [Fukaya, et al. 2007], et une amélioration de la sensibilité à l'insuline [Burcelin, et al. 2000], [Delaere, et al. 2010]. Ainsi, l'apeline, qui induit le transport de glucose dans les organes [Dray, et al. 2008], pourrait ainsi agir en amont en assurant l'absorption de glucose par les entérocytes et la sécrétion rapide d'insuline, en augmentant la sécrétion de GLP-1 [Wattez, et al. 2013] et la glycémie portale.

➤ Effets de l'apeline centrale sur le métabolisme glucidique

Suite à la description des effets de l'apeline injectée en périphérie sur le métabolisme glucidique [Dray, et al. 2008], et parce que les niveaux hypothalamiques d'apeline sont élevés dans plusieurs modèles de résistance à l'insuline [Reaux-Le Goazigo, et al. 2011], notre équipe s'est intéressée aux effets de l'apeline centrale sur le métabolisme glucidique, en condition normale, et en condition de résistance à l'insuline.

L'étude de Duparc et al a montré que l'apeline centrale régule la glycémie. L'injection icv d'une dose d'apeline de $20 \cdot 10^{-3}$ fmoles augmente la tolérance au glucose et à l'insuline de souris nourries avec un régime normal, et diminue la glycémie en condition nourrie [Duparc, et al. 2011]. Ces effets sont médiés par l'activation de l'eNOS hypothalamique. En condition de diabète de type II, l'activation de l'eNOS est altérée [Cabou, et al. 2007], et cette étude montre que l'injection icv d'apeline n'a effectivement pas d'effet bénéfique chez des souris insulino-résistantes nourries avec un régime riche en lipides.

De façon surprenante, cette étude montre qu'une dose plus élevée (40 fmoles), correspondant à la moitié de la quantité d'apeline présente dans l'hypothalamus, altère l'homéostasie glucidique : la tolérance au glucose et à l'insuline sont diminuées, et la glycémie à jeun est augmentée, alors que la glycémie nourrie reste inchangée. Cette dose d'apeline n'implique pas l'eNOS, et l'étude de Drougard et al publiée cette année a montré que cette dose d'apeline agit en faisant intervenir la production d' H_2O_2 hypothalamique, ainsi que

l'activation du système nerveux sympathique, ce qui résulte en une augmentation de la production endogène de glucose par le foie [Drougard, et al. 2013]. En effet, chez les souris nourries en régime normal, cette dose d'apeline stimule la glycolyse et la néoglucogenèse, et chez les souris insulino-résistantes, cette dose stimule seulement la glycolyse, la néoglucogenèse étant déjà sur-activée en condition de résistance à l'insuline.

Ces travaux novateurs ont permis de mettre en évidence un effet de l'apeline centrale dans le contrôle de l'homéostasie glucidique, mais aussi qu'une quantité importante d'apeline dans l'hypothalamus est capable de provoquer un état de résistance à l'insuline chez la souris, ce qui n'avait jusqu'alors jamais été observé.

➤ Effets sur le métabolisme lipidique

Peu de publications décrivent des effets aigus de l'apeline sur le métabolisme lipidique. Masaki et al ont montré qu'après une injection icv d'apeline de l'ordre du nano molaire, chez des souris nourries avec un régime normal, stimule l'activité sympathique des nerfs innervant le tissu adipeux brun chez le rat, ce qui se traduit par une augmentation de sa température et de l'expression génique d'UCP1 dans ce tissu, qui est bénéfique [Masaki, et al. 2012]. Cette même équipe, dans l'étude d'Higuchi et al, a montré qu'une injection ip d'apeline augmente la température rectale et la dépense énergétique des souris normales [Higuchi, et al. 2007].

Cela montre que l'apeline peut agir en périphérie aussi bien qu'au niveau central pour contrôler l'entrée et/ou l'utilisation de substrats énergétiques, et que son action centrale peut être bénéfique ou délétère, selon la dose utilisée. Par contre, tous les effets métaboliques étudiés après une injection d'apeline en périphérie sont bénéfiques pour la sensibilité à l'insuline.

b) Effets de traitements chroniques à l'apeline

Plusieurs traitements chroniques à l'apeline ont été réalisés chez la souris en condition de résistance à l'insuline, par notre équipe et par d'autres.

Dans l'étude d'Higuchi et al, des souris rendues résistantes à l'insuline par un régime contenant 60% de lipides pendant 6 semaines ont été traitées quotidiennement par une

injection ip de 0,1 $\mu\text{mol/kg/jour}$ d'apeline, pendant les 2 dernières semaines [Higuchi, et al. 2007].

Le traitement chronique mis en place dans notre équipe, a été administré à des souris qui ont été soumises à un régime contenant 45% de lipides à l'âge de 10 semaines pendant 16 semaines, le traitement quotidien avec la même dose d'apeline ayant eu lieu pendant les 4 dernières semaines [Attane, et al. 2012].

Une autre équipe a étudié les effets d'un traitement chronique à l'apeline, à l'aide de mini-pompes osmotiques à une dose de 2 mg/kg/jour, mais cette fois-ci chez des souris db/db âgées de 9 semaines, pendant 2 semaines, ou chez des souris $\text{Ape}^{-/-}$ âgées de 12 semaines, qui sont moins sensibles à l'insuline que les souris wt sous régime normal, pendant 4 semaines [Yue, et al. 2010].

Tous les effets de ces traitements qui sont rapportés dans cette partie ont été observés 24h après la dernière injection d'apeline, lorsqu'elle était administrée intrapéritonéalement.

Ces 3 études montrent une diminution de la prise de poids et de l'insulinémie à jeun des souris, quelle que soit la durée du traitement ou le mode d'administration de l'apeline.

➤ Effets sur la masse grasse et les adipokines circulantes

Dans l'étude d'Higuchi et al, le traitement à l'apeline a pour effet de diminuer le poids des dépôts adipeux et la taille adipocytaire après 2 semaines de traitement. De plus, la leptinémie à jeun est diminuée et l'adiponectinémie augmentée, résultant de la diminution de la masse grasse et de la taille des adipocytes [Higuchi, et al. 2007]. Dans l'étude d'Attané et al, la prise de masse grasse est aussi diminuée chez les souris traitées à l'apeline, mais les concentrations plasmatiques de leptine et d'adiponectine en condition nourrie ne sont pas modifiées [Attane, et al. 2012]. On note que chez les souris $\text{Ape}^{-/-}$, l'adiponectinémie est diminuée par rapport aux souris wt, et l'infusion d'apeline l'augmente [Yue, et al. 2010], mais cela n'a pas été mesuré chez les souris $\text{Ape}^{-/-}$ nourries avec le régime hypercalorique.

➤ Effets sur le métabolisme glucidique et la résistance à l'insuline

L'étude d'Attané et al montre que les souris traitées à l'apeline ont, en plus de l'insulinémie, une glycémie à jeun diminuée, et que leur tolérance au glucose et à l'insulinémie sont améliorées par rapport aux souris traitées au PBS et ce, dès 3 semaines de traitement

[Attane, et al. 2012]. Ce traitement améliore également la sensibilité à l'insuline des muscles, puisque le transport de glucose stimulé par l'insuline dans le muscle est augmenté, ce qui participe à la diminution de la glycémie observée.

L'étude de Yue et al montre une amélioration de la tolérance au glucose et à l'insuline, et une amélioration de la phosphorylation d'Akt stimulée par l'insuline dans le muscle chez les souris $Ape^{-/-}$ nourries avec un régime normal et traitées à l'apeline [Yue, et al. 2010]. Cela confirme une synergie entre l'apeline et l'insuline *in vivo* dans le muscle, déjà observée lors d'une simple injection d'apeline [Dray, et al. 2008]. Cependant, on ne sait pas si l'apeline peut toujours restaurer la sensibilité à l'insuline chez des souris $Ape^{-/-}$ nourries avec un régime hypercalorique.

➤ Effets sur les lipides circulants et le métabolisme lipidique

Le tissu adipeux insulino-résistant est caractérisé par une lipolyse non contrôlée, et les souris résistantes à l'insuline traitées à l'apeline pendant 2 semaines [Higuchi, et al. 2007] présentent une réduction des concentrations plasmatiques d'AGL.

Les souris $Ape^{-/-}$ présentent une augmentation plasmatique des AGL et du glycérol, reflétant une lipolyse augmentée, par rapport aux souris wt [Yue, et al.], et l'infusion de ces souris avec l'apeline a pour effet de diminuer les AGL plasmatiques [Yue, et al.]. Dans cette étude, l'apeline est capable d'inhiber l'effet stimulateur de l'isoprotérénol sur la lipolyse dans des adipocytes isolés de souris et 3T3-L1, en agissant sur la phosphorylation inhibitrice de la LHS. Cet effet implique l'activation de l'AMPK, et passe par les protéines Gq et Gi. Ces résultats ont été confirmés par l'étude de Than et al, qui a montré que l'apeline diminue la libération d'AGL par les adipocytes 3T3-L1, par un mécanisme impliquant l'activation de l'AMPK via Gq [Than, et al. 2012]. Dans ces adipocytes, l'apeline bloque la lipolyse en augmentant la quantité de périlipine autour des vacuoles lipidiques, leur apportant une plus grande stabilité, les rendant ainsi résistants aux lipases [Than, et al. 2012].

Dans l'étude d'Higuchi et al, le traitement à l'apeline diminue la triglycémie, et augmente l'expression d'UCP1 dans le tissu adipeux brun, et celle d'UCP3 dans le muscle des souris normales [Higuchi, et al. 2007]. Cela semblait indiquer une augmentation de l'activité catabolique des acides gras, en accord avec l'augmentation de leur température rectale suite à une injection d'apeline, cependant les effets de cette injection ip d'apeline sur le métabolisme

lipidique n'ont pas été étudiés de façon précise, et n'ont pas été explorés chez des souris obèses et insulino-résistantes.

Notre équipe a montré qu'après 4 semaines de traitement chez des souris obèses et insulino-résistantes, l'apeline n'induit pas une augmentation de la température rectale, mais elle permet de diminuer le quotient respiratoire, ce qui reflète l'augmentation de l'utilisation globale des lipides [Attane, et al. 2012]. Lorsqu'elles sont nourries avec un régime hyperlipidiques (HFD, high fat diet), des souris transgéniques surexprimant l'apeline ont une dépense énergétique et une température rectale augmentées par rapport aux souris wt [Yamamoto, et al. 2011], ce qui confirme que l'apeline joue un rôle dans l'utilisation des lipides.

Toutes ces données suggèrent une plus forte utilisation des lipides suite à un traitement à l'apeline. En effet, l'étude d'Attané et al [Attane, et al. 2012] a montré par microscopie électronique qu'après le traitement à l'apeline, les muscles des souris contiennent plus de mitochondries intramyofibrillaires, dont l'ultrastructure n'est pas altérée, et l'expression de PGC1a, NRF1 (nuclear respiratory factor 1) et TFAM (Mitochondrial Transcription Factor A) des marqueurs de la biogenèse mitochondriale, est augmentée. Cela est reflété par une augmentation de la β -oxydation complète, sans pour autant augmenter les DAG intramusculaires, délétères pour la sensibilité à l'insuline, et en diminuant la quantité d'acylCN, eux aussi délétères, et augmentés par le régime hyperlipidique, expliquant la meilleure sensibilité à l'insuline des muscles en ce qui concerne le transport de glucose. Ces effets de l'apeline dans le muscle sont associés à une augmentation de la phosphorylation de l'AMPK, et sont complètement abrogés chez des souris AMPK-DN, ce qui montre que les effets de l'apeline sur la biogenèse mitochondriale et la β -oxydation nécessitent l'activation de l'AMPK. Ces effets sur le muscle sont confortés par l'étude de souris transgéniques surexprimant le gène de l'apeline [Yamamoto, et al. 2011] : outre l'augmentation de la dépense énergétique et de la température rectale, ces souris prennent moins de poids, sous régime normal et sous régime gras, et prennent moins de masse grasse sous régime gras. Au niveau du muscle, la mitochondriogenèse et le nombre de fibres musculaires oxydatives sont augmentés, ce qui peut expliquer que les souris transgéniques utilisent plus les lipides que les souris wt. De plus, ils observent une augmentation de la vasculogenèse dans le muscle, qui peut également participer à l'augmentation de la dépense énergétique de ces animaux.

Une autre étude récente propose elle aussi un mécanisme indirect de l'apeline dans le maintien ou le rétablissement d'une sensibilité à l'insuline: la promotion de la croissance

vaisseaux sanguins et lymphatiques [Sawane, et al. 2013]. En effet les souris $Ape^{-/-}$ soumises à un régime gras présentent des anomalies lymphatiques et une perméabilité de l'endothélium, qui promeuvent la différenciation adipocytaire. Dans la même étude, les souris transgéniques surexprimant l'apeline, elles, ne présentent pas de dysfonction endothéliale et ont une masse adipeuse moins développée que les souris wt, mais cela n'a pas été étudié sous régime hyperlipidique.

Ainsi, les traitements chroniques à l'apeline montrent bien que malgré sa courte demi-vie [Japp, et al. 2008a], un traitement chronique quotidien suffit à améliorer la sensibilité à l'insuline des souris [Higuchi, et al. 2007], [Attane, et al. 2012] (Figure 15). Bien que tous les traitements chroniques n'induisent pas une diminution significative de la glycémie à jeun des souris obèses et insulino-résistantes, tous entraînent une diminution de l'insulinémie, cela peut donc être la conséquence d'une meilleure sensibilité à l'insuline systémique, tout comme un effet direct de l'apeline exogène sur le pancréas. De plus, en activant l'AMPK, l'apeline exerce des effets propres, indépendamment de l'insuline, ce qui est un mécanisme intéressant en condition de résistance à l'insuline, et fait donc de l'apeline une cible thérapeutique intéressante dans le traitement du diabète de type II.

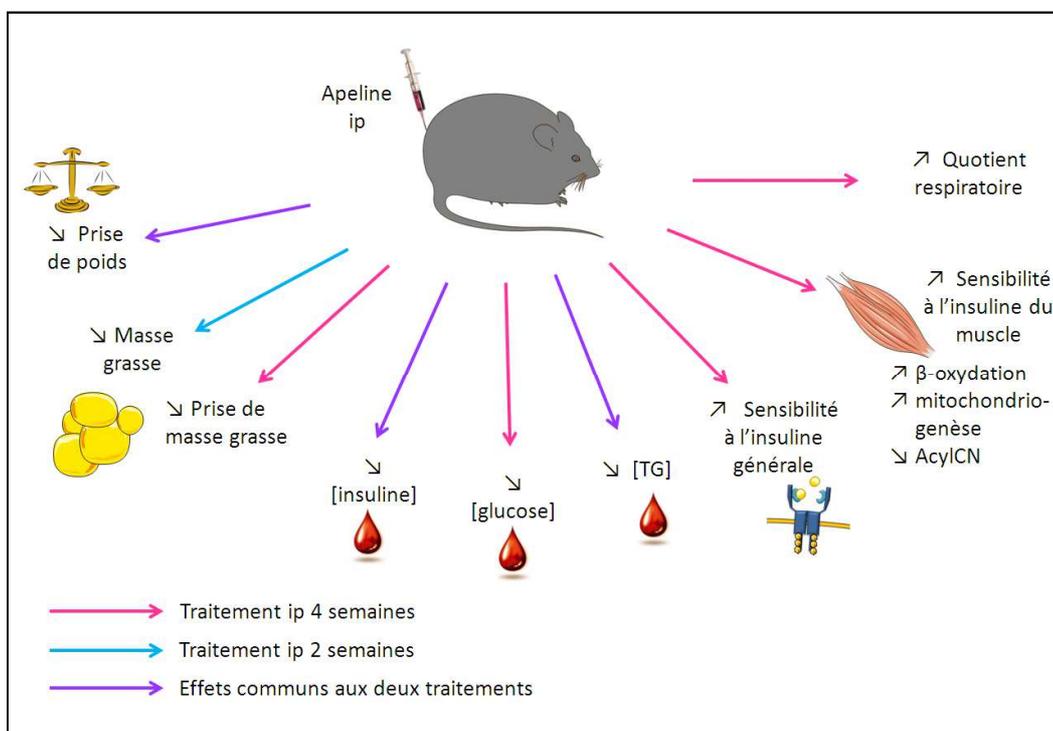


Figure 15. Les effets de traitements chroniques à l'apeline sur des souris obèses et résistantes à l'insuline nourries avec un régime hyperlipidique.

D'après [Higuchi, et al. 2007] (flèches bleues) et [Attane, et al. 2012] (flèches roses).

Le fait que l'apelinémie soit augmentée chez les patients obèses, mais que l'apeline exerce des effets bénéfiques sur la sensibilité à l'insuline chez les souris, suggère d'une part que l'augmentation de ses taux plasmatiques chez les patients insulino-résistants est probablement une réponse compensatoire pour retarder l'apparition de la résistance à l'insuline, et d'autre part qu'il n'existerait pas de résistance périphérique à l'apeline.

III) Le système Apeline/APJ et le foie

Dans les études comparant l'expression génique de l'apeline ou d'APJ dans divers organes, le foie apparaît toujours comme un "contrôle négatif", où ils sont très faiblement exprimés, voire pas du tout [O'Carroll, et al. 2000], [Lee, et al. 2000], [Hosoya, et al. 2000], [Kawamata, et al. 2001], [Boucher, et al. 2005], [Dray, et al. 2008].

Pourtant en 2001, Tatemoto et ses collaborateurs avaient détecté l'apeline par immunohistochimie sur des coupes de foie de rat [Tatemoto, et al. 2001]. Elle y est exprimée par les cellules endothéliales des veines portales et centro-lobulaires, mais aussi par les cellules de Küpffer. Ces types cellulaires étant minoritaires dans le foie, ceci pourrait expliquer le fait que les études d'expression génique ou protéique sur tissu entier ne permettent pas de détecter l'apeline. L'apeline et son récepteur étant fréquemment exprimés dans les mêmes tissus, il est possible que cela soit aussi le cas pour le foie, et ce n'est que récemment qu'APJ a été localisé dans le foie : l'étude publiée en 2008 par Principe et al a permis de considérer une implication du système apeline/APJ dans les pathologies hépatiques [Principe, et al. 2008].

1) Le système Apeline/APJ et les pathologies sévères du foie

A) Localisation de l'apeline et d'APJ dans le foie cirrhotique

Dans un modèle expérimental de cirrhose chez le rat, induite par une combinaison de tétrachlorure de carbone (CCl₄) et de phénobarbital, l'apelinémie est plus élevée que chez les rats sains [Principe, et al. 2008]. L'expression génique de l'apeline est multipliée par 4 dans le foie de ces rats, et aucune augmentation n'est observée dans les autres organes étudiés (les poumons, le cœur et les reins). Le foie cirrhotique de ces animaux présente une induction spectaculaire de l'expression d'APJ, 300 fois plus élevée dans les foies cirrhotiques, reflétée par une expression protéique triplée. L'étude immunohistologique a permis de localiser APJ dans

les zones périveineuses dans les foies sains, alors que les foies cirrhotiques présentent une expression plutôt diffuse d'APJ dans le parenchyme, suggérant une induction de son expression par les hépatocytes. La localisation de l'apeline est restreinte aux zones périveineuses dans les foies sains, comme APJ, alors que dans les foies cirrhotiques, on la retrouve également à proximité des espaces portes et des septa fibreux. La colocalisation de l'apeline avec α SMA a permis de révéler que ce sont les cellules stellaires activées à proximité des zones fibreuses qui produisent l'apeline, et non pas les hépatocytes.

Chez l'Homme, la présence et la localisation de l'apeline et d'APJ dans le foie de patients ayant une cirrhose a été confirmée par 4 études.

En 2010, une étude provenant du même laboratoire [Melgar-Lesmes, et al. 2010] localise l'apeline dans les cellules stellaires de biopsies de foies humains cirrhotiques, confirmant les résultats de Principe et al, puis une année plus tard, les mêmes auteurs publient une étude portant sur les mêmes biopsies de foies, en s'intéressant cette fois-ci à APJ [Melgar-Lesmes, et al. 2011]. Contrairement à l'étude de Principe et al, qui localisait APJ dans les hépatocytes de foies cirrhotiques de rats, cette étude le colocalise avec α SMA (α -smooth muscle actin) le long des septa fibreux et dans les cellules stellaires activées, et ce de façon très nette.

Cependant une équipe japonaise a localisé l'apeline et APJ dans d'autres types cellulaires dans le foie de patients atteints de carcinome hépatocellulaire, dont le degré de cirrhose est classifié Child–Pugh grade A ou grade C, selon la sévérité [Yokomori, et al. 2011], [Yokomori, et al. 2012]. Par microscopie électronique, on constate que l'apeline est très rare dans les foies non cirrhotiques, localisée dans les cellules endothéliales microvasculaires, et à peine dans les cellules sinusoides. Dans les foies de grade Child A, l'apeline est modérément localisée dans les cellules endothéliales des sinusoides, et dans les capillaires en cours de prolifération connectés aux sinusoides des nodules. Dans la forme de cirrhose ChildC, plus sévère, l'expression de l'apeline est plus marquée dans les capillaires artériels autour des septa, et exprimée de façon aberrante dans les sinusoides des nodules entourés par des septa fibreux. De façon intéressante, l'expression génique et protéique de l'apeline est augmentée de façon proportionnelle à la sévérité de la pathologie hépatique. De plus, l'apeline est observée dans les capillaires en cours d'angiogenèse. Dans les foies "sains", c'est le cas uniquement dans les capillaires périportaux, alors que dans les foies cirrhotiques, c'est aussi le cas dans les capillaires

connectés aux sinusoides, et dans les foies de classe ChildC, les capillaires en prolifération en direction des sinusoides et des septa expriment aussi l'apeline.

APJ, lui, est très faiblement exprimé dans les foies "sains", au niveau des veines et artères des espaces portes, et presque indétectable dans les sinusoides. Dans les foies cirrhotiques de grade Child A, on le retrouve surtout au niveau des cellules sinusoidales à proximité des nodules, et au niveau des capillaires artériels autour des septa fibreux. Dans la classe ChildC, sa présence est observée majoritairement dans les cellules sinusoidales à proximité des nodules et des septa, mais aussi dans les cellules stellaires autour des veines centro-lobulaires et portales. Comme pour l'apeline, la quantification du marquage, l'expression génique et protéique d'APJ montrent qu'il est plus exprimé dans les foies cirrhotiques, et sa présence dans les cellules stellaires est augmentée de façon proportionnelle à la sévérité de la pathologie hépatique.

B) Rôle du système Apeline/APJ dans la cirrhose

L'étude de Principe, qui colocalise l'apeline avec α SMA, propose un nouveau rôle de l'apeline, qui agirait ici comme un agent paracrine au sein du foie, sécrétée par les cellules stellaires activées, et agissant sur le parenchyme pour induire des voies proinflammatoires et néoangiogéniques, ayant une finalité pro-fibrotique [Principe, et al. 2008], ce qui est fortement suggéré par le blocage d'APJ chez ces animaux. En effet, le traitement des rats ayant une cirrhose avec l'antagoniste d'APJ F13A diminue de 25% les zones fibreuses dans le foie, et diminue la densité des vaisseaux sanguins. Il est à noter que le F13A améliore aussi la fonction cardiaque et rénale de ces rats [Principe, et al. 2008].

Alors que l'augmentation du système Apeline/APJ en conditions pathologiques est souvent interprétée comme un dernier rempart avant la défaillance d'un système, dans cette étude, cette augmentation semble être délétère. La cirrhose étant associée à un phénomène d'hypoxie, les auteurs proposaient le manque d'oxygène comme stimulus pouvant induire l'expression du système apeline/APJ dans cette pathologie, et cela a été confirmé pour APJ plus tard par les travaux de la même équipe [Melgar-Lesmes, et al. 2011].

Dans le but de déterminer le ou les éléments qui induisent l'expression de l'apeline dans les foies cirrhotiques, Melgar-Lesmes et al, qui la localisaient dans les cellules stellaires de foie humain, ont mesuré son expression dans une lignée de cellules stellaires humaines, les LX-2.

Contrairement à ce que l'on pouvait attendre, l'hypoxie, le TNF α et le LPS (lipopolysaccharides) n'augmentent pas l'expression de l'apeline dans les cellules LX-2 [Melgar-Lesmes, et al. 2010]. Par contre, l'AngII et l'endothéline 1 (ET-1), deux agents pro-fibrotiques, augmentent son expression génique et protéique dans les LX-2. Lorsque ces cellules sont traitées avec l'apeline, l'expression génique et protéique de collagène I et du récepteur β du PDGF (PDGFR β), deux facteurs extrêmement fibrogéniques, est augmentée. L'induction de la production de collagène I et de PDGFR β induite par l'AngII et l'ET-1 est totalement bloquée par le F13A, proposant l'apeline comme intermédiaire de leurs effets pro-fibrotiques.

Ainsi, les auteurs proposent le mécanisme suivant : l'AngII ou l'ET-1, via leurs récepteurs respectifs, induisent l'expression de l'apeline dans les cellules stellaires. Une fois sécrétée, l'apeline agit de façon autocrine via APJ, dont la signalisation aboutit à l'induction de l'expression de facteurs pro-fibrogéniques tels que le collagène I, qui va s'accumuler dans la MEC, et le PDGFR β qui participe à l'activation et à la prolifération des cellules stellaires (figure 16). Afin de vérifier ce modèle, ils ont traité des rats fibrosés avec des antagonistes du récepteur à l'AngII et à l'ET-1. Dans les deux cas, on observe une diminution dans le foie de l'expression génique et protéique de l'apeline, du collagène I et du PDGFR β , ce qui confirme leur hypothèse.

Ce groupe de recherche a ensuite souhaité déterminer les facteurs pouvant induire l'expression d'APJ dans les foies cirrhotés [Melgar-Lesmes, et al. 2011]. Ils ont donc étudié, dans la lignée LX-2 mais aussi dans la lignée d'hépatocytes humains HepG2, l'expression d'APJ suite à une hypoxie. L'expression protéique d'APJ est induite dans les deux lignées cellulaires. Ces cellules ont également été traitées avec du TNF α , du LPS, de l'AngII et de l'ET-1, et de façon intéressante, ces facteurs régulent l'expression d'APJ de façon totalement différente selon le type cellulaire. Dans les LX-2, seul le LPS augmente son expression, et elle est diminuée par le TNF α , l'AngII et l'ET-1. Dans les HepG2 par contre, le LPS et l'ET-1 n'ont aucun effet, et le TNF α et l'AngII augmentent l'expression d'APJ, d'un facteur 10 et 3, respectivement.

Le traitement de ces cellules à l'apeline a permis de comprendre son rôle pathogénique dans la cirrhose : dans les LX-2, elle induit l'expression de l'angiopoïétine-1, qui peut participer au développement de la fibrose hépatique [Taura, et al. 2008], et stimule leur survie.

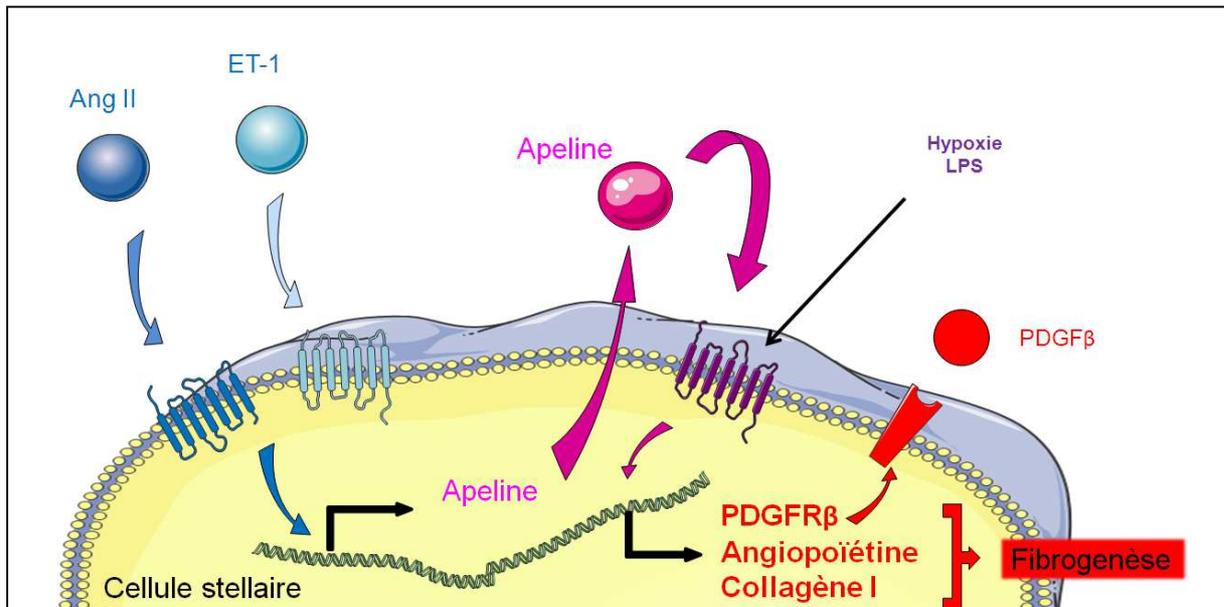


Figure 16. Rôle pro-fibrosant de l'apeline dans le foie cirrhoté.

Proposé par les études *in vitro* de Melgar-Lesmes et al [Melgar-Lesmes, et al. 2010], [Melgar-Lesmes, et al. 2011]. L'angiotensine II (AngII) et l'endothéline-1 (ET-1) induisent l'expression de l'apeline, qui, une fois sécrétée, se lie à APJ et induit la transcription de gènes pro-fibrosant. L'augmentation de l'expression d'APJ est stimulée par l'hypoxie et le LPS. Le PDGF peut être produit par les hépatocytes stimulés par l'apeline.

Dans les cellules HepG2, l'apeline induit l'expression du vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) et du PDGF- β . Ainsi, au modèle proposé précédemment, les auteurs ajoutent un effet de l'apeline sur les cellules stellaires en promouvant leur survie et leur prolifération, via l'angiopoïétine-1, mais aussi via la production de PDGF- β par les hépatocytes. L'apeline pourrait également promouvoir l'angiogenèse dans le foie, en induisant la sécrétion de VEGF-A par les hépatocytes (bien qu'ils aient seulement détecté APJ sur les HepG2 et dans les hépatocytes de rats).

Le rôle pro-fibrosant de l'apeline dans la cirrhose est confirmé par l'étude de Reichenbach et al [Reichenbach, et al. 2012], qui montre qu'après 4 semaines de traitement avec le F13A de rats ayant une cirrhose expérimentale, les taux plasmatiques des transaminases hépatiques ALAT et ASAT, et l'expression génique du TGF β R1, du PDGFR β , et d' α SMA dans le foie sont diminués. L'apoptose est elle aussi diminuée par le traitement. De plus, une étude histologique des foies montre une diminution de l'infiltration macrophagique, de la prolifération des vaisseaux sanguins, et des dépôts de collagène dans le foie suite au traitement avec le F13A.

Le dépôt excessif de collagène est le résultat d'un déséquilibre entre la production et la dégradation de la MEC. Le ratio MMP/TIMP permet d'évaluer l'efficacité du système de dégradation de la MEC : lorsqu'il est diminué, cela signifie que les MMP (les métalloprotéinases qui dégradent la MEC) sont moins nombreuses que leurs inhibiteurs (les TIMP, pour tissue inhibitors of MMP), et cela résulte en une accumulation excessive de MEC. Le traitement au F13A augmente ce ratio, et diminue l'expression de collagène, ce qui explique la diminution de zones fibrosées dans le foie des rats traités. De plus, l'expression de l' α SMA étant diminuée, cela pourrait signifier que le F13A limite l'activation des cellules stellaires.

Cette étude montre qu'en plus de l'induction de l'expression de gènes pro-fibrotiques comme le collagène et le PDGFR β [Melgar-Lesmes, et al. 2010] et de l'angiopoïétine-1 [Melgar-Lesmes, et al. 2011] dans les cellules stellaires, l'apeline pourrait aussi diminuer la capacité de dégradation de la MEC et promouvoir l'angiogenèse et l'inflammation dans le foie, ce qui contribuerait à la mise en place et/ou à l'aggravation de la cirrhose.

L'étude de Yokomori et al, qui localisait APJ dans les cellules sinusoidales et stellaires, a étudié l'expression d'APJ dans des modèles *in vitro* de cellules stellaires et de cellules sinusoidales [Yokomori, et al. 2011]. Le PDGF, le TGF β , le TNF α et l'ET-1 sont capables d'induire l'expression d'APJ dans les cellules stellaires, suggérant qu'APJ est surexprimé lorsque les cellules stellaires sont activées. On note que dans une lignée différente de cellules stellaires, les LX-2, le TNF α et l'ET-1 ont pour effet de diminuer l'expression d'APJ [Melgar-Lesmes, et al. 2011]. Dans les cellules endothéliales par contre, l'expression d'APJ n'est pas modifiée lorsque leur prolifération est activée par le VEGF.

Avec une augmentation de l'expression de l'apeline localisée dans les capillaires et les sinusoides, les deux études de Yokomori suggèrent que la double localisation d'APJ sur les cellules endothéliales et stellaires mène à des effets différents de l'apeline [Yokomori, et al. 2011], [Yokomori, et al. 2012] :

En agissant de manière autocrine sur les cellules endothéliales, elle promeut l'angiogenèse des capillaires qui rejoignent les sinusoides, ce qui augmente le flux sanguin provenant de l'espace porte, et dans le cas de la cirrhose cela mène à une hypertension portale. Ensuite, APJ étant augmenté dans les cellules stellaires activées, l'apeline pourrait donc, de façon paracrine, participer à leur prolifération et leur activation en myofibroblastes. Ces

résultats nous éclairent sur un rôle potentiel du système apeline/APJ dans le remodelage vasculaire du foie cirrhotique.

Toutes ces études reliant l'apeline et APJ à la pathologie hépatique sont d'accord sur un point : l'implication de l'apeline dans la cirrhose. Mais la localisation de l'apeline et d'APJ est un point discordant entre ces études. Yokomori et al discutent ce point en précisant qu'avec les techniques d'immunohistochimie, il est difficile de distinguer les cellules stellaires des cellules endothéliales des sinusoides. Leur étude de coupes de foies par microscopie électronique permet une localisation plus fine, montrant la présence de l'apeline et d'APJ dans des cellules sinusoidales de foies cirrhotiques.

Cela veut-il pour autant dire que les cellules stellaires présentant un marquage apeline ou APJ en immunofluorescence dans les études de Melgar-Lesmes, seraient en fait des cellules endothéliales ? La colocalisation de l'apeline et d'APJ avec l' α SMA et la morphologie "étoilée" de ces cellules tendent à montrer que ce sont bien des cellules stellaires activées en myofibroblastes, bien que cela soit moins net pour l'apeline.

Dans la lignée des études conférant un rôle délétère à APJ dans le foie, Yasusaki et al [Yasuzaki, et al. 2013] ont étudié la réponse de souris à un anticorps agoniste de Fas (Jo2), qui a pour effet d'induire une fibrose et une insuffisance hépatique fulgurante, mortelle en quelques heures. L'injection intra péritonéale de Jo2 atteint la morphologie du foie, qui devient plus gros, et qui présente des hémorragies et des zones nécrosées. De façon intéressante, l'expression de l'apeline et d'APJ est augmentée 6 heures après l'injection de Jo2, et l'expression protéique d'APJ est confirmée par western blot sur lysat total de foie et sur lysat d'hépatocytes isolés, ce qui concorde avec l'étude de Principe et al, qui identifiait APJ dans le parenchyme [Principe, et al. 2008]. Ils ont donc étudié les effets de Jo2 sur des souris invalidées pour le gène d'APJ.

Les souris APJ^{-/-} sont protégées de ces effets, et ont des concentrations plasmatiques d'ALAT et ASAT réduites par rapport aux souris wt. La phosphorylation de JNK et de Jun, et l'activation des caspases 3, 8 et 9 observées dans le foie des souris wt à la suite de l'injection de Jo2 n'a pas lieu dans le foie des souris KO. Après s'être assuré que les souris KO possèdent autant de récepteurs Fas que les wt, les auteurs ont pu conclure que l'apeline, via APJ, participe aux effets hépatotoxiques de l'activation de Fas. Bien que ce modèle de "liver injury" soit extrême et ne reflète aucune condition physiopathologique, il a permis de montrer que la

signalisation d'APJ peut jouer un rôle dans la nécrose hépatique, en activant les kinases de stress et certaines caspases.

Ces 6 études incriminant le couple apeline/APJ dans la pathologie hépatique ne concernent que des pathologies très avancées du foie, à savoir la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire chez l'Homme [Melgar-Lesmes, et al. 2010], [Melgar-Lesmes, et al. 2011], [Yokomori, et al. 2011], [Yokomori, et al. 2012], et une insuffisance hépatique extrême chez le rat [Principe, et al. 2008]. Les études de localisation de l'apeline et d'APJ ont été menées sur des foies de patients atteints d'hépatite C, responsable de ces pathologies, il faut donc rester prudent avant d'extrapoler l'implication de l'apeline et d'APJ dans la mise en place ou l'aggravation d'une cirrhose résultant d'une stéatose non alcoolique associée à l'obésité et à l'insulino-résistance.

2) Rôle du système apeline/APJ dans la résistance à l'insuline hépatique

Si l'on se place dans le contexte d'une résistance à l'insuline, l'implication du système apeline/APJ dans le foie n'a jamais été étudiée, si ce n'est dans une étude parue cette année, qui a évalué les effets de l'apeline dans un modèle artificiel d'insulino-résistance hépatique [Chu, et al. 2013]. Les auteurs ont traité des hépatocytes isolés de souris et des HepG2 avec du TNF α . L'insulino-résistance a été confirmée par l'augmentation de la phosphorylation de JNK et d'IRS-1 sur la ser307, et d'une diminution de la phosphorylation d'Akt, et de la Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3) suite à une stimulation à l'insuline. Parallèlement, le contenu en glycogène des cellules est diminué après un traitement au TNF α . Un traitement à l'apeline reverse les effets néfastes induits par le TNF α dans les hépatocytes murins isolés et en culture, mais elle n'a pas d'effet sur les cellules non traitées au TNF α . Les mêmes résultats ont été obtenus *in vivo*, 10 minutes après l'injection ip d'apeline chez des souris ayant été exposées au TNF α pendant 7 jours. Ces effets sont bien la conséquence de la liaison de l'apeline à APJ, puisque son blocage par l'antagoniste F13A reverse les effets bénéfiques de l'apeline. De plus, chez ces souris, la glycémie à jeun est doublée par le traitement au TNF α , et cette augmentation est diminuée par l'injection d'apeline.

Le fait qu'APJ soit présent dans le foie des souris, mais pas l'apeline, a conduit les auteurs à penser que l'apeline, en tant que facteur circulant, peut atteindre les hépatocytes, se

lier à APJ à leur surface, et induire une signalisation intracellulaire qui rétablit la signalisation insulinique. La diminution des taux de ROS que les auteurs observent dans les HepG2, suite au traitement à l'apeline, est un mécanisme potentiellement responsable du rétablissement de la sensibilité à l'insuline, et reste à être confirmé *in vivo*.

Cette étude est la première rapportant un effet bénéfique de l'apeline dans le foie, et cela en condition de résistance à l'insuline. Cela serait cohérent avec son statut d'adipokine bénéfique, bien qu'aucun effet métabolique n'ait été étudié suite au traitement de ces animaux avec l'apeline. Le contraste avec les études précédemment citées est probablement dû au type et à la gravité des pathologies considérées. La cirrhose et le carcinome hépatocellulaire sont des pathologies dans lesquelles la fibrose et l'angiogenèse jouent un rôle très important, et le rôle pro-angiogénique de l'apeline en fait un facteur qui va plutôt aggraver ces pathologies.

La diminution de la phosphorylation de JNK induite par l'apeline dans l'étude de Chu et al [Chu, et al. 2013] semble contradictoire avec les travaux de Yasuzaki et al, qui montraient une absence de phosphorylation de JNK dans le foie de souris APJ^{-/-} traitées avec le Jo2 [Yasuzaki, et al. 2013], cependant les conditions expérimentales sont différentes, de même que le fond génétique des animaux. On ne peut donc pas exclure que la signalisation d'APJ aboutisse à des effets différents dans le foie, selon la condition physiopathologique dans laquelle il se trouve.

Bien que cette étude montre un effet bénéfique de l'apeline sur le foie rendu insulino-résistant par le TNF α , la régulation et le rôle du système apeline/APJ dans le foie restent à déterminer en condition de résistance à l'insuline associée à une obésité et dans le cas d'un diabète de type II.

En effet, le TNF α est une cytokine largement utilisée dans des modèles animaux et cellulaires pour induire une résistance à l'insuline [Hotamisligil, et al. 1994], [Ranganathan, et al. 1996], [Lang, et al. 1992], mais le foie d'un obèse diabétique est également stéatosé, et il est possible que la liaison de l'apeline à APJ, s'il est présent dans un foie insulino-résistant stéatosé, y induise des effets différents de ceux observés dans le foie de souris simplement traitées au TNF α .

3) Taux d'apeline et pathologies hépatiques

L'étude de Principe et al montre que l'apelinémie de patients ayant une cirrhose est 3 fois plus élevée que celle des sujets sains [Principe, et al. 2008]. Suite à cette publication, des études épidémiologiques mesurant les taux d'apeline chez des patients atteints de pathologies hépatiques ont été menées.

Deux études [Ercin, et al. 2010], [Aktas, et al. 2011] montrent que les patients atteints de stéatose et de NASH ont une apelinémie plus élevée que les patients sains. Cependant, après ajustement avec l'IMC et l'indice HOMA-IR, cette différence n'est pas conservée, suggérant que l'augmentation observée est une conséquence de l'insulinémie plutôt que de la pathologie hépatique. La différence avec l'étude de Principe et al réside dans les patients recrutés, qui ne présentent pas de pathologie aussi avancée que la cirrhose. Une autre étude a mesuré les taux d'apeline chez des patients atteints de NAFLD induite par le virus de l'hépatite C [El-Mesallamy, et al. 2011]. Elle montre que les taux d'apeline sont plus élevés chez les patients atteints que chez les sujets sains, et que ces taux augmentent progressivement avec le degré de l'atteinte hépatique et ce, même après ajustement avec l'IMC, la triglycémie, et la cholestérolémie.

Doit-on alors considérer l'apeline comme une nouvelle hépatokine ? Selon Principe et al, l'apeline hépatique semble être responsable de l'augmentation de l'apelinémie chez les rats ayant une cirrhose, mais les études humaines concernant la simple stéatose ne montrent pas de corrélation entre l'apelinémie et la NAFLD indépendamment de l'insulinémie. Cependant on ne peut pas exclure un effet paracrine de l'apeline dans le foie, et une quantification de l'apeline et d'APJ dans le foie de patients ayant une stéatose permettrait de répondre à cette question. Mais pratiquer une biopsie hépatique chez des patients "seulement" obèses, diabétiques et stéatosés soulève une question éthique, il est donc difficile d'obtenir ce genre d'information pour des foies simplement stéatosés.

Chapitre IV

L'EPA : Un acide gras qui vous veut du bien

I) Les acides gras polyinsaturés, essentiels au fonctionnement de l'organisme

1) Description des acides gras polyinsaturés

Les acides gras saturés, ou SFA (Saturated Fatty Acids) possèdent uniquement des liaisons covalentes simples entre leurs atomes de carbones, souvent pairs. Les acides gras monoinsaturés, ou MUFAs (Mono-Unsaturated Fatty Acids), possèdent une double-liaison ou insaturation, et les acides gras polyinsaturés ou PUFAs (Poly-Unsaturated Fatty Acids) en possèdent plusieurs.

Les MUFAs et les PUFAs sont dits "coudés", car chaque insaturation *cis* introduit une angulation de 120° de la molécule. Ainsi, en augmentant leur occupation spatiale, les insaturations confèrent aux MUFAs et PUFAs la propriété d'augmenter la fluidité des membranes biologiques. Plus un acide gras a d'insaturations, plus il contribue à la fluidité des membranes, qui est nécessaire à de nombreuses fonctions vitales, comme la transmission synaptique [Zimmer, et al. 2000] ou le bon fonctionnement des érythrocytes [Poschl, et al. 1996].

La nomenclature qui sera utilisée tout au long de ce manuscrit est la numérotation oméga, qui prend en compte le 1^{er} carbone impliqué dans une insaturation, en partant de l'extrémité méthyle (Tableau 2). Ainsi, l'acide eicosapentaénoïque (EPA) est représenté par "C20:5 ω3", car il possède 20 atomes de carbone, et 5 insaturations dont la première est située sur le 3^{ème} carbone en partant de l'extrémité méthyle.

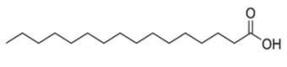
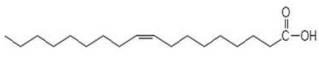
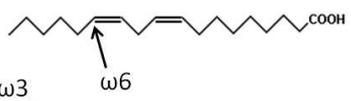
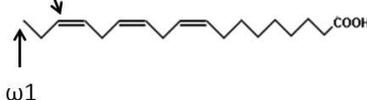
Classe	Conformation	Exemples d'acides gras
Saturés		 Acide palmitique C16:0
Mono-insaturés		 Acide oléique C18:1
Poly-insaturés		 Acide linoléique C18:2 ω6  Acide α-linolénique C18:3 ω3  EPA C20:5 ω3  DHA C22:6 ω3

Tableau 2. Classification et nomenclature des acides gras saturés, mono-insaturés et poly-insaturés. EPA : acide eicosapentaénoïque, DHA : acide docosapentaénoïque.

2) Sources de PUFAs dans l'alimentation

Les acides gras essentiels sont ceux que notre organisme ne peut pas biosynthétiser, à savoir les PUFAs des familles des $\omega 3$ et des $\omega 6$. En effet, nous ne possédons pas l'enzyme capable de créer une insaturation en position $\omega 3$ ou $\omega 6$ [Ratnayake, et al. 2009], nous les trouvons donc dans l'alimentation. L'acide α -linoléique (ALA, C18:3 $\omega 3$) est contenu dans les végétaux comme les graines de lin et de colza, dans les noix, le soja ou encore le chanvre. L'EPA (acide eicosapentaénoïque, C20:5 $\omega 3$) et le DHA (acide docosahéxaénoïque, C22:6 $\omega 3$) par contre, sont trouvés majoritairement dans les poissons gras et les huiles de poisson comme l'huile de foie de morue. Les poissons ne les synthétisent pas eux-mêmes, mais les absorbent lorsqu'ils ingèrent les algues et le plancton. Les $\omega 6$, eux, sont contenus dans la viande, les œufs, les noix, et dans la plupart des huiles alimentaires utilisées dans les sociétés occidentales.

3) Biosynthèse des PUFAs

En ingérant les précurseurs de ces familles, il nous est possible de les convertir en d'autres acides gras essentiels. Les PUFAs de la famille des $\omega 3$ sont synthétisés à partir de leur précurseur, l'ALA (C18:3 $\omega 3$) (Figure 17). L'enzyme Δ^6 -désaturase, après l'ajout d'une

insaturation, le transforme en acide stéaridonique (C18:4 ω 3), puis sa chaîne aliphatique est allongée, après l'ajout de deux atomes de carbone par l'élongase Elovl5, pour donner l'acide eicosatétraénoïque (C20 :4 ω 3). C'est l'action de la Δ^5 -désaturase qui le transforme alors en EPA (C20:5 ω 3). La biosynthèse se poursuit, alternant les réactions d'élongations et de désaturations, pour aboutir au DHA (C22:6 ω 3). Une rétroconversion du DHA en EPA est possible grâce à une étape de β -oxydation peroxysomale, et a été observé *in vitro* [Gronn, et al. 1991], [Sprecher 2000] et *in vivo* [Lefils, et al. 2010].

Les ω 6, eux sont synthétisés à partir de l'acide linoléique (LA, C18 :2 ω 6). Il entre en compétition avec l'ALA pour la Δ^6 -désaturase [Parker-Barnes, et al. 2000], pour donner un acide γ -linoléique (GLA, C18:3 ω 6), qui après élongation par l'Elovl5, devient l'acide dihomogamma-linoléique (DGLA, C20:3 ω 6), précurseur de l'acide arachidonique (AA, C20:4 ω 6). Ici aussi les réactions se succèdent pour aboutir à l'acide docosapentaénoïque (DPA, C22:5 ω 6).

Ainsi, en théorie, l'organisme des mammifères peut synthétiser l'EPA et le DHA à partir de l'ALA. Pourtant, des études suivant le devenir d'ALA radioactif après son injection chez l'Homme et des rats montrent qu'un très faible pourcentage d'ALA est convertit en EPA (8%) ou en DHA (<0,1%) [Williams, et al. 2006], [Attar-Bashi, et al. 2007], [Burdge, et al. 2003], rendant importante la consommation d'aliment en contenant.

4) Métabolites actifs dérivés des PUFAs

Les ω 3 et ω 6 peuvent également servir de précurseurs à des dérivés cyclisés et oxygénés, à savoir les prostaglandines (PG), les prostacyclines (PGI) et thromboxanes (TX) via l'action de la cyclo-oxygénase (COX), et les leucotriènes (LT) via l'action de la lipo-oxygénase (LOX) sur l'EPA et l'AA majoritairement (Figure 17). Ils sont regroupés sous le nom d'eicosanoïdes, étant dérivés d'acides gras possédant 20 carbones, et leurs rôles seront détaillés par la suite. Les époxydes et les oxylipines font aussi partie de ces eicosanoïdes [Poudyal, et al. 2011].

Les prostaglandines sont synthétisées dans tous les organes, les prostacyclines sont synthétisées particulièrement dans l'endothélium et les cellules musculaires lisses vasculaires, alors que les thromboxanes sont surtout synthétisées dans les plaquettes sanguines. Les

leucotriènes, eux, sont synthétisés par les leucocytes, monocytes et macrophages au cours de la réponse immunitaire.

De façon globale, les eicosanoïdes dérivés de l'EPA (PGE₃, PGI₃, PGD₃ ; TXA₃ ; LTB₅, LTC₅, LTD₅) sont anti-inflammatoires et anti-coagulants, alors que ceux issus de l'AA (PGE₂, PGI₂, PGD₂ ; TXA₂ ; LTB₄, LTC₄, LTD₄) sont pro-inflammatoires et thrombogènes. De façon intéressante, le DGLA (C20:3 ω6) peut lui aussi être le précurseur d'eicosanoïdes, qui sont de puissants anti-inflammatoires, vasodilatateurs, et anti-coagulants [Kapoor, et al. 2006].

Le ratio entre les eicosanoïdes pro et anti-inflammatoires dépend de la disponibilité de leurs précurseurs. Par exemple, l'augmentation d'ALA (C18:3 ω3) dans le régime de rats a pour effet de réduire la production de prostaglandines issues de l'AA (C20:4 ω6) [Hwang, et al. 1980].

Les eicosanoïdes possèdent leurs propres récepteurs, qui sont transmembranaires, de type RCPG, ou intracellulaires comme les PPARs, qui ont des rôles distincts au cours de différentes réponses physiologiques.

Les eicosanoïdes sont eux-aussi des précurseurs de molécules actives. Parmi elles, les résolvines des séries E et D, sont respectivement synthétisées à partir d'EPA et de DHA [Serhan 2007], par action de la COX et de la LOX. Les résolvines permettent un retour des tissus à l'homéostasie après un événement inflammatoire. Dans les macrophages, le DHA peut générer des protectines et des marésines [Serhan, et al. 2009], qui participent également à la résolution de l'inflammation. Parmi les autres molécules dérivées des eicosanoïdes, on retrouve les lipoxines, les neuroprotectines, les hépoxilines et les éoxines, dont la synthèse requiert l'action de la COX et de l'aspirine, ou de plusieurs LOX.

Figure 17. La biosynthèse des acides gras poly-insaturés (PUFA) des familles ω3 et ω6. (page suivante)

D'après Poudyal, et al. 2011. Les désaturases et élongases (elovl) sont impliquées dans la biosynthèse des deux familles de PUFAs, qui sont donc en compétition pour ces enzymes. L'action de la cyclo-oxygénase (COX) génère les prostaglandines (PGE, PGD), les prostacyclines (PGI) et les tromboxanes (TXA); la lipo-oxygénase (LOX) génère les leucotriènes (LT); le cytochrome P450 (CYP) génère les époxydes, les éoxines, et les hépoxilines. L'EPA et le DHA sont également les précurseurs des résolvines des séries E et D, respectivement, après l'action de la COX et de la LOX.

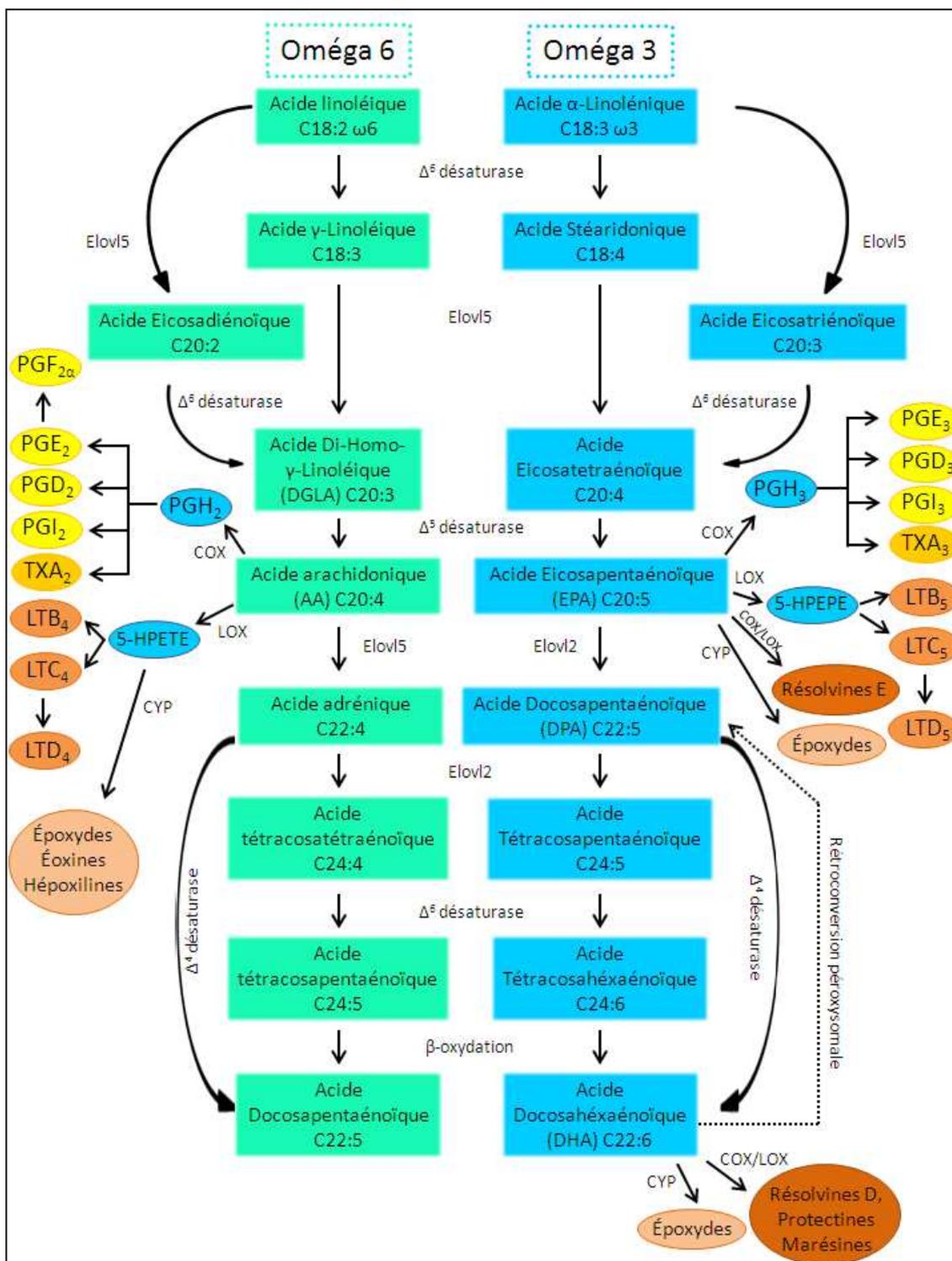


Figure 17. La biosynthèse des acides gras poly-insaturés (PUFA) des familles ω3 et ω6.

II) PUFAS et prévention de pathologies

Le ratio ω_6/ω_3 dépend du régime alimentaire, et il semble qu'il soit important pour le maintien de l'homéostasie. Le ratio obtenu par notre régime alimentaire occidental est estimé à au moins 10:1, alors que les ratios recommandés pour limiter les risques de cancers et de maladies cardiovasculaires par exemple, bien que variables, sont toujours inférieurs à 10:1 [Poudyal, et al. 2011].

1) PUFAs et maladies cardiovasculaires

Alors que l'implication potentielle des ω_6 dans les pathologies cardiovasculaires n'est pas clairement établie, l'augmentation de la consommation d'ALA, EPA et DHA est bénéfique, et réduit les risques de pathologies cardiovasculaires [Stanley, et al. 2007], [Griffin 2008]. Cela remet en cause l'idée que c'est le ratio ω_6/ω_3 qui est important, en ce qui concerne la sphère cardiovasculaire. Les effets cardioprotecteurs des ω_3 , surtout de l'ALA, l'EPA et du DHA, ont été bien largement étudiés et bien définis grâce à des études épidémiologiques, animales, et *in vitro* [Duda, et al. 2009a], [Poudyal, et al. 2013].

Les effets des ω_3 (ALA, EPA, DHA) sur l'hypertension ont également été largement documentés. Puisque la teneur en ω_3 du régime alimentaire diffère entre les pays et les cultures, l'étude INTERMAP (International collaborative study of macronutrients, micronutrients and blood pressure) s'est affranchie de ces disparités en recrutant 4680 sujets vivant au Japon, en Chine, aux Etats-Unis et en Angleterre. Cette étude menée en 2007 a montré que la pression artérielle est inversement corrélée à la quantité d'EPA et de DHA dans le régime alimentaire [Ueshima, et al. 2007]. De plus, bien que toutes les études n'obtiennent pas les mêmes résultats, des méta-analyses d'études cliniques ont montré que les ω_3 contenus dans l'huile de poisson, principalement l'EPA et le DHA, permettent, en comparaison avec un placebo, une diminution de l'hypertension de patients hypertendus non traités [Morris, et al. 1993], [Appel, et al. 1993]. De façon intéressante, la privation de ces acides gras essentiels, induit une hypertension chez le rat lorsqu'elle a lieu après la naissance [Begg, et al. 2010], mais aussi lorsqu'elle a lieu durant la période prénatale [Armitage, et al. 2003].

Les effets hypotensifs des ω 3 sont en partie médiés par l'action des eicosanoïdes vasodilatateurs dérivés de l'EPA, mais l'EPA lui-même peut agir sur la vasoconstriction induite par l'AngII ou la noradrénaline, sans faire intervenir d'intermédiaires produits par la COX ou la LOX [Juan, et al. 1986]. Le système rénine-angiotensine peut être inhibé par les PUFAs directement, qui agissent sur l'activité de l'ACE2 (EPA>ALA>DHA>GLA>LA>AA) [Kumar, et al. 1997]. L'amélioration de la fonction endothéliale par le DHA chez des patients en surpoids et hyperlipidémiques implique une augmentation de la production de **NO** [Mori, et al. 2000]. L'implication du NO a été récemment confirmée par Wu et al : en traitant des animaux aortiques de souris eNOS^{-/-} avec de l'EPA, la vasodilatation normalement induite par l'EPA n'a pas lieu [Wu, et al. 2012]. De plus, chez des souris AMPK α ^{-/-}, cet effet est également supprimé, rapportant une implication de l'activation de l'AMPK dans l'effet vasodilatateur de l'EPA [Wu, et al. 2012].

Ainsi les ω 3 sont bénéfiques contre l'hypertension, en agissant directement ou en générant des eicosanoïdes vasodilatateurs tels que la PGI₃, et en inhibant la formation de composés vasoconstricteurs tels que le TXA₂ [Poudyal and Brown 2013].

2) PUFAs et stress oxydant

Certaines études animales montrent que les ω 3 ont un effet bénéfique sur le stress oxydant causé par une insuffisance rénale chez le rongeur : l'huile de poisson, l'EPA ou le DHA diminuent les taux plasmatiques de marqueurs de stress oxydant dans des modèles d'athérosclérose [Mavrommatis, et al. 2010] et de diabète de type I [Arnal, et al. 2009]. *In vitro*, les PUFAs peuvent augmenter l'activité de l'hème-oxygénase-1, une enzyme antioxydante dans une lignée oligodendrogliale [Brand, et al. 2010], mais dans des cellules endothéliales, le DHA augmente la production de ROS [Tardivel, et al. 2009].

Chez l'Homme, aucune étude n'a montré de diminution de marqueurs plasmatiques (malondialdéhyde, diènes conjugués, NO plasmatique, lipides peroxydés, LDL oxydées, activité NADPH oxydase, xanthine oxydase, glutathion peroxydase, SOD) ou urinaires (isoprostanés F2) du stress oxydant, qu'il soit induit par un effort physique, ou associé à une dyslipidémie (hypercholestérolémie ou hypertriglycéridémie), après une supplémentation alimentaire en ω 3. Par contre, chez des patients hémodialysés, une supplémentation en EPA+DHA pendant 2 mois a permis d'augmenter l'activité plasmatique de systèmes antioxydants tels que la glutathion

péroxydase, et la supéroxyde dismutase, parallèlement à une diminution du malondialdéhyde plasmatique [Tayyebi-Khosroshahi, et al. 2010]. Les ω 3 pourraient donc, en augmentant le potentiel antioxydant de l'organisme, avoir un effet bénéfique contre le stress oxydant, bien que les études chez l'Homme peinent à le confirmer.

3) PUFAs et inflammation

Les eicosanoïdes proinflammatoires dérivés de l'AA (C20:4 ω 6) sont nécessaires à la réponse inflammatoire suite à une infection pathogène par exemple, cependant une production trop importante de ces eicosanoïdes peut se révéler délétère. La compétition qu'il existe entre les ω 3 et les ω 6 pour les élongases et les désaturases fait qu'une augmentation en ω 3 (ALA, EPA, DHA) limite la formation d'eicosanoïdes proinflammatoires tels que les leucotriènes LTB₄ et les prostaglandines PGE₂ ou les prostacyclines PGI₂ [Hwang and Carroll 1980].

De plus, des études cliniques menées sur des patients dyslipidémiques [Derosa, et al. 2009], atteints du syndrome métabolique [Ebrahimi, et al. 2009], de sclérose en plaque [Ramirez-Ramirez, et al. 2013] ou de maladies cardiovasculaires [de Mello, et al. 2009], montrent qu'une supplémentation en ω 3 (huile de poisson, EPA, DHA ou ALA) a pour effet de diminuer les concentrations plasmatiques du TNF α , de la protéine C-réactive, de l'IL1, et de IL6.

Chez l'animal, la supplémentation en EPA+DHA de rats ayant une insuffisance rénale diminue la concentration plasmatique de MCP-1 [An, et al. 2009], et chez des rats rendus insuffisants cardiaques par un banding aortique, une supplémentation en EPA+DHA a pour effet de réduire le TNF α plasmatique [Duda, et al. 2009b].

Les ω 3 peuvent agir sur l'inflammation en modulant le profil sécrétoire des cellules immunitaires. En effet, chez des sujets sains, les ω 3 modulent le profil d'expression des neutrophiles : une supplémentation en EPA réduit la transcription de leurs gènes codant pour l'IL1 β , l'IL5, l'IL17 et l'IL23 [Weaver, et al. 2009]. De plus, ces neutrophiles produisent moins de LTB₄ *ex vivo* [Weaver, et al. 2009], ce qui confirme leur profil moins inflammatoire lorsque l'apport en ω 3 est élevé. De même, des macrophages traités avec de l'EPA ou du DHA expriment et sécrètent moins de TNF α , d'IL6 et de MCP-1 par rapport aux cellules non traitées ou aux cellules traitées avec de l'acide palmitique (C16:0) [Wang, et al. 2009].

Les résolvines sont des médiateurs des effets anti-inflammatoires des ω 3 : elles diminuent la production de TNF α [Serhan, et al. 2008] et d'IL13 [Aoki, et al. 2008], et limitent l'infiltration de cellules inflammatoires dans un modèle animal d'asthme [Aoki, et al. 2008].

Ainsi les ω 3 exercent leurs effets anti-inflammatoires en agissant sur trois fronts : en limitant la production d'eicosanoïdes proinflammatoires, en inhibant la production de cytokines proinflammatoires par les cellules immunitaires, et en générant des métabolites tels que les résolvines. Nous verrons également les effets des ω 3 sur l'inflammation du tissu adipeux au cours de l'obésité dans la partie III de ce chapitre.

4) PUFAs et dyslipidémie

L'ALA exerce ses effets cardiovasculaires en améliorant le profil lipidique plasmatique en diminuant les taux de cholestérol total, de LDL-cholestérol et de TG, aussi bien chez des sujets sains que chez des patients hypercholestérolémiques. Les mêmes effets sont obtenus dans des modèles animaux d'hypercholestérolémie [Dupasquier, et al. 2006], [Dupasquier, et al. 2007], [Makni, et al. 2008].

Par contre, chez des sujets en surpoids, une supplémentation de 12 semaines en graines de *Salvia hispanica*, riches en ALA, n'a aucun effet sur les lipoprotéines plasmatiques, ni sur la concentration plasmatique en EPA ou DHA [Nieman, et al. 2009], ce qui confirme que la conversion de l'ALA en d'autres espèces d' ω 3 n'est pas efficace chez l'Homme. Par contre, chez des patients diabétiques et hyperlipidémiques déjà traités pour l'hyperlipidémie, une supplémentation en EPA+DHA est capable de réduire les taux sanguins de TG, de VLDL, et d'augmenter le taux de HDL-cholestérol [Valdivielso, et al. 2009].

Toutes ces données montrent bien un effet bénéfique des ω 3 sur la santé, et ces PUFAs sont également considérés comme une possibilité thérapeutique intéressante pour traiter la résistance à l'insuline.

III) Effets des PUFAS sur la résistance à l'insuline

1) Etudes épidémiologiques et cliniques

L'intérêt qui est porté aux $\omega 3$ et à l'insulino-résistance émerge de l'observation qui avait été faite dans une population Eskimo, qui avait un moindre taux de diabète de type II que le reste de la population [Mouratoff, et al. 1967] malgré une hyperlipidémie et un IMC élevé, et cette observation a été confirmée par deux études menées sur des Eskimos d'Alaska, du Canada et de Russie [Schraer, et al. 1988], [Young, et al. 1992]. Quelques années plus tard, une étude menée s'est intéressée à l'alimentation de ces populations, et a montré que chez les eskimos d'Alaska, la consommation quotidienne de poisson gras ou d'huile de phoque est associée à un moindre risque d'intolérance au glucose, indépendamment de l'âge, du sexe, et de l'IMC [Adler, et al. 1994]. Ces résultats sont cohérents avec l'idée que ce sont les types de graisses ingérées qui comptent, et non leur quantité : les Eskimos se nourrissant principalement de poissons gras, leur apport en $\omega 3$ est plus élevé que celui du reste de la population.

Si l'on revient aux populations occidentalisées, chez les personnes obèses, il existe une corrélation inverse entre l'EPA et le DHA contenus dans le régime alimentaire et l'IMC, le tour de taille et de hanche [Micallef, et al. 2009] et chez les diabétiques, la présence d' $\omega 3$ dans le régime est inversement associée avec les TG sanguins [Belalcazar, et al. 2010].

Les effets des $\omega 3$ sur la sensibilité à l'insuline, par contre, sont moins nets.

Chez des patients obèses, une supplémentation en huile de poisson durant 3 semaines n'a aucun effet sur la glycémie ou l'insulinémie [Pelikanova, et al. 1993], et la supplémentation alimentaire en graines ou en huile de lin, riches en ALA, de patients diabétiques de type II pendant 3 mois n'a pas d'effet sur leur contrôle glycémique, malgré une augmentation des taux circulants d'ALA, d'EPA et de DPA [Taylor, et al. 2010]. Une autre étude menée sur des femmes obèses et diabétiques a montré que la consommation d'huile de poisson riche en EPA pendant 2 mois diminue la masse grasse centrale, ainsi que la taille adipocytaire, mais n'a pas effet sur la sensibilité à l'insuline [Kabir, et al. 2007]. Chez des femmes atteintes du syndrome métabolique [Krebs, et al. 2006], la supplémentation en huile de poisson durant 6 mois n'apporte pas d'avantage supplémentaire à une restriction calorique, en ce qui concerne la perte de masse grasse et la sécrétion d'insuline suite à une charge en glucose. Une autre étude, menée sur des

sujets insulino-résistants non diabétiques, a montré que la consommation d' ω 3 pendant 3 mois réduit l'infiltration macrophagique du tissu adipeux, mais n'a pas d'effet sur la sensibilité à l'insuline [Spencer, et al. 2013].

Cependant d'autres études montrent un effet bénéfique sur la sensibilité à l'insuline chez des patients obèses et résistants à l'insuline. Une large étude menée sur plus de 300 sujets obèses a montré que la consommation d'EPA+DHA pendant 2 mois améliore la glycémie, l'insulinémie, et l'HOMA-IR, alors que la consommation de poisson gras (saumon) n'a pas les mêmes effets [Ramel, et al. 2008]. Les mêmes résultats ont été obtenus chez des femmes obèses supplémentées en EPA+DHA pendant 2 mois [Mohammadi, et al. 2012]. Chez des patients obèses, une consommation d' ω 3 pendant 6 mois a permis de diminuer l'HOMA-IR et le TNF α circulant [Spadaro, et al. 2008]. La sensibilité à l'insuline d'enfants en surpoids est améliorée après 6 mois de supplémentation en DHA [Nobili, et al. 2011], et chez des enfants et adolescents obèses et résistants à l'insuline, l'HOMA-IR est diminué après 3 mois de supplémentation en EPA+DHA, alors qu'un traitement à la Metformine ne permet pas d'obtenir ces résultats [Juarez-Lopez, et al. 2013], ce qui rend la supplémentation en ω 3 intéressante pour traiter l'insulino-résistance des enfants et adolescents, dont la prévalence est en constante augmentation [Caprio 2012].

La grande disparité des résultats obtenus par les nombreuses études cliniques ne nous permet pas de conclure quant à un effet bénéfique des ω 3 sur la sensibilité à l'insuline de patients obèses ou diabétiques, ce manque de certitude provenant du manque d'études menées sur le long terme, et sur un échantillon suffisamment important. Les effets bénéfiques montrés par certaines études, et l'association qu'il existe entre les taux d' ω 3 sanguins et la sensibilité à l'insuline, poussent quand même à vouloir comprendre comment ces ω 3 peuvent agir sur la sensibilité à l'insuline. Les études *in vitro* et les modèles animaux de résistance à l'insuline ont permis de décrypter certains mécanisme impliqués dans les effets des ω 3 sur le métabolisme énergétique et sur la sensibilité à l'insuline.

2) Modèles animaux et *in vitro*

➤ Effets généraux des ω 3 sur l'insulino-résistance.

Chez des rats nourris avec un régime hyperlipidique (HFD), la supplémentation en huile de poisson, ou en ω 3 purifiés (EPA, DHA ou EPA+DHA) entraîne une moindre prise de poids corporel et une diminution de divers dépôts adipeux [Hainault, et al. 1993], [Baillie, et al. 1999], [Belzung, et al. 1993], [Perez-Matute, et al. 2007], [Takahashi, et al. 2000], parfois associées à une réduction de l'hypertrophie adipocytaire [Belzung, et al. 1993], [Parrish, et al. 1990]. La supplémentation en huile de poisson empêche le développement de l'insulino-résistance induite par un HFD chez le rat, notamment dans le foie et le muscle [Storlien, et al. 1987]. Une étude menée en 1999 suivant le devenir du glucose lors d'un clamp euglycémique hyperinsulinémique de rats nourris avec un HFD a montré que l'huile de poisson, par rapport à l'huile de carthame (riche en ω 6) améliore la sensibilité à l'insuline, en favorisant la glycolyse musculaire et en diminuant les TG intramusculaires [Jucker, et al. 1999].

Une étude a comparé les effets de différents PUFAs sur la sensibilité à l'insuline de rats. Après 8 semaines, l'EPA et le DHA diminuent la glycémie et l'insulinémie à jeun et l'HOMA-IR des animaux de façon comparable, le mélange EPA+DHA de façon plus marquée, et l'ALA a un effet moins marqué que l'EPA et le DHA [Andersen, et al. 2008b], ce qui confirme que ces deux PUFA sont métaboliquement plus actifs que leur précurseur.

Les effets insulino-sensibilisateurs des ω 3 sont également retrouvés chez des souris nourries avec un HFD, chez qui ils améliorent la tolérance au glucose et diminuent la stéatose [Liu, et al. 2013] et impliquent une diminution de l'inflammation du tissu adipeux [Kalupahana, et al. 2010]. Dans le modèle de souris ob/ob, une supplémentation en ω 3 augmente la sensibilité à l'insuline du muscle et du foie, augmente l'activation de l'AMPK dans le muscle et le tissu adipeux, et ces effets sont associés à une diminution de la stéatose, une augmentation de la sécrétion d'adiponectine et de l'expression génique de PPAR γ , de GLUT4 et d'IRS-1 dans le tissu adipeux, et de GLUT2 et d'IRS-2 dans le foie [Gonzalez-Periz, et al. 2009]. Une analyse lipidomique chez ces animaux montre que la supplémentation en ω 3 favorise la production de résolvines et de protectines, et qu'elle inhibe celle d'eicosanoïdes dérivés des ω 6 [Gonzalez-Periz, et al. 2009]. Plus récemment, une étude menée sur le hamster nourri avec un HFD a montré que la prise de poids est empêchée par la supplémentation en ω 3, et l'intolérance au

glucose induite par le HFD est diminuée. Leur hypertriglycéridémie post-prandiale est également diminuée, ainsi que la production de VLDL et l'expression génique de SREBP-1c, FAS, SCD1 et DGAT dans le foie [Kasbi Chadli, et al. 2011].

Toutes ces études menées chez l'animal montrent bien que l'EPA, administré en même temps qu'un régime gras, permet de ralentir voire d'empêcher l'apparition de l'obésité et des signes de l'insulino-résistance, mais de façon remarquable, il est aussi capable de reverser une insulino-résistance déjà installée chez des souris. En effet, dans l'étude de Kalupahana, des souris gluco-intolérantes suite à un régime gras pendant 6 semaines, voient leur intolérance au glucose et leur stéatose hépatique diminuer après 5 semaines de ce même régime, supplémenté en EPA, sans pour autant qu'il y ait un effet sur la masse grasse [Kalupahana, et al. 2010].

Les effets bénéfiques des ω 3 sur le métabolisme énergétique sont en général médiés par l'activation du récepteur nucléaire PPAR α : la supplémentation en huile de poisson limite l'apparition de la résistance à l'insuline de souris nourries avec un HFD, et chez les souris PPAR $\alpha^{-/-}$, l'huile de poisson ne parvient pas à limiter la résistance à l'insuline et la production endogène de glucose mesurées lors d'un clamp euglycémique-hyperinsulinémique [Neschen, et al. 2007]. Une étude nutriginomique a confirmé l'implication de PPAR α , en montrant que la majorité des gènes régulés dans le foie de souris par les ω 3, particulièrement le DHA, le sont via PPAR α , puisque tous ces gènes ne sont pas modulés chez les souris PPAR $\alpha^{-/-}$ [Sanderson, et al. 2008].

➤ Effets sur le transport de glucose

L'étude de Storlien et al [Storlien, et al. 1987] a montré que la supplémentation en huile de poisson augmente le transport de glucose dans les muscles squelettiques oxydatifs (muscle soléaire et gastrocnémien rouge) stimulés par l'insuline *in vivo*. Cet effet pourrait être dû à l'augmentation de la translocation des GLUT4, mais la supplémentation en ω 3 de rats sous régime HFD permet de limiter la diminution de l'expression de GLUT4 observée dans le tissu adipeux des animaux HFD [Takahashi and Ide 2000].

In vitro par contre, c'est le transport de glucose basal qui est amélioré, après un traitement avec de l'EPA pendant 24h sur des myocytes C2C12 [Figueras, et al. 2011]. C'est

aussi le cas dans des myocytes humains en culture primaire [Aas, et al. 2006], et dans ces cellules, l'augmentation du transport basal est due à l'augmentation de l'expression génique de GLUT-1.

➤ Effets sur la prise en charge des lipides

Le fait que chez les animaux, l'ingestion d' ω 3 résulte en une moindre prise de poids et de masse grasse sous régime hyperlipidique, alors que la prise alimentaire n'est généralement pas modifiée, suggère qu'une augmentation de la dépense énergétique peut participer à une moindre prise de poids. En effet, des rats nourris avec un régime contenant de l'huile de poisson ont une dépense énergétique au repos plus importante que des rats nourris avec la même quantité d'huile de maïs [Baillie, et al. 1999], et cela semble être le résultat d'une augmentation de la β -oxydation peroxysomale, car le gène de l'acyl-coA oxydase est plus exprimé dans le muscle squelettique, le cœur et le foie, et UCP3 est plus exprimé dans le muscle squelettique des rats nourris avec l'huile de poisson.

Ainsi, la consommation d' ω 3 redirigerait les lipides vers le catabolisme, plutôt que vers le stockage dans les muscles et le foie, où leur présence est délétère. En effet, chez des rats nourris avec un régime HFD supplémenté en huile de poisson, l'activité de CPT1 est augmentée dans le cœur et les muscles squelettiques dès 4 semaines, et la CPT1 est moins sensible au malonyl-coA [Power, et al. 1997]. De même, les souris nourries avec un HFD contenant de l'EPA+DHA ont une plus forte expression génique de CPT1a et de PGC1 α dans le tissu adipeux épидидymaire, associée à une augmentation de la β -oxydation et une diminution de la lipogenèse [Flachs, et al. 2005]. De même, une supplémentation en EPA de souris nourries avec un HFD augmente l'expression et l'activité de la CPT1 et diminue celles de la FAS dans le foie [Liu, et al. 2013], [Umeda-Sawada, et al. 2001].

L'AMPK est un intermédiaire des effets des ω 3 sur le métabolisme lipidique, car en phosphorylant la malonyl-coaA-décarboxylase, elle lève l'inhibition du malonyl-coA sur la β -oxydation, et dans des cultures primaires d'adipocytes de rats, un traitement à l'EPA active l'AMPK [Lorente-Cebrian, et al. 2009]. Les effets des ω 3 sur l'oxydation sont également médiés par une modulation de l'expression génique, en particulier via PPAR α [Brandt, et al. 1998]. Les PUFAs sont de très bons ligands de PPAR α [Krey, et al. 1997], et l'expression d'UCP2 stimulée par l'EPA dans des hépatocytes semble dépendante de l'activation de PPAR α [Armstrong, et al. 2001]. De plus, les promoteurs des gènes codant pour CPT1 [Brandt, et al. 1998], de l'acyl-coA-

oxydase [Varanasi, et al. 1996] et les enzymes découplantes de la mitochondrie [Schrauwen, et al. 1999] possèdent des éléments PPRE, ce qui suggère que l'augmentation de la β -oxydation stimulée par les ω 3 ne serait pas associée à une augmentation délétère de ROS dans la mitochondrie.

Dans le muscle, la mesure directe de la β -oxydation de lipides a rarement été étudiée après une supplémentation en ω 3. Certaines études rapportent un effet inhibiteur de l'EPA sur la β -oxydation *ex vivo* dans le muscle EDL (extenseur commun des orteils) de souris, [Figueras, et al. 2011], et dans des myocytes primaires humains isolés à partir de muscle vaste latéral (VL), on observe une inhibition [Aas, et al. 2006] ou une stimulation de la β -oxydation [Wensaas, et al. 2009], selon les études. Cependant ces muscles sont respectivement glycolytiques et mixtes. Un effet stimulateur de la β -oxydation dans des muscles oxydatifs, tels que le muscle soléaire ou gastrocnémien rouge ne sont donc pas exclus, et serait cohérents avec l'activation de PPAR α par les PUFAs.

En activant PPAR α , les ω 3 sont également capables d'inhiber la lipogenèse *de novo*, en inhibant l'expression de SREBP-1c dans le foie [Price, et al. 2000] , [Jump 2008], ce qui participe à la protection contre le stockage ectopique de lipides. En effet, la stéatose hépatique et l'accumulation de lipides dans les muscles sont fréquemment diminués lorsque l'on compare un régime HFD supplémenté en ω 3 avec un HFD contenant des lipides saturés [Jucker, et al. 1999], [Gonzalez-Periz, et al. 2009], [Neschen, et al. 2007], [Svegliati-Baroni, et al. 2006], ce qui est en accord avec une meilleure sensibilité à l'insuline. L'étude de Kuda et al n'a pas montré d'effet net de l'EPA+DHA sur les TG musculaires et hépatiques de souris nourries avec un HFD, mais montre une diminution des céramides musculaires en association avec la Rosiglitazone, ce qui est bénéfique pour la sensibilité à l'insuline [Kuda, et al. 2009].

L'activation de PPAR α par les ω 3 permet donc une réorientation des lipides vers leur catabolisme plutôt que vers leur stockage [Price, et al. 2000]. Nous verrons également par la suite que d'autres effets des ω 3 peuvent être médiés par l'activation de PPAR γ .

Cependant, la toute puissance des PPARs dans les effets bénéfiques des ω 3 sur le métabolisme énergétique a été remise en cause par une étude récente. Des souris soumises à un régime riche en fructose pendant 8 semaines développent une stéatose, due à l'induction de

l'expression génique d'enzymes lipogéniques, une hypertriglycéridémie et une hypercholestérolémie, accompagnées d'une diminution de l'expression de PPAR δ et de PGC1 α dans le foie. La supplémentation en EPA+DHA protège les animaux des effets du régime, sans modifier l'expression de PPAR α , PPAR δ , PPAR γ ou PGC1 α dans le foie et le tissu adipeux [Karsenty, et al. 2012]. Il serait cependant nécessaire de mesurer l'activation et la translocation de ces récepteurs nucléaires en réponse au régime supplémenté en EPA+DHA afin d'exclure de façon certaine l'implication de ces PPARs dans les effets des ω 3 sur ce régime riche en fructose.

Les ω 3 peuvent effectivement moduler l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme de façon directe. Par exemple, les ω 3 peuvent agir sur SREBP-1c de façon directe : le DHA peut, en inhibant l'expression d'Isig2 et de SCAP, limiter la maturation et le transport de SREBP-1c vers le noyau [Botolin, et al. 2006]. Il est aussi capable d'accélérer sa dégradation par la voie du protéasome [Botolin, et al. 2006].

L'amélioration de la sensibilité à l'insuline par les ω 3 peut aussi passer par une régulation allostérique de certains acteurs de la signalisation insulinique, plutôt que par une régulation génique. Dans des modèles de cellules neuronales, le DHA est capable d'inhiber JNK et la phosphorylation inactivatrice d'IRS-1 [Ma, et al. 2009], et lorsque des souris sous HFD sont supplémentées en huile de poisson, on observe une diminution de la phosphorylation de JNK et d'IRS-1 dans l'hippocampe [Ma, et al. 2009]. La suppression de l'activation de JNK par les ω 3 a également été montrée dans des monocytes [Zhao, et al. 2005], des cardiomyocytes [Shimojo, et al. 2006], et des myoblastes en culture [Ohta, et al. 2012], on pourrait donc s'attendre à ce que les ω 3 aient le même effet dans le muscle, le foie ou le tissu adipeux, menant à une diminution de l'insulino-résistance. A ce jour, la diminution de l'activation de JNK par les ω 3 n'a pas été déterminée dans ces organes, mais un régime hyperlipidique riche en lipides saturés est capable d'augmenter l'activation de JNK ainsi que la phosphorylation d'RS1 sur une sérine [Svegliati-Baroni, et al. 2006]. Après 1 mois sous ce HFD, une supplémentation en EPA+DHA permet de diminuer l'expression du TNF α , qui est aussi capable d'interférer avec la signalisation insulinique. Cependant, dans cette étude, les effets de la supplémentation sont accompagnés d'une ré-augmentation de l'expression de PPAR α , qui est diminuée sous ce régime HFD, on ne peut donc pas exclure l'implication de PPAR α dans ce cas précis.

Ainsi, bien que les nombreuses études menées chez l'animal montrent que les ω 3, surtout l'EPA et le DHA, sont particulièrement efficaces pour réduire la prise de poids et de masse grasse sous régime gras, ainsi que la résistance à l'insuline ; leur impact sur la composition corporelle et la sensibilité à l'insuline chez l'Homme est moins net, du à la grande disparité entre les études. Il est possible que des enzymes présentes chez les rongeurs permettant aux ω 3 d'exercer leurs effets ne soient pas aussi efficaces chez l'Homme. Un autre élément non négligeable à prendre en compte est la dose utilisée pour les études chez l'Homme, qui est généralement plus faible que celles utilisées dans les études *in vitro* et animales.

Cependant, les études cliniques et animales combinant la prise d' ω 3 combinée avec des programmes de perte de poids [Krebs, et al. 2006], [Spadaro, et al. 2008] ou des traitements antidiabétiques [Horakova, et al. 2012] montrent que les ω 3 peuvent optimiser ces traitements, et encouragent à fouiller cette perspective thérapeutique.

De plus, une étude sur myocytes humain en culture a montré un effet très intéressant de l'EPA, qui promeut la flexibilité métabolique, c'est-à-dire qu'il facilite l'adaptation des cellules musculaires au substrat qui leur est apporté. Lorsque du glucose est apporté au milieu de culture, l'EPA promeut la suppression de l'oxydation des lipides, et à l'inverse, lorsque le ratio lipides/glucose est augmenté, il promeut l'augmentation de l'oxydation des lipides [Hessvik, et al. 2010]. La flexibilité métabolique étant altérée chez les patients insulino-résistants [Galgani, et al. 2008], cela ajoute un intérêt supplémentaire à l'utilisation de l'EPA dans la prévention ou le traitement du diabète de type II.

IV) L'EPA et les adipokines

Les adipokines jouant un rôle important dans le métabolisme énergétique, la relation entre PUFAs et adipokines a suscité un intérêt grandissant [Moreno-Aliaga, et al. 2010], cette partie détaillera les effets de l'EPA sur la production d'adipokines, aussi bien bénéfiques que délétères.

1) Effets de l'EPA sur les adipokines délétères

L'EPA est capable de diminuer l'expression de la résistine dans des adipocytes 3T3-L1 [Haugen, et al. 2005], mais de façon surprenante, parmi tous les acides gras testés, le plus fort effet inhibiteur est obtenu avec l'AA (C20:4 ω 6) dans cette étude. La seule étude clinique recherchant un effet des ω 3 sur la résistine a pu confirmer cet effet. Bien qu'elle ne concerne pas des patients obèses ni diabétiques, l'étude d'Olza et al a comparé les taux plasmatiques d'adipokines de patients âgés nourris de façon parentérale avec ou sans un supplément d'EPA+DHA. Les taux de leptine et d'adiponectine ne sont pas modifiés, mais ceux de résistine sont diminués chez les patients recevant le mélange EPA+DHA pendant 6 mois [Olza, et al. 2010].

Nous avons vu plus haut que les ω 3 ont un fort pouvoir anti-inflammatoire via les eicosanoïdes, en agissant sur la production de cytokines de cellules immunitaires telles que le TNF α . Ces cellules sont certes une source importante de TNF α , mais le tissu adipeux aussi. Chez des rats rendus obèses par un régime cafétéria, l'expression du TNF α dans le tissu adipeux épидидymaire est augmentée, ce qui a été confirmé par de nombreuses études utilisant des régimes hyperlipidiques, et l'administration d'EPA empêche l'augmentation de l'expression de TNF α [Perez-Matute, et al. 2007]. Dans des cultures primaires d'adipocytes humains, un traitement à l'EPA diminue de moitié la sécrétion de TNF α et de MCP-1 induite par le LPS [Murumalla, et al. 2012]. En plus de diminuer la production de TNF α par les adipocytes, l'EPA est également capable de reverser la lipolyse induite par le TNF α dans des adipocytes 3T3-L1 [Lorente-Cebrian, et al. 2012], pouvant ainsi participer à la réduction des AGL circulants, et donc à l'amélioration de la sensibilité à l'insuline générale.

Dans le foie aussi, l'expression du TNF α est sous le contrôle des ω 3. Après 1 mois de régime HFD, des rats chez qui l'expression hépatique du TNF α est augmentée, ont été supplémentés en ω 3 pendant 2 mois, et l'expression du TNF α revient à une valeur proche des rats nourris avec un régime normal [Svegliati-Baroni, et al. 2006]. Par contre, ces études animales ne précisent pas si les taux circulants de TNF α sont modifiés par l'EPA. Les études cliniques ont pu montrer une diminution du TNF α circulant suite à une supplémentation en ω 3 chez des patients non obèses et obèses [de Mello, et al. 2009], [Spadaro, et al. 2008], et l'étude de Zhang et al montre que chez les femmes hypertriglycéridémiques en surpoids, la consommation de saumon permet de diminuer leurs taux plasmatiques de TNF α , [Zhang, et al. 2012a]. Il serait intéressant

de déterminer si cette diminution résulte d'une diminution de l'expression du TNF α adipocytaire, ce qui confirmerait les études animales.

2) Effets de l'EPA sur les adipokines bénéfiques

L'expression et la sécrétion d'adiponectine sont diminuées en condition d'obésité et de résistance à l'insuline et ce, de façon inversement proportionnelle à la masse grasse. Chez des patients atteints de maladie coronarienne, les taux plasmatiques d'EPA sont corrélés avec les taux d'adiponectine [Rasmussen, et al. 2009], et chez des femmes obèses, le ratio AA/EPA est négativement associé à l'adiponectinémie et à l'expression de l'adiponectine dans le tissu adipeux viscéral [Caspar-Bauguil, et al. 2012].

L'EPA est capable d'augmenter l'adiponectinémie de sujets obèses après 3 mois de supplémentation [Itoh, et al. 2007], et en association avec un programme de perte de poids, une supplémentation en EPA+DHA permet d'augmenter l'adiponectinémie [Wong, et al. 2013] de sujets obèses. Chez des femmes hypertriglycéridémiques en surpoids, l'augmentation de la consommation de saumon a le même effet sur l'adiponectine plasmatique [Zhang, et al. 2012a]. Chez des patientes obèses atteintes de polykystose ovarienne, un traitement à l'EPA+DHA augmente l'adiponectinémie, accompagnée d'une diminution de l'HOMA-IR [Mohammadi, et al. 2012].

Chez le rongeur, le même effet est constaté, que ce soit chez des rats nourris avec un régime normal [Duda, et al. 2009b], un régime hyperlipidique [Svegliati-Baroni, et al. 2006] ou chez des souris sous HFD [Flachs, et al. 2006] ou ob/ob [Itoh, et al. 2007].

L'augmentation de l'adiponectinémie pourrait être le simple reflet d'une moindre masse grasse, mais un effet direct de l'EPA est observé sur la production d'adiponectine. Dans le tissu adipeux ou les adipocytes, l'expression [Flachs, et al. 2006], [Svegliati-Baroni, et al. 2006] et la sécrétion [Tishinsky, et al. 2011], [Lefils-Lacourtablaise, et al. 2013] de l'adiponectine est augmentée par l'EPA.

Contrairement aux effets de l'EPA sur le métabolisme lipidique, ses effets sur la production d'adiponectine ne semblent pas être médiés par PPAR α . L'étude de Neschen et al a montré que chez des souris supplémentées en huile de poisson, l'augmentation de l'adiponectinémie est toujours observée chez les souris PPAR $\alpha^{-/-}$, mais n'est pas observée

lorsque les souris wt reçoivent un inhibiteur de PPAR γ [Neschen, et al. 2006]. L'effet spécifique de l'EPA sur la production d'adiponectine par les adipocytes est lui aussi médié par l'activation de PPAR γ , car l'utilisation d'un inhibiteur empêche la sécrétion d'adiponectine par des adipocytes primaires humains stimulés à l'EPA [Tishinsky, et al. 2011]. De façon intéressante, le traitement de ces adipocytes avec l'EPA en association avec la Rosiglitazone, un agoniste de PPAR γ , entraîne une plus forte augmentation de la sécrétion d'adiponectine que celle obtenue par ces deux composés séparément [Tishinsky, et al. 2011], confirmant le rôle de PPAR γ dans cet effet de l'EPA.

L'activation de l'AMPK est aussi capable d'induire l'expression d'adiponectine dans le tissu adipeux humain *ex vivo* [Lihn, et al. 2004], et le traitement d'adipocytes avec l'EPA active cette protéine kinase. Il est donc possible que l'activation de l'AMPK suite à l'administration d'EPA entraîne l'expression d'adiponectine, ce qui reste à être confirmé, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*.

Les eicosanoïdes issue de l'EPA peuvent également induire la production d'adiponectine, comme cela a été montré pour la prostaglandine 15-désoxy- $\delta^{12,14}$ -PGJ₃ (15d-PGJ₃) dans des adipocytes 3T3-L1, et cette voie d'induction est également dépendante de PPAR γ [Lefils-Lacourtablaise, et al. 2013]. Un rôle possible de cette prostaglandine dans l'amélioration du métabolisme énergétique due aux traitements à l'EPA est donc envisageable, d'autant que l'EPA est spontanément transformé en 15d-PGJ₃ dans le tissu adipeux de souris nourries avec de l'EPA [Lefils-Lacourtablaise, et al. 2013].

Comme expliqué précédemment, l'EPA et ses métabolites sont de nature anti-inflammatoire, et il peut ainsi agir de façon indirecte sur la production d'adiponectine. La mise en co-culture d'adipocytes 3T3-L1 et d'une lignée immortalisée de macrophages RAW264, a permis de montrer que non seulement la présence de macrophages diminue l'expression et la sécrétion adipocytaire d'adiponectine, mais aussi qu'un traitement à l'EPA ré-augmente la sécrétion d'adiponectine, et cet effet est en partie dû à une diminution de l'expression de TNF α dans la co-culture [Itoh, et al. 2007].

Cependant, certaines études ne rapportent aucun effet de l'EPA ou d'autres ω 3 sur l'adiponectine. La supplémentation en ω 3 de patients insulino-résistants pendant 3 mois ne modifie pas l'adiponectinémie [Spencer, et al. 2013], et dans une étude clinique comparant l'effet de l'EPA à celui d'une statine chez des patients diabétiques et hyperlipidémiques, la

supplémentation en EPA n'a pas augmenté les taux d'adiponectine, contrairement à la statine [Nomura, et al. 2009]. De même, l'expression de l'adiponectine n'est pas modifiée par l'EPA dans le tissu adipeux de rats nourris avec un régime cafétéria [Perez-Matute, et al. 2007].

La leptine, impliquée dans le phénomène de satiété, est augmentée dans le plasma en condition d'obésité et de résistance à l'insuline [Maffei, et al. 1995], qui est également considérée comme un état de résistance centrale à la leptine. Comme évoqué précédemment, son expression dans le tissu adipeux est proportionnelle à la masse grasse, mais l'administration de leptine exogène est bénéfique en limitant le stockage ectopique des lipides [Shimabukuro, et al. 1997].

Une étude menée sur des rats rendus obèses par un régime cafétéria a montré, outre une prise de poids importante, une légère augmentation de la leptine plasmatique et, lorsque les rats reçoivent une dose quotidienne d'EPA par gavage, la leptinémie est quasiment doublée par rapport à celles des rats obèses [Perez-Matute, et al. 2007]. De plus, l'expression génique de la leptine est augmentée dans le tissu adipeux épидидymaire, alors que ce dépôt adipeux n'est pas plus développé chez ces animaux et qu'ils prennent moins de poids. Ceci confirme un rôle direct de l'EPA sur l'expression de la leptine, indépendamment de la masse grasse. Les effets de l'EPA dans cette étude sont également associés à une réduction de la prise alimentaire [Perez-Matute, et al. 2007], pouvant participer à l'amélioration globale observée. La régulation de la leptine par l'EPA semble être spécifique du dépôt adipeux considéré, ce qui est suggéré par l'étude de Raclot et al, qui montre que chez le rat nourri avec un régime HFD, la présence d'EPA dans le régime diminue l'expression génique de la leptine dans le tissu adipeux rétropéritonéal alors qu'elle n'est pas modifiée dans le tissu adipeux sous-cutané [Raclot, et al. 1997].

La leptine étant produite et sécrétée majoritairement par les adipocytes, des études *in vitro* ont tenté de décrire le mécanisme par lequel l'EPA peut induire son expression. La sécrétion de leptine est stimulée par l'insuline, mais il a été démontré qu'elle est plus sensible à l'utilisation de glucose qu'à l'insuline [Wellhoener, et al. 2000]. Ceci a été confirmé par l'étude de Murata et al qui montre que l'augmentation de l'expression et de la sécrétion de leptine, stimulée par l'EPA dans des adipocytes 3T3-L1, est inhibée par un inhibiteur de la voie de biosynthèse des glucosamines [Murata, et al. 2000]. Dans cette étude, l'activation des PPARs n'a aucun effet sur la production de leptine. Une association entre le catabolisme du glucose et

la production de leptine a également été observée dans des adipocytes isolés de rats traités *in vitro* à l'EPA [Perez-Matute, et al. 2005].

Une régulation négative de la leptine par l'EPA a été rapportée par une étude montrant une diminution de l'expression génique de la leptine dans des adipocytes 3T3-L1 traités avec 500 μ M d'EPA [Reseland, et al. 2001]. L'étude de Murata et al a rapporté un moindre effet de la dose 1000 μ M par rapport aux doses plus de 100 et 200 μ M d'EPA, en ce qui concerne l'expression de la leptine [Murata, et al. 2000]. A ces doses de 500 et 1000 μ M, plus élevées que celles classiquement utilisées *in vitro* pour l'étude des lipides, à savoir en-dessous de 300 μ M, les cellules semblent répondre différemment à l'EPA. Il est possible qu'à des concentrations trop fortes, la peroxydation de l'EPA entraîne des effets délétères du stress oxydant, mais aucune explication n'a pu être apportée par ces études.

Certaines études animales et cliniques n'ont cependant pas observé d'effets de l'EPA sur la production de leptine. Une étude menée sur des rats nourris avec des régimes gras riches en ω 6 ou en ω 3, a montré que l'expression de la leptine est augmentée dans le groupe ω 6, mais pas dans le groupe ω 3 [Takahashi and Ide 2000]. Ce manque d'effet a également été retrouvé chez des souris nourries avec un HFD supplémenté en EPA+DHA pendant 5 semaines [Flachs, et al. 2006].

La visfatine est une adipokine bénéfique pour la sensibilité à l'insuline, et sa concentration plasmatique est diminuée en condition d'obésité [Pagano, et al. 2006]. Chez des femmes diabétiques, la supplémentation en EPA+DHA a permis de doubler la concentration plasmatique de visfatine [Hajianfar, et al. 2011], et une étude menée chez le rat a permis de montrer que l'EPA a un effet propre sur la production de visfatine. L'étude de Pérez-Echarri et al montre qu'un régime cafétéria diminue son expression dans le tissu adipeux viscéral de rat après 5 semaines, et que l'administration d'EPA par gavage durant ces 5 semaines limite légèrement mais significativement cette diminution. En revanche, aucune modification de son taux plasmatique n'est observée chez ces animaux [Perez-Echarri, et al. 2009]. *In vitro*, le traitement d'adipocytes primaires de rats avec l'EPA augmente l'expression et la sécrétion de visfatine, et cet effet est dépendant de l'activation de l'AMPK [Lorente-Cebrian, et al. 2009].

3) Effets de l'EPA sur l'apeline

Parmi les facteurs circulants connus pour moduler l'expression adipocytaire de l'apeline, évoqués dans le chapitre III, se trouve l'EPA.

La première étude établissant un lien entre l'EPA et l'apeline a été publiée en 2009 et montre que la supplémentation en EPA de rats nourris avec un régime cafétéria pendant 5 semaines permet d'augmenter l'expression de l'apeline dans le tissu adipeux viscéral, de façon plus importante qu'avec le régime cafétéria seul [Perez-Echarri, et al. 2009]. L'expression de l'apeline étant augmentée dans le tissu adipeux de sujets obèses et diminué après une perte de poids [Castan-Laurell, et al. 2008], [Heinonen, et al. 2009], [Krist, et al. 2013], le fait que l'expression de l'apeline soit augmentée dans le tissu adipeux de ces rats, alors que la masse grasse est légèrement diminuée, suggère que l'EPA a un effet direct sur le tissu adipeux en augmentant la production d'apeline, indépendamment de l'amélioration de la sensibilité à l'insuline qui est observée. Ainsi, les effets bénéfiques de l'EPA sur la sensibilité à l'insuline pourraient être en partie médiés par l'action bénéfique de l'apeline. Dans ce sens, les auteurs remarquent que, bien que l'apelinémie ne soit pas modifiée par le traitement à l'EPA, le ratio apeline plasmatique / tissu adipeux est inversement corrélé à l'HOMA-IR des animaux [Perez-Echarri, et al. 2009].

Un an plus tard, l'effet de l'EPA sur l'expression de l'apeline est confirmé *in vitro* dans des adipocytes 3T3-L1 [Lorente-Cebrian, et al. 2010]. La sécrétion de l'apeline par ces adipocytes est augmentée par l'EPA. En plus de ses effets sur la production basale d'apeline, l'EPA permet d'augmenter l'expression et la sécrétion d'apeline stimulée par l'insuline, l'effet de ces deux composés étant plus marqué que leurs effets individuels. La voie des MAPK ne semble pas être impliquée dans ces effets, alors que c'est le cas pour l'induction de l'apeline par l'insuline [Boucher, et al. 2005]; mais l'activation dose-dépendante d'Akt dans les adipocytes traités à l'EPA suggère l'implication de la voie PI3K/Akt, ce qui est confirmé par l'utilisation d'un inhibiteur de PI3K, le LY294002, qui résulte en l'abolition de l'expression et de la sécrétion d'apeline stimulée par l'EPA. De façon intéressante, cette étude montre que l'EPA a un effet sur la sécrétion d'apeline indépendant de son expression génique : l'inhibition de la transcription et de la synthèse protéique dans les adipocytes n'empêche pas les adipocytes de sécréter plus d'apeline suite à une stimulation par l'EPA. Les auteurs soulèvent la possibilité de

l'existence d'un pool intracellulaire d'apeline dans les adipocytes, comme c'est le cas pour la leptine [Roh, et al. 2000]. On ne peut pas non plus exclure un effet potentiel de l'EPA sur la dégradation de l'apeline, d'autant plus que l'enzyme ACE2, capable d'hydrolyser l'apeline, est produite par les 3T3-L1 [Gupte, et al. 2008], et que l'EPA est capable d'inhiber son activité *in vitro* [Kumar and Das 1997].

Objectifs de la thèse

Au début de cette thèse, les effets bénéfiques d'un traitement chronique à l'apeline sur la sensibilité à l'insuline, le tissu adipeux blanc et le métabolisme lipidique du muscle, venaient d'être décrits chez la souris obèse et insulino-résistante [Attane, et al. 2012], sans que l'on sache pour autant si le métabolisme hépatique était aussi modifié, ni si l'apeline pouvait agir sur le foie.

C'est pourquoi nous avons étudié le métabolisme énergétique du foie chez des souris rendues obèses et résistantes à l'insuline, traitées à l'apeline pendant 4 semaines, dans un contexte identique. Nous avons également étudié la régulation de l'expression d'APJ et sa localisation dans le foie en condition d'insulino-résistance et/ou de stéatose hépatique importante.

Parallèlement, étant donné que l'apeline et l'EPA, un acide gras polyinsaturé de la famille des ω 3, exercent des effets bénéfiques sur la sensibilité à l'insuline [Poudyal and Brown 2013] et que l'EPA augmente l'expression de l'apeline dans le tissu adipeux de rat [Perez-Echarri, et al. 2009] et dans les adipocytes où il augmente aussi sa sécrétion [Lorente-Cebrian, et al. 2010], nous avons voulu savoir si l'EPA pouvait également réguler l'expression musculaire de l'apeline.

Pour cela, nous avons mené d'une part un travail de caractérisation métabolique de souris nourries avec un régime riche en lipides, supplémenté ou non en EPA, en nous intéressant particulièrement au métabolisme lipidique du muscle, et nous avons d'autre part étudié la régulation du système apeline/APJ musculaire *in vivo* et *in vitro*. Cette étude sera présentée en premier.

Résultats

Effets de l'EPA sur le métabolisme énergétique de souris insulino-résistantes et sur le système apeline/APJ musculaire.

Introduction.....	153
Article.....	154
Discussion.....	155

Effets d'un traitement chronique à l'apeline sur le métabolisme énergétique de souris obèses et insulino-résistantes, et régulation de son récepteur APJ dans la résistance à l'insuline.

Introduction.....	165
Matériel & Méthodes.....	167
Résultats.....	175
1) Effets du traitement à l'apeline sur le métabolisme hépatique.....	175
2) Régulation de l'expression d'APJ dans le foie de souris insulino-résistantes.....	182
3) Régulation de l'expression d'APJ dans le foie de souris stéatosées.....	185
Discussion.....	187

Effets de l'EPA sur le métabolisme énergétique de souris insulino-résistantes et sur le système Apeline/APJ musculaire

Ce travail a été initié dans le cadre d'une collaboration avec une équipe italienne dirigée par le Dr Lilla Lionetti, qui travaillait sur les effets d'une supplémentation alimentaire en huile de poisson, riche en EPA, chez des rats résistants à l'insuline. Cette équipe a montré que cette supplémentation, en plus d'améliorer la tolérance à l'insuline, augmente l'activité enzymatique de la CPT1 et de la citrate synthase dans les mitochondries intramyofibrillaires du muscle squelettique (résultats en cours de publication). Ces enzymes étant impliquées dans la β -oxydation et le cycle de Krebs respectivement, et les TG intramusculaires étant diminués, cela suggère une augmentation de la β -oxydation des lipides, comme dans le muscle de souris insulino-résistantes traitées à l'apeline [Attane, et al. 2012]. C'est pourquoi, dans le cadre de sa formation de thèse, Angelica Pignalosa nous a rejoints durant 6 mois, pour développer un projet pouvant allier les thématiques respectives de nos laboratoires.

Nous avons ainsi étudié, chez la souris, l'effet d'un régime gras supplémenté en EPA sur le métabolisme lipidique du muscle et sur l'expression de l'apeline, mais aussi de son récepteur APJ dans le muscle et en parallèle dans le tissu adipeux, dans le but de déterminer si l'apeline peut être impliquée dans les effets bénéfiques de l'EPA. Nous avons donc mis au point les protocoles *in vivo*, et commencé l'étude *in vitro* ensemble.

Ce travail a fait l'objet d'une publication, intitulée "Effects of dietary Eicosapentaenoic Acid (EPA) supplementation in high-fat fed mice on lipid metabolism and Apelin/APJ system in skeletal muscle" dans le journal PlosOne, publiée en novembre 2013 [Bertrand, et al. 2013].

Effects of Dietary Eicosapentaenoic Acid (EPA) Supplementation in High-Fat Fed Mice on Lipid Metabolism and Apelin/APJ System in Skeletal Muscle

Chantal Bertrand^{1,2,3}, Angelica Pignalosa^{3,9}, Estelle Wanecq^{1,2}, Chloé Rancoule^{1,2}, Aurélie Batut^{1,2}, Simon Deleruyelle^{1,2}, Lilla Lionetti³, Philippe Valet^{1,2}, Isabelle Castan-Laurell^{1,2*}

1 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U1048, Toulouse, Cedex 4, France, **2** Université de Toulouse, UPS, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, Toulouse, France, **3** Università degli Studi "Federico II", Napoli, Italy

Abstract

Various studies have shown that eicosapentaenoic acid (EPA) has beneficial effects on obesity and associated disorders. Apelin, the ligand of APJ receptor also exerts insulin-sensitizing effects especially by improving muscle metabolism. EPA has been shown to increase apelin production in adipose tissue but its effects in muscle have not been addressed. Thus, the effects of EPA supplementation (36 g/kg EPA) in high-fat diet (HFD) (45% fat, 20% protein, 35% carbohydrate) were studied in mice with focus on muscle lipid metabolism and apelin/APJ expression. Compared with HFD mice, HFD+EPA mice had significantly less weight gain, fat mass, lower blood glucose, insulinemia and hepatic steatosis after 10 weeks of diet. In addition, EPA prevented muscle metabolism alterations since intramuscular triglycerides were decreased and β -oxidation increased. In soleus muscles of HFD+EPA mice, apelin and APJ expression were significantly increased compared to HFD mice. However, plasma apelin concentrations in HFD and HFD+EPA mice were similar. EPA-induced apelin expression was confirmed in differentiated C2C12 myocytes but in this model, apelin secretion was also increased in response to EPA treatment. In conclusion, EPA supplementation in HFD prevents obesity and metabolic alterations in mice, especially in skeletal muscle. Since EPA increases apelin/APJ expression in muscle, apelin may act in a paracrine/autocrine manner to contribute to these beneficial effects.

Citation: Bertrand C, Pignalosa A, Wanecq E, Rancoule C, Batut A, et al. (2013) Effects of Dietary Eicosapentaenoic Acid (EPA) Supplementation in High-Fat Fed Mice on Lipid Metabolism and Apelin/APJ System in Skeletal Muscle. PLoS ONE 8(11): e78874. doi:10.1371/journal.pone.0078874

Editor: Marcia B. Aguilá, State University of Rio de Janeiro, Biomedical Center, Institute of Biology, Brazil

Received: April 15, 2013; **Accepted:** September 16, 2013; **Published:** November 7, 2013

Copyright: © 2013 Bertrand et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The funder is INSERM and has no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interest exist.

* E-mail: isabelle.castan@inserm.fr

⁹ These authors contributed equally to this work.

Introduction

Obesity and associated diseases such as type 2 diabetes or hypertension are a major public health problem. Different strategies, from lifestyle changes to pharmacological interventions, have been shown to be successful in improving metabolism and reducing weight gain. The role of the long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs) has been largely documented. In clinical trials, the delay of the onset of cardiovascular events and a decrease in obesity and in the incidence of type 2 diabetes has been described in response to dietary intake of PUFAs [1,2,3]. However, change in insulin sensitivity or body weight after n-3 PUFAs supplementation has not always been demonstrated [4]. Eicosapentaenoic acid (EPA), one of the major PUFAs contained in fish oil has been shown to exert anti-atherogenic, anti-inflammatory and lipid-lowering effects [4,5]. In numerous animal models, EPA supplementation into high-fat diets (HFD) has also been shown to prevent [6–9] but also to reverse obesity [6]. Since adipose tissue is now considered as an endocrine organ, different studies have also demonstrated the effect of EPA (alone or in combination with other n-3 PUFAs) on different adipokines expression and/or secretion. EPA was shown to increase leptin expression and secretion in cultured

adipocytes [10,11] but not in vivo [12]. Increased adiponectin has been observed in adipose tissue of ob/ob mice receiving n-3 PUFA-enriched diet [9] or in adipose tissue of HFD fed mice [13] and in cultured human adipocytes in response to EPA [14]. Due to the more recent identification of apelin as an adipokine involved in glucose metabolism [15], EPA alone has also been shown to increase apelin expression and secretion in 3T3-L1 adipocytes [16] and in adipose tissue of cafeteria diet-fed rats [17].

In addition, apelin is also a peptide expressed in different tissues such as skeletal muscles [18,19]. The apelin receptor, APJ, is also often expressed in the same tissues than apelin. Insulin is able to regulate both apelin and APJ expression in skeletal muscles [19]. In obese and insulin-resistant mice, apelin and APJ expression are increased in adipose tissue but not in skeletal muscles [19]. Thus, there is a tissue-dependent regulation of the apelin/APJ system that could also be modified with the severity of insulin resistance (for example in diabetic db/db mice) [19]. More recently, apelin treatment in obese and insulin resistant mice has been shown to reduce fat mass and to improve muscle metabolism by increasing fatty acid oxidation and mitochondrial biogenesis [20]. Prevention of diet-induced obesity and increased oxidative capacities in muscles has also been found in transgenic mice overexpressing

apelin [21]. Thus, apelin is considered as an insulin-sensitizing factor.

Since EPA and apelin share common metabolic features, the aim of this work was to test the hypothesis that the beneficial effects of EPA could be in part due to an up-regulation of the apelin/APJ system. Since apelin regulation has been studied in adipose tissue, we focused on muscle metabolism and on expression of both apelin and APJ in skeletal muscle of mice fed with a HFD supplemented with EPA. Moreover, only the effect of EPA was studied in order to compare with previous studies on apelin expression and on metabolic effects in mice. Dietary EPA supplementation to HFD prevented alterations in muscle lipid metabolism induced by HFD. Moreover, it increased significantly apelin/APJ expression in soleus compared to HFD fed mice. *In vitro*, in differentiated C2C12 myocytes, EPA also up-regulated apelin expression and its secretion suggesting that EPA has a direct effect on muscle apelin expression and that apelin could act as a paracrine/autocrine factor.

Materials and Methods

Animals and diets

Mice were handled in accordance with the principles and guidelines established by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), permission number C31 55507. The animal protocol was approved by the animal ethics committee of the unit US006 CREFRE (Centre Régional d'Exploration Fonctionnelle et Ressources Expérimentales).

Nine-week-old male C57Bl6/J mice were purchased from Charles River Laboratories (l'Arbresle, France). Mice were housed conventionally in a constant temperature (20–22°C) and humidity (50–60%) animal room, with a 12/12 h light/dark cycle (lights on at 7:00 A.M.) and free access to food and water. Mice were fed a normal diet (ND), (10, 20 and 70% of energy from fat, protein and carbohydrate respectively) or a HFD containing 45% fat, 20% protein, 35% carbohydrate, or HFD containing EPA (HFD+EPA) 45% fat including 3.6% EPA Ethyl Ester (36 g/kg wt/wt), 20% protein, 35% carbohydrate. Both HFD were containing vitamin E (0.13%) to prevent peroxidation of EPA. EPA (99.3% purity) was kindly provided by KD Pharma, Bexbach Germany. All diets were custom diets made by Research Diets (Research Diets Inc, New Brunswick, NJ, USA). After 10 weeks of diet, all mice were sacrificed after a 6-hour fast.

Plasma parameters

Plasma insulin and apelin concentrations were determined with an ultrasensitive mouse insulin ELISA kit (Mercodia, Uppsala, Sweden) and a nonselective apelin-12 EIA kit (Phoenix Pharmaceuticals, Belmont, CA), respectively. Glycemia was measured with a glucometer (Accu-check, Roche Diagnostics Grenoble, France) on blood from the tail vein in fasted mice. EPA and long-chain fatty acids levels especially, were measured by HPLC after methylation. Briefly, plasma (10 µl) was hydrolysed in 1 ml KOH (0.5 M in methanol) at 50°C for 30 minutes, in the presence of the internal standards glyceryl triheptadecanoate (2 mg), and trans-methylated in boron trifluoride methanol solution 14% (1 ml) and hexane (1 ml) at 80°C for 1 h. After addition of water to the crude, fatty acid methyl esters (FAMES) were extracted with hexane, brought to dryness and dissolved in ethyl acetate (20 ml). FAMES were analyzed by gas-liquid chromatography [22] on a Clarus 600 Perkin Elmer system using a Famewax RESTEK fused silica capillary columns (30 m×0.32 mm i.d, 0.25 mm film thickness). Oven temperature was programmed from 110°C to 220°C at a rate of 2°C per min and the carrier gas was hydrogen (0.5 bar).

The injector and the detector were at 225°C and 245°C respectively.

Food intake measurement

Food intake was measured 2 days and 6 weeks after the beginning of the different diets. Mice were housed individually on a 12 cm-diameter grid of metabolic cages (BioSeb, Spain). They were given free access to food and water, and the food was weighed every 12 hours during 48 hours, after 24 h of acclimatization.

Body fat mass composition

To determine fat and lean mass, mice were placed in a clear plastic holder, without anesthesia or sedation, and inserted into the EchoMRI-3-in-1 system (Echo Medical Systems, Houston, TX). Total body fat and lean mass were measured one day before sacrifice.

Oral glucose tolerance test (OGTT)

OGTT was performed one week before the end of the protocol. After 6 h fast during the light period, mice received glucose (3 g/kg body weight) by gavage through a gastric tube (outer diameter 1.2 mm). Glycemia was monitored from the tail vein 0, 15, 30, 45, 60, 90, and 120 min after glucose administration, using a glucometer (Accu-check, Roche Diagnostic, Grenoble, France). The area under the curve (AUC) was calculated.

Palmitate oxidation

Palmitate oxidation was determined *ex vivo* in whole soleus muscle as previously described [20]. Briefly, muscles were incubated in modified Krebs-Henseleit buffer containing 1.5% FA-free BSA, 5 mmol/L glucose, 1 mmol/L palmitate, and 0.5 µCi/mL ¹⁴C-palmitate (PerkinElmer) at 37°C for 60 min in a sealed glass vial. At the end of the incubation, tissues were removed and homogenized in 800 µL lysis buffer for protein quantification by the method of Bradford (BioRad, France). Complete oxidation was determined by acidifying the incubation buffer with 1 mL of 1 mol/L H₂SO₄, and the ¹⁴CO₂ was trapped by benzethonium hydroxide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) placed in a 0.5 mL microtube in the vial. After 120 min, the microtube was removed and placed in a scintillation vial, and the radioactivity was counted (Cytosint, MP Biomedicals).

Measurement of liver and skeletal muscle lipid content and liver histological analysis

Gastrocnemius muscle (red part) and a sample of liver were used to extract total lipids by the Folch method [23], with minor modifications. Briefly, the frozen tissues were homogenized and the lipids were extracted using 2.5 ml chloroform/methanol (2/1: v/v) and 1.2 ml KCl/HCl 2N. After centrifugation, 100 µL of the organic phase, containing neutral lipids, was brought to dryness under nitrogen. For determination of triglycerides (TG) content, the lipid pellet was solubilized in isopropanol and TG concentrations were determined using the enzymatic TG PAP kit (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) following the manufacturer's instructions. Muscle TG content was normalized to protein content (Bradford method) and liver TG content was normalized to tissue weight. For histological analysis, liver samples were fixed in 4% buffered formalin for 24 hours, and maintained at 4°C in 70% ethanol. Fixed tissues were processed routinely for paraffin embedding, and 4-µm sections were prepared and stained with hematoxylin-eosin (H&E) and viewed using an optical microscope (Nikon Eclipse TE 2000-U).

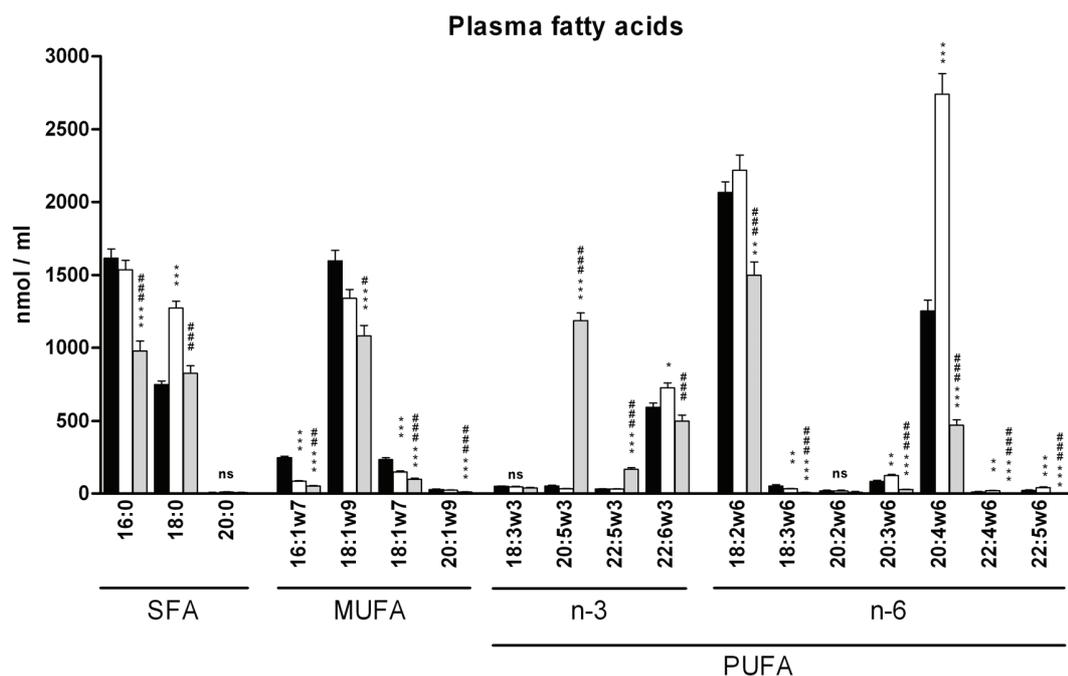


Figure 1. Plasma lipid composition. SFA (Saturated Fatty Acids), MUFAs (Mono-Unsaturated Fatty Acids) and PUFAs (Poly-Unsaturated Fatty Acids) were measured by gas-liquid chromatography in plasma of fasted mice after 10 weeks feeding with ND (black column, n=6), HFD (white column, n=12) or HFD+EPA (grey column, n=9). Data are expressed as mean \pm SEM. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 vs ND; # p <0.05, ## p <0.01, ### p <0.001 vs HFD. ns: not significant
doi:10.1371/journal.pone.0078874.g001

Gene expression study

Immediately after euthanasia, soleus muscle, adipose tissue (perigonadal and subcutaneous depots) and liver were taken and frozen in liquid nitrogen, and total RNAs were isolated using the GeneJET RNA Purification kit (Fermentas). Total RNAs (500 ng) were reverse transcribed using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) in the presence of a random hexamer. The same reaction was performed without Superscript II to estimate DNA contamination. Real time PCR was performed as previously described [20]. Analysis of HPRT expression was performed to normalize gene expression. The sequences of the primers for apelin are: GTTTGTGGAGTGCCACTG (forward) and CGAAGTTCGGGCTTCAC (reverse), for APJ: GCTGTG-CCTGTCATGGTGTT (forward) and CACTGGATCTT-GGTGCCATTT (reverse), for leptin: GGGCTTACCCCAT-CTGA (forward) and TGGCTATCTGCAGCACATTTTG (reverse), for adiponectin: TGGAAATGACAGGAGCTGAAGG (forward) and TATAAGCGGCTTCTCCAGGCT (reverse), for SREBP-1c: CTGGCTTGGTGATGCTATGTTG (forward) and GACCATCAAGGCCCTCAA (reverse), for UCP3: GCTGG-AGTCTCACCTGTTTACTG (forward) and ACAGAAGCC-AGCTCCAAAGG (reverse); for CTP1b: GTGCAAGCAG-CCCCTCTAG (forward) and TTGGCGGATACATGATCA (reverse), and for the housekeeping gene HPRT: TGCC-CATCTGCCTAGTAAAGC (forward) and GGACGCAGCAA-CTGACATTTTC (reverse).

Cell culture experiments

C2C12 mouse myoblasts (ATCC number CRL-1772TM) were cultured at 37°C in DMEM 1 g/L glucose (Sigma-Aldrich), supplemented with 20% FBS, 292 mg/ml glutamine and antibiotics (2.5 µg/ml amphotericin and 50 µg/ml gentamicin) in

12-well culture plates. To induce differentiation after confluence, medium was changed to DMEM 4.5 g/L glucose, supplemented with 5% horse serum. Cells were maintained for 14 days in order to obtain differentiated polynucleated myotubes. Prior to treatment with EPA (Sigma-Aldrich), cells were serum-deprived for 12 hours. BSA and 200 µM EPA (1:5) were mixed thoroughly with serum-free medium the day before the stimulation, from a 10 mM EPA stock solution in ethanol, and kept at 4°C overnight. Equivalent volume of ethanol was mixed with BSA for the control condition. Different EPA concentrations (10, 50, 100 and 200 µM) were prepared from the 200 µM solution, and 1 ml was added to the cells. After 24 h, the medium was collected and kept at -80°C and the cells were washed with ice-cold PBS, and harvested in lysis buffer (Fermentas) containing β-mercapto-ethanol for RNA extraction. Apelin concentration in the medium was measured as described above after addition of 0.2 TIU/ml Aprotinin (Sigma-Aldrich) in the medium and concentration of the medium by evaporation (Concentrator 5301, Eppendorf). Differentiated C2C12 cells were also treated after 12-hour serum deprivation with the PI3K inhibitor LY 294002 (20 µM) (Sigma-Aldrich) or the ERK 1/2 inhibitor U0126 (20 µM) (Cell Signaling) alone or in the presence of 100 µM EPA for 24 h. The inhibitors were added 30 min prior to the addition of EPA.

Statistical analysis

Data were expressed as means \pm SEM. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA). Analysis of differences between groups was performed with one-way ANOVA followed by Tukey test *post hoc*. Non parametric Student t test was also used when appropriate. Differences were considered significant at P <0.05.

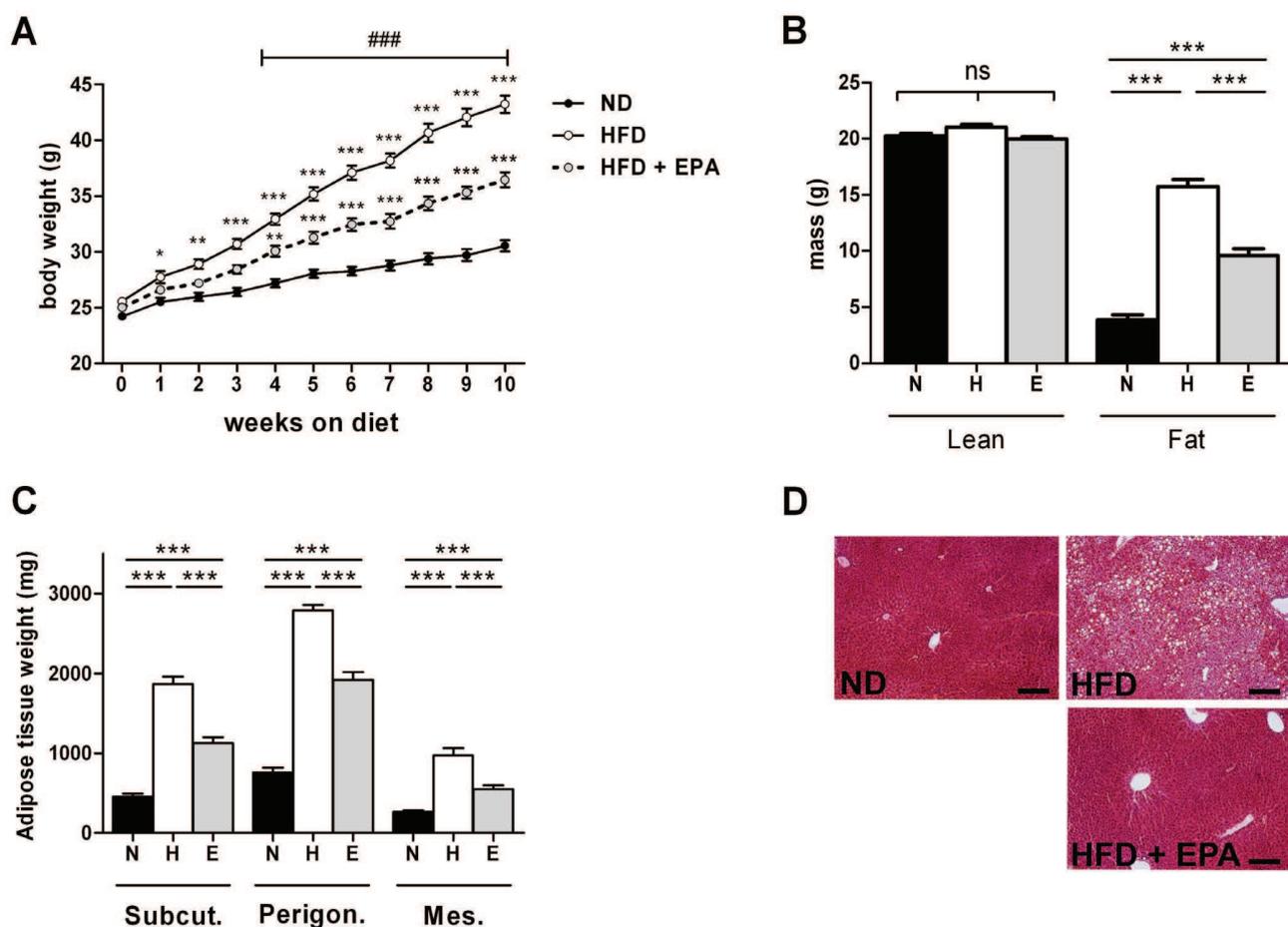


Figure 2. Protective effect of EPA supplementation on the HFD-induced obesity. (A) Body weight in mice after 10-week feeding with a ND ($n = 12$), HFD ($n = 14$) or HFD+EPA ($n = 14$). Results represent mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs ND; and ### $p < 0.001$ vs HFD, ns: not significant. (B) fat and lean mass and (C) fat pads weights of subcutaneous (Subcut), perigonadal (Perigon) and mesenteric (Mes) adipose tissue in mice fed for 10 weeks with a ND or N ($n = 12$), HFD or H ($n = 14$) or HFD+EPA or E ($n = 14$). Results represent mean \pm SEM. *** $p < 0.001$. (D) Representative photographs of H&E staining of liver section of mice fed the different diets for 10 weeks (bar = 200 μ m). doi:10.1371/journal.pone.0078874.g002

Results

Bioavailability of EPA and fatty acid composition in plasma of ND, HFD and HFD+EPA mice

First, detectable plasma lipids were analyzed in the three groups of mice after 10-week feeding, in order to quantify the increment in EPA concentration especially in the HFD+EPA group. As shown in Fig. 1, EPA (C20:5 n-3) was significantly increased in plasma of HFD+EPA compared to ND and HFD mice: $53.5 \pm 4.3 \mu\text{M}$ in ND vs $34.1 \pm 1.5 \mu\text{M}$ in HFD and $1225.5 \pm 50.1 \mu\text{M}$ in HFD+EPA. Interestingly, PUFAs from the omega-6 family, saturated and mono unsaturated fatty acids were globally significantly decreased in plasma of HFD+EPA mice compared to HFD mice. Thus, arachidonic acid-derived lipids, known to exert pro-inflammatory effects [6,24], were decreased in plasma of HFD+EPA mice.

Effect of EPA on HFD-induced obesity

Both HFD and HFD+EPA groups gained weight compared to control ND mice (Fig. 2A) but to a significant lesser extent for HFD+EPA mice. After 10-week feeding, HFD+EPA mice had higher fat mass (Fig. 2B) and fat pads weights (Fig. 2C) than control ND mice but significantly less than HFD fed mice.

However, food intake was not different between HFD and HFD+EPA mice 2 days after the beginning of the protocol (HFD: 15.5 ± 1.0 kcal/24 h and HFD+EPA: 19.0 ± 2.0 kcal/24 h) and after 6 weeks (HFD: 6.8 ± 2.6 kcal/24 h and HFD+EPA: 7.7 ± 2.1 kcal/24 h). Moreover, there was less lipid accumulation in the liver of HFD+EPA mice than in the liver of HFD mice (Fig. 2D). This was in agreement with i) the measurement of triglycerides content: 0.24 ± 0.02 for ND ($n = 10$) vs 0.38 ± 0.04 for HFD ($n = 14$) and $0.17^{***} \pm 0.02$ g TG/g liver for HFD+EPA ($n = 14$) *** $P < 0.001$ vs HFD and ii) the expression of hepatic sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c), a transcription factor involved in lipid synthesis: ND ($n = 10$): 100 ± 10.94 AU, HFD ($n = 14$) 246.2 ± 38.7 AU vs 143.6 ± 19.8 AU in HFD+EPA ($n = 14$) * $P < 0.05$ vs HFD. HFD+EPA mice also had a lower glycemia (Fig. 3A) and insulinemia (Fig. 3B) and a better glucose tolerance as shown in figure 3C compared to HFD fed mice. Thus, dietary EPA supplementation protected against weight gain, hepatic steatosis and insulin resistance.

Effect of EPA on adipokines gene expression

Since HFD+EPA mice had a lower fat mass than HFD mice and an insulinemia similar to control mice, the expression of adipokines such as leptin (associated to fat mass expansion) and

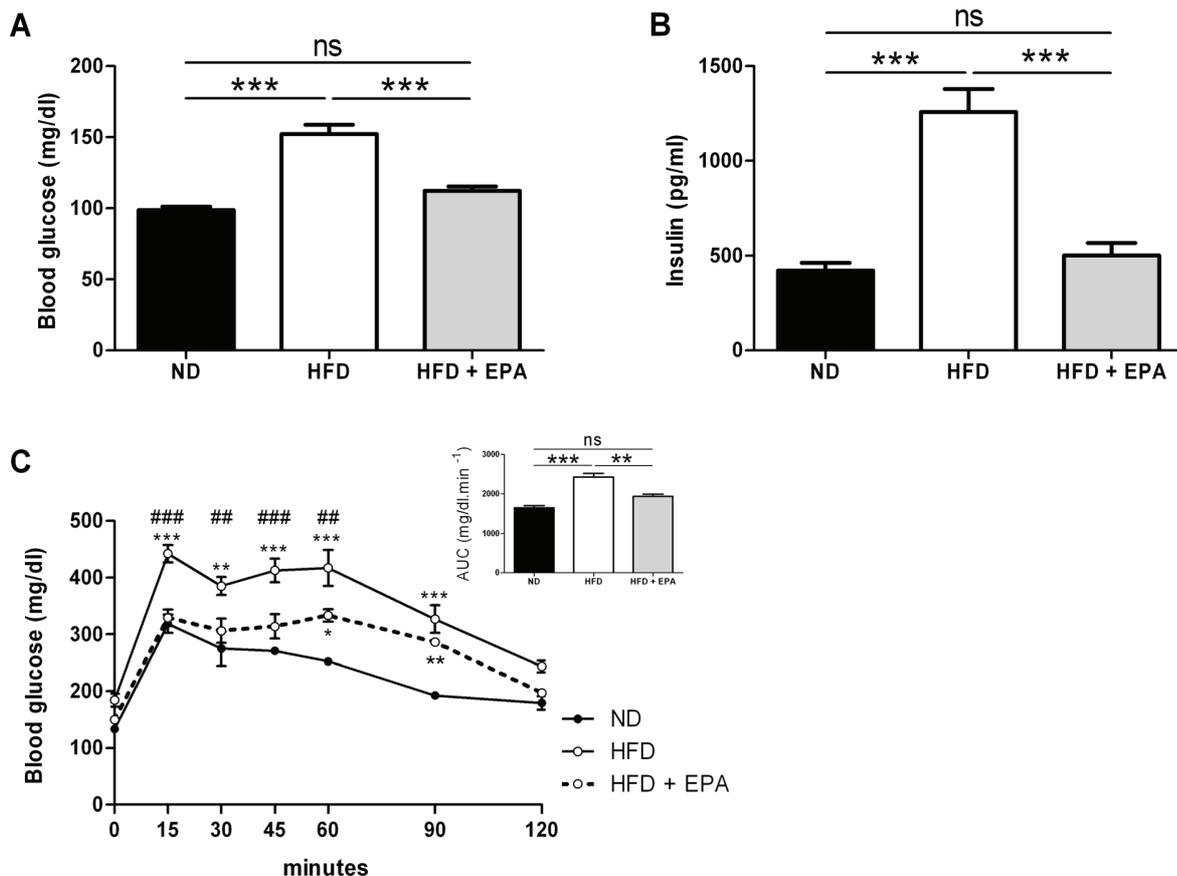


Figure 3. Protective effect of EPA supplementation on the HFD-induced impaired glucose metabolism. (A) Glycemia and (B) insulinemia in 6 h-fasted mice fed a ND (n = 12), a HFD (n = 14) or a HFD+EPA (n = 14) after 10 weeks. Results represent mean \pm SEM. ***p < 0.001, (C) OGTT curves and area under the curve (AUC) of glycemia monitored during OGTT performed on 6 h fasted (during light period) mice after 9 weeks of diet in ND (n = 4), HFD (n = 6) and HFD+EPA (n = 6) mice. Results represent mean \pm SEM. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 vs ND; and ## p < 0.01, ### p < 0.001 vs HFD.

doi:10.1371/journal.pone.0078874.g003

adiponectin (associated to insulin sensitivity) were measured in subcutaneous adipose tissue. As expected, leptin was increased and adiponectin expression decreased in adipose tissue of HFD mice compared to ND (Fig. 4A, B). In adipose tissue of HFD+EPA mice, leptin expression was decreased whereas adiponectin was increased compared to HFD mice. These results are in agreement with the “healthy” phenotype of HFD+EPA mice described in figure 2 and 3. Concerning the apelin/APJ system, both apelin and APJ mRNA levels were increased in adipose of HFD mice as previously reported [19]. However, their expressions were not different between HFD and HFD+EPA mice in subcutaneous (Fig. 4C and D) and perigonadal adipose tissue (not shown). Plasma apelin levels were not modified either (0.70 ± 0.03 ng/ml in HFD mice (n = 14) and 0.67 ± 0.02 ng/ml in HFD+EPA mice (n = 14)).

Effect of EPA on muscle lipid metabolism

Since muscles are mainly involved in substrate utilization, we focused on lipid utilization by measuring the intramuscular triglycerides (IMTG) and the 14 C-palmitate oxidation ex vivo in soleus muscle. Muscle homogenates of HFD mice contained more IMTG when compared to HFD+EPA and control mice (Fig. 5A). Moreover the complete oxidation of 14 C-palmitate to CO_2 (Fig. 5B), although not significantly decreased in muscle of HFD mice, was significantly increased in muscle of HFD+EPA

compared to HFD mice. The expression of carnitine-palmitoyl-transferase 1b (CPT1b), the rate-limiting enzyme in mitochondrial fatty acid oxidation, as well as the uncoupling protein-3 (UCP3), known to increase with muscle mitochondrial content and to enhance FAO [25], were also significantly increased (Fig. 5C, D) in muscle of HFD+EPA compared to HFD. Thus, limited IMTG storage coupled to increased fatty acid oxidation account for a better utilization of lipids and less metabolic alterations in muscle of HFD+EPA mice.

Effect of EPA on apelin and APJ gene expression in skeletal muscle and C2C12 myotubes

Apelin and APJ expression in muscle of HFD mice were not significantly increased compared to ND mice as previously reported [19]. However, a significant increase was observed in muscle of HFD+EPA (Fig. 6A and B). In order to confirm a direct effect of EPA on apelin and APJ expression, an in vitro approach on C2C12 muscle cells was performed. Of note, APJ expression was not detectable in C2C12 after 14 days of differentiation (data not shown). However, apelin expression was increased after a 24 h EPA treatment in a dose-dependent manner with a maximal effect at 100 μM EPA (Fig. 6C). Interestingly, EPA not only increased significantly apelin expression but also apelin secretion (Fig. 6D). The values obtained with 100 μM EPA were 19.67 ± 5.00 pg/ml

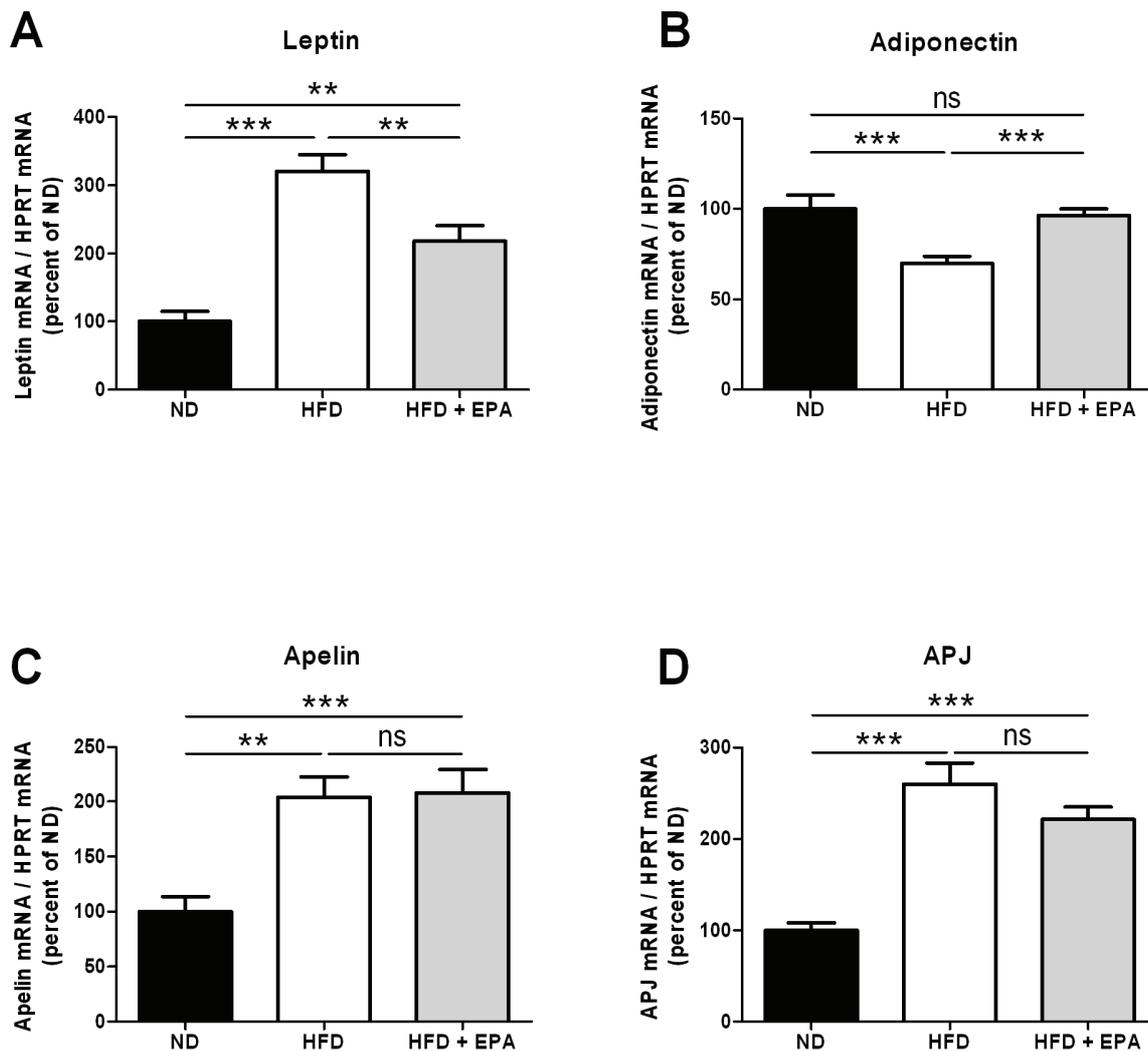


Figure 4. Effect of EPA on adipokines and APJ mRNA expression in adipose tissue. (A) Leptin, (B) Adiponectin, (C) Apelin and (D) APJ expression in total adipose tissue of ND (n = 12), HFD (n = 14) and HFD+EPA mice (n = 14). Results represent mean \pm SEM **p<0.01, ***p<0.001 doi:10.1371/journal.pone.0078874.g004

in control condition (n = 4) and 39.80 ± 5.90 pg/ml in response to $100 \mu\text{M}$ EPA (n = 5). To get further insight, the pathway regulating the stimulatory effect of EPA on apelin gene expression was investigated. Since several peroxisome proliferator activated receptors (PPAR) responsive elements are present in the human promoter of apelin [26] and since PPAR are activated by n-3 PUFAs and PPAR α is involved in partitioning fatty acids towards oxidation [27], we measured the expression of PPAR α in response to $100 \mu\text{M}$ EPA in C2C12 myotubes. Even though PPAR α gene expression was very weak, no increase was observed in response to EPA (not shown) suggesting that PPAR α does not play a major role in the stimulatory effect of EPA on apelin gene expression. Next, since PI3K and MAPK pathways have been shown to regulate insulin or TNF α -induced apelin expression in adipocytes [28,29], C2C12 cells were treated with the PI3K inhibitor LY 294002 ($20 \mu\text{M}$) or the ERK 1/2 inhibitor U0126 ($20 \mu\text{M}$) in the absence or presence of $100 \mu\text{M}$ EPA. As shown in Fig. 6E, only the treatment with U0126 decreased the stimulatory effect of EPA on apelin gene expression suggesting that the MAPK pathway is involved. However, U0126 had no effect on apelin secretion

induced by EPA (Fig.6F) suggesting that this mechanism is not dependent on the ERK activation.

Discussion

In the present study we investigated in mice the effect of a HFD supplemented with EPA on metabolic disturbances usually associated with HFD feeding. We also studied the regulation of the apelin/APJ system especially in skeletal muscles, since chronic apelin treatment has recently been shown to improve insulin sensitivity mainly by increasing muscle oxidative capacities [20].

The effects of n-3 PUFAs (either a single species or in combination) on obesity have been studied in several animal models. In mice fed a HFD enriched with EPA in a similar amount than in the present study (45% energy from fat, 3,6% EPA), even though the amount given is far beyond the amount that can be given in humans, significant decreased weight gain associated with decreased adiposity was also observed [6]. However the anti-obesity effect of EPA has not been found in mice fed a HFD containing low sucrose (38.1% fat, 8.5% sucrose, 5% EPA), unlike in mice fed a high-fat/high-sucrose diet (25% fat,

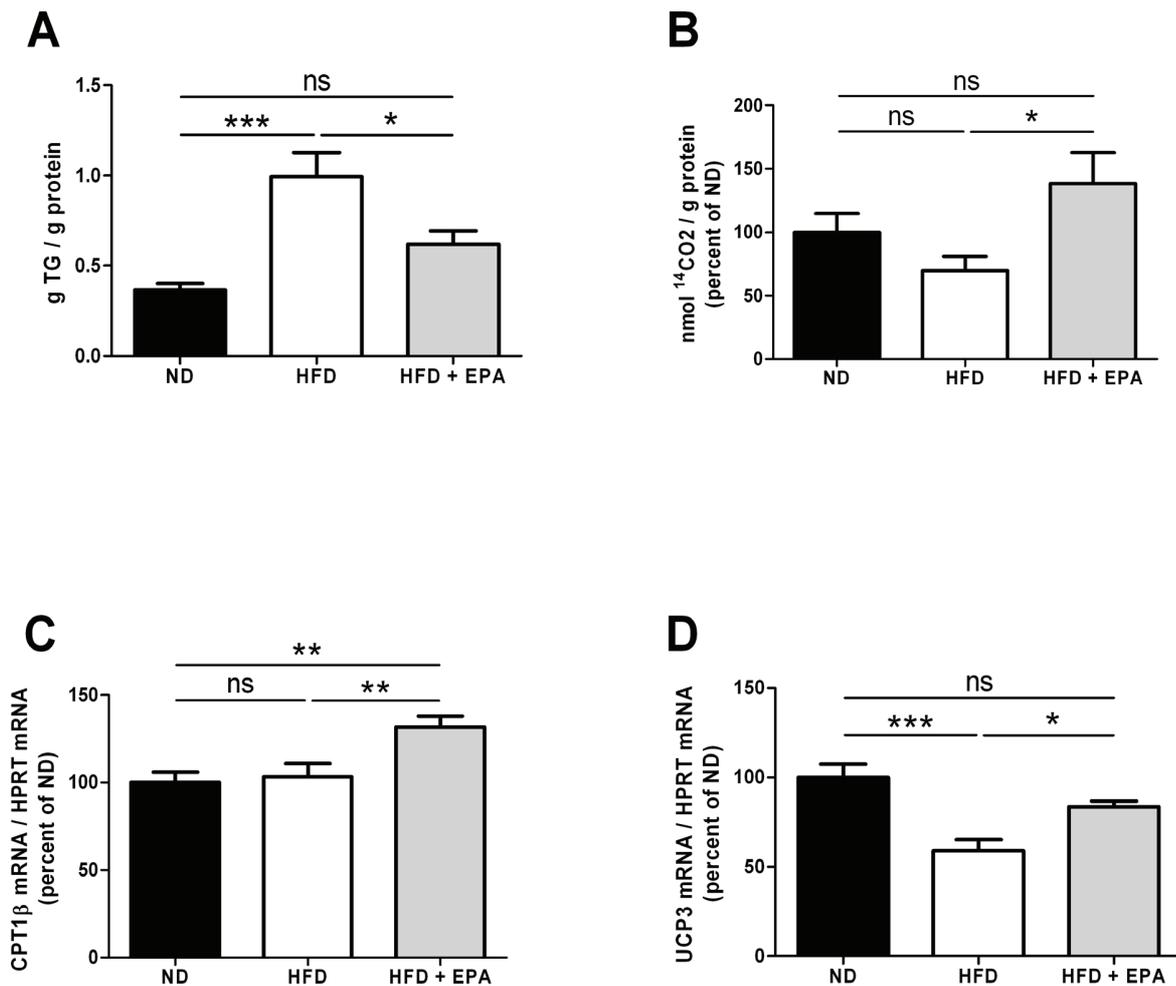


Figure 5. Effect of EPA on muscle lipid metabolism. (A) Intramuscular triglycerides content in red gastrocnemius of ND (n = 9), HFD (n = 10) and HFD+EPA (n = 10) mice. (B) ¹⁴C-palmitate complete β -oxidation and mRNA expression of (C) CPT1b and (D) UCP3 in soleus muscle of ND (n = 9), HFD (n = 6–10) and HFD+EPA mice (n = 6–10). Results are mean \pm SEM and were normalized to the ND group (100%) for B, C and D, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

doi:10.1371/journal.pone.0078874.g005

32.5% sucrose, 5% EPA) [7]. This underlines the importance of the composition of the diet in both the treated and control group. More recently, attenuated body weight gain and reduced fat mass percentage has also been observed in golden Syrian hamsters fed a HFD supplemented with n-3 PUFA [8]. In the present study, EPA supplementation prevents body weight and fat mass gain in agreement with the anti-obesity effect of EPA. Reduced fat mass also has an impact on adipokines profile in adipose tissue as shown here by a decrease in leptin expression and an increase in adiponectin expression as previously reported [9,12,13]. Moreover, significant correlations have been found between obesity and the fatty acid composition in serum. Lipid profile in serum mirrors to a certain extent dietary fatty acid composition and reflects endogenous fatty acid metabolism. For example, high plasma concentrations of palmitic (C16:0) or dihomo- γ -linolenic (C20:3 n-6) acids have been reported to be associated with obesity and the metabolic syndrome in humans [30]. Hereby, plasma concentrations of saturated fatty acids and C20:3 n-6 were decreased in HFD+EPA mice compared to HFD mice, strengthening the beneficial anti-obesity effect of EPA.

Obesity has also been associated with lipid accumulation in the liver leading to steatosis. Limited storage of TG in the liver in response to EPA has been observed in several studies in rodents [7–9] but also in humans [31]. This was confirmed in the present study, in mice, by an absence of TG accumulation and no increased expression of SREBP-1c in the liver of HFD+EPA mice compared to HFD mice. Since SREBP-1c controls the expression of lipogenic enzymes, this suggests that a decrease in lipogenesis could contribute to the EPA protective effect from HFD-induced obesity. The weak expression of hepatic SREBP-1c could be due to a direct effect of EPA on SREBP-1c gene transcription as previously reported [32] or related to the low concentration of plasma insulin observed in HFD+EPA mice since this transcription factor is regulated by insulin [33].

EPA effects on adipose tissue and liver and consequently their decrease in lipid content, questioned about the fate of fatty acids. This is why we focused on the study of lipid metabolism in skeletal muscle. Indeed, resistance to obesity could be due to increased fatty acid oxidation in the muscles. This function has rarely been measured in response to EPA in muscle. Hereby, fatty acid oxidation and the expression of CPT1b were increased in soleus

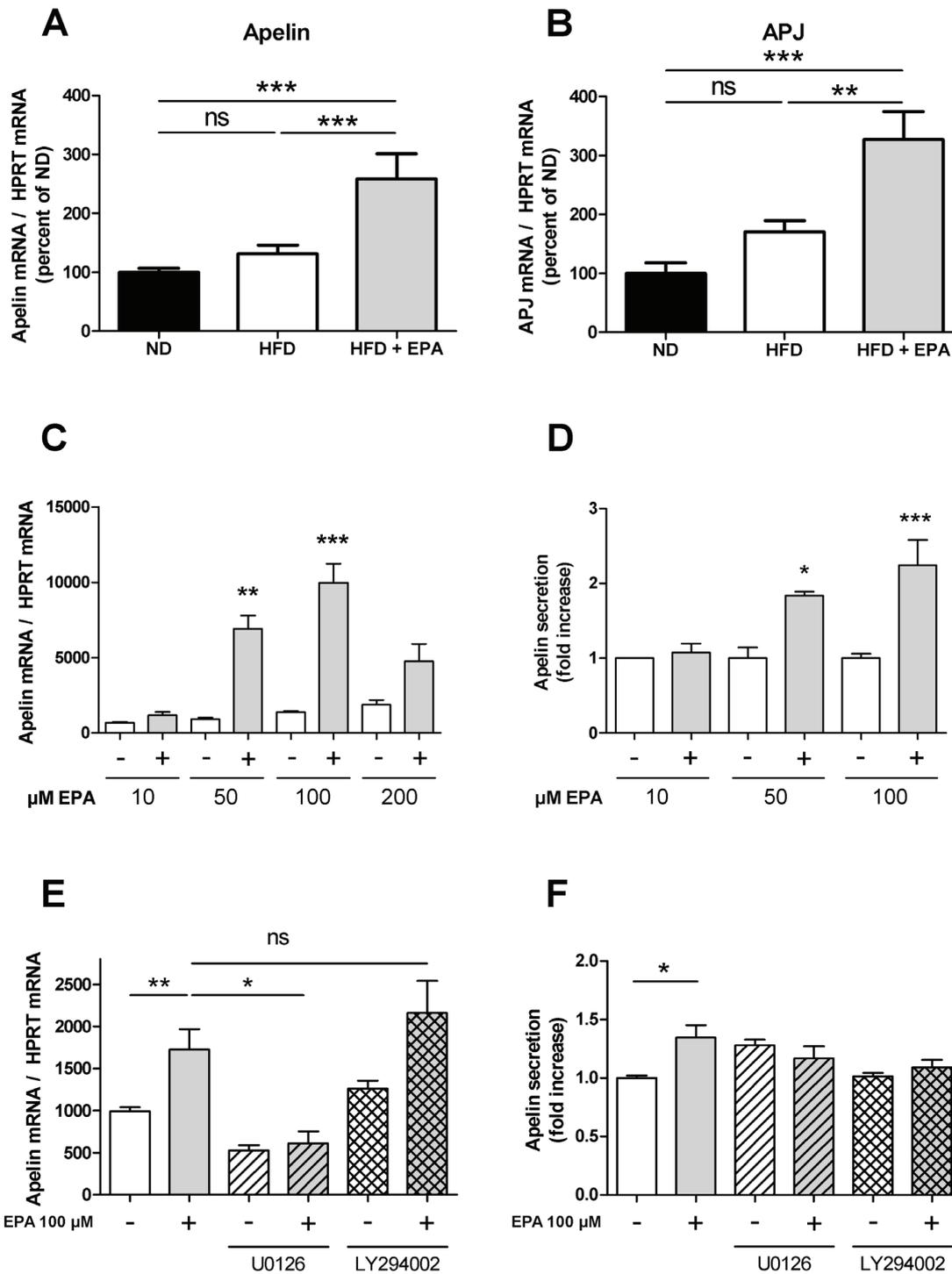


Figure 6. EPA induces in vivo and in vitro expression of the apelin/APJ system in muscle. (A) Apelin and (B) APJ mRNA expression in soleus muscle of ND (n=7), HFD (n=10) and HFD+EPA (n=5). Results represent mean ±SEM **p<0.01, ***p<0.001, ns: not significant. (C) Apelin mRNA expression and (D) secretion in differentiated C2C12 cells treated with the indicated EPA concentrations or the corresponding BSA content for 24 hours after 12-hour serum deprivation. Data are mean ±SEM n=4–5 in each condition. *p<0.05, **p<0.01 ***p<0.001. (E) Effect of 100 μM EPA in the absence or in the presence of the PI3K inhibitor LY294002 (20 μM) or the ERK 1/2 inhibitor U0126 (20 μM) for 24 h after 12-hour serum deprivation on apelin mRNA expression and (F) secretion in differentiated C2C12 cells. Results represent mean ±SEM (n=4–5 in each condition) *p<0.05, **p<0.01, ns: not significant. doi:10.1371/journal.pone.0078874.g006

muscle of HFD+EPA mice. Thus, the observed increase in CTP1b expression in response to EPA most likely promotes the entry of fat into the mitochondria and subsequent oxidation. A physiological overexpression of CPT1 in skeletal muscle was shown to increase fatty acid oxidation and to prevent HFD-induced fatty acid esterification into intracellular lipids that resulted in enhanced muscle insulin sensitivity [34]. Increased UCP3 expression has also been associated with a better use of lipids. In the present study, UCP3 expression was significantly increased in muscle of HFD+EPA mice. Constitutive UCP3 overexpression at physiological levels (over 2-fold) has been shown to decrease the respiratory exchange ratio and to increase mouse skeletal muscle capacity for fatty acid transport and oxidation [35]. Thus, a better use of lipids balanced by a decrease of IMTG in muscle could contribute to a better insulin sensitivity. In line with this, EPA supplementation in HFD fed mice prevented hyperinsulinemia and hyperglycemia and the impaired glucose tolerance observed in HFD mice.

Like EPA, apelin has been shown to increase insulin sensitivity in obese and insulin-resistant mice [15,20]. Expression and secretion of apelin in response to EPA treatment has been studied, until now, only in adipose tissue [16,17]. Since apelin plays a major role in muscle metabolism, it was important to determine whether EPA could regulate apelin expression in muscle comparatively to adipose tissue. The liver is not a major target of apelin since APJ is weakly expressed in basal conditions [36]. To our knowledge, APJ regulation by EPA has never been reported but EPA has been shown to regulate the leptin receptor expression [37]. APJ gene expression in adipose tissue was not differentially regulated between HFD and HFD+EPA fed mice. Similar results were obtained for apelin gene expression although protein levels were not measured. However, apelin mRNA has been shown to parallel protein level in different tissues and situations [38,39]. The absence of significant increase of apelin expression in adipose tissue of EPA+HFD mice compared to HFD mice differs from the previous published *in vivo* study [17]. This discrepancy could be due to the composition of the diet, the model used and how EPA was administered. Indeed, Perez-Echarri et al have shown increased apelin expression in adipose tissue of rats fed a high-fat cafeteria diet where EPA was given daily by oral administration [17]. However, since HFD+EPA mice in the present study had less fat mass and lower insulinemia (both factors being able to increase apelin [28]) than HFD mice, a decrease in apelin production might even be expected. Thus, EPA may have an effect on the expression of apelin and APJ in adipose tissue of HFD+EPA fed mice.

We report here for the first time an increase of apelin expression in the muscle of HFD+EPA mice compared to HFD mice and in C2C12 myotubes. The signaling pathway regulating the stimulatory effect of EPA on apelin gene expression in C2C12 myotubes

was dependent on ERK1/2 but not PI3K activation. These results are different to those obtained by Lorente-Cebrian et al showing that in 3T3-L1 adipocytes, EPA-induced apelin gene expression was dependent of PI3K and independent of MAPK activation [16]. However, the pharmacological inhibitors and the cell type used were not the same than in the present study. Moreover, U0126, the ERK1/2 inhibitor was unable to inhibit the stimulatory effect of EPA on apelin secretion. A difference between apelin gene expression and apelin secretion in response to an inhibitor has been already reported in adipocytes [16]. These results suggest that the mechanism involved in apelin secretion might be MAPK independent. Further investigations are necessary to better define the different signaling pathways and whether other targets are involved. Moreover, EPA effect on apelin secretion seems to be more moderate than the effect observed on apelin gene expression underlying that indeed different mechanism could be involved. However it could not be excluded that apelin could be stored like in cardiomyocytes [40] and only a part of the produced apelin, is secreted. All together, these results suggest that a direct effect of EPA on the expression of apelin *in vivo* could be expected. Additionally and importantly, EPA in differentiated C2C12 efficiently stimulates not only apelin gene expression but also apelin secretion. Thus, apelin could act as a paracrine or autocrine factor in the muscle and could be then considered as a new beneficial myokine.

In conclusion, dietary EPA prevents obesity and metabolic alterations in mice fed a HFD. However, careful attention is necessary when extrapolating to human interventions since, very recently, too high n3-PUFAs plasma levels were shown to correlate with increased prostate cancer [41]. In the present study, in skeletal muscle of HFD+EPA mice, the apelin/APJ system was up-regulated, a better use of lipids was shown matching with the decreased steatosis and decreased fat mass. By combining the results obtained *in vitro* and *in vivo*, it could be hypothesized that in response to EPA, increased APJ expression in muscle and increased apelin production (expression and secretion), could, in turn, contribute to improved muscle metabolism by a paracrine/autocrine regulation loop.

Acknowledgments

We would like to acknowledge for their expertise the Anexplo platform (phenotyping, lipidomics), the staff of animal facilities and Dr J.S. Saulnier-Blache for reading the manuscript and fruitful discussion.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ICL LL PV. Performed the experiments: CB AP EW AB SD CR. Analyzed the data: CB AP. Wrote the paper: ICL CB.

References

- Kopecky J, Rossmel M, Flachs P, Kuda O, Brauner P, et al. (2009) n-3 PUFA: bioavailability and modulation of adipose tissue function. *Proc Nutr Soc* 68:361–369.
- Delarue J, LeFoll C, Corporeau C, Lucas D (2004) N-3 long chain polyunsaturated fatty acids: a nutritional tool to prevent insulin resistance associated to type 2 diabetes and obesity? *Reprod Nutr Dev* 44:289–299.
- Siriwardhana N, Kalupahana NS, Moustaid-Moussa N (2012) Health benefits of n-3 polyunsaturated fatty acids: eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. *Adv Food Nutr Res* 65:211–222.
- Fedor D, Kelley DS (2009) Prevention of insulin resistance by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 12:138–146.
- Poudyal H, Panchal SK, Diwan V, Brown L (2011) Omega-3 fatty acids and metabolic syndrome: effects and emerging mechanisms of action. *Prog Lipid Res* 50:372–387.
- Kalupahana NS, Claycombe K, Newman SJ, Stewart T, Siriwardhana N, et al. (2010) Eicosapentaenoic acid prevents and reverses insulin resistance in high-fat diet-induced obese mice via modulation of adipose tissue inflammation. *J Nutr* 140:1915–1922.
- Sato A, Kawano H, Notsu T, Ohta M, Nakakuki M, et al. (2010) Antiobesity effect of eicosapentaenoic acid in high-fat/high-sucrose diet-induced obesity: importance of hepatic lipogenesis. *Diabetes* 59:2495–2504.
- Kasbi Chadli F, Andre A, Prieur X, Loirand G, Meynier A, et al. (2011) n-3 PUFA prevent metabolic disturbances associated with obesity and improve endothelial function in golden Syrian hamsters fed with a high-fat diet. *Br J Nutr*:1–11.
- Gonzalez-Periz A, Horrillo R, Ferre N, Gronert K, Dong B, et al. (2009) Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by omega-3 fatty acids: a role for resolvins and protectins. *FASEB J* 23:1946–1957.

10. Perez-Matute P, Marti A, Martinez JA, Fernandez-Otero MP, Stanhope KL, et al. (2005) Eicosapentaenoic fatty acid increases leptin secretion from primary cultured rat adipocytes: role of glucose metabolism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288:R1682–1688.
11. Murata M, Kaji H, Takahashi Y, Iida K, Mizuno I, et al. (2000) Stimulation by eicosapentaenoic acids of leptin mRNA expression and its secretion in mouse 3T3-L1 adipocytes in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 270:343–348.
12. Reseland JE, Haugen F, Hollung K, Solvoll K, Halvorsen B, et al. (2001) Reduction of leptin gene expression by dietary polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res* 42:743–50.
13. Flachs P, Mohamed-Ali V, Horakova O, Rossmeisl M, Hosseinzadeh-Attar MJ, et al. (2006) Polyunsaturated fatty acids of marine origin induce adiponectin in mice fed a high-fat diet. *Diabetologia* 49:394–397.
14. Tishinsky JM, Ma DW, Robinson LE (2011) Eicosapentaenoic acid and rosiglitazone increase adiponectin in an additive and PPARgamma-dependent manner in human adipocytes. *Obesity (Silver Spring)* 19:262–268.
15. Dray C, Knauf C, Daviaud D, Wageat A, Boucher J, et al. (2008) Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell Metab* 8:437–445.
16. Lorente-Cebrian S, Bustos M, Marti A, Martinez JA, Moreno-Aliaga MJ (2010) Eicosapentaenoic acid up-regulates apelin secretion and gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Nutr Food Res* 54 Suppl 1:S104–11.
17. Perez-Echarri N, Perez-Matute P, Marcos-Gomez B, Martinez JA, Moreno-Aliaga MJ (2009) Effects of eicosapentaenoic acid ethyl ester on visfatin and apelin in lean and overweight (cafeteria diet-fed) rats. *Br J Nutr* 101:1059–1067.
18. O'Carroll AM, Selby TL, Palkovits M, Lolait SJ (2000) Distribution of mRNA encoding B78/apj, the rat homologue of the human APJ receptor, and its endogenous ligand apelin in brain and peripheral tissues. *Biochim Biophys Acta* 1492:72–80.
19. Dray C, Debard C, Jager J, Disse E, Daviaud D, et al. (2010) Apelin and APJ regulation in adipose tissue and skeletal muscle of type 2 diabetic mice and humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298:E1161–1169.
20. Attane C, Foussal C, Le Gonidec S, Benani A, Daviaud D, et al. (2012) Apelin treatment increases complete Fatty Acid oxidation, mitochondrial oxidative capacity, and biogenesis in muscle of insulin-resistant mice. *Diabetes* 61:310–320.
21. Yamamoto T, Habata Y, Matsumoto Y, Yasuhara Y, Hashimoto T, et al. (2011) Apelin-transgenic mice exhibit a resistance against diet-induced obesity by increasing vascular mass and mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 1810:853–862.
22. Lillington JM, Trafford DJ, Makin HL (1981) A rapid and simple method for the esterification of fatty acids and steroid carboxylic acids prior to gas-liquid chromatography. *Clin Chim Acta* 111:91–98.
23. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226:497–509.
24. Figueras M, Olivan M, Busquets S, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM (2011) Effects of eicosapentaenoic acid (EPA) treatment on insulin sensitivity in an animal model of diabetes: improvement of the inflammatory status. *Obesity (Silver Spring)* 19:362–369.
25. Jones TE, Baar K, Ojuka E, Chen M, Holloszy JO (2003) Exercise induces an increase in muscle UCP3 as a component of the increase in mitochondrial biogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284:E96–101.
26. Mazzucotelli A, Ribet C, Castan-Laurell I, Daviaud D, Guigné C, et al. (2008) The transcriptional co-activator PGC1alpha up regulates apelin in human and mouse adipocytes. *Regul Pept* 150:33–37.
27. Calder PC (2012) Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. *J Nutr* 142: 592S–599S.
28. Boucher J, Masri B, Daviaud D, Gesta S, Guigne C, et al. (2005) Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology* 146:1764–1771.
29. Daviaud D, Boucher J, Gesta S, Dray C, Guigne C, et al. (2006) TNFalpha up-regulates apelin expression in human and mouse adipose tissue. *FASEB J* 20: 1528–30.
30. Warenso E, Ohrvall M, Vessby B (2006) Fatty acid composition and estimated desaturase activities are associated with obesity and lifestyle variables in men and women. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 16:128–136.
31. Di Minno MN, Russolillo A, Lupoli R, Ambrosino P, Di Minno A, et al. (2012) Omega-3 fatty acids for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 18:5839–5847.
32. Jump DB (2008) N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *Curr Opin Lipidol* 19:242–247.
33. Dentin R, Denechaud PD, Benhamed F, Girard J, Postic C (2006) Hepatic gene regulation by glucose and polyunsaturated fatty acids: a role for ChREBP. *J Nutr* 136:1145–1149.
34. Bruce CR, Hoy AJ, Turner N, Watt MJ, Allen TL, et al. (2009) Overexpression of carnitine palmitoyltransferase-1 in skeletal muscle is sufficient to enhance fatty acid oxidation and improve high-fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes* 58: 550–558.
35. Bezaire V, Spriet LL, Campbell S, Sabet N, Gerrits M, et al. (2005) Constitutive UCP3 overexpression at physiological levels increases mouse skeletal muscle capacity for fatty acid transport and oxidation. *FASEB J* 19:977–979.
36. Pope GR, Roberts EM, Lolait SJ, O'Carroll AM (2012) Central and peripheral apelin receptor distribution in the mouse: species differences with rat. *Peptides* 33: 139–148.
37. Fan C, Liu X, Shen W, Deckelbaum RJ, Qi K (2011) The Regulation of Leptin, Leptin Receptor and Pro-opiomelanocortin Expression by N-3 PUFAs in Diet-Induced Obese Mice Is Not Related to the Methylation of Their Promoters. *Nutr Metab (Lond)* 8:31.
38. Wang XL, Tao Y, Lu Q, Jiang YR (2012) Apelin supports primary rat retinal Müller cells under chemical hypoxia and glucose deprivation. *Peptides* 33: 298–306.
39. Berta J, Kenessey I, Dobos J, Tovari J, Klepetko W (2010) Apelin expression in human non-small cell lung cancer: role in angiogenesis and prognosis. *J Thorac Oncol* 8: 1120–1129.
40. Ronkainen VP, Ronkainen JJ, Hänninen SL, Leskinen H, Ruas JL, et al. (2007) Hypoxia inducible factor regulates the cardiac expression and secretion of apelin. *FASEB J* 21: 1821–1830.
41. Brasky TM, Darke AK, Song X, Tangen CM, Goodman PJ, et al. (2013) Plasma Phospholipid Fatty Acids and Prostate Cancer Risk in the SELECT Trial. *J Natl Cancer Inst.* 105(15): 1132–1141.

Discussion et perspectives de l'article

"Effects of dietary Eicosapentaenoic Acid (EPA) supplementation on Apelin and metabolism in muscle of high-fat fed mice"

Dans cette étude, nous avons tout d'abord confirmé que la supplémentation en EPA du régime HFD contenant 45% de lipides limite l'apparition de l'obésité, en limitant la prise de masse grasse. Bien que nous n'ayons pas mesuré directement la sensibilité à l'insuline des souris, la supplémentation en EPA a permis de limiter l'intolérance au glucose et de prévenir totalement l'élévation de la glycémie et de l'insulinémie à jeun induites par le régime gras en 10 semaines.

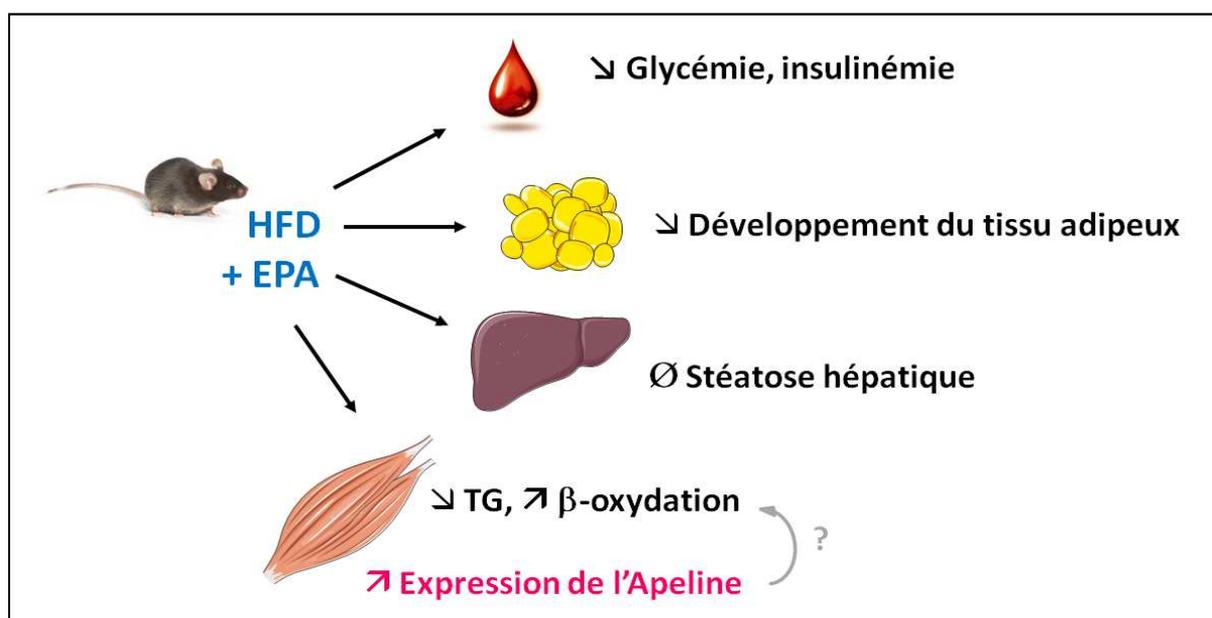


Figure 18. Récapitulatif des effets de la supplémentation en EPA d'un régime HFD.

La très forte augmentation de l'EPA plasmatique nous confirme son absorption intestinale chez les souris supplémentées en EPA (ND : 53,53 μM ; HFD : 34,10 μM ; HFD+EPA : 1186,64 μM). De plus, la concentration d'EPA dans le plasma étant un indicateur fiable de l'incorporation de ces acides gras dans des tissus tels que le tissu adipeux, le foie, les reins et les muscles squelettiques [Tu, et al. 2013], il est très probable que l'EPA soit également fortement représenté dans les lipides des organes des souris supplémentées en EPA.

Le type d'acides gras plasmatiques, plutôt que leur quantité, étant important pour le métabolisme et la sensibilité à l'insuline, nous avons également étudié le profil lipidique du plasma des souris afin de savoir si la supplémentation en EPA modifiait ce profil. Les acides gras saturés, considérés comme délétères pour la sensibilité à l'insuline, sont moins présents dans le plasma des souris supplémentées en EPA que chez les souris nourries avec le HFD sans EPA, en accord avec le meilleur profil métabolique des animaux. En accord avec la compétition qu'il existe entre les $\omega 3$ et les $\omega 6$ pour les enzymes de biosynthèse [Poudyal, et al. 2011], la concentration plasmatique de tous les PUFAs de la famille des $\omega 6$ est diminuée dans le groupe des souris supplémentées en EPA. De façon surprenante, le plasma des souris minces et nourries avec le régime HFD contient du DHA à une concentration non négligeable (ND : 591 μM ; HFD : 728 μM), alors que les régimes n'en contiennent pas. Les régimes ND et HFD contenant de l'ALA (C18:3 $\omega 3$) en quantité 10 fois inférieure à celle d'EPA dans le régime HFD+EPA, il est donc peu probable que le DHA présent en soit issu. Néanmoins, la présence de DHA a déjà été observée dans divers tissus de souris nourries avec un régime n'en contenant pas [Lefils, et al. 2010]. La présence de DHA dans les tissus étant corrélée à sa concentration plasmatique, ce résultat est en accord avec cette étude.

Les souris supplémentées en EPA sont totalement protégées du développement d'une stéatose, la quantité de TG hépatiques étant même inférieure à celle des souris non obèses. Cela est en accord avec des études menées sur des souris supplémentées en EPA de façon préventive [Liu, et al. 2013], [Kalupahana, et al. 2010] et la diminution de l'expression du facteur de transcription SREBP-1c que nous observons est en accord avec la protection contre la stéatose. Les $\omega 3$ sont capables d'inhiber la lipogenèse *de novo*, soit en activant le récepteur nucléaire PPAR α , qui est capable d'inhiber l'expression de SREBP-1c, soit en agissant sur son activation, comme c'est le cas pour le DHA [Botolin, et al. 2006]. On peut alors supposer que l'EPA peut, lui aussi, inhiber l'expression des protéines permettant la maturation et la translocation de SREBP-1c dans le noyau.

Dans le tissu adipeux, la moindre expression de la leptine et la plus forte expression de l'adiponectine sont en accord avec la moindre prise de masse grasse des souris supplémentées en EPA. L'expression de l'apeline et d'APJ est significativement augmentée chez les souris nourries avec le régime HFD, ce qui avait déjà été observé par notre équipe [Dray, et al. 2010],

et qui est en accord avec l'hyperinsulinémie et l'augmentation de masse grasse induites par ce régime. En revanche, nous n'observons pas d'augmentation supplémentaire de leur expression chez les souris supplémentées en EPA par rapport aux souris nourries avec le régime HFD.

Au premier abord, nos résultats ne semblent pas être en accord avec l'effet de l'EPA sur l'apeline dans le tissu adipeux de rats nourris avec un régime cafétéria supplémenté en EPA, par rapport au régime cafétéria seul [Perez-Echarri, et al. 2009]. Les différences expérimentales avec notre étude sont nombreuses (modèle animal, type de régime hypercalorique, durée de l'expérimentation, mode d'administration et dose d'EPA utilisée), cependant il est important de noter que les souris supplémentées en EPA ont une insulinémie identique au groupe des souris nourries avec le régime normal, et que le poids des dépôts adipeux en question est significativement plus faible que chez les souris nourries avec le régime HFD. Ainsi, en postulant que, chez nos souris, l'EPA n'a pas d'effet direct sur l'apeline adipocytaire, l'expression de l'apeline dans le tissu adipeux des souris supplémentées en EPA devrait être bien inférieure à celle des souris nourries avec le HFD. Or, l'expression de l'apeline dans le tissu adipeux est aussi élevée chez les souris supplémentées en EPA que chez les souris nourries avec le régime HFD. Cela suggère que l'EPA stimule l'expression de l'apeline dans le tissu des souris supplémentées en EPA. De plus, l'expression de l'apeline dans le tissu adipeux des souris supplémentées en EPA ne dépassant pas celle des souris HFD, cela peut expliquer que l'apelinémie ne soit pas augmentée chez les souris supplémentées en EPA.

Ayant montré que les souris supplémentées en EPA ont moins de masse adipeuse, moins de TG intramusculaires (TGIM), et ne présentent pas de stéatose, malgré une prise alimentaire identique aux souris obèses non supplémentées, nous avons voulu déterminer le devenir des lipides ingérés chez ces souris. Les ω 3 contenus dans l'huile de poisson ayant la capacité d'augmenter la dépense énergétique [Baillie, et al. 1999] et de rediriger les lipides vers le catabolisme en augmentant l'activité enzymatique de la CPT1 dans les muscles [Power and Newsholme 1997], il était possible que l'EPA prévienne l'apparition de l'obésité et du stockage ectopique de lipides en augmentant l'oxydation des lipides dans le muscle des souris. Tout d'abord, on observe une tendance à la diminution de la β -oxydation du ^{14}C -palmitate *ex vivo* dans le muscle des souris nourries avec le régime HFD par rapport aux souris non obèses, ce qui est cohérent avec une altération de la capacité oxydative du muscle insulino-résistant. Nous montrons que la β -oxydation est significativement doublée, et que l'expression de la CPT1 β est

augmentée chez les souris supplémentées en EPA par rapport aux souris sous HFD, ce qui était suggéré par l'augmentation de l'activité de la CPT1 dans le muscle soléaire de rat après une supplémentation en huile de poisson, observée par Power et al, après 4 et 10 semaines [Power and Newsholme 1997], et par l'équipe avec laquelle nous avons collaboré, après 6 semaines de régime (résultats en cours de publication). L'UCP3, une protéine découplante dont le rôle bénéfique dans la β -oxydation n'est pas encore clair, est également plus exprimée dans le muscle des souris supplémentées en EPA, en accord avec une étude *in vitro* récemment publiée [Lee, et al. 2013]. L'augmentation de ces deux acteurs de l'oxydation des lipides est cohérente avec la diminution des TGIM [Bruce, et al. 2009], [Bezaire, et al. 2005] et l'amélioration de la tolérance au glucose [Bruce, et al. 2009] que nous avons observée.

Ainsi, le métabolisme lipidique du muscle est moins altéré chez les souris supplémentées en EPA, et notre étude est la première à montrer que la supplémentation en EPA augmente la β -oxydation des acides gras dans le muscle oxydatif chez la souris. De plus, une augmentation de la capacité oxydative du muscle est aussi observée après 4 semaines de traitement chronique à l'apeline [Attane, et al. 2012], et l'expression génique d'UCP3 dans le muscle est augmentée après un traitement chronique à l'apeline de 2 semaines [Higuchi, et al. 2007], renforçant la similarité entre les effets de l'apeline et de l'EPA sur le métabolisme énergétique du muscle.

L'expression de l'apeline dans le muscle est doublée dans le muscle des souris supplémentées en EPA. Afin de nous assurer que cette augmentation est due à un effet direct de l'EPA, nous avons utilisé un modèle *in vitro*. Des cellules C2C12 différenciées en myocytes ont été traitées avec différentes dose d'EPA (10, 50, 100 et 200 μ M) pendant 24h, et la plus forte induction de l'expression de l'apeline a été obtenue avec la dose de 100 μ M. Le traitement des C2C12 avec le U0126, qui inhibe la phosphorylation des kinases MEK1/2, montre que l'induction de l'expression de l'apeline par l'EPA est dépendante de ces kinases. Ainsi, le traitement à l'EPA, par l'activation des kinases MEK1/2, et donc des MAPK ERK1/2, induirait l'activation de facteur(s) de transcription ou de coactivateur(s) de facteur de transcription [Meissner, et al. 2011], reconnaissant le promoteur de l'apeline dans les cellules musculaires. A ce jour, le promoteur de l'apeline a été peu étudié, et très peu de facteurs de transcription ont été reconnus comme pouvant induire l'expression de l'apeline [Jiang, et al. 2013], [Cox, et al. 2006], [Wang, et al. 2006], [Han, et al. 2008], et aucune étude n'a abordé leur régulation par

l'EPA dans le muscle. L'expression génique du facteur de transcription HIF (hypoxia-induced factor), qui induit l'expression de l'apeline dans les adipocytes [Glassford, et al. 2007] et les cardiomyocytes [Ronkainen, et al. 2007], est augmentée dans le rein de rats diabétiques de type I supplémentés en EPA [Taneda, et al. 2010], mais son expression protéique est diminuée dans le tissu adipeux humain après une supplémentation en EPA+DHA [Mejia-Barradas, et al. 2013]. Il serait donc intéressant de savoir quel est l'effet de l'EPA sur le HIF musculaire, et son éventuelle implication dans l'expression de l'apeline.

En revanche, nos données montrent que l'induction de l'expression de l'apeline n'est pas dépendante de l'activation de la PI3K, alors que c'est le cas dans les adipocytes 3T3-L1 [Lorente-Cebrian, et al. 2010]. Bien que nous n'ayons pas utilisé les mêmes inhibiteurs de la PI3K que dans l'étude de Lorente et al, il est possible que les voies de signalisation empruntées par l'EPA pour induire l'expression de l'apeline soient tissu-spécifiques. Il sera nécessaire de le confirmer dans le muscle de souris, par exemple en traitant les muscles et le tissu adipeux *ex vivo* avec l'EPA et les inhibiteurs des différentes voies de signalisation.

D'autres acteurs intracellulaires pourraient être impliqués dans cet effet sur l'expression de l'apeline. Par exemple, la production de leptine ou d'adiponectine dans les adipocytes par l'EPA est dépendante de la biosynthèse des glucosamines [Murata, et al. 2000] ou encore de l'activation de PPAR γ [Tishinsky, et al. 2011]. Bien que PPAR α soit une cible privilégiée des ω 3 dans le muscle de souris traitées à l'EPA, son expression n'est pas modifiée. Par conséquent, PPAR α ne semble pas être impliqué dans l'induction de l'expression de l'apeline musculaire par l'EPA. PPAR γ peut également médier des effets de l'EPA dans les cellules C2C12 [Huang, et al. 2011], mais des résultats préliminaires obtenus au laboratoire sur l'inhibition de PPAR γ par l'antagoniste GW9662 sur les cellules C2C12 (données non présentées) suggèrent que PPAR γ n'est pas impliqué non plus dans l'effet de l'EPA sur l'expression de l'apeline.

En plus d'augmenter l'expression de l'apeline musculaire *in vivo* et *in vitro*, l'EPA est aussi capable d'augmenter la sécrétion de l'apeline par les myotubes en culture, ce qui fait de l'apeline une potentielle myokine !

La régulation de la sécrétion de l'apeline ne semble pas être dépendante de la voie des MAPK, étant donné que l'on retrouve autant d'apeline dans le milieu de culture des C2C12 traitées avec l'EPA, avec ou sans U0126. Cependant, il semble que l'inhibiteur seul induise la

sécrétion d'apeline, alors qu'il diminue son expression génique, ce qui est plutôt surprenant et peut être expliqué par le faible nombre de cas.

Dans les myotubes C2C12, l'expression de l'apeline est multipliée par 4,5 et sa sécrétion par 1,5 seulement alors que, dans les adipocytes 3T3-L1, l'induction de la sécrétion de l'apeline est plus forte que l'induction de son expression génique [Lorente-Cebrian, et al. 2010]. On retrouve ici une différence entre le tissu adipeux et le muscle sur la régulation de l'apeline par l'EPA. Dans le tissu adipeux, les auteurs montrent qu'il s'agirait d'un éventuel rôle post-traductionnel de l'EPA sur la sécrétion de l'apeline. Dans le muscle, il est envisageable qu'une partie de l'apeline produite dans les myotubes soit stockée dans la cellule, comme cela a été montré dans des cardiomyocytes de rat [Ronkainen, et al. 2007]. Si l'on replace le rapport expression/sécrétion de la culture cellulaire sur les myotubes dans un contexte *in vivo*, l'expression de l'apeline étant doublée dans le muscle, on peut s'attendre à une induction plus faible de sa sécrétion. Cela, mis en parallèle avec l'augmentation de l'expression d'APJ dans le muscle des souris supplémentées en EPA, sous réserve de démontrer que le muscle peut effectivement sécréter l'apeline à suite de cette supplémentation en EPA, on peut imaginer que l'apeline musculaire agisse de façon autocrine et/ou paracrine en tant que myokine bénéfique, plutôt qu'à distance comme une hormone classique. Cela serait en accord avec le fait que l'apelinémie n'est pas augmentée chez les souris supplémentées en EPA.

Notre étude a donc établi un lien entre l'EPA et l'apeline musculaire, reste maintenant à savoir si cette apeline musculaire est impliquée dans les effets de l'EPA sur le catabolisme des acides gras. Notre modèle de myocytes C2C12 ne nous permet pas d'y répondre car ces cellules n'expriment pas APJ. Un autre modèle de cellules musculaires possédant APJ (naturellement ou par la transfection du gène codant pour APJ) serait mieux adapté pour répondre à cette question. Les cellules pourraient alors être traitées avec un antagoniste d'APJ comme le F13A ou un siRNA, en présence d'EPA et les effets métaboliques pourraient être mesurés. L'utilisation de souris invalidées pour l'apeline a été envisagée, afin de voir si la supplémentation en EPA est aussi efficace en termes de protection contre l'obésité et la résistance à l'insuline et d'induction de l'utilisation musculaire des lipides, cependant les souris *Ape^{-/-}* étant résistantes à l'insuline [Yue, et al. 2010], il est possible que nous ne puissions pas déterminer avec certitude l'implication de l'apeline dans les effets de l'EPA dans ce modèle. Un traitement *in vivo* avec le F13A pourrait également répondre à cette question, d'autant plus

que son effet inhibiteur sur la β -oxydation induite par l'apeline dans le muscle de souris en régime normal a été validé par notre équipe [Attane, et al. 2012].

Chez l'Homme, au niveau de l'organisme dans son ensemble, une supplémentation en EPA ou en EPA+DHA ne modifie pas l'oxydation de ^{14}C -ALA chez des patients légèrement hyperlipidémiques [Burdge, et al. 2003] ni celle de ^{13}C -palmitate chez des patients atteints de cancer et de cachexie [Zuijdgeest-Van Leeuwen, et al. 2000]. L'étude de l'oxydation des lipides par la mesure du CO_2 radiomarqué expiré ne reflète pas uniquement l'oxydation qui a lieu dans les muscles, et il est important de connaître l'effet de l'EPA sur le catabolisme des lipides spécifiquement dans le muscle. Or, les effets de l'EPA sur l'oxydation des lipides dans le muscle chez l'Homme n'a jamais été étudié *in vivo* ni *ex vivo* à notre connaissance. Les deux seules études qui les ont mesurés dans des myotubes différenciés à partir du muscle vaste latéral de sujets sains et diabétiques de type II en culture primaire, ont montré des effets différents de notre étude. Une étude sur myotubes traités avec la dose d'EPA que nous avons utilisée ($100\mu\text{M}$), a montré une augmentation de l'expression de CPT1 et de l'oxydation incomplète du ^{14}C -palmitate, mais pas de l'oxydation complète, après 4 jours de traitement à l'EPA [Wensaas, et al. 2009]. La seconde étude a montré un effet de l'EPA inverse, à savoir une diminution de l'oxydation complète du ^{14}C -oléate, sans pour autant modifier l'oxydation incomplète, après un traitement de 24h avec $600\mu\text{M}$ d'EPA [Aas, et al. 2006]. Il est cependant possible qu'une trop forte dose d'EPA puisse avoir des effets inverses à ceux obtenus avec des doses autour de $100\mu\text{M}$, ce qui a été montré pour l'expression de la leptine dans les adipocytes 3T3-L1 avec une dose de $500\mu\text{M}$ [Reseland, et al. 2001]. Dans notre étude, la dose de $200\mu\text{M}$ d'EPA induit à un moindre degré l'expression de l'apeline dans les C2C12 que les doses de 50 et $100\mu\text{M}$, il n'est donc pas impossible qu'en utilisant une dose plus élevée, on observe une diminution.

Cependant, les études *in vitro* sur cellules musculaires humaines possèdent un biais car les myotubes sont différenciés à partir de cellules progénitrices isolées à partir de biopsies de muscle, et le traitement par l'EPA a lieu *in vitro*. La mesure de la capacité oxydative du muscle de sujets ayant reçu une supplémentation en EPA permettrait de déterminer de façon plus pertinente ses effets sur le catabolisme des lipides dans le muscle. Dans notre étude, c'est ce que nous avons mesuré sur le muscle soléaire des souris *ex vivo*, et cela pourrait être envisageable chez l'Homme sur un homogénat de biopsie musculaire [Sparks, et al. 2013].

L'EPA peut agir directement sur l'activation de récepteurs nucléaires, tels que les PPARs, pour moduler l'expression génique des cellules, mais les PUFAs et les eicosanoïdes qui en sont dérivés sont eux aussi bioactifs. La question qui se pose alors est : les effets de l'EPA que nous observons sur l'expression de l'apeline et d'APJ *in vivo* et la sécrétion de l'apeline *in vitro*, sont-ils dépendants de l'EPA natif, du DPA, ou bien de sa métabolisation en eicosanoïde(s) ?

La concentration de DPA étant multipliée par 5 dans le plasma des souris supplémentées en EPA par rapport aux souris nourries avec le régime ND et HFD, on ne peut donc pas exclure que le DPA agisse sur le métabolisme et pourquoi pas sur l'expression de l'apeline des souris supplémentées en EPA. Les effets de cet $\omega 3$ sur la santé ont été très peu étudiés, mais quelques études lui confèrent un rôle bénéfique d'anti-aggrégant plaquettaire et d'anti-inflammatoire [Kaur, et al. 2011]. De plus, une supplémentation alimentaire en DPA pendant 4 semaines réduit les TG et l'activité enzymatique de la FAS dans le foie de souris db/db [Gotoh, et al. 2009].

Dans les adipocytes humains ou murins par exemple, l'EPA peut augmenter l'expression de l'adiponectine [Flachs, et al. 2006] ainsi que sa sécrétion [Tishinsky, et al. 2011], [Lefils-Lacourtablaise, et al. 2013], mais le 15-désoxy- $\delta^{12,14}$ -PGJ₃ (15d-PGJ₃), un eicosanoïde dérivé de la prostaglandine PGD₃, elle-même produite à partir de l'EPA, est également capable d'induire la sécrétion d'adiponectine dans les adipocytes 3T3-L1 [Lefils-Lacourtablaise, et al. 2013]. On ne sait pas encore si la production de ce nouvel eicosanoïde est indispensable à l'induction de la sécrétion de l'adiponectine par l'EPA, mais cette étude ouvre un nouveau champ d'investigation des effets de l'EPA sur le métabolisme énergétique et sur la production d'adipokines. Et si, plutôt que la quantité d'EPA ajoutée dans le régime alimentaire ou dans un milieu de culture, l'important était son taux de conversion en métabolites bioactifs ? Une différence dans l'efficacité des systèmes COX/LOX dans les différents modèles animaux ou cellulaires utilisés pourrait alors expliquer la variabilité observée entre les études, aussi bien animales que cliniques. Il est important de noter qu'un régime hyperlipidique peut augmenter l'expression de la COX-2 dans le tissu adipeux de rat [Tian, et al. 2011], le régime alimentaire pourrait donc être un paramètre à prendre en compte lorsque l'on souhaite évaluer les effets de l'EPA (ou de tout PUFA de la famille des $\omega 3$ ou des $\omega 6$).

Les muscles de souris, de rats et humains [Testa, et al. 2007], ainsi que les cellules C2C12 [Markworth, et al. 2013] possèdent la COX. Les effets de l'AA (C20:4 $\omega 6$) sur la différenciation des C2C12 étant dépendants de l'activation de la COX [Markworth and Cameron-Smith 2013], il

est envisageable que les effets de l'EPA que nous observons *in vitro*, mais aussi *in vivo*, soient dépendants de la production d'eicosanoïdes issus de l'EPA.

Bien que les études cliniques menées sur les effets de la supplémentation alimentaire en $\omega 3$ sur la sensibilité à l'insuline soient discordantes, la régulation de la production d'adipokines par ces $\omega 3$, piste initiée depuis de nombreuses années, continue d'être suivie pour les nouvelles adipokines et apporte de nouveaux éléments.

En ce qui concerne l'apeline, nous ne savons pas encore si une supplémentation en EPA augmente les taux plasmatiques ou l'expression génique de l'apeline chez l'Homme, ni si les effets bénéfiques de l'apeline sur le métabolisme énergétique seront les mêmes que ceux observés chez les rongeurs. Les doses d'EPA utilisées chez l'animal étant supérieures à celles utilisées lors des études cliniques, il est également important de s'assurer que la concentration plasmatique d'EPA nécessaire pour observer des effets bénéfiques sur le métabolisme énergétique ne dépasse pas celles qui sont associées à un risque de développer d'autres pathologies, comme cela a tout récemment été montré pour le cancer de la prostate [Brasky, et al. 2013]. Bien qu'un effet direct de l'EPA sur le développement de ce cancer n'ait pas été démontré, une supplémentation en EPA sur une longue période pourrait ne pas être anodine, et doit donc être surveillée de près afin d'éviter l'apparition d'éventuels effets négatifs.

Effets d'un traitement à l'apeline sur le métabolisme énergétique hépatique de souris obèses et diabétiques, et régulation de son récepteur APJ dans la résistance à l'insuline

Au commencement de ma thèse, seule l'étude de Principe et al établissait un lien entre le système apeline/APJ et le foie [Principe, et al. 2008]. Depuis, plusieurs études ont montré que le système apeline/APJ est en partie responsable de l'induction de processus fibrogéniques et angiogéniques dans la cirrhose [Melgar-Lesmes, et al. 2010], [Melgar-Lesmes, et al. 2011], [Yokomori, et al. 2011], [Yokomori, et al. 2012]. En revanche, dans le foie de souris rendues insulino-résistantes par le TNF α [Chu, et al. 2013], l'apeline a un effet bénéfique. Cependant, le rôle de l'apeline dans la pathologie hépatique non alcoolique associée à l'obésité et au diabète de type II n'est toujours pas établi.

La résistance à l'insuline dans le foie se traduit par une perte des effets de l'insuline sur l'inhibition de la néoglucogenèse, conduisant à une production hépatique de glucose excessive, et par un maintien des effets de l'insuline sur la lipogenèse *de novo*, l'accumulation de lipides conduisant à l'apparition d'une stéatose.

Parmi les traitements actuellement disponibles pour traiter le diabète de type II, le foie peut être une cible privilégiée, ce qui est le cas de la Metformine, qui induit une diminution de la production hépatique de glucose. De plus, la Metformine entraîne une diminution des dépôts adipeux et de la stéatose, alors qu'une augmentation et une redistribution de la masse grasse ont été observées sous traitement par une autre classe d'antidiabétiques, les thiazolidinediones. A ce jour, les études réalisées chez l'animal montrent que l'apeline améliore la sensibilité à l'insuline chez les souris obèses et résistantes à l'insuline en diminuant leur masse grasse et en augmentant les capacités oxydatives du muscle. Ainsi, les effets de l'apeline sur la sensibilité à l'insuline sont jusqu'ici communs à ces deux classes d'antidiabétiques mais ceux sur le foie ne sont pas connus. Il est vrai que le récepteur de l'apeline, APJ, est très faiblement exprimé dans le foie en condition basale, cependant il est important de savoir si l'apeline, en agissant directement sur le foie, contribue ou non à cette amélioration globale de la sensibilité à l'insuline.

Dans ce but, nous avons étudié, chez des souris obèses et insulino-résistantes, les effets du traitement chronique à l'apeline, qui a permis de mettre en évidence les effets bénéfiques de l'apeline sur le métabolisme lipidique du muscle squelettique [Attane, et al. 2012], sur les principales fonctions métaboliques du foie. Nous avons également étudié l'expression d'APJ dans les différentes populations cellulaires hépatiques ainsi que sa régulation au cours de l'insulino-résistance.

Matériels & Méthodes

Animaux et traitement à l'apeline

Les souris ont été manipulées conformément aux principes et aux lignes directrices établies par l'Institut National de la Recherche Médicale (INSERM), dans des conditions constantes de température (20-22°C) et d'humidité (50-60%).

Des souris C57Bl6/J mâles âgées de 10 semaines (Charles River) ont été nourries soit avec un régime standard (ND) soit avec un régime hyperlipidique (HFD) contenant 20% des calories sous forme de protéines, 35% sous forme de glucides et 45% sous forme de lipides (Research Diet, NJ), pendant 12 semaines, *ad libitum*. Un suivi régulier du poids, de la glycémie et de l'insulinémie ont permis d'évaluer leur état de résistance à l'insuline. Les résultats obtenus précédemment dans notre équipe avaient déterminé que 12 semaines de régime HFD sont nécessaires à l'apparition de l'insulino-résistance.

Traitement à l'apeline :

Les souris sous HFD, une fois insulino-résistantes, ont été séparées en deux groupes. Un groupe recevant une injection intra-péritonéale quotidienne d'apeline (0,1 $\mu\text{mol/kg/jour}$) pendant 28 jours, l'autre groupe étant traité au PBS [Attane, et al. 2012]. Les souris ND ont reçu le même traitement au PBS.

Après 4 semaines de traitement, les souris ont été sacrifiées 24h après la dernière injection par dislocation cervicale, après un jeûne de 7h pendant la période nocturne (00h-07h). Le sang a été prélevé à la veine cave inférieure en utilisant une seringue contenant de l'EDTA (0,1M), puis le plasma, obtenu après une centrifugation de 10 minutes à 13000rpm à 4°C, a été congelé dans l'azote et conservé à -80°C avant d'être analysé. Le foie a été pesé, découpé et congelé dans l'azote liquide puis conservé à -80°C avant d'être étudié. Une partie du foie a été immergée 24h à 4°C dans du paraformaldéhyde à 4%, puis transférée dans de l'éthanol à 70% avant d'être incluse dans un bloc de paraffine, pour les analyses histologiques.

Les souris db/db et les db/m issues des mêmes portées âgées de 20 semaines ont été obtenues la veille du sacrifice, en condition nourrie. Après la dislocation cervicale des souris, le sang a été prélevé à la veine cave inférieure afin de limiter le sang présent dans les organes

prélevés. Le foie, ainsi que le tissu adipeux épididymaire et le muscle soléaire, ont été prélevés, congelés dans l'azote liquide et conservés -80°C avant d'être étudiés.

Mesure de la composition corporelle des animaux

La composition corporelle (masse maigre et masse grasse) des souris a été mesurée un jour avant le début et à la fin du traitement à l'apeline. Brièvement, les souris éveillées ont été placées dans un tube translucide, inséré dans l'appareil d'EchoMRI (EchoMRI-3-1 echo medical system, Houston, Tx, USA), et la masse maigre et grasse obtenue a été rapportée au poids corporel total et exprimée en pourcentage.

Paramètres plasmatiques

La glycémie à jeun a été mesurée avant le début et à la fin du traitement le jour du sacrifice, à l'aide d'un glucomètre à partir d'une goutte de sang prélevée à la veine caudale (Accu-check, Roche Diagnostics). L'insulinémie a été mesurée à l'aide du kit ELISA "insulin sensitive kit" (Mercodia) à partir de 5 µl de plasma. La concentration plasmatique de β-hydroxybutyrate (β-HB) a été mesurée à l'aide du kit "β-hydroxybutyrate colorimetric assay" (Biovision) à partir de 50µL de plasma.

Dosage de glycogène hépatique

Un morceau d'environ 30mg de foie congelé a été pesé et incubé dans 200µl de NaOH (1M) pendant 1h à 55°C. Après l'ajout de 200µL d'HCl (1M) et une centrifugation de 5 minutes à 7,0g à 4°C, 10µl du surnageant a été incubé dans 40µL d'une solution d'acétate de sodium (0,2M ; pH 7,4) contenant ou ne contenant pas 50U/ml d'amyloglucosidase. Après 1h d'agitation lente à 55°C, le glucose a été dosé à l'aide du réactif RTU (BioMérieux), à partir de 6µl du digestat et des échantillons ne contenant pas l'enzyme. La densité optique (DO) à 505nm, mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre, nous a permis de calculer la concentration en glucose des digestats à l'aide d'une gamme étalon. Le foie contenant du glucose libre, la différence entre le glucose mesuré dans un échantillon incubé avec l'amyloglucosidase et son duplicata incubé sans amyloglucosidase correspond à la quantité de glucose produit à partir du glycogène.

Activité enzymatique de la PEPCK

Un morceau d'environ 50mg de foie congelé a été homogénéisé dans 500µl de tampon de lyse (HEPES 20mM, Saccharose 0.25M, EDTA 1mM, DTT 1mM). Après une centrifugation, les protéines ont été dosées sur le surnageant, et 200µg de protéines ont été diluées dans 50µl de tampon Hepes (50mM) pour réaliser le dosage enzymatique. Une première solution contenant du phosphoénolpyruvate (PEP) (2mM), du NaHCO₃ (60mM), de la malate déshydrogénase (MDH) et du β-NADH en concentration saturante (respectivement 10UI/mL et 0,3mM) dans un tampon HEPES (50mM) a été ajoutée (100µL). La réaction a ensuite été amorcée par l'ajout de 50µL d'une solution contenant du MnSO₄ (4mM) et 2mM de dGDP.

La PEPCK catalyse la formation de PEP à partir d'oxaloacétate (OAA) *in vivo*, et cette réaction est réversible. Lors du dosage, le PEP est ajouté en excès. La carboxylation du PEP en OA qui est alors réalisée est couplée à une autre réaction, non réversible, catalysée par la MDH afin de favoriser la formation de l'OAA. La disparition du NADH,H⁺, réalisée lors de la transformation de l'OA en malate, a été suivie en temps réel par une lecture spectrophotométrique continue à 340nm pendant 5min. Pour chaque échantillon, un contrôle négatif a été réalisé en parallèle en effectuant le dosage en absence de l'accepteur de phosphate dGDP. En tenant compte de la stœchiométrie des 2 réactions et du coefficient d'extinction du NADH,H⁺ à 340nm ($\epsilon_{340nm} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), l'activité PEPCK de l'échantillon a été calculée et exprimée en µmol/min/mg de protéine.

Test de tolérance au pyruvate

Les souris, après un jeûne de 6h en période diurne (8h-14h), ont reçu une injection intrapéritonéale de pyruvate (2mg/g) dilué dans du PBS. La glycémie a été mesurée comme décrit précédemment aux temps -30, 0, 15, 30, 45, 60, 90, et 120 minutes après l'administration du pyruvate.

Dosage des triglycérides hépatiques

Un morceau d'environ 50mg de foie congelé a été pesé et homogénéisé (Precellys tissue homogenizer) dans 600µl d'un tampon de lyse (Tris 20mM, NaCl 150mM, EDTA 1mM, EGTA 1mM, 1% Triton X-100, pH 7,5). Les lipides ont été extraits en ajoutant 2,5ml de liquide de Folch (chloroforme/méthanol 2:1 v/v) et 1,2ml de KCl/HCl (2N) à 450µl de lysat. Après une centrifugation de 10 minutes à 2500rpm à 4°C, 100µl de la phase organique ont été mis sous

évaporation à l'azote, le culot obtenu a été dilué dans 100µl (ND) ou 300µl (HFD) d'isopropanol, et 20µl ont été utilisés pour doser la quantité de triglycérides à l'aide du kit enzymatique "TG PAP kit" (Biomérieux).

Coloration Hémalum-éosine de coupes de foie

Des sections de 3 µm d'épaisseur de foie ont été réalisées sur des lames Superfrost Plus (Thermoscientific). Après déparaffinage au Bioclear, les lames ont été réhydratées à l'eau courante pendant 3 minutes. Les lames ont été trempées dans un bain d'hémalum pendant 10 minutes. Après un lavage à l'eau et un bain d'alcool acide à 70%, elles ont ensuite été rapidement incubées dans une solution ammoniacale à 3%. Après un autre lavage, les lames ont été incubées dans un bain d'éosine-orange (éosine 1%, orange G 1%) pendant 2 minutes. Après un bain d'alcool à 70%, les lames ont été séchées, montées et observées au microscope (Nikon Eclipse TE2000-U).

Mesure *ex vivo* de la β-oxydation du ¹⁴C-palmitate sur homogénat de foie

Au moment du sacrifice des souris, un morceau d'environ 50 mg de foie a été pesé et homogénéisé dans un tube en verre maintenu sur la glace contenant 1ml du tampon d'homogénéisation (sucrose (250 mM), EDTA (1 mM), Tris-HCl (10 mM) pH 7,4), à l'aide d'un homogénéiseur (Glas Col, LLC, Terre Haute, Indiana). Dans le puits d'une plaque de 24 double-puits, "fabriquée maison", 80 µl d'homogénat ont été mélangés à 320 µl de tampon d'incubation contenant du sucrose (125 mM), du chlorure de potassium (200 mM), du phosphate de potassium (25 mM), du Tris-HCl (8 mM), de l'ATP (2 mM), de l'héxalate de chlorure de magnésium (2,5 mM), de la L-carnitine (2,5 mM), du dithiothreitol (2,5 mM), du Tris-HCl (20 mM), du malate (0,25 mM), du NAD⁺ (0,25 mM), du coenzyme A (0,125 mM), de la BSA délipidée (0,5%), et un mélange de palmitate (180µM) et de 1-¹⁴C-palmitate (1µCi/ml, Perkin Elmer), sous agitation, pendant 2h à 37°C. Afin de stopper la réaction, 40µl d'acide perchlorique ont été ajoutés et le ¹⁴CO₂ libéré a été capté par le NaOH contenu dans le puits adjacent. Après une incubation d'1h à température ambiante sans agitation, la β-oxydation complète du ¹⁴C-palmitate a été déterminée en mesurant la quantité de ¹⁴CO₂ contenu dans 200µl de NaOH présent dans le puits adjacent. La β-oxydation incomplète a été déterminée en comptant la quantité de ¹⁴C contenue dans 200µl de milieu acidifié après centrifugation 10 minutes à 10000rpm, contenant les ASM (acide-soluble metabolites, les produits de la β-

oxydation incomplète). La quantité de ^{14}C a été comptée à l'aide d'un compteur β (Perkin Elmer).

Mesure *in vivo* de la sécrétion de TG sous forme de VLDL

Les souris, anesthésiées à l'isoflurane après un jeûne de 6h en période nocturne (00h-07h), ont reçu une injection rétro-orbitale de tyloxapol (500mg/kg dans du NaCl) (Triton WR1339, Sigma-Aldrich), un agent de surface non-ionique qui inhibe la lipoprotéine-lipase (LPL). Du sang a été prélevé à la veine caudale 30 minutes avant et 30, 60 et 120 minutes après l'injection de tyloxapol. Après une centrifugation de 10 minutes à 13000rpm à 4°C, les TG ont été mesurés sur 5 μ l de plasma à l'aide du kit enzymatique "TG PAP kit" (Biomérieux).

Mesure de l'expression génique

Les ARN totaux ont été extraits des échantillons de foie, de muscle soléaire et de tissu adipeux épидидymaire congelés à -80°C à l'aide du kit "Gene Jet RNA purification" (Fermentas) en suivant les instructions du fabricant.

Les ARN ont ensuite été rétro-transcrits en ADN complémentaires. Pour cela, 500 ng d'ARN, préalablement traités à la DNase, ont été incubés 7 minutes à 75°C en présence d'amorces aléatoires (75 ng/ μ L) puis une heure à 37°C dans un tampon contenant les dNTP à 0,5 mM, du dithiothréitol à 5 mM et la reverse transcriptase à 200 unités (Super Script II, Invitrogen) dans un volume final de 20 μ L. La réaction a été arrêtée en chauffant à 95°C pendant 5 minutes. En parallèle, des contrôles négatifs ont été réalisés, en remplaçant l'enzyme par son tampon. L'expression des gènes codant pour la PEPCK, FAT, PPAR α , SREBP-1c, FAS, ACC2 et APJ a été mesurée à partir 5 μ L d'ADNc dilué au 1/10. Après ajout de 10 μ L de Taq polymérase (Mesablue for SyberGreen, Eurogentec) et des amorces sens et antisens spécifiques aux gènes d'intérêt, l'ADNc a été amplifié grâce au StepOne (Applied Bio System). En parallèle, l'expression du gène de ménage HPRT a été mesurée afin de normaliser l'expression génique.

Pour l'expression d'APJ dans le foie des souris PPAR α -/- et LXR-/-, les ARN de foie ont été extraits à l'aide du Trizol Reagent (Invitrogen), rétro-transcrits avec l'enzyme High Capacity cDNA (Applied Biosystems) et l'expression d'APJ a été mesurée comme décrit dans l'étude "A systems biology approach to the hepatic role of the oxysterol receptor LXR in the regulation of lipogenesis highlights a cross-talk with PPAR α " [Ducheix, et al. 2013], et normalisée avec

l'expression du gène TBP. La génération des souris KO et les traitements avec les antagonistes sont également décrits dans cette étude.

Western Blot de pAMPK et pACC.

Les échantillons de foie de souris nourries avec le régime normal et celles nourries avec le régime HFD, traitées au PBS ou à l'apeline, ont été homogénéisés à 4°C (Precellys tissue homogenizer) dans un tampon de lyse (Tris 20mM, NaCl 150mM, EDTA 1mM, EGTA 1mM, 1% Triton X-100, inhibiteurs de protéases (Sigma), pH 7,5). Après une centrifugation de 10 minutes à 4°C à 14000 rpm, les protéines ont été dosées sur le surnageant. Vingt µg de protéines ont été dilués dans un volume total de 20µl contenant un agent réducteur et le bleu de charge (BioRad). Le tout a été chauffé à 95°C avant d'être déposé dans les puits d'un gel de polyacrylamide (gradient 4-12% Criterion BioRad) et la migration a eu lieu à 125V pendant 2h. Les protéines ont été transférées à 60V pendant 1h sur une membrane de nitrocellulose (Whatman) qui, après une coloration au rouge Ponceau, a été saturée pendant 1h avec du PBS-T (PBS, Tween 20 à 0,1%) contenant 5% de lait pendant une heure sous agitation à température ambiante. La membrane a été découpée puis incubée sur la nuit à 4°C avec les anticorps primaires reconnaissant les protéines suivantes : AMPK α (Cell Signaling), pAMPK α (Thr 172, Cell Signaling), ACC (Cell signaling), pACC (Ser 79, Cell Signaling), et la β -actine (Cell Signaling) en tant que protéine de ménage, tous produits chez le lapin, dilués dans du PBS-T (PBS, Tween 20 à 0,1%) contenant 5% de lait. Après 5 lavages au PBS-T, la membrane a été incubée pendant 3 heures avec un anticorps secondaire anti-lapin couplé à la HRP (horseradish peroxydase, Cell Signaling Technology) dilué au 1/3000 dans du PBS-T contenant 3% de lait. Après 5 lavages, la révélation a été effectuée par chimiluminescence après une incubation d'une minute dans le réactif de détection (ECL WB detection reagent, GE HealthCare), puis à l'aide d'un film sensible à la lumière (high performance chemiluminescence film, GE Healthcare). La quantification a été réalisée à l'aide du logiciel Image Quant TL Software (GE Healthcare).

Western Blot d'APJ.

Les échantillons de foie, de cœur et de poumons de souris db/m et db/db ont été homogénéisés à 4°C (Precellys tissue homogenizer) dans un tampon de lyse (Tris, NaCl, EDTA, EGTA, MgCl₂, inhibiteurs de protéases Sigma) et centrifugés pendant 30 minutes à 4°C à 14800 rpm. Le surnageant a été jeté et le culot rincé avec du tampon de lyse, puis re-suspendu dans

du tampon de lyse contenant 1% de Triton X-100. Après une centrifugation de 20 minutes à 4°C à 14000 rpm, les protéines ont été dosées sur le surnageant à l'aide du réactif de Bradford, par spectrophotométrie. Trente µg de protéines ont été chauffés pendant 5 minutes à 37°C (au lieu des 95°C habituels, qui peuvent faire précipiter APJ et empêcher leur entrée dans le gel [Puffer, et al. 2000]) pendant 5 minutes, puis chargés dans les puits d'un gel de polyacrylamide (gradient 4-12% Criterion BioRad) et la migration a eu lieu pendant 2h à 125V. Les protéines ont été transférées à 60V pendant 1h sur une membrane de PVDF (Whatman) qui, après une coloration au rouge Ponceau, a été saturée pendant 1h avec du PBS-T (PBS, Tween 20 à 0,1%) contenant 5% de lait pendant une heure sous agitation à température ambiante. La membrane a été incubée sur la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire polyclonal anti-APJ produit chez le lapin (APLNR (H300), SantaCruz Biotechnology) dilué au 1/1000 dans du PBS-T contenant 3% de lait. Après 5 lavages au PBS-T, la membrane a été incubée pendant 2 heures avec un anticorps secondaire anti-lapin couplé à la HRP (horseradish peroxydase, Cell Signaling Technology) dilué au 1/3000 dans du PBS-T contenant 3% de lait. Après 5 lavages, la révélation a été effectuée après une incubation de 5 minutes avec la solution SuperSignal West Pico (Thermoscientific), enregistrée par l'appareil Chemidoc (Biorad Laboratories) et visualisé à l'aide du logiciel Image Lab (BioRad).

Immunofluorescence

Les coupes de foie de souris nourries avec le régime HFD, déparaffinées au Bioclear (deux bains de 30 minutes), ont été réhydratées 3 fois 10 minutes dans des bains d'éthanol à 100%, 90%, 75%, puis 50%. Afin de démasquer les épitopes, les lames ont été lavées au PBS puis placées dans une solution de citrate (Target Retrieval Solution, citrate pH6, Dako) chauffée à 90°C et ramenée à 80°C, trois fois consécutives, puis jusqu'à ébullition pendant 20 secondes, au micro-onde. Les coupes ont été perméabilisées pendant 10 minutes au PBS-Triton X-100 à 0,2%. Les sites libres ont été bloqués par saturation avec une solution de PBS-BSA 5% pendant une heure à température ambiante. Les coupes de foie ont ensuite été incubées sur la nuit à 4°C avec l'anticorps polyclonal anti-APJ produit chez le lapin (APLNR (H300), SantaCruz Biotechnology) dilué au 1/150, et l'anticorps monoclonal anti-αSMA produit chez la souris (α-smooth muscle cell actin monoclonal antibody, Sigma), dilué au 1/800, dans une solution de dilution (Antibody diluent, Dako). Des coupes n'ayant été incubées qu'avec la solution de dilution sans anticorps primaires ont été utilisées comme contrôles négatifs. Après 5 lavages au

PBS, les lames ont été incubées en présence des deux anticorps secondaires, dirigés contre l'anticorps anti-APJ (Jackson ImmunoResearch, couplé à la cyanine 3) et contre l'anticorps anti- α SMA (Invitogen, couplé au fluorochrome Alexa488), dilués au 1/100 dans la solution de dilution (Dako), pendant 2 heures, à 4°C, dans l'obscurité. Un liquide de montage contenant du DAPI (mounting media, Sigma) a été utilisé pour monter les lamelles sur les lames. Le montage a été scellé avec du vernis et les échantillons ont été observés au microscope (Nikon Eclipse TE2000-U).

Statistiques

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne avec l'erreur standard à la moyenne (SEM). Les différences statistiques sont mesurées par t-test de Student ou par ANOVA selon le type de données. Le niveau de significativité choisi est * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$.

Résultats

1) Effets du traitement à l'apeline sur des souris rendues résistantes à l'insuline par un HFD

Comme décrit précédemment [Attane, et al. 2012], nous avons montré que le traitement à l'apeline de 4 semaines chez les souris HFD, comparativement aux souris HFD traitées au PBS, n'a pas d'effet sur le poids des souris (HFD+PBS : $43,22 \pm 0,97$ g ; HFD+Ape : $39,68 \pm 1,16$ g, n.s). En revanche, il a pour effet de diminuer la prise de masse grasse et l'insulinémie à jeun, l'effet sur la glycémie à jeun étant moins net dans ces protocoles (Figure A).

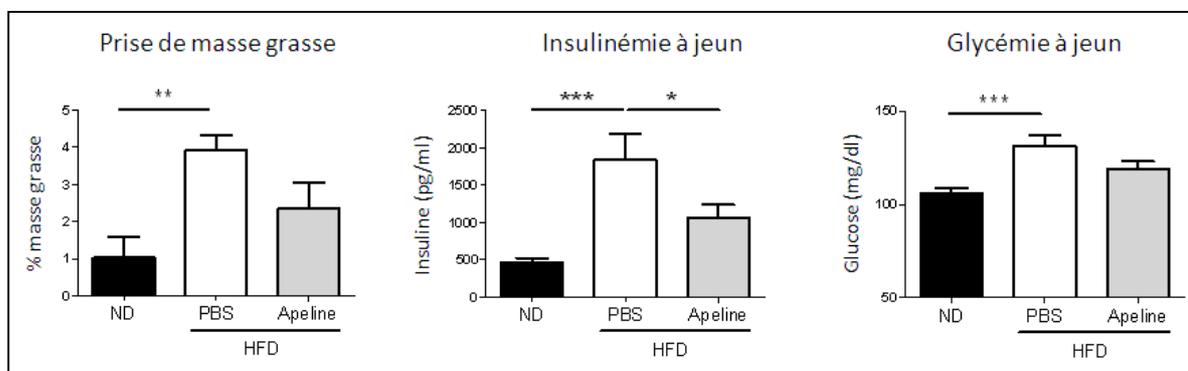


Figure A. Effets du traitement à l'apeline de 4 semaines sur la prise de masse grasse, l'insulinémie et la glycémie à jeun de souris nourries avec un régime ND (n=14), ou HFD, traitées au PBS (n=12) et à l'apeline (n=16). Les résultats représentent la moyenne \pm SEM. *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001.

➤ Métabolisme glucidique

Tout d'abord nous avons mesuré les taux de glycogène hépatique, et ni le régime HFD ni le traitement à l'apeline n'a d'effet sur le stockage de glycogène chez nos animaux (Figure B).

Afin de savoir si la néoglucogénèse était modifiée par le traitement à l'apeline, nous nous sommes intéressés à la PEPCK, une enzyme impliquée dans ce processus. Son expression génique est légèrement diminuée en réponse au traitement apeline, mais en mesurant son activité, nous n'avons pas pu montrer de diminution chez les souris traitées à l'apeline (Figure B).

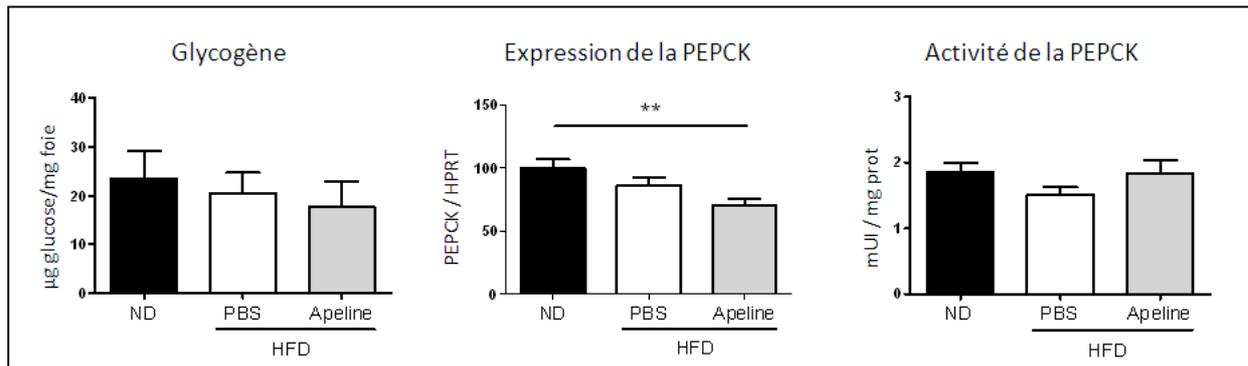


Figure B. Effets du traitement à l'apeline de sur le stock de glycogène, l'expression génique (en % du groupe ND) et l'activité enzymatique de la PEPCK dans le foie de souris nourries avec un régime ND (n=5-10), ou HFD, traitées au PBS (n=5-10) et à l'apeline (n=5-10). Les résultats représentent la moyenne \pm SEM. **p<0,01.

Nous avons également réalisé un test de tolérance au pyruvate qui permet d'observer, *in vivo*, la capacité du foie à synthétiser et à libérer du glucose à partir de pyruvate (Figure C). Sur une première série de souris HFD, on observe que la glycémie des souris traitées à l'apeline retourne à sa valeur de départ plus rapidement que celle des souris traitées au PBS. Ce résultat encourageant n'ayant pas été retrouvé avec une autre série de souris incluant des souris ND, il est donc difficile de conclure quant à un effet de l'apeline sur la néoglucogénèse par cette expérience.

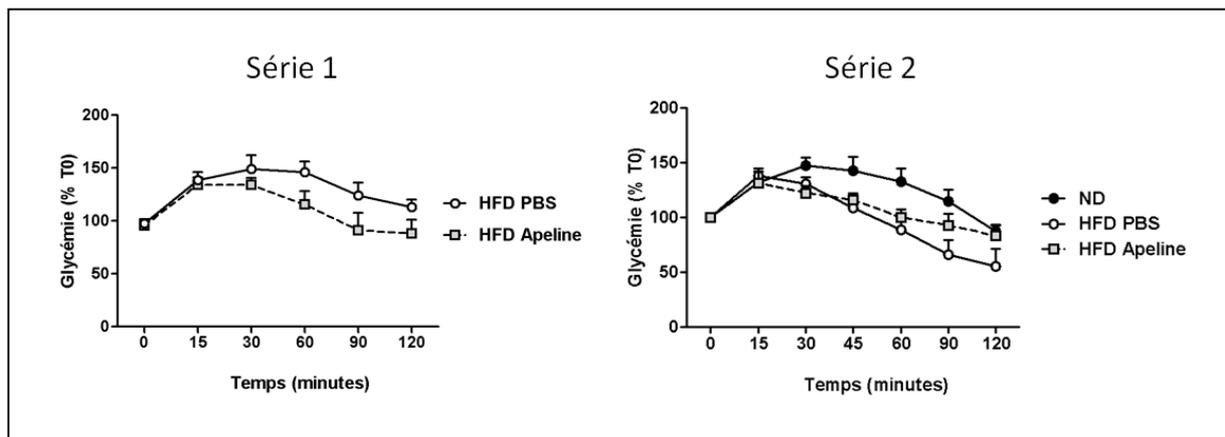


Figure C. Test de tolérance au pyruvate réalisé après 4 semaines de traitement à l'apeline. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM. Série 1 : HFD PBS n=5, HFD Ape n=4. Série 2 : ND n=4, HFD PBS n=5, HFD Ape n=6.

Afin de savoir si le traitement à l'apeline a un effet sur la néoglucogenèse, nous envisageons de reconduire ces expériences dans un nouveau protocole et aussi de déterminer l'expression et l'activité de la glucose-6-phosphatase, qui est l'enzyme responsable de la libération du glucose hépatique dans la circulation.

➤ Métabolisme lipidique

Nous avons dans un premier temps évalué l'effet du traitement à l'apeline sur la stéatose, en dosant les TG hépatiques des souris. Tout d'abord, on constate que les souris nourries avec un HFD ont 3 fois plus de TG stockés dans le foie que les souris ND, et que celles qui ont reçu le traitement à l'apeline ont moins de TG hépatiques. Cet effet sur les TG est visible sur les coupes de foie après coloration à l'hémalun-éosine (Figure D).

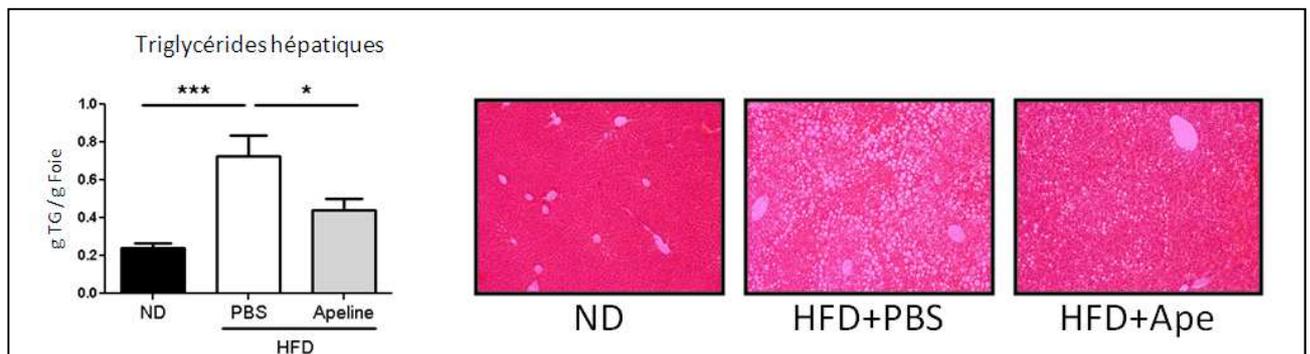


Figure D. Effet du traitement à l'apeline sur le stock de triglycérides hépatiques et de souris nourries avec un régime ND (n=13), ou HFD, traitées au PBS (n=11) et à l'apeline (n=14). Dosage de TG hépatique et photographies représentatives de coloration à l'hémalun-éosine de coupes de foie. Grossissement x100. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Nous avons donc exploré différents aspects du métabolisme lipidique du foie afin de comprendre cette diminution des TG dans le foie des souris traitées à l'apeline.

On observe que l'expression du transporteur d'acides gras FAT, qui est significativement augmentée suite au régime HFD, n'est pas modifiée par le traitement à l'apeline (Figure E).

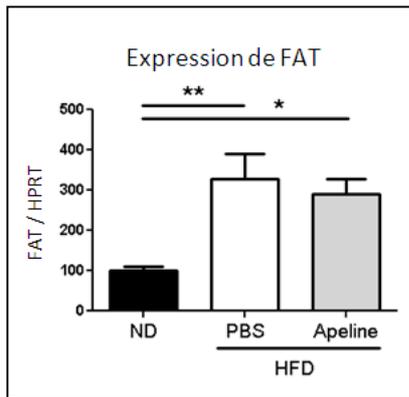


Figure E. Expression génique de FAT (en % du groupe ND) après 4 semaines de traitement à l'apeline, dans le foie de souris ND (n=8), ou HFD, traitées au PBS (n=11) et à l'apeline (n=11). Les résultats représentent la moyenne \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

L'accumulation de TG dans le foie en réponse au régime hyperlipidique est souvent accompagnée dans un premier temps d'une augmentation de l'oxydation des acides gras, qui se produit soit dans les mitochondries soit dans les peroxysomes. Lorsque la β -oxydation avait été mesurée dans le muscle, la technique utilisée permettait de mesurer l'oxydation complète et incomplète sur le muscle intact. Cette technique n'a pas pu donner de résultats fiables sur le foie. C'est pourquoi, en collaborant avec le Dr Cédric Moro du "Laboratoire de Recherche sur les Obésités" au sein de l'institut I2MC, nous avons mesuré la β -oxydation complète et incomplète des acides gras sur des homogénats de foie. De plus, cette technique nous a permis de nous affranchir d'un éventuel effet de l'apeline sur l'entrée des lipides dans les cellules. Chez les souris nourries avec le régime HFD, l'oxydation complète et incomplète du ^{14}C -palmitate est augmentée comparativement aux souris ND, montrant qu'à ce stade de résistance à l'insuline, la β -oxydation est stimulée pour faire face au surplus de lipides. Suite au traitement à l'apeline, la β -oxydation complète et incomplète est diminuée par rapport aux souris traitées au PBS (Figure F).

Dans le foie, la β -oxydation est couplée à la cétogénèse en condition de jeûne. On observe que le HFD a tendance à augmenter le β -hydroxy-butyrate (β -HB) plasmatique, alors que ce n'est pas le cas chez les souris traitées à l'apeline, qui ont une valeur de β -HB plasmatiques avoisinant celle des souris ND (Figure F).

Le récepteur nucléaire PPAR α gouvernant l'expression de gènes impliqués dans le catabolisme des acides gras dans le foie, nous avons souhaité savoir si son expression était modifiée par le traitement à l'apeline. Bien que son expression soit légèrement augmentée dans le foie des souris HFD, aucun effet du traitement à l'apeline n'est observé sur l'expression de PPAR α (Figure F).

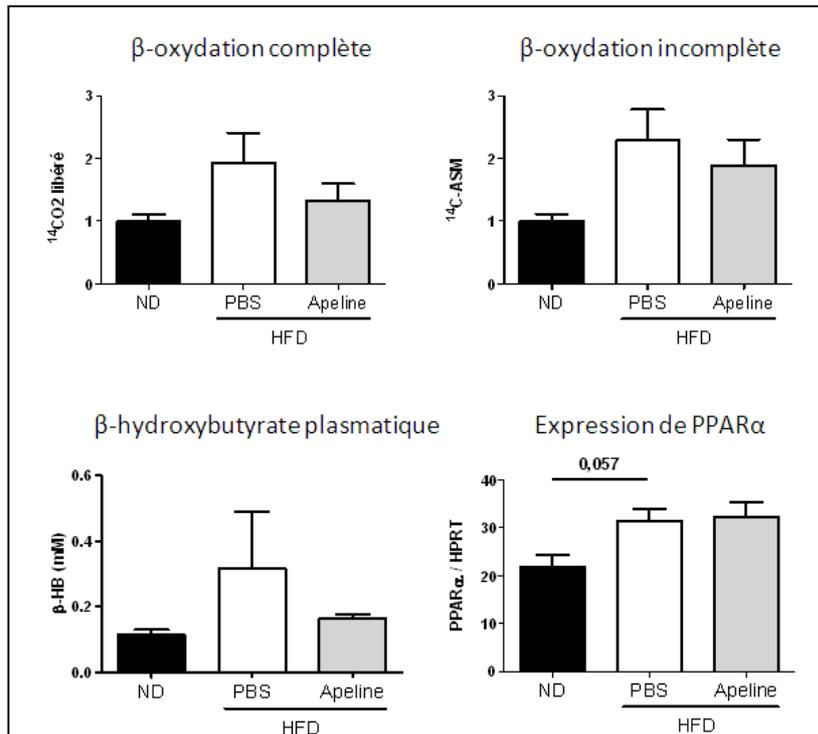


Figure F. Effets du traitement à l’apeline sur la β-oxydation complète et incomplète du ¹⁴C-palmitate sur homogénat de foie (en fois d’augmentation par rapport au groupe ND), le β-hydroxybutyrate plasmatique, et l’expression de PPARα de souris nourries avec un régime ND (n=4-12), ou HFD, traitées au PBS (n=4-12) et à l’apeline (n=4-15). Les résultats représentent la moyenne ± SEM.

Puisqu’au cours de l’insulino-résistance, la lipogenèse *de novo* est suractivée, et qu’elle est en partie responsable de l’accumulation des lipides dans le foie au cours de l’insulino-résistance [Donnelly, et al. 2005], nous avons étudié l’expression d’un facteur de transcription majeur de ce processus, SREBP-1c, et de l’une de ces cibles, la FAS, une enzyme lipogénique. Le régime HFD induit effectivement leur expression et, de façon intéressante, leur expression est significativement diminuée par le traitement à l’apeline, suggérant ainsi que ce traitement a un effet favorable sur la stéatose (Figure G).

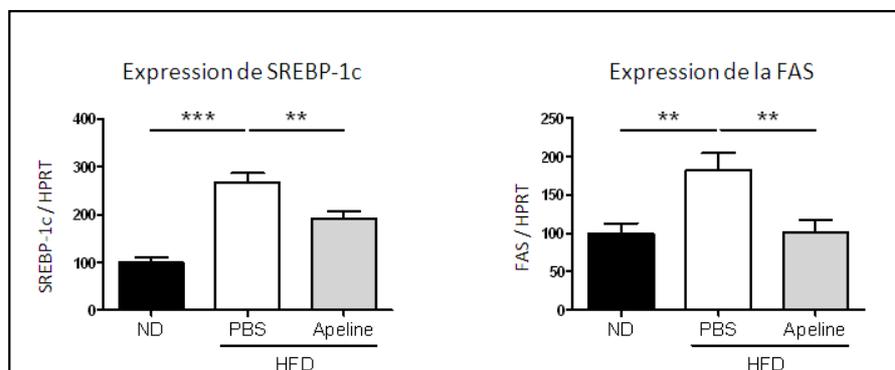


Figure G. Effets du traitement à l’apeline sur l’expression génique de SREBP-1c et de la FAS (en % du groupe ND) dans le foie de souris nourries avec un régime ND (n=14), ou HFD, traitées au PBS (n=12) et à l’apeline (n=15). Les résultats représentent la moyenne ± SEM. **p<0,01 ; ***p<0,01.

D'autre part, au cours de l'insulino-résistance, le flux sortant de lipides sous forme de VLDL est aussi augmenté [Kamagate and Dong 2008a]. La quantité de TG hépatiques étant diminuée par le traitement à l'apeline, nous avons souhaité savoir si cela était la conséquence d'une sécrétion augmentée de VLDL. En dosant les TG plasmatiques après une injection iv d'un inhibiteur de LPL, nous avons pu évaluer la quantité de lipides sécrétés par le foie sous forme de VLDL. Chez les souris traitées à l'apeline, la sécrétion de VLDL est significativement diminuée à 60 et 120 minutes par rapport aux souris traitées au PBS (Figure H). Cela suggère que chez nos souris, la sécrétion de VLDL est dépendante de la quantité disponible de TG.

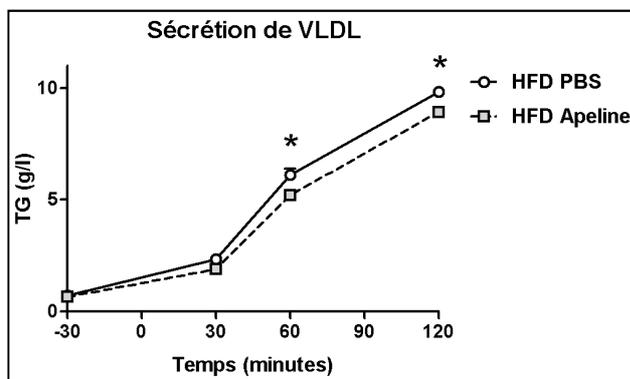


Figure H. Effets du traitement à l'apeline sur la sécrétion de VLDL par le foie sur des souris nourries avec un régime HFD, traitées au PBS (n=5) et à l'apeline (n=4). Les résultats représentent la moyenne \pm SEM. *p<0,05.

Le traitement à l'apeline semble donc être bénéfique en limitant le stockage des lipides dans le foie, et en diminuant sa capacité à les relarguer sous forme de VLDL.

L'AMPK est un régulateur clé du métabolisme énergétique qui, lorsqu'elle est activée, promeut la β -oxydation et inhibe la synthèse de lipides dans le foie [Fogarty, et al. 2010]. Dans le muscle squelettique, il a été montré que l'apeline pouvait augmenter la phosphorylation de l'AMPK dans le muscle en réponse à un traitement aigu [Dray, et al. 2008] comme à un traitement chronique [Attane, et al. 2012]. Nous avons donc voulu déterminer si, dans le foie, cela était aussi le cas après 4 semaines de traitement à l'apeline.

Par western blot, nous avons quantifié la phosphorylation de l'AMPK dans le foie des souris, et aucun effet du HFD ni du traitement à l'apeline n'a pu être mis en évidence (Figure I), contrairement à ce qui a été observé dans le muscle. L'ACC, l'enzyme responsable de la synthèse du malonyl-coA, peut être inactivée par l'AMPK en étant phosphorylée. Dans le foie

des souris HFD, non seulement la quantité totale d'ACC est diminuée, mais elle est aussi plus phosphorylée, donc moins active (Figure I). Ainsi, bien que la phosphorylation ne soit pas significativement augmentée, la quantité de malonyl-coA hépatique pourrait être diminuée, ce qui peut expliquer la plus forte β -oxydation observée sous HFD. L'anticorps utilisé reconnaissant les deux formes d'ACC, nous avons mesuré l'expression génique d'ACC2 responsable de la formation du malonyl-coA inhibant la β -oxydation [Abu-Elheiga, et al. 2005], et elle est moins exprimée sous HFD. En revanche, aucun effet du traitement à l'apeline n'est observé sur la quantité ou la phosphorylation d'ACC. Vu la variabilité et le faible nombre de cas utilisés, il est difficile d'affirmer que la régulation d'ACC est indépendante de l'AMPK, mais les effets du traitement à l'apeline dans le foie ne semblent pas être dépendants de l'activation de l'AMPK.

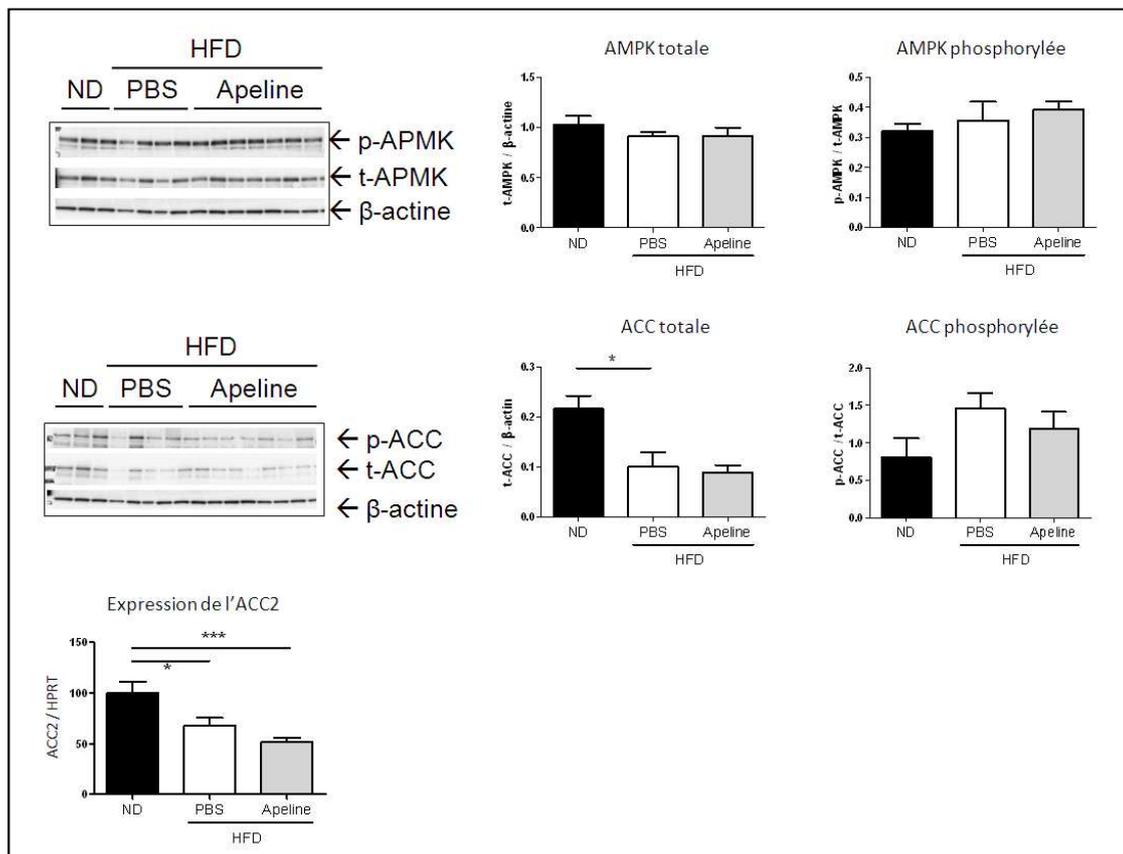


Figure I. Western-Blot de pAMPK et pACC, et expression d'ACC2 (en % du groupe ND, n=12-16 dans chaque groupe) dans le foie de souris nourries avec un régime ND ou HFD, traitées au PBS ou à l'apeline. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM. *p<0,05 ; ***p<0,001.

Comparativement au muscle [Attane, et al. 2012], le traitement à l'apeline ne semble donc pas avoir un effet sur le catabolisme des lipides, ni sur le métabolisme glucidique dans le

foie. APJ étant très faiblement exprimé dans le foie, on peut alors penser que les effets observés seraient une conséquence de l'amélioration générale causée par le traitement à l'apeline, et seraient ainsi indépendants d'une action du système apeline/APJ sur le foie, sachant que les souris obèses et insulino-résistantes traitées à l'apeline ont une insulïnémie nettement diminuée et une meilleure sensibilité à l'insuline. Afin de savoir si l'apeline peut agir directement sur le foie en condition d'insulino-résistance, nous avons étudié l'expression d'APJ dans le foie et sa régulation dans diverses pathologies hépatiques.

2) Régulation de l'expression d'APJ dans le foie de souris obèses et résistantes à l'insuline

APJ est très faiblement exprimé dans le foie dans les conditions physiologiques. Chez les souris obèses et insulino-résistantes nourries avec un HFD (non traitées à l'apeline), l'expression génique d'APJ augmente significativement (Figure J), mais dans une moindre mesure que celle observée dans les cas de cirrhose chez le rat [Principe, et al. 2008] et l'Homme [Yokomori, et al. 2011].

Avant de déterminer quel(s) est (sont) le(s) type(s) cellulaires qui expriment APJ dans le foie, et vu le faible niveau d'expression des ARNm dans le foie de nos souris insulino-résistantes, nous avons recherché un modèle qui exprimerait davantage APJ dans le foie pour nous permettre de faire les mises au point en terme d'expression protéique, par western blot et par immunofluorescence. Dans un premier temps nous nous sommes intéressés au modèle de souris db/db. Ces souris, qui ne possèdent pas le récepteur à la leptine, sont hyperphagiques et deviennent massivement obèses et résistantes à l'insuline sous régime ND, de façon plus rapide et plus importante que des souris nourries avec un HFD. Chez des souris db/db âgées de 20 semaines, l'expression en ARNm d'APJ est augmentée d'un facteur 4 dans le foie entier, mais il reste très faiblement exprimé comparativement au tissu adipeux ou au muscle (Figure J). Cependant, alors que l'expression d'APJ augmente dans le foie, elle diminue dans les autres tissus.

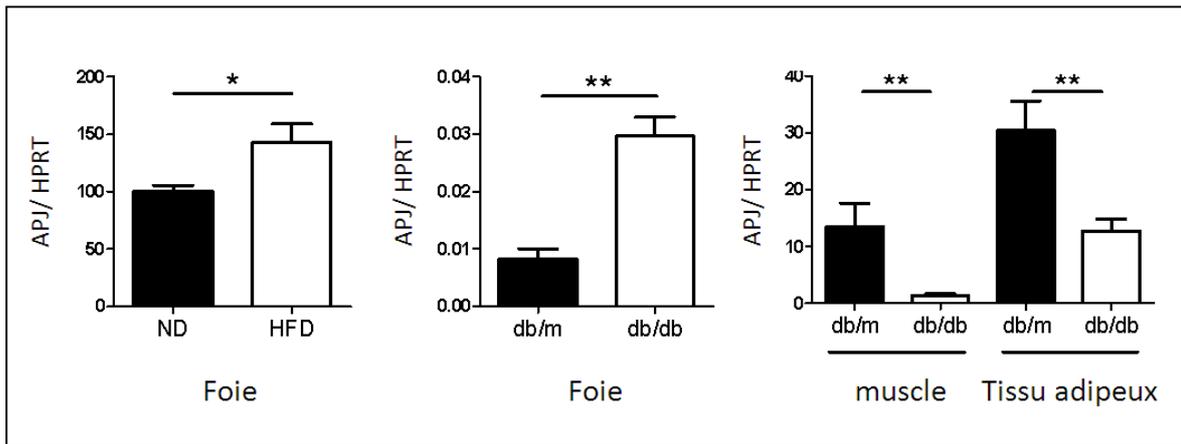


Figure J. Expression génique d'APJ dans le foie de souris nourries avec régime ND (n=10) ou HFD (n=16) en % du groupe ND, et dans le foie, le muscle et le tissu adipeux de souris db/m (n=7) et db/db (n=6). Les résultats représentent la moyenne ± SEM. *p<0,05 ; **p<0,01.

Pour confirmer ces résultats au niveau protéique, nous avons décidé de mettre au point l'identification d'APJ par western blot à partir des foies de souris db/db. Parallèlement, nous avons utilisé des tissus connus pour exprimer APJ : le cœur et les poumons (Figure K).

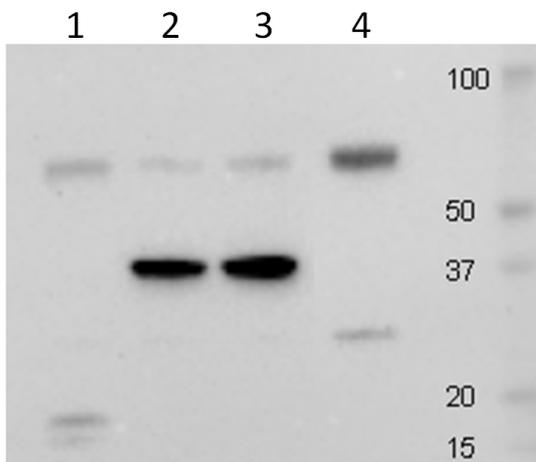


Figure K. Western blot anti-APJ sur lysats de cœur (piste 1) et de poumon (piste 4) de souris db/m, et de foie de souris db/m et db/db (pistes 2 et 3).

Nous observons une bande autour de 40 kDa qui n'apparaît que dans le foie. Bien qu'elle soit cohérente avec le poids moléculaire théorique d'APJ (42kDa), elle n'est pas du tout présente dans le cœur ni dans les poumons, ce qui nous fait nous questionner sur l'identité de cette bande. Une autre bande est détectée autour de 70kDa, elle est présente dans les 3 organes et est cohérente avec le profil d'expression génique d'APJ [Hosoya, et al. 2000]. Elle

correspond à celle qui est décrite par le fournisseur de cet anticorps, mais pas à ce qui est décrit dans la littérature [Puffer, et al. 2000].

Nous avons alors souhaité déterminer le type cellulaire qui surexprime APJ. Pour cela, nous avons réalisé un co-marquage par immunofluorescence dans le foie de souris HFD.

Mais par quel type de cellule hépatique commencer ? Vu la faible expression d'APJ en ARNm, nous avons supposé qu'APJ n'était pas exprimé par les hépatocytes, mais par un type cellulaire minoritaire. Nous avons alors choisi les cellules stellaires, qui expriment APJ en condition de cirrhose [Melgar-Lesmes, et al. 2011], [Yokomori, et al. 2011], et avons donc réalisé des expériences de co-marquage d'APJ avec α SMA.

La protéine α SMA est classiquement utilisée en tant que marqueur des cellules stellaires activées, cependant elle est aussi exprimée par les cellules musculaires lisses entourant les vaisseaux sanguins. Sans surprise, on observe un co-marquage anti- α SMA et anti-APJ dans les parois des vaisseaux sanguins, ce qui confirme l'expression d'APJ dans ces cellules (Figure L).

APJ semble être également présent dans des cellules isolées, qui présentent un faible marquage anti- α SMA. Ce co-marquage est très rare sur les coupes de foie.

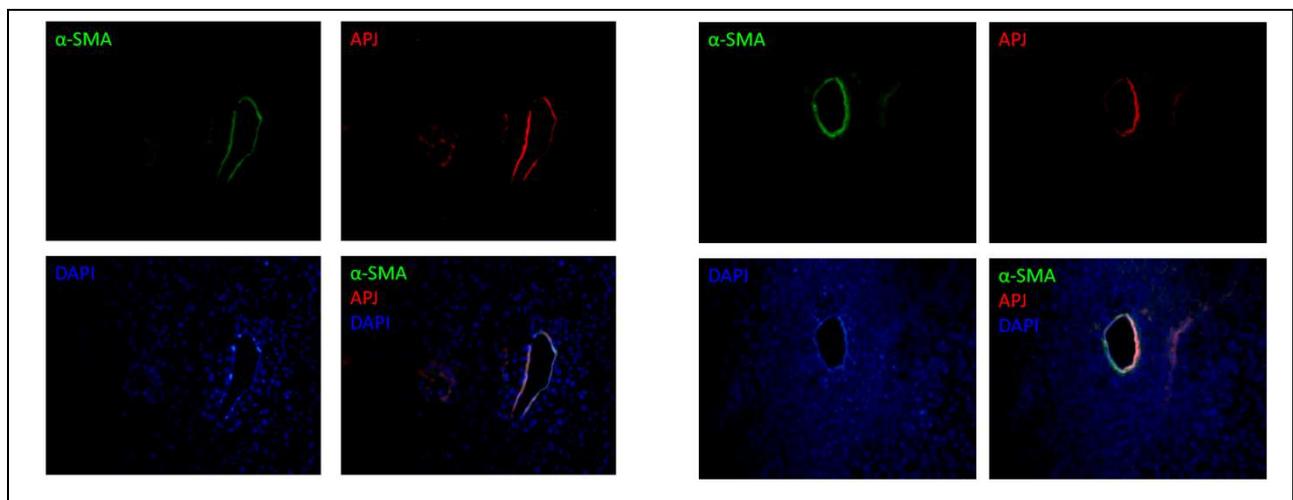


Figure L. Marquage d'APJ et d' α SMA par immunofluorescence et des noyaux par le DAPI, sur des coupes de foie de souris nourries avec un régime HFD. Grossissement x200.

3) Régulation de l'expression d'APJ dans des modèles pharmacologiques de stéatose

En initiant une collaboration avec Hervé Guillou, responsable de l'équipe "Toxicologie Intégrative et Métabolisme" de l'Unité Toxalim (INRA, Tournefeuille), nous avons eu accès à des foies de différents modèles de souris transgéniques qui ont un phénotype hépatique marqué, dans l'optique de trouver un modèle animal de surexpression d'APJ dans le foie.

Le premier modèle de souris sur lequel nous avons mesuré l'expression hépatique d'APJ est le modèle $PPAR\alpha^{-/-}$. $PPAR\alpha$ est un récepteur nucléaire connu pour activer de nombreux gènes liés au catabolisme des acides gras. Les souris $PPAR\alpha^{-/-}$ ont une stéatose hépatique importante, liée à un défaut d'oxydation des acides gras [Hashimoto, et al. 2000]. D'autre part, l'équipe d'H. Guillou s'intéresse aux effets du fénofibrate, un agoniste de $PPAR\alpha$, sur l'expression de gènes codant pour différentes protéines impliquées dans la lipogenèse *de novo* [Ducheix, et al. 2013]. L'expression d'APJ a donc été mesurée dans le foie de souris wt et $PPAR\alpha^{-/-}$ traitées ou non au fénofibrate (Figure M). Le foie des souris wt traitées au fénofibrate surexprime APJ, alors que le traitement au fénofibrate n'a pas cet effet chez les souris $PPAR\alpha^{-/-}$, ce qui suggère un effet dépendant de $PPAR\alpha$. De façon surprenante, l'absence de $PPAR\alpha$ induit également l'expression d'APJ, par rapport aux souris wt.

Ces résultats pourraient être mis en relation avec le contenu et le type de lipides mesurés dans le foie. En effet, l'expression d'APJ n'est pas proportionnelle au contenu en TG, mais il semble que la quantité de cholestérol estérifié puisse jouer un rôle.

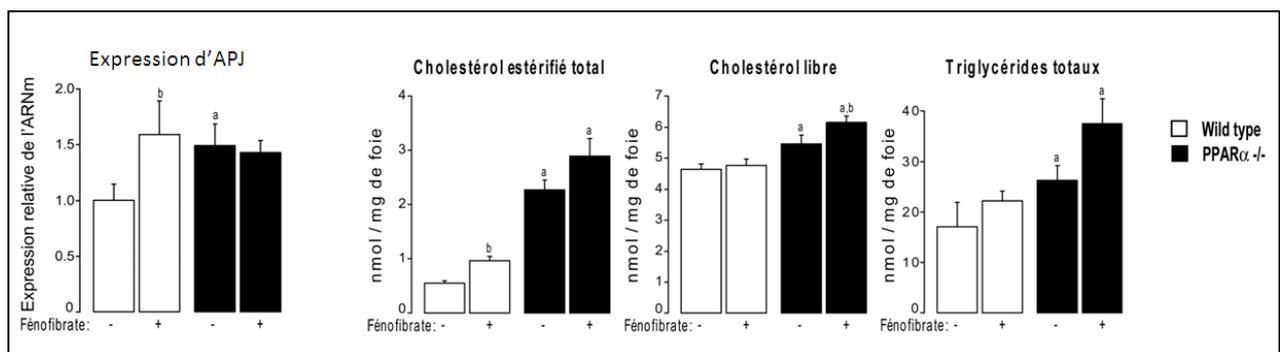


Figure M. Expression génique d'APJ dans le foie de souris wt traitées avec le Fénofibrate (n=5) ou avec le véhicule (n=6) et des souris $PPAR\alpha^{-/-}$ traitées avec le Fénofibrate (n=6) ou avec le véhicule (n=6), exprimée en fois d'augmentation par rapport au groupe wt non traité au fénofibrate.

Contenu en cholestérol estérifié total, en cholestérol libre et en TG hépatiques. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM. «a» indique une différence significative entre les deux génotypes pour un même traitement. «b» indique une différence significative entre les deux traitements pour un même génotype.

Nous avons aussi étudié l'expression d'APJ dans le foie de souris invalidées pour les récepteurs nucléaires LXR α et LXR β (LXR $\alpha/\beta^{-/-}$), traitées ou non avec le T0901317, un agoniste de ces récepteurs (Figure N). Le traitement des souris avec le T0901317 induit fortement l'expression de gènes impliqués dans la lipogenèse *de novo* et entraîne l'accumulation de TG hépatiques [Ducheix, et al. 2013]. Chez les souris LXR $\alpha/\beta^{-/-}$, le T0901317 n'augmente plus le stockage de TG et, par rapport aux souris wt, elles présentent un taux de cholestérol estérifié hépatique beaucoup plus élevé, et de cholestérol libre également, dans une moindre mesure.

Dans ce modèle, le traitement au T0901317 induit l'expression d'APJ, mais cette augmentation ne semble pas être dépendante des LXR, puisqu'on observe une tendance à l'augmentation de l'expression d'APJ après le traitement au T0901317 chez les souris LXR $\alpha/\beta^{-/-}$. De plus, l'expression d'APJ seulement doublée dans le foie où les TG sont multipliés par 6, et la faible quantité de TG hépatique chez ces souris LXR $\alpha/\beta^{-/-}$ nous confirme qu'il n'y aurait pas de lien entre le degré de stéatose et l'expression d'APJ. Ici aussi, on constate que chez les souris LXR $\alpha/\beta^{-/-}$, qui ont plus de cholestérol estérifié et libre que les souris wt, APJ est plus exprimé.

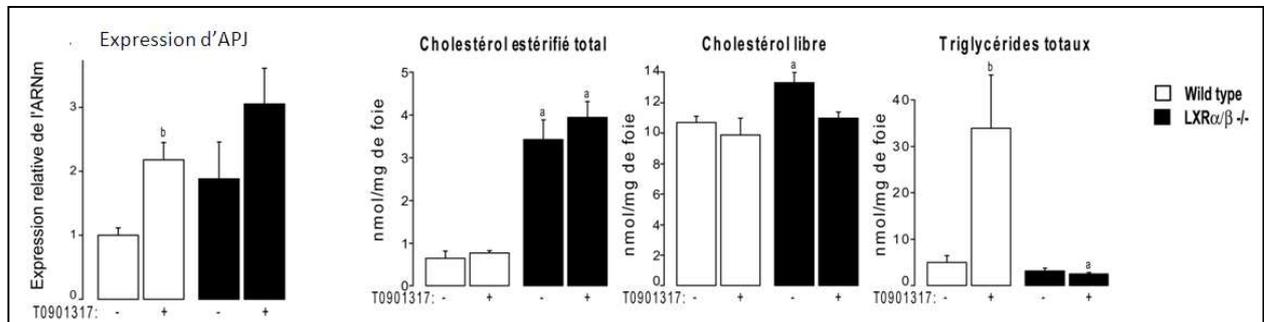


Figure N. Expression génique d'APJ dans le foie de souris wt traitées avec le T0901317 (n=5) ou avec le véhicule (n=5) et des souris LXR $\alpha/\beta^{-/-}$ traitées avec le T0901317 (n=5) ou avec le véhicule (n=5), exprimée en fois d'augmentation par rapport au groupe wt non traité au T0901317.

Contenu en cholestérol estérifié total, en cholestérol libre et en TG hépatiques. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM. «a» indique une différence significative entre les deux génotypes pour un même traitement. «b» indique une différence significative entre les deux traitements pour un même génotype.

Lorsque l'on compare l'expression relative d'APJ dans ces deux modèles avec celle observée chez les souris db/db, on constate qu'elle reste dans le même ordre de grandeur.

Discussion et perspectives

➤ Effets du traitement chronique à l'apeline sur le métabolisme énergétique du foie

Les résultats obtenus sur le métabolisme glucidique du foie ne permettent pas de montrer un effet marquant de l'apeline. Les résultats encourageants obtenus lors d'un test de tolérance au pyruvate sur une première série de souris n'ont pas été reproduits lorsque nous avons répété ce test sur une deuxième série de souris. Il est important de noter que dans les deux séries de souris, dans les 2 groupes de souris nourries avec le HFD, la glycémie augmente de la même façon pendant les 15 minutes suivant l'injection de pyruvate. Cette phase d'ascension de la glycémie est le reflet de la production de glucose par le foie à partir du pyruvate. La diminution de la glycémie observée après 30 minutes, elle, est le reflet de l'entrée du glucose dans les organes périphériques, mais elle peut également refléter l'inhibition de la néoglucogenèse hépatique par l'insuline. Nous savons que les souris traitées à l'apeline sont plus sensibles à l'insuline que les souris traitées au PBS [Attane, et al. 2012] car le transport de glucose stimulé par l'insuline dans le muscle est augmenté, cela peut expliquer le retour plus rapide à la glycémie basale, mais on ne peut pas exclure un effet potentiel sur le pancréas. En effet, bien que l'apeline puisse limiter de façon aiguë la sécrétion d'insuline suite à une augmentation de la glycémie [Sorhede Winzell, et al. 2005], un traitement chronique à l'apeline de souris Akita augmente le contenu en insuline des cellules β pancréatiques [Chen, et al. 2011]. Il serait donc intéressant de mesurer l'insulinémie des souris 15 minutes après l'injection de pyruvate, afin de déterminer si le retour plus rapide à la glycémie basale chez les souris traitées à l'apeline, dans la première série de souris, est le résultat d'une meilleure sensibilité à l'insuline périphérique et/ou hépatique, ou bien d'une plus forte sécrétion d'insuline par le pancréas en réponse à l'augmentation de la glycémie suite à la production hépatique de glucose.

Quelle que soit la régulation de la glycémie lors de la phase descendante du PTT, il semble que le traitement à l'apeline n'agisse pas sur la capacité néoglucogénique proprement dite du foie, ce qui est en accord avec les résultats obtenus sur l'expression et l'activité enzymatique de la PEPCCK mesurée sur le foie de souris ayant été mises à jeun pendant 7h en période nocturne.

Au niveau du métabolisme lipidique, les souris ont un contenu hépatique en TG réduit de 40% après 4 semaines de traitement, et l'analyse histologique montre que la taille des vésicules lipidiques est réduite par rapport aux foies des souris traitées au PBS. La stéatose étant le résultat de la dérégulation de plusieurs mécanismes, nous avons exploré le métabolisme lipidique du foie de ces souris, au niveau de l'entrée, de l'utilisation, de la synthèse et de la sécrétion des lipides.

Le transporteur d'acides gras FAT n'est pas le seul transporteur permettant l'entrée d'acides gras dans les hépatocytes, mais c'est le seul dont l'expression hépatique a été reliée à la stéatose et à la résistance à l'insuline [Memon, et al. 1999], [Koonen, et al. 2007], [Greco, et al. 2008]. C'est pourquoi nous avons choisi d'étudier son expression en réponse au traitement. Le régime HFD augmente bien son expression, mais le traitement à l'apeline n'a pas d'effet. Il semble donc que la diminution de la stéatose des souris traitées à l'apeline ne soit pas due à un moindre transport des lipides plasmatiques. Cependant, il sera important de confirmer que sa présence à la membrane plasmique des hépatocytes n'est pas modifiée par le traitement à l'apeline, par immunohistochimie par exemple.

Nous nous sommes intéressés à l'utilisation des lipides dans le foie, d'une part parce qu'une augmentation de la β -oxydation des lipides permet de réduire la stéatose chez des souris nourries avec un HFD [Orellana-Gavaldà, et al. 2011], et d'autre part parce que notre traitement à l'apeline peut induire l'augmentation de la β -oxydation dans le muscle squelettique [Attane, et al. 2012]. Nous avons donc souhaité savoir si c'est également le cas dans le foie. La mesure de la β -oxydation sur homogénat de foie, contrairement à celle effectuée sur le muscle intact [Attane, et al. 2012], nous a permis de mesurer la capacité oxydative des organites, en nous affranchissant de potentiels effets sur le transport des lipides. Cela nous a permis de montrer que le régime HFD a pour effet d'augmenter la capacité oxydative des hépatocytes, aussi bien au niveau de la β -oxydation complète (CO_2) qu'incomplète (ASM). En revanche, en réponse au traitement à l'apeline et contrairement à ce que l'on attendait, la β -oxydation est moindre que chez les souris traitées au PBS. Il en est de même pour la concentration plasmatique de β -hydroxybutyrate (β -HB). La variabilité entre les différentes séries de souris ne nous a pas permis d'atteindre la significativité, néanmoins la β -oxydation complète et le β -HB plasmatique des souris traitées à l'apeline rejoignent un niveau proche des souris nourries avec un régime normal.

Dans le muscle de ces souris, la β -oxydation n'est pas modifiée par le régime HFD mais le traitement à l'apeline l'augmente et permet une meilleure utilisation des lipides [Attane, et al. 2012]. Dans le foie des souris nourries avec le HFD, nous avons observé une tendance à l'augmentation de la β -oxydation, et le traitement à l'apeline la diminue. Ainsi, bien que les effets de l'apeline soient différents dans le foie de ceux observés dans le muscle, ils sont toujours associés à un meilleur métabolisme lipidique. Nous pouvons alors nous demander si l'apeline agit directement sur la β -oxydation hépatique ou si cette diminution de la capacité oxydative est le simple résultat de la moindre disponibilité des lipides dans le foie des souris traitées à l'apeline. Pour tenter de répondre à cette question, nous avons mesuré l'expression génique du récepteur nucléaire PPAR α , qui gouverne les processus cataboliques des lipides. Son expression est augmentée dans le foie des souris nourries avec le régime HFD, ce qui confirme que l'afflux de lipides induit la transcription de gènes du catabolisme des lipides, mais le traitement à l'apeline ne modifie pas son expression. Bien que préliminaire et devant être confirmée au niveau protéique, l'expression génique de PPAR α nous indique que la diminution de la β -oxydation dans le foie, après le traitement, ne serait pas le résultat d'une inhibition directe de l'apeline, mais plutôt la conséquence de la moindre quantité de lipides disponibles dans le foie.

La diminution de la β -oxydation implique que le foie des souris traitées à l'apeline contiendrait moins de substrats disponibles pour la néoglucogénèse. Or, cela n'a pas pu être démontré par le protocole que nous avons utilisé pour mesurer l'activité de la PEPCK, et son expression génique semble indiquer que la néoglucogénèse n'est pas diminuée.

Il nous apparaissait donc que l'action de l'apeline dans le foie est différente de son action dans le muscle, nous avons donc poursuivi l'exploration du métabolisme lipidique pouvant influencer sur la quantité de lipides hépatiques, à commencer par la lipogénèse *de novo*.

L'expression génique du facteur de transcription SREBP-1c, qui est augmentée par le régime HFD, est significativement diminuée après le traitement à l'apeline. L'expression génique d'un facteur de transcription ne reflétant pas nécessairement son activation et donc sa capacité à induire l'expression de gènes impliqués dans la lipogénèse *de novo*, nous avons également mesuré l'expression de la FAS, l'une de ses cibles. Son expression est bien augmentée sous HFD, ce qui participe à l'accumulation de TG dans le foie ; et dans le foie des souris traitées à l'apeline, elle est similaire à celle des souris ND. Il sera intéressant de mesurer

également l'expression génique d'autres enzymes importantes dans la lipogenèse *de novo*, telles que l'ACC1, la SCD1 et l'Elovl6, afin de déterminer si le traitement à l'apeline agit à différents niveaux de ce processus.

L'expression des enzymes impliquées dans la lipogenèse *de novo* n'est pas sous le seul contrôle de SREBP-1c. ChREBP est lui aussi un facteur de transcription inducteur de la lipogenèse *de novo*, qui a de nombreux gènes-cibles en commun avec SREBP-1c ; cependant, dans notre modèle, aucune modification de son expression génique n'est observée entre les groupes traité et non traité (donnée non présentée). Il ne paraît donc pas impliqué dans les effets de l'apeline dans notre modèle. Il semble donc que le traitement à l'apeline empêche l'induction du programme lipogénique dans le foie des souris nourries avec le régime HFD en inhibant l'expression et, probablement, l'activation de SREBP-1c.

L'étude de Donnelly et al montre que, chez l'Homme résistant à l'insuline et ayant une stéatose, la lipogenèse *de novo* est à l'origine de 30% des lipides présents dans le foie [Donnelly, et al. 2005]. En gardant à l'esprit qu'il est difficile de transposer les résultats obtenus chez les animaux à l'Homme, si nous faisons un parallèle avec notre étude, le blocage total de l'induction de l'expression de la FAS que nous observons chez les souris traitées à l'apeline pourrait expliquer la diminution d'environ 40% des TG hépatiques par rapport aux souris traitées au PBS.

Les AGL plasmatiques, eux, sont à l'origine de plus de la moitié des lipides stockés dans le foie stéatosé chez les patients insulino-résistants [Donnelly, et al. 2005]. Nous savons que des traitements chroniques à l'apeline ont pour effet de diminuer les AGL plasmatiques [Higuchi, et al. 2007], [Yue, et al. 2011]. La diminution des AGL a été attribuée à un effet inhibiteur de la lipolyse adipocytaire par l'apeline chez la souris [Yue, et al. 2011]; [Than, et al. 2012]. Bien que n'ayant pas observé de diminution des AGL plasmatiques, l'étude d'Attané et al [Attané, et al. 2012] montre que notre traitement à l'apeline permet d'augmenter la capacité des muscles à oxyder les lipides, sans pour autant modifier le contenu en TG intramusculaires. Cela suggère que ces lipides oxydés proviendraient de la circulation et non du stock intramusculaire de lipides, et donc que l'augmentation de l'oxydation des lipides pourrait entraîner la diminution des AGL plasmatiques observée.

La diminution des TG plasmatiques après 4 semaines de traitement à l'apeline [Attané, et al. 2012] pourrait également expliquer la diminution des lipides dans le foie. Cependant, il

est aussi envisageable que le foie, plutôt que de subir cette diminution en TG plasmatiques, y participe, ce qui est suggéré par la moindre sécrétion de VLDL observée chez les souris traitées à l'apeline.

Une autre source de lipides hépatiques chez les patients insulino-résistants et ayant une stéatose, est l'absorption intestinale (environ 15%) [Donnelly, et al. 2005]. A l'heure actuelle, aucune donnée n'est disponible sur un potentiel effet de l'apeline sur l'absorption entérique des lipides, mais nous ne pouvons pas exclure que les souris traitées à l'apeline absorbent moins de lipides lors de la digestion. Il serait donc intéressant de mesurer l'absorption intestinale de lipides chez ces souris.

L'AMPK, senseur énergétique au carrefour du métabolisme glucidique et lipidique, est une cible de l'apeline dans le muscle [Dray, et al. 2008], [Attane, et al. 2012], le tissu adipeux [Attane, et al. 2011] et l'intestin [Dray, et al. 2013]. Dans l'hépatocyte, l'activation de l'AMPK active la β -oxydation en diminuant les taux de malonyl-coA via l'inactivation de l'ACC2 [Fogarty and Hardie 2010] et via l'activation de la MCD (malonyl-coA décarboxylase) [Park, et al. 2002] ; elle inhibe également la lipogenèse *de novo* via l'inhibition de l'ACC1 [Assifi, et al. 2005] et des facteurs de transcription SREBP-1c et ChREBP [Fogarty and Hardie 2010]. Au niveau du métabolisme glucidique, l'activation de l'AMPK inhibe le stockage de glycogène [Bultot, et al. 2012] et la néoglucogénèse [Canto and Auwerx 2010].

Il semble que dans le foie des souris traitées à l'apeline, elle ne soit pas activée. L'expression protéique de l'ACC, qui est une cible notamment de l'AMPK, est diminuée dans le foie des souris sous HFD. On observe une tendance à l'augmentation de sa phosphorylation inactivatrice avec le régime HFD, ainsi qu'une diminution de l'expression génique de l'ACC2, cela suggère que, sous HFD, le foie contiendrait moins de malonyl-coA, en accord avec l'augmentation de la β -oxydation que l'on observe. Il est donc possible que l'ACC soit phosphorylée de façon indépendante de l'AMPK dans le foie, par exemple par la PKC ou par la PKA [Kim, et al. 1989]. Le traitement à l'apeline, en revanche, n'a pas d'effet sur la quantité d'ACC totale en protéine ni en ARN, et bien que l'on observe une tendance à la diminution de sa phosphorylation, il est peu probable que cela soit à l'origine de la diminution de la β -oxydation chez les souris traitées à l'apeline.

Ainsi, le traitement chronique à l'apeline améliore le métabolisme lipidique dans le foie, alors qu'il ne semble pas avoir d'effet sur le métabolisme glucidique. Cependant, le HFD ne semblant pas altérer le stockage de glycogène ni la néoglucogenèse, il est possible que ce versant du métabolisme hépatique ne soit pas (encore) altéré au stade où les souris ont été étudiées. Nous savons qu'elles sont hyperinsulinémiques et intolérantes au glucose et à l'insuline [Attane, et al. 2012]. L'évaluation de la sensibilité à l'insuline du foie, par exemple en mesurant la phosphorylation d'IRS-1 ou d'Akt en réponse à l'insuline, nous permettra de déterminer si le foie est résistant à l'insuline, et donc si l'altération du métabolisme lipidique est la conséquence de l'hyper-insulinémie, ou si elle résulte de l'activation d'autres processus menant à l'accumulation de lipides dans le foie en condition d'insulino-résistance, tels que le stress du réticulum endoplasmique ou l'inflammation. Cela nous permettra également de déterminer si la diminution de la stéatose chez les souris traitées à l'apeline est le résultat de la diminution de l'insulinémie ou d'une action directe de l'apeline sur ces processus.

Le stress du réticulum endoplasmique, lorsqu'il est activé de façon excessive et chronique, peut effectivement mener à l'apparition d'une stéatose en induisant le programme de lipogenèse *de novo*. Or, l'apeline atténue le stress du réticulum endoplasmique dans le pancréas de souris diabétiques de type 1 [Chen, et al. 2011] et dans le myocarde de rat ayant subi une ischémie-reperfusion [Tao, et al. 2011] ou de nourris avec un régime HFD [Ceylan-Isik, et al. 2013]. Si l'on suppose que le stress du réticulum endoplasmique est activé dans le foie de nos souris nourries avec le régime HFD, il serait possible que le traitement à l'apeline atténue ce stress, et que cela soit la raison pour laquelle la lipogenèse *de novo* est diminuée par le traitement.

L'inflammation dans le foie est également liée à l'insulino-résistance et à la stéatose : l'inactivation des cellules de Küpffer par le gadolinium empêche le développement de la stéatose sous HFD [Huang, et al. 2010] et leur suppression par un traitement au clodronate a le même effet sous un régime déficient en choline et méthionine [Tosello-Tramont, et al. 2012]. Il sera donc intéressant d'évaluer le niveau d'inflammation du foie de nos souris nourries avec le régime HFD, et l'effet de l'apeline sur cette inflammation. Les taux plasmatiques d'apeline sont souvent associés à l'inflammation dans les études épidémiologiques ou cliniques [Castan-Laurell, et al. 2008], [Heinonen, et al. 2009], [Du, et al. 2010], [Sheibani, et al. 2012], mais le rôle de l'apeline dans l'inflammation n'a pas encore été clairement établi. L'étude de Leeper et al montre que l'apeline réduit les dommages vasculaires après l'induction d'un anévrisme

aortique *in vivo*, et ce, en inhibant l'infiltration macrophagique et la sécrétion des cytokines proinflammatoires ; et *in vitro*, où elle inhibe la production de TNF α et de MCP-1 par les macrophages [Leeper, et al. 2009]. La seule donnée disponible sur l'apeline et l'inflammation dans le foie est qu'après un traitement chronique de 4 semaines au F13A, un antagoniste d'APJ, chez des rats cirrhotiques, l'expression hépatique de CD68 est diminuée, reflétant une moindre infiltration de macrophages dans le foie [Reichenbach, et al. 2012]. L'effet de l'apeline n'a cependant pas été testé directement sur le foie dans ce modèle, ni dans un modèle d'insulino-résistance. Chez nos souris, nous avons pour l'instant seulement mesuré l'expression génique du TNF α , qui n'est pas modifiée par le régime HFD, ni par le traitement à l'apeline (données non présentées). D'autres marqueurs de l'inflammation devront être étudiés afin d'établir si ce régime HFD induit une inflammation dans le foie, et si le traitement à l'apeline peut la réduire et, ainsi, réduire ses effets sur le métabolisme énergétique.

La stéatose pouvant être dissociée du profil métabolique général et de la résistance à l'insuline dans certains cas [Sun and Lazar 2013], une diminution des TG hépatiques pourrait aboutir à une augmentation des TG plasmatiques et à leur redistribution dans d'autres organes, et y induire une résistance à l'insuline. Cependant, le traitement à l'apeline n'induit ni une augmentation des lipides plasmatiques, au contraire il diminue la triglycéridémie des souris [Attane, et al. 2012], ni une redistribution des lipides car ce traitement n'entraîne pas de différence dans les TG intramusculaires [Attane, et al. 2012], et les souris traitées à l'apeline prennent moins de masse grasse au cours des 4 semaines de traitement que les souris traitées au PBS. Ainsi, dans notre étude, la diminution de la stéatose est associée à un meilleur métabolisme général, puisque ces souris sont plus sensibles à l'insuline.

➤ Régulation d'APJ dans le foie de souris obèses et insulino-résistantes / stéatosées

Parce qu'il nous semblait essentiel de déterminer si les effets que l'on observe sur le foie après 4 semaines de traitement à l'apeline, sont directs ou s'ils sont la conséquence de l'amélioration globale, nous avons commencé d'une part à étudier la régulation d'APJ dans le foie, et d'autre part à identifier le type cellulaire l'exprimant.

L'expression d'APJ est augmentée dans le foie de souris nourries avec un régime HFD, et de façon plus importante chez les souris db/db, dont l'insulino-résistance est plus marquée. De façon intéressante, sa régulation est inverse à celle observée dans le muscle squelettique et dans le tissu adipeux des souris db/db. Cela souligne le fait que le système apeline/APJ se comporte différemment dans le foie comparativement aux autres tissus, et pourrait donc y avoir un rôle différent.

Au niveau protéique, le western blot d'APJ, comme tout western blot de récepteur RCPG, nous promettait de longues mises au point et, afin de s'assurer que c'est bien APJ que nous détecterions, nous avons utilisé d'autres organes en tant que contrôles positifs, à savoir le cœur et le poumon. Bien que cohérente avec le poids moléculaire théorique d'APJ et avec l'induction de l'expression génique dans le foie des souris db/db, la bande observée autour de 40kDa étant présente uniquement dans le foie, il est peu probable qu'il s'agisse d'APJ. Une autre bande située autour de 70kDa a été détectée par ce western blot. Le poids moléculaire théorique d'APJ étant de 42kDa, bien qu'APJ puisse être dimérisé et oligomérisé [Piairo, et al. 2011], un dimère serait observé au-delà de 80kDa. APJ est un RCPG qui possède plusieurs sites de glycosylation [Medhurst, et al. 2003], [O'Dowd, et al. 1993], cependant il est peu probable que cela se traduise par une augmentation du poids moléculaire assez importante pour qu'il soit détecté à 70kDa. Néanmoins, cette bande, identifiée comme étant APJ par les développeurs de l'anticorps utilisé, est cohérente avec le profil d'expression connu d'APJ : plus importante dans les poumons que dans le cœur, et très faible dans le foie [Hosoya, et al. 2000]. De plus, et de façon très intéressante, on remarque une expression plus importante dans le foie d'une souris db/db que dans celui d'une souris db/m, cela pouvant confirmer les résultats d'expression génique. Un autre western blot incluant un nombre plus important d'échantillons de foie de souris, ainsi que d'autres contrôles positifs et négatifs, pourra être réalisé afin de déterminer s'il s'agit bien d'APJ, et une quantification de son niveau d'expression protéique dans le foie de souris db/db ou nourries avec le régime HFD nous permettra de confirmer les résultats d'expression génique. Des cellules surexprimant APJ pourront être utilisées comme contrôle positif.

➤ Régulation de l'expression d'APJ dans des modèles pharmacologiques d'induction de stéatose

A la recherche d'un modèle animal où APJ serait plus fortement exprimé dans le foie que dans celui de souris sous HFD ou db/db, l'étude du foie de souris invalidées pour PPAR α ou pour LXR α/β , et traitées avec des agonistes de ces récepteurs nucléaires, ne nous a hélas pas apporté de meilleur modèle. Bien que l'expression d'APJ soit augmentée dans certaines conditions, son niveau d'expression est du même ordre de grandeur de celui observé dans le foie des souris db/db. En revanche, nous en avons retiré des informations quant à une possible régulation de l'expression d'APJ dans le foie.

Tout d'abord, son expression ne semble pas liée à la quantité de TG stockés dans le foie des animaux, ce que l'on constate dans le groupe des souris wt et PPAR $\alpha^{-/-}$ traitées ou non avec le fénofibrate, un agoniste de PPAR α . Chez les souris wt, l'expression d'APJ est augmentée lorsqu'elles sont traitées avec le fénofibrate, qui augmente également le contenu hépatique en cholestérol estérifié, mais aucune régulation d'APJ par le fénofibrate n'est observée chez les souris PPAR $\alpha^{-/-}$ alors que les TG sont augmentés. Cela suggère que l'induction d'APJ par le fénofibrate serait dépendante de l'activation de PPAR α . De plus, l'induction de l'expression d'APJ semble liée à l'augmentation du contenu hépatique en cholestérol estérifié : il est doublé par le traitement au fénofibrate (qui augmente l'expression d'APJ de 1,5 fois), et son augmentation bien plus faible chez les souris PPAR $\alpha^{-/-}$ peut expliquer l'absence d'augmentation de l'expression d'APJ par le fénofibrate.

Bien que préliminaires, ces résultats sont en accord avec l'augmentation de l'expression d'APJ que nous observons dans le foie des souris nourries avec le régime HFD, qui surexprime également PPAR α . Il serait donc intéressant de déterminer si les souris PPAR $\alpha^{-/-}$ surexpriment APJ dans le foie sous HFD. On note tout de même une plus forte expression d'APJ chez les souris PPAR $\alpha^{-/-}$ par rapport aux wt, ce qui semble incohérent avec l'induction par le fénofibrate. Cependant, il est possible que des phénomènes de compensation soient mis en place dans le foie des souris PPAR $\alpha^{-/-}$ et qui puissent eux aussi agir sur l'expression d'APJ.

L'expression d'APJ est doublée par le traitement de souris au T0901317, un agoniste de LXR α/β , ici aussi sans lien avec la quantité de TG hépatiques. Le fait que la quantité de TG hépatiques soit multipliée par 6 chez les souris traitées au T0901317 et que l'expression d'APJ

soit seulement doublée nous conforte dans l'idée que l'expression d'APJ ne serait pas associée à l'ampleur de la stéatose. Chez les souris $LXR\alpha/\beta^{-/-}$, l'expression d'APJ est plus élevée que chez les souris wt, ce qui est aussi le cas du cholestérol estérifié.

De façon intéressante, l'induction de l'expression d'APJ par le T0901317 semble être indépendante des LXR puisque, bien que non significative, on observe une augmentation de son expression chez les souris $LXR\alpha/\beta^{-/-}$ traitées au T0901317. Le composé T0901317 étant également un agoniste du récepteur nucléaire FXR [Houck, et al. 2004], son activation pourrait induire l'expression d'APJ. Dans le foie de souris db/db, l'expression de FXR est plus élevée que chez les db/m [Zhang, et al. 2006], ce qui suggère FXR comme un autre régulateur potentiel de l'expression d'APJ. Il serait donc intéressant d'étudier la régulation d'APJ suite à un traitement avec un agoniste de FXR afin de vérifier cette hypothèse.

Nous avons également évalué l'expression d'APJ dans le foie de souris ayant développé une fibrose hépatique marquée, après un traitement ip au tétrachlorure de carbone (CCl_4), qui ont été l'objet d'une étude publiée en 2011 [Kostadinova, et al. 2012]. Nous espérions détecter une forte expression d'APJ, comme c'est le cas dans le foie de rats cirrhotiques dans l'étude de Principe et al [Principe, et al. 2008], mais cela n'a malheureusement pas été le cas (données non présentées). De plus, le niveau d'expression d'APJ est inférieur à celui mesuré dans les modèles utilisés dans cette thèse, et rend ainsi complexe l'étude du récepteur APJ.

➤ Localisation d'APJ dans le foie des souris obèses et insulino-résistantes

L'immunohistochimie classique ne nous ayant pas permis de détecter APJ sur les coupes de foie (données non présentées), nous avons décidé d'utiliser l'immunofluorescence. Grâce à cette technique, APJ est détecté autour des veines centrolobulaires et des veines et artères des triades portales sur les coupes de foie de souris nourries avec le HFD, et son co-marquage avec α SMA confirme sa présence sur les cellules musculaires lisses.

L'absence de marquage d'APJ dans les hépatocytes est surprenante au vu des effets bénéfiques du traitement à l'apeline sur le métabolisme hépatique. Dans l'étude de Chu et al, l'apeline a un effet sur le métabolisme du glycogène, en agissant directement sur APJ, présent sur les hépatocytes [Chu, et al. 2013]. Bien que nous n'observions pas de marquage d'APJ dans ces cellules, il sera tout de même intéressant de savoir si l'apeline peut avoir un effet sur les

hépatocytes isolés de souris obèses et résistantes à l'insuline. Il sera également intéressant de surexprimer APJ dans les hépatocytes, en culture ou *in vivo* spécifiquement dans le foie, afin de savoir si cela peut accentuer les effets bénéfiques de l'apeline que nous observons ou si, au contraire, cela est délétère pour le métabolisme du foie.

De façon intéressante, nous avons également détecté APJ en-dehors des vaisseaux sanguins, dans de rares cellules qui expriment également α SMA. Ces cellules seraient donc des cellules stellaires activées. Dans les études menées sur la cirrhose humaine ou de rat, APJ est également exprimé par les cellules stellaires [Yokomori, et al. 2011], [Melgar-Lesmes, et al. 2011] et, dans une lignée cellulaire de cellules stellaires qui expriment APJ (LX-2), l'apeline promeut leur prolifération. Or, dans notre étude, très peu de cellules stellaires sont visibles par immunofluorescence, et l'expression génique d' α SMA est indétectable par qPCR, aussi bien chez les souris nourries avec le régime normal ou le HFD, suggérant que les cellules stellaires activées sont très rares dans notre modèle de résistance à l'insuline (données non présentées).

Dans les cellules LX-2, les effets pro-fibrosants de l'Angiotensine II et de l'endothéline-1 sont médiés par l'apeline, ce qui lui confère un rôle pro-fibrosant, néfaste pour le fonctionnement du foie [Melgar-Lesmes, et al. 2010]. Le fait que le traitement à l'apeline améliore le métabolisme hépatique, et qu'APJ soit *à priori* exprimé par les cellules stellaires, alors qu'en condition de cirrhose, l'apeline a un effet délétère, peut être interprété de différentes façons :

1) L'apeline pourrait induire dans les cellules stellaires des processus intracellulaires différents selon l'état métabolique du foie. Afin de le déterminer, nous pourrions étudier l'effet de l'apeline sur des cellules stellaires isolées du foie de souris HFD, ainsi l'effet observé serait plus pertinent que le traitement de lignées cellulaires. Selon l'effet observé, il sera important de déterminer sa répercussion sur le métabolisme des hépatocytes.

2) APJ pourrait aussi être exprimé par d'autres types cellulaires dans le foie. Leur identification est réalisable par immunofluorescence, mais aussi par cytométrie en flux, une technique utilisée dans l'institut, qui pourra sans doute nous apporter de nouveaux éléments de réponse.

Les cellules de Küpffer, dont le profil anti-inflammatoire (M2) peut devenir pro-inflammatoire (M1), impliquées dans le développement de la stéatose, pourraient exprimer APJ. Un co-marquage d'APJ et de CD68 peut être effectué afin de savoir si ces cellules expriment APJ. Si

c'est le cas, il sera important de déterminer si cette expression est basale dans ces cellules, comme c'est le cas pour l'apeline [Tatemoto, et al. 2001] et si l'augmentation de son expression est un reflet de leur infiltration dans le foie, ou si son expression est concomitante avec l'acquisition d'un profil M1. Il faudra alors identifier les mécanismes pouvant expliquer le rôle d'APJ dans les macrophages sur le métabolisme lipidique des hépatocytes. Pour cela, nous pouvons envisager une co-culture de cellules de Kupffer préalablement traitées à l'apeline, avec des hépatocytes primaires de souris HFD ou avec une lignée hépatocytaire préalablement chargée en lipides par exemple par un traitement à l'acide oléique [Fujimoto, et al. 2007]. L'utilisation du F13A *in vitro* pourra également confirmer que les effets observés passent bien par la liaison de l'apeline à APJ.

En restant dans l'idée de l'augmentation d'une population cellulaire plutôt que de l'induction de l'expression d'APJ dans des cellules déjà présentes, il a été montré que le foie stéatosé contient plus de cellules ovales que le foie sain, aussi bien chez le rat que chez l'Homme [Tolosa, et al. 2011]. L'expression d'APJ par ces cellules progénitrices est donc une possibilité à ne pas écarter. Dans ces cellules, l'apeline pourrait promouvoir leur prolifération, mais on en sait très peu sur ces cellules, et leur rôle dans le métabolisme énergétique n'a jamais été étudié.

Dans l'étude de Yokomori et al, APJ est localisé sur les cellules stellaires mais aussi sur les cellules endothéliales des sinusoides [Yokomori, et al. 2011]. Dans l'éventualité où les cellules endothéliales exprimeraient APJ dans notre étude, l'apeline pourrait, via une vasodilatation, améliorer la pathologie hépatique. En effet, l'alimentation de rats avec un régime cafétéria pendant un mois, induisant une insulino-résistance et une stéatose, induit une dysfonction sinusoidale, par une inhibition de l'eNOS et ce avant l'apparition de l'inflammation et de la fibrose [Pasarín, et al. 2012]. Il est donc possible que dans notre modèle de régime HFD pendant 3 mois, si l'inflammation et la fibrose ne sont pas présentes, la fonction endothéliale hépatique soit déjà endommagée et que l'apeline l'améliore, d'autant plus que l'apeline est connue pour activer l'eNOS dans les cellules endothéliales [Tatemoto, et al. 2001], dans le muscle squelettique [Dray, et al. 2008], et dans l'hypothalamus [Duparc, et al. 2011]. Le lien avec l'amélioration du métabolisme lipidique que nous observons resterait tout de même à être établi.

3) L'induction d'APJ dans les cellules stellaires, et plus globalement dans le foie en condition de résistance à l'insuline, pourrait ne pas être suffisante pour que l'apeline y exerce

des effets directs, ainsi les effets observés après 4 semaines de traitement à l'apeline seraient la conséquence de l'amélioration du métabolisme musculaire et de la moindre prise de masse grasse. Plusieurs possibilités sont alors envisageables :

Nous avons proposé plus tôt que la moindre sécrétion de TG dans la circulation via les VLDL chez les souris traitées à l'apeline puisse être l'une des raisons pour lesquelles la triglycéridémie des souris est diminuée [Attane, et al. 2012], [Higuchi, et al. 2007]. Il est aussi possible que la diminution de la stéatose soit une conséquence de cette diminution de la triglycéridémie, limitant le stockage ectopique des lipides.

Les effets du traitement à l'apeline sur le foie pourraient être le résultat de la modification du profil sécrétoire du TA. Il est peu probable que l'apeline agisse sur le foie via une augmentation de l'adiponectinémie car sa phosphorylation n'est pas augmentée dans le foie des souris traitées à l'apeline. De plus, l'adiponectinémie n'est pas augmentée après 4 semaines de traitement [Attane, et al. 2012]. Mais d'autres adipokines que nous n'avons pas mesurées, agissant sur la sensibilité à l'insuline, pourraient être augmentées par ce traitement.

Certaines hépatokines agissent sur le métabolisme foie, cela a été démontré par exemple pour le FGF21, la RBP-4, la Sélénoprotéine P et l'Hépassocine. Leur production étant modifiée dans le foie stéatosé, il est tout à fait envisageable que l'amélioration de la sensibilité à l'insuline des souris traitées à l'apeline modifie leur expression et que le métabolisme hépatique en soit amélioré. Les données préliminaires menées sur le foie des souris nourries nous indiquent que l'expression de la Sélénoprotéine P est augmentée d'un facteur 1,3 dans le foie des souris traitées à l'apeline (données non présentées), ce qui semble contradictoire avec leur meilleure sensibilité à l'insuline, et cela doit être confirmé chez les souris sacrifiées à jeun.

Pour conclure, cette étude a permis de mettre en évidence l'augmentation de l'expression hépatique d'APJ dans deux modèles de résistance à l'insuline, les souris nourries avec un régime HFD et les souris db/db, ainsi que dans le foie de modèles pharmacologiques de stéatose chez la souris. Une régulation de son expression par le récepteur nucléaire PPAR α ou par le cholestérol estérifié est possible et requiert une attention particulière dans l'optique de comprendre cette surexpression.

Le traitement chronique à l'apeline de 4 semaines, mis en place au laboratoire, a pour effet de diminuer la stéatose hépatique de souris nourries avec un régime HFD, en réduisant la

lipogenèse *de novo* par une diminution de l'expression de SREBP-1c et de la FAS. L'ensemble des effets du traitement à l'apeline sur le foie sont représentés dans la figure 19.

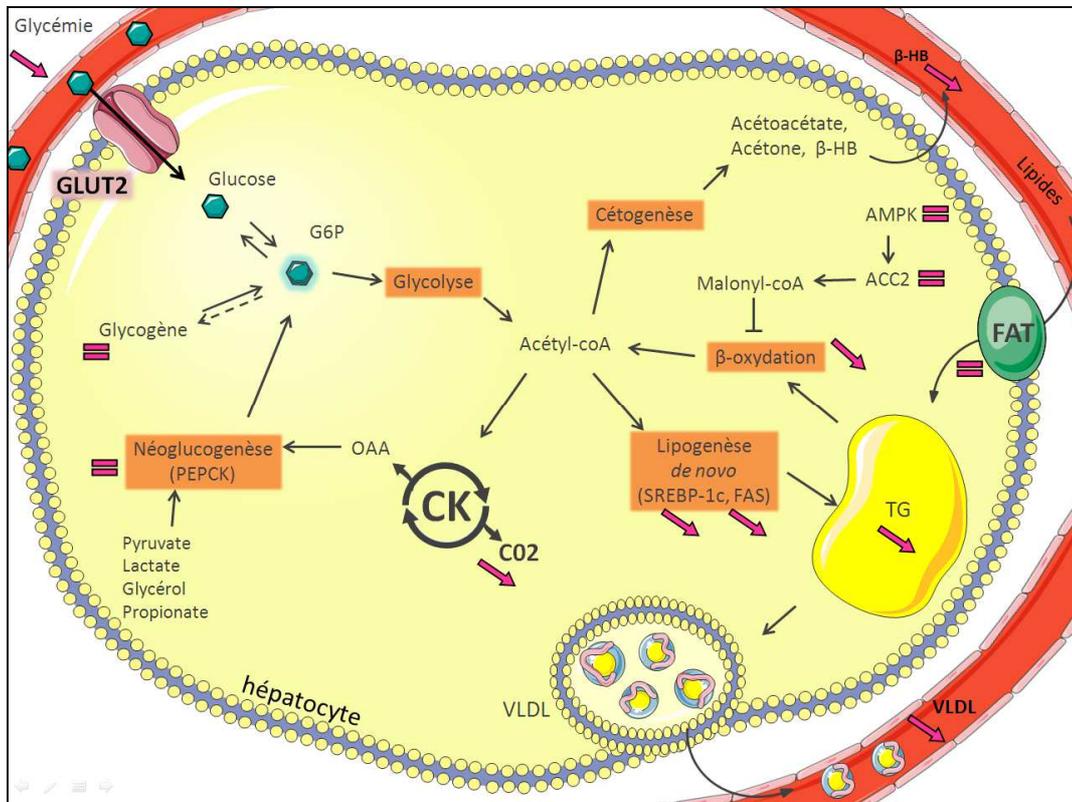


Figure 19. Récapitulatif des effets du traitement à l'apeline pendant 4 semaines sur le foie de souris obèses et résistantes à l'insuline.

(Les effets du traitement sont représentés par les signaux = ou ↗)

Malgré son induction dans le foie des souris sous HFD, le faible niveau d'expression d'APJ suggère que les effets de l'apeline pourraient être indirects. Cependant, sa localisation dans un type cellulaire minoritaire du foie n'exclut pas un effet direct (mais indirect vis-à-vis du métabolisme), ce que nous nous attacherons à déterminer, en utilisant des modèles de culture primaire sur différents types cellulaires de foie. Ces expériences nous apporteront les informations nécessaires pour déterminer si l'apeline agit directement, et si elle est bénéfique ou délétère pour le métabolisme hépatique.

Conclusion générale

Dans une première partie, nous nous sommes intéressés aux effets d'un régime hyperlipidique supplémenté en EPA sur le métabolisme lipidique musculaire et la régulation du système apeline/APJ dans le muscle squelettique. Les effets de l'EPA sur le tissu adipeux et sur l'expression génique et la sécrétion de différentes adipokines, dont l'apeline, ont fait l'objet de nombreuses publications. L'apeline étant un peptide présent dans de nombreux tissus, cette étude a permis de montrer que sa régulation a aussi lieu dans le muscle, un autre tissu métaboliquement actif, et surtout que l'apeline pourrait être sécrétée par le muscle. Le fait que l'apeline puisse désormais être considérée aussi comme une myokine a également été montré très récemment dans un travail en collaboration avec l'équipe du Pr. Langin de l'I2MC, en réponse à l'exercice physique chez des personnes obèses [Besse-Patin, et al. 2013]. Cependant, dans cette étude comme dans la nôtre, l'apelinémie n'est pas augmentée, ce qui privilégierait plutôt une action locale de l'apeline. Bien que, comme nous l'avons discuté, nous n'ayons pas encore démontré le rôle que peut jouer cette augmentation de la production musculaire d'apeline dans les effets métaboliques de l'EPA, ces résultats renforcent l'idée selon laquelle l'apeline est bénéfique pour le métabolisme. En revanche, il serait important de définir, dans les effets de l'EPA, la part jouée par l'apeline comparativement aux autres adipokines impliquées dans la sensibilité à l'insuline, comme l'adiponectine. L'apeline jouant un rôle sur le métabolisme et la fonction cardiaque, il serait également intéressant de déterminer si l'EPA est capable de réguler le système apeline/APJ dans le cœur.

Dans une deuxième partie, nous avons étudié les effets d'un traitement chronique à l'apeline sur le métabolisme hépatique, et la localisation d'APJ. Hormis la diminution de la stéatose, les effets du traitement sont peu marqués dans le foie, comparativement à ce qui a pu être observé dans le muscle [Attane, et al. 2012]. Pour l'instant, bien que nous ne puissions pas encore l'affirmer, il semble que l'amélioration du métabolisme hépatique soit une conséquence de l'amélioration du métabolisme musculaire et de la diminution des dépôts adipeux chez la souris obèse et résistante à l'insuline. Par conséquent, le foie ne semble pas être une cible privilégiée de l'apeline. Ainsi, dans la perspective d'utiliser l'apeline comme potentiel agent thérapeutique, son mode d'action se distingue de celui de la Metformine, mais aussi en partie de celui des TZD. La validation de l'intérêt thérapeutique de l'apeline devrait être faite très

prochainement chez l'Homme. En effet, dans le cadre d'une collaboration entre le Pr. Pierre Gourdy, du Service de Diabétologie, Maladies Métaboliques et Nutrition du CHU Ranguel, et notre équipe, l'effet aigu de l'apeline sur la sensibilité à l'insuline va être testé chez des sujets volontaires au cours d'un clamp euglycémique hyperinsulinémique. Cette preuve de concept chez l'Homme ouvrirait de nouvelles perspectives et en particulier la mise en place d'essais cliniques s'intéressant à des sujets atteints d'un diabète de type II ou du syndrome métabolique.

Bibliographie

Aas V, Rokling-Andersen MH, Kase ET, Thoresen GH, Rustan AC (2006) Eicosapentaenoic acid (20:5 n-3) increases fatty acid and glucose uptake in cultured human skeletal muscle cells. *Journal of lipid research* 47:366-374

Abu-Elheiga L, Oh W, Kordari P, Wakil SJ (2003) Acetyl-coa carboxylase 2 mutant mice are protected against obesity and diabetes induced by high-fat/high-carbohydrate diets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:10207-10212

Abu-Elheiga L, Matzuk MM, Kordari P, Oh W, Shaikenov T, Gu Z, Wakil SJ (2005) Mutant mice lacking acetyl-coa carboxylase 1 are embryonically lethal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:12011-12016

Achard CS, Laybutt DR (2012) Lipid-induced endoplasmic reticulum stress in liver cells results in two distinct outcomes: Adaptation with enhanced insulin signaling or insulin resistance. *Endocrinology* 153:2164-2177

Adams JM, 2nd, Pratipanawat T, Berria R, Wang E, DeFronzo RA, Sullards MC, Mandarino LJ (2004) Ceramide content is increased in skeletal muscle from obese insulin-resistant humans. *Diabetes* 53:25-31

Adams SH, Hoppel CL, Lok KH, Zhao L, Wong SW, Minkler PE, Hwang DH, Newman JW, Garvey WT (2009) Plasma acylcarnitine profiles suggest incomplete long-chain fatty acid beta-oxidation and altered tricarboxylic acid cycle activity in type 2 diabetic african-american women. *The Journal of nutrition* 139:1073-1081

Adiels M, Boren J, Caslake MJ, Stewart P, Soro A, Westerbacka J, Wennberg B, Olofsson SO, Packard C, Taskinen MR (2005) Overproduction of vldl1 driven by hyperglycemia is a dominant feature of diabetic dyslipidemia. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25:1697-1703

Adler AI, Boyko EJ, Schraer CD, Murphy NJ (1994) Lower prevalence of impaired glucose tolerance and diabetes associated with daily seal oil or salmon consumption among alaska natives. *Diabetes care* 17:1498-1501

Agius L (2013) High-carbohydrate diets induce hepatic insulin resistance to protect the liver from substrate overload. *Biochemical pharmacology* 85:306-312

Aguer C, Fiehn O, Seifert EL, Bezaire V, Meissen JK, Daniels A, Scott K, Renaud JM, Padilla M, Bickel DR, Dysart M, Adams SH, Harper ME (2013) Muscle uncoupling protein 3 overexpression mimics endurance training and reduces circulating biomarkers of incomplete beta-oxidation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*

Ahmad F, Considine RV, Goldstein BJ (1995) Increased abundance of the receptor-type protein-tyrosine phosphatase lar accounts for the elevated insulin receptor dephosphorylating activity in adipose tissue of obese human subjects. *The Journal of clinical investigation* 95:2806-2812

Ahmad F, Azevedo JL, Cortright R, Dohm GL, Goldstein BJ (1997) Alterations in skeletal muscle protein-tyrosine phosphatase activity and expression in insulin-resistant human obesity and diabetes. *The Journal of clinical investigation* 100:449-458

Aktas B, Yilmaz Y, Eren F, Yonal O, Kurt R, Alahdab YO, Celikel CA, Ozdogan O, Imeryuz N, Kalayci C, Avsar E (2011) Serum levels of vaspin, obestatin, and apelin-36 in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism: clinical and experimental* 60:544-549

Alapatt P, Guo F, Komanetsky SM, Wang S, Cai J, Sargsyan A, Rodriguez Diaz E, Bacon BT, Aryal P, Graham TE (2013) Liver retinol transporter and receptor for serum retinol-binding protein (rbp4). *The Journal of biological chemistry* 288:1250-1265

Alexiadou K, Kokkinos A, Liatis S, Perrea D, Katsilambros N, Tentolouris N (2012) Differences in plasma apelin and visfatin levels between patients with type 1 diabetes mellitus and healthy subjects and response after acute hyperglycemia and insulin administration. *Hormones* 11:444-450

Alonso-Magdalena P, Vieira E, Soriano S, Menes L, Burks D, Quesada I, Nadal A (2010) Bisphenol a exposure during pregnancy disrupts glucose homeostasis in mothers and adult male offspring. *Environmental health perspectives* 118:1243-1250

An J, Muoio DM, Shiota M, Fujimoto Y, Cline GW, Shulman GI, Koves TR, Stevens R, Millington D, Newgard CB (2004) Hepatic expression of malonyl-coa decarboxylase reverses muscle, liver and whole-animal insulin resistance. *Nature medicine* 10:268-274

An WS, Kim HJ, Cho KH, Vaziri ND (2009) Omega-3 fatty acid supplementation attenuates oxidative stress, inflammation, and tubulointerstitial fibrosis in the remnant kidney. *American journal of physiology Renal physiology* 297:F895-903

Andersen G, Burgdorf KS, Sparso T, Borch-Johnsen K, Jorgensen T, Hansen T, Pedersen O (2008a) Ahsg tag single nucleotide polymorphisms associate with type 2 diabetes and dyslipidemia: Studies of metabolic traits in 7,683 white danish subjects. *Diabetes* 57:1427-1432

Andersen G, Harnack K, Erbersdobler HF, Somoza V (2008b) Dietary eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid are more effective than alpha-linolenic acid in improving insulin sensitivity in rats. *Annals of nutrition & metabolism* 52:250-256

Aoki H, Hisada T, Ishizuka T, Utsugi M, Kawata T, Shimizu Y, Okajima F, Dobashi K, Mori M (2008) Resolvin e1 dampens airway inflammation and hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *Biochemical and biophysical research communications* 367:509-515

Appel LJ, Miller ER, 3rd, Seidler AJ, Whelton PK (1993) Does supplementation of diet with 'fish oil' reduce blood pressure? A meta-analysis of controlled clinical trials. *Archives of internal medicine* 153:1429-1438

Arafat AM, Kaczmarek P, Skrzypski M, Pruszyńska-Oszmerek E, Kolodziejcki P, Szczepankiewicz D, Sassek M, Wojciechowicz T, Wiedenmann B, Pfeiffer AF, Nowak KW, Strowski MZ (2013) Glucagon increases circulating fibroblast growth factor 21 independently of endogenous insulin levels: A novel mechanism of glucagon-stimulated lipolysis? *Diabetologia* 56:588-597

Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y (1999) Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochemical and biophysical research communications* 257:79-83

Armitage JA, Pearce AD, Sinclair AJ, Vingrys AJ, Weisinger RS, Weisinger HS (2003) Increased blood pressure later in life may be associated with perinatal n-3 fatty acid deficiency. *Lipids* 38:459-464

Armstrong MB, Towle HC (2001) Polyunsaturated fatty acids stimulate hepatic ucp-2 expression via a pparalpha-mediated pathway. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 281:E1197-1204

Arnal E, Miranda M, Johnsen-Soriano S, Alvarez-Nolting R, Diaz-Llopis M, Araiz J, Cervera E, Bosch-Morell F, Romero FJ (2009) Beneficial effect of docosahexanoic acid and lutein on retinal structural, metabolic, and functional abnormalities in diabetic rats. *Current eye research* 34:928-938

Aron-Wisnewsky J, Tordjman J, Poitou C, Darakhshan F, Hugol D, Basdevant A, Aissat A, Guerre-Millo M, Clement K (2009) Human adipose tissue macrophages: M1 and m2 cell surface markers in subcutaneous and omental depots and after weight loss. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 94:4619-4623

Arturi F, Succurro E, Procopio C, Pedace E, Mannino GC, Lugara M, Procopio T, Androozzi F, Sciacqua A, Hribal ML, Perticone F, Sesti G (2011) Nonalcoholic fatty liver disease is associated with low circulating levels of insulin-like growth factor-i. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 96:E1640-1644

Assifi MM, Suchankova G, Constant S, Prentki M, Saha AK, Ruderman NB (2005) Amp-activated protein kinase and coordination of hepatic fatty acid metabolism of starved/carbohydrate-refed rats. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 289:E794-800

Attane C, Daviaud D, Dray C, Dusaulcy R, Masseboeuf M, Prevot D, Carpenne C, Castan-Laurell I, Valet P (2011) Apelin stimulates glucose uptake but not lipolysis in human adipose tissue ex vivo. *Journal of molecular endocrinology* 46:21-28

Attane C, Foussal C, Le Gonidec S, Benani A, Daviaud D, Wanecq E, Guzman-Ruiz R, Dray C, Bezaire V, Rancoule C, Kuba K, Ruiz-Gayo M, Levade T, Penninger J, Burcelin R, Penicaud L, Valet P, Castan-Laurell I (2012) Apelin treatment increases complete fatty acid oxidation, mitochondrial oxidative capacity, and biogenesis in muscle of insulin-resistant mice. *Diabetes* 61:310-320

Attar-Bashi NM, Weisinger RS, Begg DP, Li D, Sinclair AJ (2007) Failure of conjugated linoleic acid supplementation to enhance biosynthesis of docosahexanoic acid from alpha-linolenic acid in healthy human volunteers. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 76:121-130

Auberger P, Falquerho L, Contreres JO, Pages G, Le Cam G, Rossi B, Le Cam A (1989) Characterization of a natural inhibitor of the insulin receptor tyrosine kinase: Cdna cloning, purification, and anti-mitogenic activity. *Cell* 58:631-640

Avramoglu RK, Qiu W, Adeli K (2003) Mechanisms of metabolic dyslipidemia in insulin resistant states: Deregulation of hepatic and intestinal lipoprotein secretion. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 8:d464-476

Aydin S (2010) The presence of the peptides apelin, ghrelin and nesfatin-1 in the human breast milk, and the lowering of their levels in patients with gestational diabetes mellitus. *Peptides* 31:2236-2240

Aydin S (2013) Presence of adropin, nesfatin-1, apelin-12, ghrelins and salusins peptides in the milk, cheese whey and plasma of dairy cows. *Peptides* 43:83-87

Azizi M, Iturrioz X, Blanchard A, Peyrard S, De Mota N, Chartrel N, Vaudry H, Corvol P, Llorens-Cortes C (2008) Reciprocal regulation of plasma apelin and vasopressin by osmotic stimuli. *J Am Soc Nephrol* 19:1015-1024

- Badin PM, Vila IK, Louche K, Mairal A, Marques MA, Bourlier V, Tavernier G, Langin D, Moro C (2013) High-fat diet-mediated lipotoxicity and insulin resistance is related to impaired lipase expression in mouse skeletal muscle. *Endocrinology* 154:1444-1453
- Badman MK, Pissios P, Kennedy AR, Koukos G, Flier JS, Maratos-Flier E (2007) Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by pparalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell metabolism* 5:426-437
- Baffy G (2009) Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease: The emerging view. *Journal of hepatology* 51:212-223
- Bahr MJ, Boeker KH, Manns MP, Tietge UJ (2009) Decreased hepatic rbp4 secretion is correlated with reduced hepatic glucose production but is not associated with insulin resistance in patients with liver cirrhosis. *Clinical endocrinology* 70:60-65
- Baillie RA, Takada R, Nakamura M, Clarke SD (1999) Coordinate induction of peroxisomal acyl-coa oxidase and ucp-3 by dietary fish oil: A mechanism for decreased body fat deposition. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 60:351-356
- Balas B, Baig MR, Watson C, Dunning BE, Ligueros-Saylan M, Wang Y, He YL, Darland C, Holst JJ, Deacon CF, Cusi K, Mari A, Foley JE, DeFronzo RA (2007) The dipeptidyl peptidase iv inhibitor vildagliptin suppresses endogenous glucose production and enhances islet function after single-dose administration in type 2 diabetic patients. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 92:1249-1255
- Bandsma RH, Wiegman CH, Herling AW, Burger HJ, ter Harmsel A, Meijer AJ, Romijn JA, Reijngoud DJ, Kuipers F (2001) Acute inhibition of glucose-6-phosphate translocator activity leads to increased de novo lipogenesis and development of hepatic steatosis without affecting vldl production in rats. *Diabetes* 50:2591-2597
- Barnes G, Japp AG, Newby DE (2010) Translational promise of the apelin--apj system. *Heart* 96:1011-1016
- Basantani MK, Sitnick MT, Cai L, Brenner DS, Gardner NP, Li JZ, Schoiswohl G, Yang K, Kumari M, Gross RW, Zechner R, Kershaw EE (2011) Pnpla3/adiponutrin deficiency in mice does not contribute to fatty liver disease or metabolic syndrome. *Journal of lipid research* 52:318-329
- Basciano H, Miller AE, Naples M, Baker C, Kohen R, Xu E, Su Q, Allister EM, Wheeler MB, Adeli K (2009) Metabolic effects of dietary cholesterol in an animal model of insulin resistance and hepatic steatosis. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 297:E462-473
- Bechmann LP, Hannivoort RA, Gerken G, Hotamisligil GS, Trauner M, Canbay A (2012) The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *Journal of hepatology* 56:952-964
- Bedoucha M, Atzpodien E, Boelsterli UA (2001) Diabetic kky mice exhibit increased hepatic ppargamma1 gene expression and develop hepatic steatosis upon chronic treatment with antidiabetic thiazolidinediones. *Journal of hepatology* 35:17-23
- Begg DP, Sinclair AJ, Stahl LA, Garg ML, Jois M, Weisinger RS (2010) Dietary protein level interacts with omega-3 polyunsaturated fatty acid deficiency to induce hypertension. *American journal of hypertension* 23:125-128
- Belalcazar LM, Reboussin DM, Haffner SM, Reeves RS, Schwenke DC, Hoogeveen RC, Pi-Sunyer FX, Ballantyne CM, Look Ahead Obesity I, Thrombosis Research G (2010) Marine omega-3 fatty acid

intake: Associations with cardiometabolic risk and response to weight loss intervention in the look ahead (action for health in diabetes) study. *Diabetes care* 33:197-199

Belfiore F, Romeo F, Napoli E, Lo Vecchio L (1974) Enzymes of glucose metabolism in liver of subjects with adult-onset diabetes. *Diabetes* 23:293-301

Belfiore F, Romeo F, Iannello S, Salamone C (1989) The glucose-6-phosphatase/glucokinase ratio in the liver of obese-diabetic subjects. *Biochemical medicine and metabolic biology* 41:77-80

Belfort R, Harrison SA, Brown K, Darland C, Finch J, Hardies J, Balas B, Gastaldelli A, Tio F, Pulcini J, Berria R, Ma JZ, Dwivedi S, Havranek R, Fincke C, DeFronzo R, Bannayan GA, Schenker S, Cusi K (2006) A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *The New England journal of medicine* 355:2297-2307

Belzung F, Raclot T, Groscolas R (1993) Fish oil n-3 fatty acids selectively limit the hypertrophy of abdominal fat depots in growing rats fed high-fat diets. *The American journal of physiology* 264:R1111-1118

Ben-Jonathan N, Hugo ER, Brandebourg TD (2009) Effects of bisphenol a on adipokine release from human adipose tissue: Implications for the metabolic syndrome. *Molecular and cellular endocrinology* 304:49-54

Benhamed F, Denechaud PD, Lemoine M, Robichon C, Moldes M, Bertrand-Michel J, Ratziu V, Serfaty L, Housset C, Capeau J, Girard J, Guillou H, Postic C (2012) The lipogenic transcription factor chrebp dissociates hepatic steatosis from insulin resistance in mice and humans. *The Journal of clinical investigation* 122:2176-2194

Bertrand C, Pignalosa A, Wanecq E, Rancoule C, Batut A, Deleruyelle S, Lionetti L, Valet P, Castan-Laurell I (2013) Effects of dietary eicosapentaenoic acid (epa) supplementation in high-fat fed mice on lipid metabolism and apelin/apj system in skeletal muscle. *PloS one* 8:e78874

Besse-Patin A, Montastier E, Vinel C, Castan-Laurell I, Louche K, Dray C, Daviaud D, Mir L, Marques MA, Thalamas C, Valet P, Langin D, Moro C, Viguerie N (2013) Effect of endurance training on skeletal muscle myokine expression in obese men: Identification of apelin as a novel myokine. *International journal of obesity*

Bezaire V, Spriet LL, Campbell S, Sabet N, Gerrits M, Bonen A, Harper ME (2005) Constitutive ucp3 overexpression at physiological levels increases mouse skeletal muscle capacity for fatty acid transport and oxidation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19:977-979

Biddinger SB, Hernandez-Ono A, Rask-Madsen C, Haas JT, Aleman JO, Suzuki R, Scapa EF, Agarwal C, Carey MC, Stephanopoulos G, Cohen DE, King GL, Ginsberg HN, Kahn CR (2008) Hepatic insulin resistance is sufficient to produce dyslipidemia and susceptibility to atherosclerosis. *Cell metabolism* 7:125-134

Bloch-Damti A, Bashan N (2005) Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling* 7:1553-1567

Boden G, Chen X (1999) Effects of fatty acids and ketone bodies on basal insulin secretion in type 2 diabetes. *Diabetes* 48:577-583

Bohler H, Jr., Mokshagundam S, Winters SJ (2010) Adipose tissue and reproduction in women. *Fertility and sterility* 94:795-825

Botolin D, Wang Y, Christian B, Jump DB (2006) Docosahexaenoic acid (22:6,n-3) regulates rat hepatocyte srebp-1 nuclear abundance by erk- and 26s proteasome-dependent pathways. *Journal of lipid research* 47:181-192

Boucher J, Masri B, Daviaud D, Gesta S, Guigne C, Mazzucotelli A, Castan-Laurell I, Tack I, Knibiehler B, Carpene C, Audigier Y, Saulnier-Blache JS, Valet P (2005) Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology* 146:1764-1771

Boulware SD, Tamborlane WV, Rennert NJ, Gesundheit N, Sherwin RS (1994) Comparison of the metabolic effects of recombinant human insulin-like growth factor-i and insulin. Dose-response relationships in healthy young and middle-aged adults. *The Journal of clinical investigation* 93:1131-1139

Brand A, Bauer NG, Hallott A, Goldbaum O, Ghebremeskel K, Reifen R, Richter-Landsberg C (2010) Membrane lipid modification by polyunsaturated fatty acids sensitizes oligodendroglial oln-93 cells against oxidative stress and promotes up-regulation of heme oxygenase-1 (hsp32). *Journal of neurochemistry* 113:465-476

Brandt JM, Djouadi F, Kelly DP (1998) Fatty acids activate transcription of the muscle carnitine palmitoyltransferase i gene in cardiac myocytes via the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *The Journal of biological chemistry* 273:23786-23792

Brasky TM, Darke AK, Song X, Tangen CM, Goodman PJ, Thompson IM, Meyskens FL, Jr., Goodman GE, Minasian LM, Parnes HL, Klein EA, Kristal AR (2013) Plasma phospholipid fatty acids and prostate cancer risk in the select trial. *Journal of the National Cancer Institute* 105:1132-1141

Brown JM, Betters JL, Lord C, Ma Y, Han X, Yang K, Alger HM, Melchior J, Sawyer J, Shah R, Wilson MD, Liu X, Graham MJ, Lee R, Crooke R, Shulman GI, Xue B, Shi H, Yu L (2010) Cgi-58 knockdown in mice causes hepatic steatosis but prevents diet-induced obesity and glucose intolerance. *Journal of lipid research* 51:3306-3315

Brown MS, Goldstein JL (2008) Selective versus total insulin resistance: A pathogenic paradox. *Cell metabolism* 7:95-96

Bruce CR, Hoy AJ, Turner N, Watt MJ, Allen TL, Carpenter K, Cooney GJ, Febbraio MA, Kraegen EW (2009) Overexpression of carnitine palmitoyltransferase-1 in skeletal muscle is sufficient to enhance fatty acid oxidation and improve high-fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes* 58:550-558

Buechler C, Wanninger J, Neumeier M (2011) Adiponectin, a key adipokine in obesity related liver diseases. *World journal of gastroenterology : WJG* 17:2801-2811

Bultot L, Guigas B, Von Wilamowitz-Moellendorff A, Maisin L, Vertommen D, Hussain N, Beullens M, Guinovart JJ, Foretz M, Viollet B, Sakamoto K, Hue L, Rider MH (2012) Amp-activated protein kinase phosphorylates and inactivates liver glycogen synthase. *The Biochemical journal* 443:193-203

Burcelin R, Dolci W, Thorens B (2000) Portal glucose infusion in the mouse induces hypoglycemia: Evidence that the hepatoportal glucose sensor stimulates glucose utilization. *Diabetes* 49:1635-1642

Burdge GC, Finnegan YE, Minihane AM, Williams CM, Wootton SA (2003) Effect of altered dietary n-3 fatty acid intake upon plasma lipid fatty acid composition, conversion of [¹³C]alpha-linolenic acid to longer-chain fatty acids and partitioning towards beta-oxidation in older men. *The British journal of nutrition* 90:311-321

Burgess SC, He T, Yan Z, Lindner J, Sherry AD, Malloy CR, Browning JD, Magnuson MA (2007) Cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase does not solely control the rate of hepatic gluconeogenesis in the intact mouse liver. *Cell metabolism* 5:313-320

Byon JC, Kusari AB, Kusari J (1998) Protein-tyrosine phosphatase-1b acts as a negative regulator of insulin signal transduction. *Molecular and cellular biochemistry* 182:101-108

Cabler S, Agarwal A, Flint M, du Plessis SS (2010) Obesity: Modern man's fertility nemesis. *Asian journal of andrology* 12:480-489

Cabou C, Cani PD, Campistron G, Knauf C, Mathieu C, Sartori C, Amar J, Scherrer U, Burcelin R (2007) Central insulin regulates heart rate and arterial blood flow: An endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism altered during diabetes. *Diabetes* 56:2872-2877

Canbay A, Taimr P, Torok N, Higuchi H, Friedman S, Gores GJ (2003) Apoptotic body engulfment by a human stellate cell line is profibrogenic. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 83:655-663

Cantley JL, Yoshimura T, Camporez JP, Zhang D, Jornayvaz FR, Kumashiro N, Guebre-Egziabher F, Jurczak MJ, Kahn M, Guigni BA, Serr J, Hankin J, Murphy RC, Cline GW, Bhanot S, Manchem VP, Brown JM, Samuel VT, Shulman GI (2013) Cgi-58 knockdown sequesters diacylglycerols in lipid droplets/er-preventing diacylglycerol-mediated hepatic insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110:1869-1874

Canto C, Auwerx J (2010) Amp-activated protein kinase and its downstream transcriptional pathways. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 67:3407-3423

Cao R, Cronk ZX, Zha W, Sun L, Wang X, Fang Y, Studer E, Zhou H, Pandak WM, Dent P, Gil G, Hylemon PB (2010) Bile acids regulate hepatic gluconeogenic genes and farnesoid x receptor via g(alpha)i-protein-coupled receptors and the akt pathway. *Journal of lipid research* 51:2234-2244

Caprio S (2012) Development of type 2 diabetes mellitus in the obese adolescent: A growing challenge. *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists* 18:791-795

Cariou B, Zair Y, Staels B, Bruckert E (2011) Effects of the new dual ppar alpha/delta agonist gft505 on lipid and glucose homeostasis in abdominally obese patients with combined dyslipidemia or impaired glucose metabolism. *Diabetes care* 34:2008-2014

Cariou B, Hanf R, Lambert-Porcheron S, Zair Y, Sauvinet V, Noel B, Flet L, Vidal H, Staels B, Laville M (2013) Dual peroxisome proliferator-activated receptor alpha/delta agonist gft505 improves hepatic and peripheral insulin sensitivity in abdominally obese subjects. *Diabetes care*

Carmona MC, Louche K, Nibbelink M, Prunet B, Bross A, Desbazeille M, Dacquet C, Renard P, Casteilla L, Penicaud L (2005) Fenofibrate prevents rosiglitazone-induced body weight gain in ob/ob mice. *International journal of obesity* 29:864-871

Caspar-Bauguil S, Fioroni A, Galinier A, Allenbach S, Pujol MC, Salvayre R, Cartier A, Lemieux I, Richard D, Biron S, Marceau P, Casteilla L, Penicaud L, Mauriege P (2012) Pro-inflammatory phospholipid arachidonic acid/eicosapentaenoic acid ratio of dysmetabolic severely obese women. *Obesity surgery* 22:935-944

Castan-Laurell I, Vitkova M, Daviaud D, Dray C, Kovacikova M, Kovacova Z, Hejnova J, Stich V, Valet P (2008) Effect of hypocaloric diet-induced weight loss in obese women on plasma apelin and adipose tissue expression of apelin and apj. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 158:905-910

- Castan-Laurell I, Dray C, Knauf C, Kunduzova O, Valet P (2012) Apelin, a promising target for type 2 diabetes treatment? *Trends in endocrinology and metabolism*: TEM 23:234-241
- Catala-Niell A, Estrany ME, Proenza AM, Gianotti M, Llado I (2008) Skeletal muscle and liver oxidative metabolism in response to a voluntary isocaloric intake of a high fat diet in male and female rats. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 22:327-336
- Cengiz C, Ardicoglu Y, Bulut S, Boyacioglu S (2010) Serum retinol-binding protein 4 in patients with nonalcoholic fatty liver disease: Does it have a significant impact on pathogenesis? *European journal of gastroenterology & hepatology* 22:813-819
- Ceylan-Isik AF, Kandadi MR, Xu X, Hua Y, Chicco AJ, Ren J, Nair S (2013) Apelin administration ameliorates high fat diet-induced cardiac hypertrophy and contractile dysfunction. *Journal of molecular and cellular cardiology* 63C:4-13
- Cha JY, Repa JJ (2007) The liver x receptor (lxr) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of lxr. *The Journal of biological chemistry* 282:743-751
- Chakravarthy MV, Pan Z, Zhu Y, Tordjman K, Schneider JG, Coleman T, Turk J, Semenkovich CF (2005) "New" hepatic fat activates pparalpha to maintain glucose, lipid, and cholesterol homeostasis. *Cell metabolism* 1:309-322
- Chakravarthy MV, Lodhi IJ, Yin L, Malapaka RR, Xu HE, Turk J, Semenkovich CF (2009) Identification of a physiologically relevant endogenous ligand for pparalpha in liver. *Cell* 138:476-488
- Chamouton J, Latruffe N (2012) Pparalpha/hnf4alpha interplay on diversified responsive elements. Relevance in the regulation of liver peroxisomal fatty acid catabolism. *Current drug metabolism* 13:1436-1453
- Chartoumpakis DV, Ziros PG, Psyrogiannis AI, Papavassiliou AG, Kyriazopoulou VE, Sykiotis GP, Habeos IG (2011) Nrf2 represses fgf21 during long-term high-fat diet-induced obesity in mice. *Diabetes* 60:2465-2473
- Chen H, Zheng C, Zhang X, Li J, Li J, Zheng L, Huang K (2011) Apelin alleviates diabetes-associated endoplasmic reticulum stress in the pancreas of akita mice. *Peptides* 32:1634-1639
- Chen MM, Ashley EA, Deng DX, Tsalenko A, Deng A, Tabibiazar R, Ben-Dor A, Fenster B, Yang E, King JY, Fowler M, Robbins R, Johnson FL, Bruhn L, McDonagh T, Dargie H, Yakhini Z, Tsao PS, Quertermous T (2003) Novel role for the potent endogenous inotrope apelin in human cardiac dysfunction. *Circulation* 108:1432-1439
- Chen W, Chang B, Li L, Chan L (2010) Patatin-like phospholipase domain-containing 3/adiponutrin deficiency in mice is not associated with fatty liver disease. *Hepatology* 52:1134-1142
- Choi HY, Hwang SY, Lee CH, Hong HC, Yang SJ, Yoo HJ, Seo JA, Kim SG, Kim NH, Baik SH, Choi DS, Choi KM (2013a) Increased selenoprotein p levels in subjects with visceral obesity and nonalcoholic fatty liver disease. *Diabetes & metabolism journal* 37:63-71
- Choi JH, Rhee EJ, Bae JC, Park SE, Park CY, Cho YK, Oh KW, Park SW, Lee WY (2013b) Increased risk of type 2 diabetes in subjects with both elevated liver enzymes and ultrasonographically diagnosed nonalcoholic fatty liver disease: A 4-year longitudinal study. *Archives of medical research* 44:115-120

Choi KM, Han KA, Ahn HJ, Lee SY, Hwang SY, Kim BH, Hong HC, Choi HY, Yang SJ, Yoo HJ, Baik SH, Choi DS, Min KW (2013c) The effects of caloric restriction on fetuin-a and cardiovascular risk factors in rats and humans: A randomized controlled trial. *Clinical endocrinology* 79:356-363

Christou GA, Tselepis AD, Kiortsis DN (2012) The metabolic role of retinol binding protein 4: An update. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 44:6-14

Chu J, Zhang H, Huang X, Lin Y, Shen T, Chen B, Man Y, Wang S, Li J (2013) Apelin ameliorates tnf-alpha-induced reduction of glycogen synthesis in the hepatocytes through g protein-coupled receptor apj. *PloS one* 8:e57231

Chun HJ, Ali ZA, Kojima Y, Kundu RK, Sheikh AY, Agrawal R, Zheng L, Leeper NJ, Pearl NE, Patterson AJ, Anderson JP, Tsao PS, Lenardo MJ, Ashley EA, Quertermous T (2008) Apelin signaling antagonizes ang ii effects in mouse models of atherosclerosis. *The Journal of clinical investigation* 118:3343-3354

Cipriani S, Mencarelli A, Palladino G, Fiorucci S (2010) Fxr activation reverses insulin resistance and lipid abnormalities and protects against liver steatosis in zucker (fa/fa) obese rats. *Journal of lipid research* 51:771-784

Clarke KJ, Whitaker KW, Reyes TM (2009) Diminished metabolic responses to centrally-administered apelin-13 in diet-induced obese rats fed a high-fat diet. *J Neuroendocrinol* 21:83-89

Clarke PR, Hardie DG (1990) Regulation of hmg-coa reductase: Identification of the site phosphorylated by the amp-activated protein kinase in vitro and in intact rat liver. *The EMBO journal* 9:2439-2446

Cnop M, Foufelle F, Velloso LA (2012) Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends in molecular medicine* 18:59-68

Coburn CT, Knapp FF, Jr., Febbraio M, Beets AL, Silverstein RL, Abumrad NA (2000) Defective uptake and utilization of long chain fatty acids in muscle and adipose tissues of cd36 knockout mice. *The Journal of biological chemistry* 275:32523-32529

Conti R, Mannucci E, Pessotto P, Tassoni E, Carminati P, Giannessi F, Arduini A (2011) Selective reversible inhibition of liver carnitine palmitoyl-transferase 1 by teglicar reduces gluconeogenesis and improves glucose homeostasis. *Diabetes* 60:644-651

Cortez-Pinto H, Camilo ME, Baptista A, De Oliveira AG, De Moura MC (1999a) Non-alcoholic fatty liver: Another feature of the metabolic syndrome? *Clinical nutrition* 18:353-358

Cortez-Pinto H, Chatham J, Chacko VP, Arnold C, Rashid A, Diehl AM (1999b) Alterations in liver atp homeostasis in human nonalcoholic steatohepatitis: A pilot study. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 282:1659-1664

Coskun T, Bina HA, Schneider MA, Dunbar JD, Hu CC, Chen Y, Moller DE, Kharitonkov A (2008) Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. *Endocrinology* 149:6018-6027

Cox CM, D'Agostino SL, Miller MK, Heimark RL, Krieg PA (2006) Apelin, the ligand for the endothelial g-protein-coupled receptor, apj, is a potent angiogenic factor required for normal vascular development of the frog embryo. *Dev Biol* 296:177-189

Cui RR, Mao DA, Yi L, Wang C, Zhang XX, Xie H, Wu XP, Liao XB, Zhou H, Meng JC, Yuan LQ, Liao EY Apelin suppresses apoptosis of human vascular smooth muscle cells via apj/pi3-k/akt signaling pathways. *Amino acids* 39:1193-1200

- D'Aniello C, Lonardo E, Iaconis S, Guardiola O, Liguoro AM, Liguori GL, Autiero M, Carmeliet P, Minchiotti G (2009) G protein-coupled receptor apj and its ligand apelin act downstream of cripto to specify embryonic stem cells toward the cardiac lineage through extracellular signal-regulated kinase/p70s6 kinase signaling pathway. *Circulation research* 105:231-238
- Davenport CB (1923) Body build and its inheritance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 9:226-230
- Daviaud D, Boucher J, Gesta S, Dray C, Guigne C, Quilliot D, Ayav A, Ziegler O, Carpene C, Saulnier-Blache JS, Valet P, Castan-Laurell I (2006) Tnfalpha up-regulates apelin expression in human and mouse adipose tissue. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20:1528-1530
- Davies SP, Carling D, Munday MR, Hardie DG (1992) Diurnal rhythm of phosphorylation of rat liver acetyl-coa carboxylase by the amp-activated protein kinase, demonstrated using freeze-clamping. Effects of high fat diets. *European journal of biochemistry / FEBS* 203:615-623
- Day CP, James OF (1998) Steatohepatitis: A tale of two "hits"? *Gastroenterology* 114:842-845
- de Mello VD, Erkkila AT, Schwab US, Pulkkinen L, Kolehmainen M, Atalay M, Mussalo H, Lankinen M, Oresic M, Lehto S, Uusitupa M (2009) The effect of fatty or lean fish intake on inflammatory gene expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with coronary heart disease. *European journal of nutrition* 48:447-455
- De Mota N, Lenkei Z, Llorens-Cortes C (2000) Cloning, pharmacological characterization and brain distribution of the rat apelin receptor. *Neuroendocrinology* 72:400-407
- De Mota N, Reaux-Le Goazigo A, El Messari S, Chartrel N, Roesch D, Dujardin C, Kordon C, Vaudry H, Moos F, Llorens-Cortes C (2004) Apelin, a potent diuretic neuropeptide counteracting vasopressin actions through inhibition of vasopressin neuron activity and vasopressin release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:10464-10469
- Delaere F, Magnan C, Mithieux G (2010) Hypothalamic integration of portal glucose signals and control of food intake and insulin sensitivity. *Diabetes & metabolism* 36:257-262
- Delzenne NM, Cani PD (2011) Interaction between obesity and the gut microbiota: Relevance in nutrition. *Annual review of nutrition* 31:15-31
- den Boer M, Voshol PJ, Kuipers F, Havekes LM, Romijn JA (2004) Hepatic steatosis: A mediator of the metabolic syndrome. Lessons from animal models. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 24:644-649
- Dentin R, Benhamed F, Hainault I, Fauveau V, Fougelle F, Dyck JR, Girard J, Postic C (2006) Liver-specific inhibition of chrebp improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice. *Diabetes* 55:2159-2170
- Derosa G, Maffioli P, D'Angelo A, Salvadeo SA, Ferrari I, Fogari E, Gravina A, Mereu R, Randazzo S, Cicero AF (2009) Effects of long chain omega-3 fatty acids on metalloproteinases and their inhibitors in combined dyslipidemia patients. *Expert opinion on pharmacotherapy* 10:1239-1247
- Ding EL, Song Y, Manson JE, Hunter DJ, Lee CC, Rifai N, Buring JE, Gaziano JM, Liu S (2009) Sex hormone-binding globulin and risk of type 2 diabetes in women and men. *The New England journal of medicine* 361:1152-1163

Ding X, Boney-Montoya J, Owen BM, Bookout AL, Coate KC, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA (2012) Betaklotho is required for fibroblast growth factor 21 effects on growth and metabolism. *Cell metabolism* 16:387-393

Dong XC, Copps KD, Guo S, Li Y, Kollipara R, DePinho RA, White MF (2008) Inactivation of hepatic foxo1 by insulin signaling is required for adaptive nutrient homeostasis and endocrine growth regulation. *Cell metabolism* 8:65-76

Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ (2005) Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of clinical investigation* 115:1343-1351

Dray C, Knauf C, Daviaud D, Waget A, Boucher J, Buleon M, Cani PD, Attane C, Guigne C, Carpenne C, Burcelin R, Castan-Laurell I, Valet P (2008) Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell metabolism* 8:437-445

Dray C, Debard C, Jager J, Disse E, Daviaud D, Martin P, Attane C, Wanecq E, Guigne C, Bost F, Tanti JF, Laville M, Vidal H, Valet P, Castan-Laurell I (2010) Apelin and apj regulation in adipose tissue and skeletal muscle of type 2 diabetic mice and humans. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 298:E1161-1169

Dray C, Sakar Y, Vinel C, Daviaud D, Masri B, Garrigues L, Wanecq E, Galvani S, Negre-Salvayre A, Barak LS, Monsarrat B, Burlet-Schiltz O, Valet P, Castan-Laurell I, Ducroc R (2013) The intestinal glucose-apelin cycle controls carbohydrate absorption in mice. *Gastroenterology* 144:771-780

Drougard A, Duparc T, Brenachot X, Carneiro L, Gouaze A, Fournel A, Geurts L, Cadoudal T, Prats AC, Penicaud L, Vieau D, Lesage J, Leloup C, Benani A, Cani PD, Valet P, Knauf C (2013) Hypothalamic apelin/ros signaling controls hepatic glucose metabolism in the onset of diabetes. *Antioxidants & redox signaling*

Du X, Kang JP, Wu JH, Lv Q, Tang CS, Ma CS (2010) Elevated high sensitive c-reactive protein and apelin levels after percutaneous coronary intervention and drug-eluting stent implantation. *Journal of Zhejiang University Science B* 11:548-552

Ducheix S, Podechard N, Lasserre F, Polizzi A, Pommier A, Murzilli S, Di Lisio C, D'Amore S, Bertrand-Michel J, Montagner A, Pineau T, Loiseau N, Lobaccaro JM, Martin PG, Guillou H (2013) A systems biology approach to the hepatic role of the oxysterol receptor lxr in the regulation of lipogenesis highlights a cross-talk with pparalpha. *Biochimie* 95:556-567

Duda MK, O'Shea KM, Stanley WC (2009a) Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation for the treatment of heart failure: Mechanisms and clinical potential. *Cardiovascular research* 84:33-41

Duda MK, O'Shea KM, Tintinu A, Xu W, Khairallah RJ, Barrows BR, Chess DJ, Azimzadeh AM, Harris WS, Sharov VG, Sabbah HN, Stanley WC (2009b) Fish oil, but not flaxseed oil, decreases inflammation and prevents pressure overload-induced cardiac dysfunction. *Cardiovascular research* 81:319-327

Dunmore SJ, Brown JE (2013) The role of adipokines in beta-cell failure of type 2 diabetes. *The Journal of endocrinology* 216:T37-45

Duparc T, Colom A, Cani PD, Massaly N, Rastrelli S, Drougard A, Le Gonidec S, Mouldous L, Frances B, Leclercq I, Llorens-Cortes C, Pospisilik JA, Delzenne NM, Valet P, Castan-Laurell I, Knauf C (2011) Central apelin controls glucose homeostasis via a nitric oxide-dependent pathway in mice. *Antioxidants & redox signaling* 15:1477-1496

Dupasquier CM, Weber AM, Ander BP, Rampersad PP, Steigerwald S, Wigle JT, Mitchell RW, Kroeger EA, Gilchrist JS, Moghadasian MM, Lukas A, Pierce GN (2006) Effects of dietary flaxseed on vascular

contractile function and atherosclerosis during prolonged hypercholesterolemia in rabbits. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 291:H2987-2996

Dupasquier CM, Dibrov E, Kneesh AL, Cheung PK, Lee KG, Alexander HK, Yeganeh BK, Moghadasian MH, Pierce GN (2007) Dietary flaxseed inhibits atherosclerosis in the ldl receptor-deficient mouse in part through antiproliferative and anti-inflammatory actions. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 293:H2394-2402

Ebert T, Bachmann A, Lossner U, Kratzsch J, Bluher M, Stumvoll M, Fasshauer M (2009) Serum levels of angiotensin-related growth factor in diabetes mellitus and chronic hemodialysis. *Metabolism: clinical and experimental* 58:547-551

Ebrahimi M, Ghayour-Mobarhan M, Rezaiean S, Hoseini M, Parizade SM, Farhoudi F, Hosseininezhad SJ, Tavallaei S, Vejdani A, Azimi-Nezhad M, Shakeri MT, Rad MA, Mobarra N, Kazemi-Bajestani SM, Ferns GA (2009) Omega-3 fatty acid supplements improve the cardiovascular risk profile of subjects with metabolic syndrome, including markers of inflammation and auto-immunity. *Acta cardiologica* 64:321-327

El-Mesallamy HO, Hamdy NM, Rizk HH, El-Zayadi AR (2011) Apelin serum level in Egyptian patients with chronic hepatitis c. *Mediators of inflammation* 2011:703031

El Messari S, Iturrioz X, Fassot C, De Mota N, Roesch D, Llorens-Cortes C (2004) Functional dissociation of apelin receptor signaling and endocytosis: Implications for the effects of apelin on arterial blood pressure. *Journal of neurochemistry* 90:1290-1301

El Ouaamari A, Kawamori D, Dirice E, Liew CW, Shadrach JL, Hu J, Katsuta H, Hollister-Lock J, Qian WJ, Wagers AJ, Kulkarni RN (2013) Liver-derived systemic factors drive beta cell hyperplasia in insulin-resistant states. *Cell reports* 3:401-410

Endo M, Masaki T, Seike M, Yoshimatsu H (2007) Tnf-alpha induces hepatic steatosis in mice by enhancing gene expression of sterol regulatory element binding protein-1c (srebp-1c). *Experimental biology and medicine* 232:614-621

Ercin CN, Dogru T, Tapan S, Kara M, Haymana C, Karadurmus N, Karslioglu Y, Acikel C (2010) Plasma apelin levels in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism: clinical and experimental* 59:977-981

Erdem G, Dogru T, Tasci I, Sonmez A, Tapan S (2008) Low plasma apelin levels in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* 116:289-292

Estell JL (2012) The foxo family: Partners in crime or silent heroes. *Endocrinology* 153:549-551

Fabbrini E, Magkos F, Mohammed BS, Pietka T, Abumrad NA, Patterson BW, Okunade A, Klein S (2009) Intrahepatic fat, not visceral fat, is linked with metabolic complications of obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:15430-15435

Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM (1998) Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving tgfbeta, pge2, and paf. *The Journal of clinical investigation* 101:890-898

Fain O (2003) [tnf-alpha inhibitors]. *La Revue du praticien* 53:1989-1990

Falcao-Pires I, Goncalves N, Gavina C, Pinho S, Teixeira T, Moura C, Amorim MJ, Pinho P, Areias JC, Leite-Moreira A (2010) Correlation between plasma levels of apelin and myocardial hypertrophy in rats and humans: Possible target for treatment? *Expert opinion on therapeutic targets* 14:231-241

Falcao-Pires I, Castro-Chaves P, Miranda-Silva D, Lourenco AP, Leite-Moreira AF (2012) Physiological, pathological and potential therapeutic roles of adipokines. *Drug discovery today* 17:880-889

Fan X, Zhou N, Zhang X, Mukhtar M, Lu Z, Fang J, DuBois GC, Pomerantz RJ (2003) Structural and functional study of the apelin-13 peptide, an endogenous ligand of the hiv-1 coreceptor, *apj. Biochemistry* 42:10163-10168

Fernandez-Galilea M, Perez-Matute P, Prieto-Hontoria P, Martinez JA, Moreno-Aliaga MJ (2011) Effects of lipoic acid on apelin in 3t3-l1 adipocytes and in high-fat fed rats. *Journal of physiology and biochemistry* 67:479-486

Ferri S, Sesso A (1981) Ultrastructural study of kupffer cells in teleost liver under normal and experimental conditions. *Cell and tissue research* 220:387-391

Fievet C, Fruchart JC, Staels B (2006) Pparalpha and ppargamma dual agonists for the treatment of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Current opinion in pharmacology* 6:606-614

Figueras M, Oliván M, Busquets S, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM (2011) Effects of eicosapentaenoic acid (epa) treatment on insulin sensitivity in an animal model of diabetes: Improvement of the inflammatory status. *Obesity* 19:362-369

Fisher FM, Chui PC, Antonellis PJ, Bina HA, Kharitonov A, Flier JS, Maratos-Flier E (2010) Obesity is a fibroblast growth factor 21 (fgf21)-resistant state. *Diabetes* 59:2781-2789

Flachs P, Horakova O, Brauner P, Rossmeisl M, Pecina P, Franssen-van Hal N, Ruzickova J, Sponarova J, Drahotka Z, Vlcek C, Keijzer J, Houstek J, Kopecky J (2005) Polyunsaturated fatty acids of marine origin upregulate mitochondrial biogenesis and induce beta-oxidation in white fat. *Diabetologia* 48:2365-2375

Flachs P, Mohamed-Ali V, Horakova O, Rossmeisl M, Hosseinzadeh-Attar MJ, Hensler M, Ruzickova J, Kopecky J (2006) Polyunsaturated fatty acids of marine origin induce adiponectin in mice fed a high-fat diet. *Diabetologia* 49:394-397

Flamment M, Hajduch E, Ferre P, Fougelle F (2012) New insights into er stress-induced insulin resistance. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 23:381-390

Flanagan JN, Linder K, Mejhert N, Dungen E, Wahlen K, Decaunes P, Ryden M, Bjorklund P, Arver S, Bhasin S, Bouloumie A, Arner P, Dahlman I (2009) Role of follistatin in promoting adipogenesis in women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 94:3003-3009

Fogarty S, Hardie DG (2010) Development of protein kinase activators: Ampk as a target in metabolic disorders and cancer. *Biochimica et biophysica acta* 1804:581-591

Foretz M, Hebrard S, Leclerc J, Zarrinpashneh E, Soty M, Mithieux G, Sakamoto K, Andreelli F, Viollet B Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the Ikb1/ampk pathway via a decrease in hepatic energy state. *The Journal of clinical investigation* 120:2355-2369

Foretz M, Guichard C, Ferre P, Fougelle F (1999) Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:12737-12742

- Foufelle F, Hegarty B, Bobard A, Hainault I, Bossard P, Ferre P (2005) [a new role for insulin in the control of energetic metabolism in liver]. *Medecine sciences : M/S* 21:569-571
- Francia P, Salvati A, Balla C, De Paolis P, Pagannone E, Borro M, Gentile G, Simmaco M, De Biase L, Volpe M (2007) Cardiac resynchronization therapy increases plasma levels of the endogenous inotrope apelin. *Eur J Heart Fail* 9:306-309
- Fu S, Yang L, Li P, Hofmann O, Dicker L, Hide W, Lin X, Watkins SM, Ivanov AR, Hotamisligil GS (2011) Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity. *Nature* 473:528-531
- Fu S, Watkins SM, Hotamisligil GS (2012) The role of endoplasmic reticulum in hepatic lipid homeostasis and stress signaling. *Cell metabolism* 15:623-634
- Fujimoto Y, Itabe H, Kinoshita T, Homma KJ, Onoduka J, Mori M, Yamaguchi S, Makita M, Higashi Y, Yamashita A, Takano T (2007) Involvement of acsl in local synthesis of neutral lipids in cytoplasmic lipid droplets in human hepatocyte huh7. *Journal of lipid research* 48:1280-1292
- Fukaya M, Mizuno A, Arai H, Muto K, Uebanso T, Matsuo K, Yamamoto H, Taketani Y, Doi T, Takeda E (2007) Mechanism of rapid-phase insulin response to elevation of portal glucose concentration. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 293:E515-522
- Galgani JE, Moro C, Ravussin E (2008) Metabolic flexibility and insulin resistance. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 295:E1009-1017
- Garcia-Diaz D, Campion J, Milagro FI, Martinez JA (2007) Adiposity dependent apelin gene expression: Relationships with oxidative and inflammation markers. *Molecular and cellular biochemistry* 305:87-94
- Gastaldelli A, Miyazaki Y, Mahankali A, Berria R, Pettiti M, Buzzigoli E, Ferrannini E, DeFronzo RA (2006a) The effect of pioglitazone on the liver: Role of adiponectin. *Diabetes care* 29:2275-2281
- Gastaldelli A, Miyazaki Y, Pettiti M, Santini E, Ciociaro D, DeFronzo RA, Ferrannini E (2006b) The effect of rosiglitazone on the liver: Decreased gluconeogenesis in patients with type 2 diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 91:806-812
- Gavrilova O, Haluzik M, Matsusue K, Cutson JJ, Johnson L, Dietz KR, Nicol CJ, Vinson C, Gonzalez FJ, Reitman ML (2003) Liver peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass. *The Journal of biological chemistry* 278:34268-34276
- Ge X, Chen C, Hui X, Wang Y, Lam KS, Xu A (2011) Fibroblast growth factor 21 induces glucose transporter-1 expression through activation of the serum response factor/ets-like protein-1 in adipocytes. *The Journal of biological chemistry* 286:34533-34541
- Geiger K, Muendlein A, Stark N, Saely CH, Wabitsch M, Fraunberger P, Drexel H (2011) Hypoxia induces apelin expression in human adipocytes. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 43:380-385
- Glassford AJ, Yue P, Sheikh AY, Chun HJ, Zarafshar S, Chan DA, Reaven GM, Quertermous T, Tsao PS (2007) Hif-1 regulates hypoxia- and insulin-induced expression of apelin in adipocytes. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 293:E1590-1596

Gomez-Valades AG, Mendez-Lucas A, Vidal-Alabro A, Blasco FX, Chillon M, Bartrons R, Bermudez J, Perales JC (2008) Pck1 gene silencing in the liver improves glycemia control, insulin sensitivity, and dyslipidemia in db/db mice. *Diabetes* 57:2199-2210

Gonzalez-Periz A, Horrillo R, Ferre N, Gronert K, Dong B, Moran-Salvador E, Titos E, Martinez-Clemente M, Lopez-Parra M, Arroyo V, Claria J (2009) Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by omega-3 fatty acids: A role for resolvins and protectins. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23:1946-1957

Goodpaster BH, He J, Watkins S, Kelley DE (2001) Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: Evidence for a paradox in endurance-trained athletes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 86:5755-5761

Gospodarowicz D (1974) Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3t3 cell growth. *Nature* 249:123-127

Gotoh N, Nagao K, Onoda S, Shirouchi B, Furuya K, Nagai T, Mizobe H, Ichioka K, Watanabe H, Yanagita T, Wada S (2009) Effects of three different highly purified n-3 series highly unsaturated fatty acids on lipid metabolism in c57bl/ksj-db/db mice. *Journal of agricultural and food chemistry* 57:11047-11054

Goudriaan JR, Dahlmans VE, Teusink B, Ouwens DM, Febbraio M, Maassen JA, Romijn JA, Havekes LM, Voshol PJ (2003) Cd36 deficiency increases insulin sensitivity in muscle, but induces insulin resistance in the liver in mice. *Journal of lipid research* 44:2270-2277

Graham TE, Yang Q, Bluher M, Hammarstedt A, Ciaraldi TP, Henry RR, Wason CJ, Oberbach A, Jansson PA, Smith U, Kahn BB (2006) Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *The New England journal of medicine* 354:2552-2563

Grattagliano I, Caraceni P, Calamita G, Ferri D, Gargano I, Palasciano G, Portincasa P (2008) Severe liver steatosis correlates with nitrosative and oxidative stress in rats. *European journal of clinical investigation* 38:523-530

Grattagliano I, de Bari O, Bernardo TC, Oliveira PJ, Wang DQ, Portincasa P (2012) Role of mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease--from origin to propagation. *Clinical biochemistry* 45:610-618

Greco D, Kotronen A, Westerbacka J, Puig O, Arkkila P, Kiviluoto T, Laitinen S, Kolak M, Fisher RM, Hamsten A, Auvinen P, Yki-Jarvinen H (2008) Gene expression in human nafld. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 294:G1281-1287

Grefhorst A, Hoekstra J, Derks TG, Ouwens DM, Baller JF, Havinga R, Havekes LM, Romijn JA, Kuipers F (2005a) Acute hepatic steatosis in mice by blocking beta-oxidation does not reduce insulin sensitivity of very-low-density lipoprotein production. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 289:G592-598

Grefhorst A, van Dijk TH, Hammer A, van der Sluijs FH, Havinga R, Havekes LM, Romijn JA, Groot PH, Reijngoud DJ, Kuipers F (2005b) Differential effects of pharmacological liver x receptor activation on hepatic and peripheral insulin sensitivity in lean and ob/ob mice. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 289:E829-838

Griffin BA (2008) How relevant is the ratio of dietary n-6 to n-3 polyunsaturated fatty acids to cardiovascular disease risk? Evidence from the optilip study. *Current opinion in lipidology* 19:57-62

- Gronn M, Christensen E, Hagve TA, Christophersen BO (1991) Peroxisomal retroconversion of docosahexaenoic acid (22:6(n-3)) to eicosapentaenoic acid (20:5(n-3)) studied in isolated rat liver cells. *Biochimica et biophysica acta* 1081:85-91
- Gulick T, Cresci S, Caira T, Moore DD, Kelly DP (1994) The peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:11012-11016
- Guo L, Li Q, Wang W, Yu P, Pan H, Li P, Sun Y, Zhang J (2009) Apelin inhibits insulin secretion in pancreatic beta-cells by activation of pi3-kinase-phosphodiesterase 3b. *Endocr Res* 34:142-154
- Gupte M, Boustany-Kari CM, Bharadwaj K, Police S, Thatcher S, Gong MC, English VL, Cassis LA (2008) Ace2 is expressed in mouse adipocytes and regulated by a high-fat diet. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 295:R781-788
- Habata Y, Fujii R, Hosoya M, Fukusumi S, Kawamata Y, Hinuma S, Kitada C, Nishizawa N, Murosaki S, Kurokawa T, Onda H, Tatemoto K, Fujino M (1999) Apelin, the natural ligand of the orphan receptor apj, is abundantly secreted in the colostrum. *Biochimica et biophysica acta* 1452:25-35
- Haeusler RA, Accili D (2008) The double life of irs. *Cell metabolism* 8:7-9
- Hainault I, Carolotti M, Hajduch E, Guichard C, Lavau M (1993) Fish oil in a high lard diet prevents obesity, hyperlipemia, and adipocyte insulin resistance in rats. *Annals of the New York Academy of Sciences* 683:98-101
- Hajianfar H, Hosseinzadeh MJ, Bahonar A, Mohammad K, Askari GR, Entezari MH, Keshavarz A, Ansari N (2011) The effect of omega-3 on the serum visfatin concentration in patients with type ii diabetes. *Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences* 16:490-495
- Hajri T, Han XX, Bonen A, Abumrad NA (2002) Defective fatty acid uptake modulates insulin responsiveness and metabolic responses to diet in cd36-null mice. *The Journal of clinical investigation* 109:1381-1389
- Hamilton BS, Paglia D, Kwan AY, Deitel M (1995) Increased obese mrna expression in omental fat cells from massively obese humans. *Nature medicine* 1:953-956
- Han S, Wang G, Qi X, Englander EW, Greeley GH, Jr. (2008) Involvement of a stat3 binding site in inflammation-induced enteric apelin expression. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 295:G1068-1078
- Han XX, Chabowski A, Tandon NN, Calles-Escandon J, Glatz JF, Luiken JJ, Bonen A (2007) Metabolic challenges reveal impaired fatty acid metabolism and translocation of fat/cd36 but not fabppm in obese zucker rat muscle. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 293:E566-575
- Hansen J, Brandt C, Nielsen AR, Hojman P, Whitham M, Febbraio MA, Pedersen BK, Plomgaard P (2011) Exercise induces a marked increase in plasma follistatin: Evidence that follistatin is a contraction-induced hepatokine. *Endocrinology* 152:164-171
- Hansen J, Rinnov A, Krogh-Madsen R, Fischer CP, Andreasen AS, Berg RM, Moller K, Pedersen BK, Plomgaard P (2013) Plasma follistatin is elevated in patients with type 2 diabetes: Relationship to hyperglycemia, hyperinsulinemia, and systemic low-grade inflammation. *Diabetes/metabolism research and reviews*

Hara H, Uchida S, Yoshimura H, Aoki M, Toyoda Y, Sakai Y, Morimoto S, Fukamachi H, Shiokawa K, Hanada K (2000) Isolation and characterization of a novel liver-specific gene, hepassocin, upregulated during liver regeneration. *Biochimica et biophysica acta* 1492:31-44

Harano Y, Kosugi K, Kashiwagi A, Nakano T, Hidaka H, Shigeta Y (1982) Regulatory mechanism of ketogenesis by glucagon and insulin in isolated and cultured hepatocytes. *Journal of biochemistry* 91:1739-1748

Hardie DG, Carling D (1997) The amp-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? *European journal of biochemistry / FEBS* 246:259-273

Hashimoto T, Cook WS, Qi C, Yeldandi AV, Reddy JK, Rao MS (2000) Defect in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-inducible fatty acid oxidation determines the severity of hepatic steatosis in response to fasting. *The Journal of biological chemistry* 275:28918-28928

Hashimoto T, Kihara M, Ishida J, Imai N, Yoshida S, Toya Y, Fukamizu A, Kitamura H, Umemura S (2006) Apelin stimulates myosin light chain phosphorylation in vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26:1267-1272

Hashimoto T, Kihara M, Imai N, Yoshida S, Shimoyamada H, Yasuzaki H, Ishida J, Toya Y, Kiuchi Y, Hirawa N, Tamura K, Yazawa T, Kitamura H, Fukamizu A, Umemura S (2007) Requirement of apelin-apelin receptor system for oxidative stress-linked atherosclerosis. *The American journal of pathology* 171:1705-1712

Haugen F, Zahid N, Dalen KT, Hollung K, Nebb HI, Drevon CA (2005) Resistin expression in 3t3-l1 adipocytes is reduced by arachidonic acid. *Journal of lipid research* 46:143-153

He S, McPhaul C, Li JZ, Garuti R, Kinch L, Grishin NV, Cohen JC, Hobbs HH (2010) A sequence variation (i148m) in pnpla3 associated with nonalcoholic fatty liver disease disrupts triglyceride hydrolysis. *The Journal of biological chemistry* 285:6706-6715

Heinonen MV, Laaksonen DE, Karhu T, Karhunen L, Laitinen T, Kainulainen S, Rissanen A, Niskanen L, Herzig KH (2009) Effect of diet-induced weight loss on plasma apelin and cytokine levels in individuals with the metabolic syndrome. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 19:626-633

Heinrichsdorff J, Olefsky JM (2012) Fetuin-a: The missing link in lipid-induced inflammation. *Nature medicine* 18:1182-1183

Hennige AM, Staiger H, Wicke C, Machicao F, Fritsche A, Haring HU, Stefan N (2008) Fetuin-a induces cytokine expression and suppresses adiponectin production. *PloS one* 3:e1765

Herrera BM, Keildson S, Lindgren CM (2011) Genetics and epigenetics of obesity. *Maturitas* 69:41-49

Herzig S, Long F, Jhala US, Hedrick S, Quinn R, Bauer A, Rudolph D, Schutz G, Yoon C, Puigserver P, Spiegelman B, Montminy M (2001) Creb regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator pgc-1. *Nature* 413:179-183

Hessvik NP, Bakke SS, Fredriksson K, Boekschoten MV, Fjorckenstad A, Koster G, Hesselink MK, Kersten S, Kase ET, Rustan AC, Thoresen GH (2010) Metabolic switching of human myotubes is improved by n-3 fatty acids. *Journal of lipid research* 51:2090-2104

Higuchi K, Masaki T, Gotoh K, Chiba S, Katsuragi I, Tanaka K, Kakuma T, Yoshimatsu H (2007) Apelin, an apj receptor ligand, regulates body adiposity and favors the messenger ribonucleic acid expression of uncoupling proteins in mice. *Endocrinology* 148:2690-2697

Hijmans BS, Grefhorst A, Oosterveer MH, Groen AK (2013) Zonation of glucose and fatty acid metabolism in the liver: Mechanism and metabolic consequences. *Biochimie*

Holland WL, Summers SA (2008) Sphingolipids, insulin resistance, and metabolic disease: New insights from in vivo manipulation of sphingolipid metabolism. *Endocrine reviews* 29:381-402

Holst JJ (2007) The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiological reviews* 87:1409-1439

Hondares E, Rosell M, Gonzalez FJ, Giralt M, Iglesias R, Villarroya F (2010) Hepatic fgf21 expression is induced at birth via pparalpha in response to milk intake and contributes to thermogenic activation of neonatal brown fat. *Cell metabolism* 11:206-212

Horakova O, Medrikova D, van Schothorst EM, Bunschoten A, Flachs P, Kus V, Kuda O, Bardova K, Janovska P, Hensler M, Rossmeisl M, Wang-Sattler R, Prehn C, Adamski J, Illig T, Keijer J, Kopecky J (2012) Preservation of metabolic flexibility in skeletal muscle by a combined use of n-3 pufa and rosiglitazone in dietary obese mice. *PloS one* 7:e43764

Horie S, Ishii H, Suga T (1981) Changes in peroxisomal fatty acid oxidation in the diabetic rat liver. *Journal of biochemistry* 90:1691-1696

Horton JD, Bashmakov Y, Shimomura I, Shimano H (1998) Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and re-fed mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:5987-5992

Horton JD, Goldstein JL, Brown MS (2002) Srebps: Activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *The Journal of clinical investigation* 109:1125-1131

Hosoya M, Kawamata Y, Fukusumi S, Fujii R, Habata Y, Hinuma S, Kitada C, Honda S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M (2000) Molecular and functional characteristics of apj. Tissue distribution of mrna and interaction with the endogenous ligand apelin. *The Journal of biological chemistry* 275:21061-21067

Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM (1993) Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: Direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259:87-91

Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, Spiegelman BM (1994) Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:4854-4858

Hotamisligil GS (2005) Role of endoplasmic reticulum stress and c-jun nh2-terminal kinase pathways in inflammation and origin of obesity and diabetes. *Diabetes* 54 Suppl 2:S73-78

Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, Nishida M, Kihara S, Sakai N, Nakajima T, Hasegawa K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Hanafusa T, Matsuzawa Y (2000) Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 20:1595-1599

Houck KA, Borchert KM, Hepler CD, Thomas JS, Bramlett KS, Michael LF, Burris TP (2004) T0901317 is a dual lxr/fxr agonist. *Molecular genetics and metabolism* 83:184-187

Howell JJ, Manning BD (2011) Mtor couples cellular nutrient sensing to organismal metabolic homeostasis. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 22:94-102

Hua X, Wu J, Goldstein JL, Brown MS, Hobbs HH (1995) Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein-1 (srebf1) and localization of srebf1 and srebf2 to chromosomes 17p11.2 and 22q13. *Genomics* 25:667-673

Huang F, Wei H, Luo H, Jiang S, Peng J (2011) Epa inhibits the inhibitor of kappaalpha (ikappaalpha)/nf-kappaab/muscle ring finger 1 pathway in c2c12 myotubes in a ppargamma-dependent manner. *The British journal of nutrition* 105:348-356

Huang W, Metlakunta A, Dedousis N, Zhang P, Sipula I, Dube JJ, Scott DK, O'Doherty RM (2010) Depletion of liver kupffer cells prevents the development of diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *Diabetes* 59:347-357

Hue L, Taegtmeier H (2009) The randle cycle revisited: A new head for an old hat. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 297:E578-591

Huffman KM, Shah SH, Stevens RD, Bain JR, Muehlbauer M, Slentz CA, Tanner CJ, Kuchibhatla M, Houmard JA, Newgard CB, Kraus WE (2009) Relationships between circulating metabolic intermediates and insulin action in overweight to obese, inactive men and women. *Diabetes care* 32:1678-1683

Hugo ER, Brandebourg TD, Woo JG, Loftus J, Alexander JW, Ben-Jonathan N (2008) Bisphenol a at environmentally relevant doses inhibits adiponectin release from human adipose tissue explants and adipocytes. *Environmental health perspectives* 116:1642-1647

Hwang DH, Carroll AE (1980) Decreased formation of prostaglandins derived from arachidonic acid by dietary linolenate in rats. *The American journal of clinical nutrition* 33:590-597

Hylemon PB, Zhou H, Pandak WM, Ren S, Gil G, Dent P (2009) Bile acids as regulatory molecules. *Journal of lipid research* 50:1509-1520

Inagaki T, Dutchak P, Zhao G, Ding X, Gautron L, Parameswara V, Li Y, Goetz R, Mohammadi M, Esser V, Elmquist JK, Gerard RD, Burgess SC, Hammer RE, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA (2007) Endocrine regulation of the fasting response by pparalpha-mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell metabolism* 5:415-425

Indumathi D, Jayashree S, Selvaraj J, Sathish S, Mayilvanan C, Akilavalli N, Balasubramanian K (2013) Effect of bisphenol-a on insulin signal transduction and glucose oxidation in skeletal muscle of adult male albino rat. *Human & experimental toxicology* 32:960-971

Inui Y, Kawata S, Matsuzawa Y, Tokunaga K, Fujioka S, Tamura S, Kobatake T, Keno Y, Odaka H, Matsuo T, et al. (1990) Inhibitory effect of a new alpha-glucosidase inhibitor on fatty liver in Zucker fatty rats. *Journal of hepatology* 10:62-68

Iozzo P, Bucci M, Roivainen A, Nagren K, Jarvisalo MJ, Kiss J, Guiducci L, Fielding B, Naum AG, Borra R, Virtanen K, Savunen T, Salvadori PA, Ferrannini E, Knuuti J, Nuutila P (2010) Fatty acid metabolism in the liver, measured by positron emission tomography, is increased in obese individuals. *Gastroenterology* 139:846-856, 856 e841-846

Ishida J, Hashimoto T, Hashimoto Y, Nishiwaki S, Iguchi T, Harada S, Sugaya T, Matsuzaki H, Yamamoto R, Shiota N, Okunishi H, Kihara M, Umemura S, Sugiyama F, Yagami K, Kasuya Y, Mochizuki N, Fukamizu A (2004) Regulatory roles for apj, a seven-transmembrane receptor related to angiotensin-type 1 receptor in blood pressure in vivo. *The Journal of biological chemistry* 279:26274-26279

Itoh M, Suganami T, Satoh N, Tanimoto-Koyama K, Yuan X, Tanaka M, Kawano H, Yano T, Aoe S, Takeya M, Shimatsu A, Kuzuya H, Kamei Y, Ogawa Y (2007) Increased adiponectin secretion by highly purified eicosapentaenoic acid in rodent models of obesity and human obese subjects. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27:1918-1925

Iwanaga Y, Kihara Y, Takenaka H, Kita T (2006) Down-regulation of cardiac apelin system in hypertrophied and failing hearts: Possible role of angiotensin ii-angiotensin type 1 receptor system. *Journal of molecular and cellular cardiology* 41:798-806

Ix JH, Biggs ML, Mukamal KJ, Kizer JR, Zieman SJ, Siscovick DS, Mozaffarian D, Jensen MK, Nelson L, Ruderman N, Djousse L (2012) Association of fetuin-a with incident diabetes mellitus in community-living older adults: The cardiovascular health study. *Circulation* 125:2316-2322

Iynedjian PB, Jotterand D, Nospikel T, Asfari M, Pilot PR (1989) Transcriptional induction of glucokinase gene by insulin in cultured liver cells and its repression by the glucagon-camp system. *The Journal of biological chemistry* 264:21824-21829

Japp AG, Cruden NL, Amer DA, Li VK, Goudie EB, Johnston NR, Sharma S, Neilson I, Webb DJ, Megson IL, Flapan AD, Newby DE (2008a) Vascular effects of apelin in vivo in man. *Journal of the American College of Cardiology* 52:908-913

Japp AG, Newby DE (2008b) The apelin-apj system in heart failure: Pathophysiologic relevance and therapeutic potential. *Biochemical pharmacology* 75:1882-1892

Japp AG, Cruden NL, Barnes G, van Gemeren N, Mathews J, Adamson J, Johnston NR, Denvir MA, Megson IL, Flapan AD, Newby DE (2010) Acute cardiovascular effects of apelin in humans: Potential role in patients with chronic heart failure. *Circulation* 121:1818-1827

Jayashree S, Indumathi D, Akilavalli N, Sathish S, Selvaraj J, Balasubramanian K (2013) Effect of bisphenol-a on insulin signal transduction and glucose oxidation in liver of adult male albino rat. *Environmental toxicology and pharmacology* 35:300-310

Jiang H, Ye XP, Yang ZY, Zhan M, Wang HN, Cao HM, Xie HJ, Pan CM, Song HD, Zhao SX (2013) Aldosterone directly affects apelin expression and secretion in adipocytes. *Journal of molecular endocrinology* 51:37-48

Jonker JT, Wang Y, de Haan W, Diamant M, Rijzewijk LJ, van der Meer RW, Lamb HJ, Tamsma JT, de Roos A, Romijn JA, Rensen PC, Smit JW (2010) Pioglitazone decreases plasma cholesteryl ester transfer protein mass, associated with a decrease in hepatic triglyceride content, in patients with type 2 diabetes. *Diabetes care* 33:1625-1628

Jornayvaz FR, Shulman GI (2012) Diacylglycerol activation of protein kinase cepsilon and hepatic insulin resistance. *Cell metabolism* 15:574-584

Juan H, Sametz W (1986) Vasoconstriction induced by noradrenaline and angiotensin ii is antagonized by eicosapentaenoic acid independent of formation of trienoic eicosanoids. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 332:288-292

Juarez-Lopez C, Klunder-Klunder M, Madrigal-Azcarate A, Flores-Huerta S (2013) Omega-3 polyunsaturated fatty acids reduce insulin resistance and triglycerides in obese children and adolescents. *Pediatric diabetes* 14:377-383

Jucker BM, Cline GW, Barucci N, Shulman GI (1999) Differential effects of safflower oil versus fish oil feeding on insulin-stimulated glycogen synthesis, glycolysis, and pyruvate dehydrogenase flux in skeletal muscle: A ¹³C nuclear magnetic resonance study. *Diabetes* 48:134-140

Jump DB (2008) N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *Current opinion in lipidology* 19:242-247

Kabir M, Skurnik G, Naour N, Pechtner V, Meugnier E, Rome S, Quignard-Boulangé A, Vidal H, Slama G, Clement K, Guerre-Millo M, Rizkalla SW (2007) Treatment for 2 mo with n 3 polyunsaturated fatty acids reduces adiposity and some atherogenic factors but does not improve insulin sensitivity in women with type 2 diabetes: A randomized controlled study. *The American journal of clinical nutrition* 86:1670-1679

Kalupahana NS, Claycombe K, Newman SJ, Stewart T, Siriwardhana N, Matthan N, Lichtenstein AH, Moustaid-Moussa N (2010) Eicosapentaenoic acid prevents and reverses insulin resistance in high-fat diet-induced obese mice via modulation of adipose tissue inflammation. *The Journal of nutrition* 140:1915-1922

Kamagate A, Dong HH (2008a) Foxo1 integrates insulin signaling to vldl production. *Cell cycle* 7:3162-3170

Kamagate A, Qu S, Perdomo G, Su D, Kim DH, Slusher S, Meseck M, Dong HH (2008b) Foxo1 mediates insulin-dependent regulation of hepatic vldl production in mice. *The Journal of clinical investigation* 118:2347-2364

Kanai M, Raz A, Goodman DS (1968) Retinol-binding protein: The transport protein for vitamin a in human plasma. *The Journal of clinical investigation* 47:2025-2044

Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K, Kasuga M (2006) Mcp-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *The Journal of clinical investigation* 116:1494-1505

Kang Y, Kim J, Anderson JP, Wu J, Gleim SR, Kundu RK, McLean DL, Kim JD, Park H, Jin SW, Hwa J, Quertermous T, Chun HJ (2013) Apelin-apj signaling is a critical regulator of endothelial mef2 activation in cardiovascular development. *Circulation research* 113:22-31

Kapoor R, Huang YS (2006) Gamma linolenic acid: An antiinflammatory omega-6 fatty acid. *Current pharmaceutical biotechnology* 7:531-534

Karsenty J, Landrier JF, Rousseau-Ralliard D, Robbez-Masson V, Margotat A, Deprez P, Lechene P, Grynberg A, Lairon D, Planells R, Gastaldi M (2012) Beneficial effects of omega-3 fatty acids on the consequences of a fructose diet are not mediated by ppar delta or pgc1 alpha. *European journal of nutrition*

Kasai A, Shintani N, Oda M, Kakuda M, Hashimoto H, Matsuda T, Hinuma S, Baba A (2004) Apelin is a novel angiogenic factor in retinal endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* 325:395-400

Kasbi Chadli F, Andre A, Prieur X, Loirand G, Meynier A, Krempf M, Nguyen P, Ouguerram K (2011) N-3 pufa prevent metabolic disturbances associated with obesity and improve endothelial function in golden syrian hamsters fed with a high-fat diet. *The British journal of nutrition*:1-11

Katz NR (1992) Metabolic heterogeneity of hepatocytes across the liver acinus. *The Journal of nutrition* 122:843-849

Kaur G, Cameron-Smith D, Garg M, Sinclair AJ (2011) Docosapentaenoic acid (22:5n-3): A review of its biological effects. *Progress in lipid research* 50:28-34

- Kawaguchi T, Osatomi K, Yamashita H, Kabashima T, Uyeda K (2002) Mechanism for fatty acid "sparing" effect on glucose-induced transcription: Regulation of carbohydrate-responsive element-binding protein by amp-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry* 277:3829-3835
- Kawamata Y, Habata Y, Fukusumi S, Hosoya M, Fujii R, Hinuma S, Nishizawa N, Kitada C, Onda H, Nishimura O, Fujino M (2001) Molecular properties of apelin: Tissue distribution and receptor binding. *Biochimica et biophysica acta* 1538:162-171
- Kelley DE, Goodpaster B, Wing RR, Simoneau JA (1999) Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. *The American journal of physiology* 277:E1130-1141
- Kelley DE, He J, Menshikova EV, Ritov VB (2002) Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* 51:2944-2950
- Kermode-Scott B (2012) Meta-analysis confirms raised risk of bladder cancer from pioglitazone. *Bmj* 345:e4541
- Kern M, Kloting N, Niessen HG, Thomas L, Stiller D, Mark M, Klein T, Bluher M (2012) Linagliptin improves insulin sensitivity and hepatic steatosis in diet-induced obesity. *PloS one* 7:e38744
- Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *The Journal of clinical investigation* 103:1489-1498
- Kharitonov A, Shiyanova TL, Koester A, Ford AM, Micanovic R, Galbreath EJ, Sandusky GE, Hammond LJ, Moyers JS, Owens RA, Gromada J, Brozinick JT, Hawkins ED, Wroblewski VJ, Li DS, Mehrbod F, Jaskunas SR, Shanafelt AB (2005) Fgf-21 as a novel metabolic regulator. *The Journal of clinical investigation* 115:1627-1635
- Kihara Y, Ogami Y, Tabaru A, Unoki H, Otsuki M (1997) Safe and effective treatment of diabetes mellitus associated with chronic liver diseases with an alpha-glucosidase inhibitor, acarbose. *Journal of gastroenterology* 32:777-782
- Kiki I, Altunkaynak BZ, Altunkaynak ME, Vuraler O, Unal D, Kaplan S (2007) Effect of high fat diet on the volume of liver and quantitative feature of kupffer cells in the female rat: A stereological and ultrastructural study. *Obesity surgery* 17:1381-1388
- Kim JY, Hickner RC, Cortright RL, Dohm GL, Houmard JA (2000) Lipid oxidation is reduced in obese human skeletal muscle. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 279:E1039-1044
- Kim KH, Lopez-Casillas F, Bai DH, Luo X, Pape ME (1989) Role of reversible phosphorylation of acetyl-coa carboxylase in long-chain fatty acid synthesis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 3:2250-2256
- Kim TH, Kim H, Park JM, Im SS, Bae JS, Kim MY, Yoon HG, Cha JY, Kim KS, Ahn YH (2009) Interrelationship between liver x receptor alpha, sterol regulatory element-binding protein-1c, peroxisome proliferator-activated receptor gamma, and small heterodimer partner in the transcriptional regulation of glucokinase gene expression in liver. *The Journal of biological chemistry* 284:15071-15083
- Kim YD, Park KG, Lee YS, Park YY, Kim DK, Nedumaran B, Jang WG, Cho WJ, Ha J, Lee IK, Lee CH, Choi HS (2008) Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis through amp-activated protein kinase-dependent regulation of the orphan nuclear receptor shp. *Diabetes* 57:306-314

- Kita Y, Takamura T, Misu H, Ota T, Kurita S, Takeshita Y, Uno M, Matsuzawa-Nagata N, Kato K, Ando H, Fujimura A, Hayashi K, Kimura T, Ni Y, Otoda T, Miyamoto K, Zen Y, Nakanuma Y, Kaneko S (2012) Metformin prevents and reverses inflammation in a non-diabetic mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. *PloS one* 7:e43056
- Kitazawa M, Ohizumi Y, Oike Y, Hishinuma T, Hashimoto S (2007) Angiopoietin-related growth factor suppresses gluconeogenesis through the akt/forkhead box class o1-dependent pathway in hepatocytes. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 323:787-793
- Kleinz MJ, Davenport AP (2005a) Emerging roles of apelin in biology and medicine. *Pharmacology & therapeutics* 107:198-211
- Kleinz MJ, Skepper JN, Davenport AP (2005b) Immunocytochemical localisation of the apelin receptor, apj, to human cardiomyocytes, vascular smooth muscle and endothelial cells. *Regulatory peptides* 126:233-240
- Koek GH, Liedorp PR, Bast A (2011) The role of oxidative stress in non-alcoholic steatohepatitis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 412:1297-1305
- Koishi R, Ando Y, Ono M, Shimamura M, Yasumo H, Fujiwara T, Horikoshi H, Furukawa H (2002) Angptl3 regulates lipid metabolism in mice. *Nature genetics* 30:151-157
- Koliaki C, Roden M (2013) Hepatic energy metabolism in human diabetes mellitus, obesity and non-alcoholic fatty liver disease. *Molecular and cellular endocrinology*
- Koonen DP, Jacobs RL, Febbraio M, Young ME, Soltys CL, Ong H, Vance DE, Dyck JR (2007) Increased hepatic cd36 expression contributes to dyslipidemia associated with diet-induced obesity. *Diabetes* 56:2863-2871
- Koonen DP, Jensen MK, Handberg A (2011) Soluble cd36- a marker of the (pathophysiological) role of cd36 in the metabolic syndrome? *Archives of physiology and biochemistry* 117:57-63
- Kostadinova R, Montagner A, Gouranton E, Fleury S, Guillou H, Dombrowicz D, Desreumaux P, Wahli W (2012) Gw501516-activated pparbeta/delta promotes liver fibrosis via p38-jnk mapk-induced hepatic stellate cell proliferation. *Cell & bioscience* 2:34
- Koster A, Chao YB, Mosior M, Ford A, Gonzalez-DeWhitt PA, Hale JE, Li D, Qiu Y, Fraser CC, Yang DD, Heuer JG, Jaskunas SR, Eacho P (2005) Transgenic angiopoietin-like (angptl)4 overexpression and targeted disruption of angptl4 and angptl3: Regulation of triglyceride metabolism. *Endocrinology* 146:4943-4950
- Kostiuk MA, Keller BO, Berthiaume LG (2010) Palmitoylation of ketogenic enzyme hmgcs2 enhances its interaction with pparalpha and transcription at the hmgcs2 ppre. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24:1914-1924
- Koves TR, Ussher JR, Noland RC, Slentz D, Mosedale M, Ilkayeva O, Bain J, Stevens R, Dyck JR, Newgard CB, Lopaschuk GD, Muoio DM (2008) Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell metabolism* 7:45-56
- Krebs JD, Browning LM, McLean NK, Rothwell JL, Mishra GD, Moore CS, Jebb SA (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. *International journal of obesity* 30:1535-1544

- Krey G, Braissant O, L'Horsset F, Kalkhoven E, Perroud M, Parker MG, Wahli W (1997) Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Molecular endocrinology* 11:779-791
- Krist J, Wieder K, Klotting N, Oberbach A, Kralisch S, Wiesner T, Schon MR, Gartner D, Dietrich A, Shang E, Lohmann T, Dressler M, Fasshauer M, Stumvoll M, Bluher M (2013) Effects of weight loss and exercise on apelin serum concentrations and adipose tissue expression in human obesity. *Obesity facts* 6:57-69
- Krssak M, Brehm A, Bernroider E, Anderwald C, Nowotny P, Dalla Man C, Cobelli C, Cline GW, Shulman GI, Waldhausl W, Roden M (2004) Alterations in postprandial hepatic glycogen metabolism in type 2 diabetes. *Diabetes* 53:3048-3056
- Kubota N, Kubota T, Itoh S, Kumagai H, Kozono H, Takamoto I, Mineyama T, Ogata H, Tokuyama K, Ohsugi M, Sasako T, Moroi M, Sugi K, Kakuta S, Iwakura Y, Noda T, Ohnishi S, Nagai R, Tobe K, Terauchi Y, Ueki K, Kadowaki T (2008) Dynamic functional relay between insulin receptor substrate 1 and 2 in hepatic insulin signaling during fasting and feeding. *Cell metabolism* 8:49-64
- Kuda O, Jelenik T, Jilkova Z, Flachs P, Rossmeisl M, Hensler M, Kazdova L, Ogston N, Baranowski M, Gorski J, Janovska P, Kus V, Polak J, Mohamed-Ali V, Burcelin R, Cinti S, Bryhn M, Kopecky J (2009) N-3 fatty acids and rosiglitazone improve insulin sensitivity through additive stimulatory effects on muscle glycogen synthesis in mice fed a high-fat diet. *Diabetologia* 52:941-951
- Kumar KV, Das UN (1997) Effect of cis-unsaturated fatty acids, prostaglandins, and free radicals on angiotensin-converting enzyme activity in vitro. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine* 214:374-379
- Kumashiro N, Erion DM, Zhang D, Kahn M, Beddow SA, Chu X, Still CD, Gerhard GS, Han X, Dziura J, Petersen KF, Samuel VT, Shulman GI (2011) Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:16381-16385
- Ladeiras-Lopes R, Ferreira-Martins J, Leite-Moreira AF (2008) The apelinergic system: The role played in human physiology and pathology and potential therapeutic applications. *Arquivos brasileiros de cardiologia* 90:343-349
- Lambrecht NW, Yakubov I, Zer C, Sachs G (2006) Transcriptomes of purified gastric ecl and parietal cells: Identification of a novel pathway regulating acid secretion. *Physiological genomics* 25:153-165
- Landau BR, Wahren J, Chandramouli V, Schumann WC, Ekberg K, Kalhan SC (1996) Contributions of gluconeogenesis to glucose production in the fasted state. *The Journal of clinical investigation* 98:378-385
- Lang CH, Dobrescu C, Bagby GJ (1992) Tumor necrosis factor impairs insulin action on peripheral glucose disposal and hepatic glucose output. *Endocrinology* 130:43-52
- Lang IA, Galloway TS, Scarlett A, Henley WE, Depledge M, Wallace RB, Melzer D (2008) Association of urinary bisphenol a concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 300:1303-1310
- Lanthier N, Molendi-Coste O, Horsmans Y, van Rooijen N, Cani PD, Leclercq IA (2010) Kupffer cell activation is a causal factor for hepatic insulin resistance. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 298:G107-116
- Larance M, Ramm G, James DE (2008) The glut4 code. *Molecular endocrinology* 22:226-233

- Latruffe N, Vamecq J (1997) Peroxisome proliferators and peroxisome proliferator activated receptors (ppars) as regulators of lipid metabolism. *Biochimie* 79:81-94
- Le Roy T, Llopis M, Lepage P, Bruneau A, Rabot S, Bevilacqua C, Martin P, Philippe C, Walker F, Bado A, Perlemuter G, Cassard-Doulcier AM, Gerard P (2012) Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Gut*
- LeBrasseur NK, Kelly M, Tsao TS, Farmer SR, Saha AK, Ruderman NB, Tomas E (2006) Thiazolidinediones can rapidly activate amp-activated protein kinase in mammalian tissues. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 291:E175-181
- Lee AH, Scapa EF, Cohen DE, Glimcher LH (2008) Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor xbp1. *Science* 320:1492-1496
- Lee CH, Olson P, Hevener A, Mehl I, Chong LW, Olefsky JM, Gonzalez FJ, Ham J, Kang H, Peters JM, Evans RM (2006a) Ppardelta regulates glucose metabolism and insulin sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:3444-3449
- Lee DH, Lee IK, Song K, Steffes M, Toscano W, Baker BA, Jacobs DR, Jr. (2006b) A strong dose-response relation between serum concentrations of persistent organic pollutants and diabetes: Results from the national health and examination survey 1999-2002. *Diabetes care* 29:1638-1644
- Lee DK, Cheng R, Nguyen T, Fan T, Kariyawasam AP, Liu Y, Osmond DH, George SR, O'Dowd BF (2000) Characterization of apelin, the ligand for the apj receptor. *Journal of neurochemistry* 74:34-41
- Lee DK, Lanca AJ, Cheng R, Nguyen T, Ji XD, Gobeil F, Jr., Chemtob S, George SR, O'Dowd BF (2004) Agonist-independent nuclear localization of the apelin, angiotensin at1, and bradykinin b2 receptors. *The Journal of biological chemistry* 279:7901-7908
- Lee DK, Saldivia VR, Nguyen T, Cheng R, George SR, O'Dowd BF (2005) Modification of the terminal residue of apelin-13 antagonizes its hypotensive action. *Endocrinology* 146:231-236
- Lee DK, Ferguson SS, George SR, O'Dowd BF (2010) The fate of the internalized apelin receptor is determined by different isoforms of apelin mediating differential interaction with beta-arrestin. *Biochemical and biophysical research communications* 395:185-189
- Lee MS, Kim IH, Kim Y (2013) Effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on uncoupling protein 3 gene expression in c(2)c(12) muscle cells. *Nutrients* 5:1660-1671
- Lee SJ, McPherron AC (2001) Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:9306-9311
- Lee UE, Friedman SL (2011) Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best practice & research Clinical gastroenterology* 25:195-206
- Leeper NJ, Tedesco MM, Kojima Y, Schultz GM, Kundu RK, Ashley EA, Tsao PS, Dalman RL, Quertermous T (2009) Apelin prevents aortic aneurysm formation by inhibiting macrophage inflammation. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 296:H1329-1335
- Lefebvre P, Cariou B, Lien F, Kuipers F, Staels B (2009) Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiological reviews* 89:147-191
- Lefils-Lacourtblaise J, Socorro M, Geloan A, Daira P, Debard C, Loizon E, Guichardant M, Dominguez Z, Vidal H, Lagarde M, Bernoud-Hubac N (2013) The eicosapentaenoic acid metabolite 15-deoxy-

delta(12,14)-prostaglandin j3 increases adiponectin secretion by adipocytes partly via a ppargamma-dependent mechanism. *PloS one* 8:e63997

Lefils J, Geloën A, Vidal H, Lagarde M, Bernoud-Hubac N (2010) Dietary dha: Time course of tissue uptake and effects on cytokine secretion in mice. *The British journal of nutrition* 104:1304-1312

Lehmann JM, Kliewer SA, Moore LB, Smith-Oliver TA, Oliver BB, Su JL, Sundseth SS, Winegar DA, Blanchard DE, Spencer TA, Willson TM (1997) Activation of the nuclear receptor lxr by oxysterols defines a new hormone response pathway. *The Journal of biological chemistry* 272:3137-3140

Levene AP, Goldin RD (2012) The epidemiology, pathogenesis and histopathology of fatty liver disease. *Histopathology* 61:141-152

Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI (2005) Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:11070-11075

Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI (2006) Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444:1022-1023

Li AC, Glass CK (2004) Ppar- and lxr-dependent pathways controlling lipid metabolism and the development of atherosclerosis. *Journal of lipid research* 45:2161-2173

Li DK, Zhou Z, Miao M, He Y, Wang J, Ferber J, Herrinton LJ, Gao E, Yuan W (2011a) Urine bisphenol-a (bpa) level in relation to semen quality. *Fertility and sterility* 95:625-630 e621-624

Li L, Yang G, Li Q, Tang Y, Yang M, Yang H, Li K (2006) Changes and relations of circulating visfatin, apelin, and resistin levels in normal, impaired glucose tolerance, and type 2 diabetic subjects. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* 114:544-548

Li S, Brown MS, Goldstein JL (2010) Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: Mtorc1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:3441-3446

Li T, Chiang JY (2012) Bile acid signaling in liver metabolism and diseases. *Journal of lipids* 2012:754067

Li Y, Xu S, Mihaylova MM, Zheng B, Hou X, Jiang B, Park O, Luo Z, Lefai E, Shyy JY, Gao B, Wierzbicki M, Verbeuren TJ, Shaw RJ, Cohen RA, Zang M (2011b) Ampk phosphorylates and inhibits srebp activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. *Cell metabolism* 13:376-388

Liang G, Yang J, Horton JD, Hammer RE, Goldstein JL, Brown MS (2002) Diminished hepatic response to fasting/refeeding and liver x receptor agonists in mice with selective deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c. *The Journal of biological chemistry* 277:9520-9528

Liao W, Hui TY, Young SG, Davis RA (2003) Blocking microsomal triglyceride transfer protein interferes with apob secretion without causing retention or stress in the er. *Journal of lipid research* 44:978-985

Lieber CS, Leo MA, Mak KM, Xu Y, Cao Q, Ren C, Ponomarenko A, DeCarli LM (2004) Acarbose attenuates experimental non-alcoholic steatohepatitis. *Biochemical and biophysical research communications* 315:699-703

- Lihn AS, Jessen N, Pedersen SB, Lund S, Richelsen B (2004) Aicar stimulates adiponectin and inhibits cytokines in adipose tissue. *Biochemical and biophysical research communications* 316:853-858
- Lin HZ, Yang SQ, Chuckaree C, Kuhajda F, Ronnet G, Diehl AM (2000) Metformin reverses fatty liver disease in obese, leptin-deficient mice. *Nature medicine* 6:998-1003
- Lin X, Braymer HD, Bray GA, York DA (1998) Differential expression of insulin receptor tyrosine kinase inhibitor (fetuin) gene in a model of diet-induced obesity. *Life sciences* 63:145-153
- Liu X, Xue Y, Liu C, Lou Q, Wang J, Yanagita T, Xue C, Wang Y (2013) Eicosapentaenoic acid-enriched phospholipid ameliorates insulin resistance and lipid metabolism in diet-induced-obese mice. *Lipids in health and disease* 12:109
- Liu XJ, Yang C, Gupta N, Zuo J, Chang YS, Fang FD (2007) Protein kinase c-zeta regulation of glut4 translocation through actin remodeling in cho cells. *Journal of molecular medicine* 85:851-861
- Lochhead PA, Salt IP, Walker KS, Hardie DG, Sutherland C (2000) 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes pepck and glucose-6-phosphatase. *Diabetes* 49:896-903
- Lodhi IJ, Wei X, Semenkovich CF (2011) Lipoexpediency: De novo lipogenesis as a metabolic signal transmitter. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 22:1-8
- Lonardo A, Bellentani S, Ratziu V, Loria P (2011) Insulin resistance in nonalcoholic steatohepatitis: Necessary but not sufficient - death of a dogma from analysis of therapeutic studies? *Expert review of gastroenterology & hepatology* 5:279-289
- Longuet C, Robledo AM, Dean ED, Dai C, Ali S, McGuinness I, de Chavez V, Vuguin PM, Charron MJ, Powers AC, Drucker DJ (2013) Liver-specific disruption of the murine glucagon receptor produces alpha-cell hyperplasia: Evidence for a circulating alpha-cell growth factor. *Diabetes* 62:1196-1205
- Loot AE, Fleming I (2013) A novel apj signaling cascade that regulates cardiovascular development. *Circulation research* 113:4-6
- Lorente-Cebrian S, Bustos M, Marti A, Martinez JA, Moreno-Aliaga MJ (2009) Eicosapentaenoic acid stimulates amp-activated protein kinase and increases visfatin secretion in cultured murine adipocytes. *Clinical science* 117:243-249
- Lorente-Cebrian S, Bustos M, Marti A, Martinez JA, Moreno-Aliaga MJ (2010) Eicosapentaenoic acid up-regulates apelin secretion and gene expression in 3t3-l1 adipocytes. *Mol Nutr Food Res* 54 Suppl 1:S104-111
- Lorente-Cebrian S, Bustos M, Marti A, Fernandez-Galilea M, Martinez JA, Moreno-Aliaga MJ (2012) Eicosapentaenoic acid inhibits tumour necrosis factor-alpha-induced lipolysis in murine cultured adipocytes. *The Journal of nutritional biochemistry* 23:218-227
- Lv SY, Yang YJ, Chen Q (2013) Regulation of feeding behavior, gastrointestinal function and fluid homeostasis by apelin. *Peptides* 44:87-92
- Ma L, Robinson LN, Towle HC (2006) Chrebp*mlx is the principal mediator of glucose-induced gene expression in the liver. *The Journal of biological chemistry* 281:28721-28730
- Ma QL, Yang F, Rosario ER, Ubeda OJ, Beech W, Gant DJ, Chen PP, Hudspeth B, Chen C, Zhao Y, Vinters HV, Frautschy SA, Cole GM (2009) Beta-amyloid oligomers induce phosphorylation of tau and inactivation of insulin receptor substrate via c-jun n-terminal kinase signaling: Suppression by omega-

3 fatty acids and curcumin. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:9078-9089

Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S, et al. (1995) Leptin levels in human and rodent: Measurement of plasma leptin and ob rna in obese and weight-reduced subjects. *Nature medicine* 1:1155-1161

Maguire JJ, Klein MJ, Pitkin SL, Davenport AP (2009) [pyr1]apelin-13 identified as the predominant apelin isoform in the human heart: Vasoactive mechanisms and inotropic action in disease. *Hypertension* 54:598-604

Mahady SE, Webster AC, Walker S, Sanyal A, George J (2011) The role of thiazolidinediones in non-alcoholic steatohepatitis - a systematic review and meta analysis. *Journal of hepatology* 55:1383-1390

Makni M, Fetoui H, Gargouri NK, Garoui el M, Jaber H, Makni J, Boudawara T, Zeghal N (2008) Hypolipidemic and hepatoprotective effects of flax and pumpkin seed mixture rich in omega-3 and omega-6 fatty acids in hypercholesterolemic rats. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 46:3714-3720

Malin SK, Mulya A, Fealy CE, Haus JM, Pagadala MR, Scelsi AR, Huang H, Flask CA, McCullough AJ, Kirwan JP (2013) Fetuin-a is linked to improved glucose tolerance after short-term exercise training in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of applied physiology*

Mao J, DeMayo FJ, Li H, Abu-Elheiga L, Gu Z, Shaikenov TE, Kordari P, Chirala SS, Heird WC, Wakil SJ (2006) Liver-specific deletion of acetyl-coa carboxylase 1 reduces hepatic triglyceride accumulation without affecting glucose homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:8552-8557

Markworth JF, Cameron-Smith D (2013) Arachidonic acid supplementation enhances in vitro skeletal muscle cell growth via a cox-2-dependent pathway. *American journal of physiology Cell physiology* 304:C56-67

Marmugi A, Ducheix S, Lasserre F, Polizzi A, Paris A, Priymenko N, Bertrand-Michel J, Pineau T, Guillou H, Martin PG, Mselli-Lakhal L (2012) Low doses of bisphenol a induce gene expression related to lipid synthesis and trigger triglyceride accumulation in adult mouse liver. *Hepatology* 55:395-407

Masaki T, Yasuda T, Yoshimatsu H (2012) Apelin-13 microinjection into the paraventricular nucleus increased sympathetic nerve activity innervating brown adipose tissue in rats. *Brain research bulletin* 87:540-543

Masri B, Lahlou H, Mazarguil H, Knibiehler B, Audigier Y (2002) Apelin (65-77) activates extracellular signal-regulated kinases via a ptx-sensitive g protein. *Biochemical and biophysical research communications* 290:539-545

Masri B, Morin N, Cornu M, Knibiehler B, Audigier Y (2004) Apelin (65-77) activates p70 s6 kinase and is mitogenic for umbilical endothelial cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18:1909-1911

Mathews ST, Singh GP, Ranalletta M, Cintron VJ, Qiang X, Goustin AS, Jen KL, Charron MJ, Jahn-Dechent W, Grunberger G (2002) Improved insulin sensitivity and resistance to weight gain in mice null for the ahsg gene. *Diabetes* 51:2450-2458

Matsuzaka T, Shimano H, Yahagi N, Kato T, Atsumi A, Yamamoto T, Inoue N, Ishikawa M, Okada S, Ishigaki N, Iwasaki H, Iwasaki Y, Karasawa T, Kumadaki S, Matsui T, Sekiya M, Ohashi K, Hasty AH, Nakagawa Y, Takahashi A, Suzuki H, Yatoh S, Sone H, Toyoshima H, Osuga J, Yamada N (2007) Crucial

role of a long-chain fatty acid elongase, *elovl6*, in obesity-induced insulin resistance. *Nature medicine* 13:1193-1202

Matsuzaki H, Daitoku H, Hatta M, Tanaka K, Fukamizu A (2003) Insulin-induced phosphorylation of *fkhr* (*foxo1*) targets to proteasomal degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:11285-11290

Mavrommatis Y, Ross K, Rucklidge G, Reid M, Duncan G, Gordon MJ, Thies F, Sneddon A, de Roos B (2010) Intervention with fish oil, but not with docosahexaenoic acid, results in lower levels of hepatic soluble epoxide hydrolase with time in *apoe* knockout mice. *The British journal of nutrition* 103:16-24

Mazza A, Fruci B, Garinis GA, Giuliano S, Malaguarnera R, Belfiore A (2012) The role of metformin in the management of *nafld*. *Experimental diabetes research* 2012:716404

Mazzucotelli A, Ribet C, Castan-Laurell I, Daviaud D, Guigne C, Langin D, Valet P (2008) The transcriptional co-activator *pgc-1alpha* up regulates *apelin* in human and mouse adipocytes. *Regulatory peptides* 150:33-37

McGarry JD, Mannaerts GP, Foster DW (1977) A possible role for malonyl-coa in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis. *The Journal of clinical investigation* 60:265-270

Medhurst AD, Jennings CA, Robbins MJ, Davis RP, Ellis C, Winborn KY, Lawrie KW, Hervieu G, Riley G, Bolaky JE, Herrity NC, Murdock P, Darker JG (2003) Pharmacological and immunohistochemical characterization of the *apj* receptor and its endogenous ligand *apelin*. *Journal of neurochemistry* 84:1162-1172

Meissner JD, Freund R, Krone D, Umeda PK, Chang KC, Gros G, Scheibe RJ (2011) Extracellular signal-regulated kinase 1/2-mediated phosphorylation of p300 enhances myosin heavy chain *i/beta* gene expression via acetylation of nuclear factor of activated t cells *c1*. *Nucleic acids research* 39:5907-5925

Mejia-Barradas CM, Del-Rio-Navarro BE, Dominguez-Lopez A, Campos-Rodriguez R, Martinez-Godinez MD, Rojas-Hernandez S, Lara-Padilla E, Abarca-Rojano E, Miliar-Garcia A (2013) The consumption of n-3 polyunsaturated fatty acids differentially modulates gene expression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma and hypoxia-inducible factor 1 alpha in subcutaneous adipose tissue of obese adolescents. *Endocrine*

Melgar-Lesmes P, Casals G, Pauta M, Ros J, Reichenbach V, Bataller R, Morales-Ruiz M, Jimenez W (2010) *Apelin* mediates the induction of profibrogenic genes in human hepatic stellate cells. *Endocrinology* 151:5306-5314

Melgar-Lesmes P, Pauta M, Reichenbach V, Casals G, Ros J, Bataller R, Morales-Ruiz M, Jimenez W (2011) Hypoxia and proinflammatory factors upregulate *apelin* receptor expression in human stellate cells and hepatocytes. *Gut* 60:1404-1411

Memon RA, Fuller J, Moser AH, Smith PJ, Grunfeld C, Feingold KR (1999) Regulation of putative fatty acid transporters and acyl-coa synthetase in liver and adipose tissue in *ob/ob* mice. *Diabetes* 48:121-127

Memon RA, Tecott LH, Nonogaki K, Beigneux A, Moser AH, Grunfeld C, Feingold KR (2000) Up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptors (*ppar-alpha*) and *ppar-gamma* messenger ribonucleic acid expression in the liver in murine obesity: Troglitazone induces expression of *ppar-gamma*-responsive adipose tissue-specific genes in the liver of obese diabetic mice. *Endocrinology* 141:4021-4031

- Meral C, Tascilar E, Karademir F, Tanju IA, Cekmez F, Ipcioglu OM, Ercin CN, Gocmen I, Dogru T (2010) Elevated plasma levels of apelin in children with type 1 diabetes mellitus. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism* : JPEM 23:497-502
- Mesmin C, Fenaille F, Becher F, Tabet JC, Ezan E (2011) Identification and characterization of apelin peptides in bovine colostrum and milk by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of proteome research* 10:5222-5231
- Micallef M, Munro I, Phang M, Garg M (2009) Plasma n-3 polyunsaturated fatty acids are negatively associated with obesity. *The British journal of nutrition* 102:1370-1374
- Michalopoulos GK, DeFrances MC (1997) Liver regeneration. *Science* 276:60-66
- Miettinen KH, Magga J, Vuolteenaho O, Vanninen EJ, Punnonen KR, Ylitalo K, Tuomainen P, Peuhkurinen KJ (2007) Utility of plasma apelin and other indices of cardiac dysfunction in the clinical assessment of patients with dilated cardiomyopathy. *Regulatory peptides* 140:178-184
- Miller RA, Chu Q, Xie J, Foretz M, Viollet B, Birnbaum MJ (2013) Biguanides suppress hepatic glucagon signalling by decreasing production of cyclic amp. *Nature* 494:256-260
- Minehira K, Young SG, Villanueva CJ, Yetukuri L, Oresic M, Hellerstein MK, Farese RV, Jr., Horton JD, Preitner F, Thorens B, Tappy L (2008) Blocking vldl secretion causes hepatic steatosis but does not affect peripheral lipid stores or insulin sensitivity in mice. *Journal of lipid research* 49:2038-2044
- Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Muller C, Carling D, Kahn BB (2002) Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating amp-activated protein kinase. *Nature* 415:339-343
- Misu H, Takamura T, Takayama H, Hayashi H, Matsuzawa-Nagata N, Kurita S, Ishikura K, Ando H, Takeshita Y, Ota T, Sakurai M, Yamashita T, Mizukoshi E, Yamashita T, Honda M, Miyamoto K, Kubota T, Kubota N, Kadowaki T, Kim HJ, Lee IK, Minokoshi Y, Saito Y, Takahashi K, Yamada Y, Takakura N, Kaneko S (2010) A liver-derived secretory protein, selenoprotein p, causes insulin resistance. *Cell metabolism* 12:483-495
- Misu H, Ishikura K, Kurita S, Takeshita Y, Ota T, Saito Y, Takahashi K, Kaneko S, Takamura T (2012) Inverse correlation between serum levels of selenoprotein p and adiponectin in patients with type 2 diabetes. *PLoS one* 7:e34952
- Mithieux G, Zitoun C (1996) Mechanisms by which fatty-acyl-coa esters inhibit or activate glucose-6-phosphatase in intact and detergent-treated rat liver microsomes. *European journal of biochemistry / FEBS* 235:799-803
- Mitro N, Mak PA, Vargas L, Godio C, Hampton E, Molteni V, Kreuzsch A, Saez E (2007) The nuclear receptor Ixr is a glucose sensor. *Nature* 445:219-223
- Mogensen M, Sahlin K, Fernstrom M, Glinzborg D, Vind BF, Beck-Nielsen H, Hojlund K (2007) Mitochondrial respiration is decreased in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 56:1592-1599
- Mohammadi E, Rafrat M, Farzadi L, Asghari-Jafarabadi M, Sabour S (2012) Effects of omega-3 fatty acids supplementation on serum adiponectin levels and some metabolic risk factors in women with polycystic ovary syndrome. *Asia Pacific journal of clinical nutrition* 21:511-518
- Monetti M, Levin MC, Watt MJ, Sajan MP, Marmor S, Hubbard BK, Stevens RD, Bain JR, Newgard CB, Farese RV, Sr., Hevener AL, Farese RV, Jr. (2007) Dissociation of hepatic steatosis and insulin resistance in mice overexpressing dgat in the liver. *Cell metabolism* 6:69-78

Monsenego J, Mansouri A, Akkaoui M, Lenoir V, Esnous C, Fauveau V, Tavernier V, Girard J, Prip-Buus C (2012) Enhancing liver mitochondrial fatty acid oxidation capacity in obese mice improves insulin sensitivity independently of hepatic steatosis. *Journal of hepatology* 56:632-639

Moon MJ, Oh DY, Moon JS, Kim DK, Hwang JI, Lee JY, Kim JI, Cho S, Kwon HB, Seong JY (2007) Cloning and activation of the bullfrog apelin receptor: Gi/o coupling and high affinity for [pro1]apelin-13. *Molecular and cellular endocrinology* 277:51-60

Moran-Salvador E, Lopez-Parra M, Garcia-Alonso V, Titos E, Martinez-Clemente M, Gonzalez-Periz A, Lopez-Vicario C, Barak Y, Arroyo V, Claria J (2011) Role for ppargamma in obesity-induced hepatic steatosis as determined by hepatocyte- and macrophage-specific conditional knockouts. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25:2538-2550

Moreira RK (2007) Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Archives of pathology & laboratory medicine* 131:1728-1734

Moreno-Aliaga MJ, Lorente-Cebrian S, Martinez JA (2010) Regulation of adipokine secretion by n-3 fatty acids. *The Proceedings of the Nutrition Society* 69:324-332

Mori K, Emoto M, Yokoyama H, Araki T, Teramura M, Koyama H, Shoji T, Inaba M, Nishizawa Y (2006) Association of serum fetuin-a with insulin resistance in type 2 diabetic and nondiabetic subjects. *Diabetes care* 29:468

Mori TA, Watts GF, Burke V, Hilme E, Puddey IB, Beilin LJ (2000) Differential effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on vascular reactivity of the forearm microcirculation in hyperlipidemic, overweight men. *Circulation* 102:1264-1269

Morino K, Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Frattini J, Shatzkes N, Neschen S, White MF, Bilz S, Sono S, Pypaert M, Shulman GI (2005) Reduced mitochondrial density and increased irs-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. *The Journal of clinical investigation* 115:3587-3593

Morris MC, Sacks F, Rosner B (1993) Does fish oil lower blood pressure? A meta-analysis of controlled trials. *Circulation* 88:523-533

Mouratoff GJ, Carroll NV, Scott EM (1967) Diabetes mellitus in eskimos. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 199:107-112

Muise ES, Azzolina B, Kuo DW, El-Sherbeini M, Tan Y, Yuan X, Mu J, Thompson JR, Berger JP, Wong KK (2008) Adipose fibroblast growth factor 21 is up-regulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma and altered metabolic states. *Molecular pharmacology* 74:403-412

Munkhtulga L, Nakayama K, Utsumi N, Yanagisawa Y, Gotoh T, Omi T, Kumada M, Erdenebulgan B, Zolzaya K, Lkhagvasuren T, Iwamoto S (2007) Identification of a regulatory snp in the retinol binding protein 4 gene associated with type 2 diabetes in mongolia. *Human genetics* 120:879-888

Muoio DM Intramuscular triacylglycerol and insulin resistance: Guilty as charged or wrongly accused? *Biochimica et biophysica acta* 1801:281-288

Muoio DM, Newgard CB (2008) Mechanisms of disease: Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Nature reviews Molecular cell biology* 9:193-205

- Murata M, Kaji H, Takahashi Y, Iida K, Mizuno I, Okimura Y, Abe H, Chihara K (2000) Stimulation by eicosapentaenoic acids of leptin mRNA expression and its secretion in mouse 3T3-L1 adipocytes in vitro. *Biochemical and biophysical research communications* 270:343-348
- Murumalla RK, Gunasekaran MK, Padhan JK, Bencharif K, Gence L, Festy F, Cesari M, Roche R, Hoareau L (2012) Fatty acids do not pay the toll: Effect of SFA and PUFA on human adipose tissue and mature adipocytes inflammation. *Lipids in health and disease* 11:175
- Mutel E, Abdul-Wahed A, Ramamonjisoa N, Stefanutti A, Houberton I, Cavassila S, Pilleul F, Beuf O, Gautier-Stein A, Penhoat A, Mithieux G, Rajas F (2011) Targeted deletion of liver glucose-6 phosphatase mimics glycogen storage disease type 1a including development of multiple adenomas. *Journal of hepatology* 54:529-537
- Muthulakshmi S, Saravanan R (2013) Efficacy of azelaic acid on hepatic key enzymes of carbohydrate metabolism in high fat diet induced type 2 diabetic mice. *Biochimie* 95:1239-1244
- Nabben M, Hoeks J, Briede JJ, Glatz JF, Moonen-Kornips E, Hesselink MK, Schrauwen P (2008) The effect of UCP3 overexpression on mitochondrial ROS production in skeletal muscle of young versus aged mice. *FEBS Lett* 582:4147-4152
- Nagata T, Fukazawa M, Honda K, Yata T, Kawai M, Yamane M, Murao N, Yamaguchi K, Kato M, Mitsui T, Suzuki Y, Ikeda S, Kawabe Y (2013) Selective SGLT2 inhibition by tofogliflozin reduces renal glucose reabsorption under hyperglycemic but not under hypo- or euglycemic conditions in rats. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 304:E414-423
- Nair AK, Sugunan D, Kumar H, Anilkumar G (2010) Case-control analysis of SNPs in GLUT4, RBP4 and STRA6: Association of SNPs in STRA6 with type 2 diabetes in a South Indian population. *PLoS one* 5:e11444
- Neel JV (1999) Diabetes mellitus: A "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? 1962. *Bulletin of the World Health Organization* 77:694-703; discussion 692-693
- Neschen S, Morino K, Rossbacher JC, Pongratz RL, Cline GW, Sono S, Gillum M, Shulman GI (2006) Fish oil regulates adiponectin secretion by a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-dependent mechanism in mice. *Diabetes* 55:924-928
- Neschen S, Morino K, Dong J, Wang-Fischer Y, Cline GW, Romanelli AJ, Rossbacher JC, Moore IK, Regittnig W, Munoz DS, Kim JH, Shulman GI (2007) N-3 fatty acids preserve insulin sensitivity in vivo in a peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-dependent manner. *Diabetes* 56:1034-1041
- Nguyen P, Leray V, Diez M, Serisier S, Le Bloc'h J, Siliart B, Dumon H (2008) Liver lipid metabolism. *Journal of animal physiology and animal nutrition* 92:272-283
- Nicholson JK, Holmes E, Wilson ID (2005) Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. *Nature reviews Microbiology* 3:431-438
- Nieman DC, Cayea EJ, Austin MD, Henson DA, McAnulty SR, Jin F (2009) Chia seed does not promote weight loss or alter disease risk factors in overweight adults. *Nutrition research* 29:414-418
- Nishimura T, Nakatake Y, Konishi M, Itoh N (2000) Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochimica et biophysica acta* 1492:203-206
- Nobili V, Bedogni G, Alisi A, Pietrobattista A, Rise P, Galli C, Agostoni C (2011) Docosahexaenoic acid supplementation decreases liver fat content in children with non-alcoholic fatty liver disease: Double-blind randomised controlled clinical trial. *Archives of disease in childhood* 96:350-353

- Nomura S, Inami N, Shouzu A, Omoto S, Kimura Y, Takahashi N, Tanaka A, Urase F, Maeda Y, Ohtani H, Iwasaka T (2009) The effects of pitavastatin, eicosapentaenoic acid and combined therapy on platelet-derived microparticles and adiponectin in hyperlipidemic, diabetic patients. *Platelets* 20:16-22
- Nyman LR, Tian L, Hamm DA, Schoeb TR, Gower BA, Nagy TR, Wood PA (2011) Long term effects of high fat or high carbohydrate diets on glucose tolerance in mice with heterozygous carnitine palmitoyltransferase-1a (cpt-1a) deficiency: Diet influences on cpt1a deficient mice. *Nutrition & diabetes* 1:e14
- O'Carroll AM, Selby TL, Palkovits M, Lolait SJ (2000) Distribution of mrna encoding b78/apj, the rat homologue of the human apj receptor, and its endogenous ligand apelin in brain and peripheral tissues. *Biochimica et biophysica acta* 1492:72-80
- O'Donnell LA, Agrawal A, Sabnekar P, Dichter MA, Lynch DR, Kolson DL (2007) Apelin, an endogenous neuronal peptide, protects hippocampal neurons against excitotoxic injury. *Journal of neurochemistry* 102:1905-1917
- O'Dowd BF, Heiber M, Chan A, Heng HH, Tsui LC, Kennedy JL, Shi X, Petronis A, George SR, Nguyen T (1993) A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene* 136:355-360
- O'Rahilly S (2009) Human genetics illuminates the paths to metabolic disease. *Nature* 462:307-314
- Ogawa Y, Kurosu H, Yamamoto M, Nandi A, Rosenblatt KP, Goetz R, Eliseenkova AV, Mohammadi M, Kuro-o M (2007) Betaklotho is required for metabolic activity of fibroblast growth factor 21. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:7432-7437
- Ohno S, Yakabi K, Ro S, Ochiai M, Onouchi T, Sakurada T, Takabayashi H, Ishida S, Takayama K (2012) Apelin-12 stimulates acid secretion through an increase of histamine release in rat stomachs. *Regulatory peptides* 174:71-78
- Ohta M, Kawano H, Notsu T, Naba H, Imada K (2012) Eicosapentaenoic acid attenuates statin-induced er stress and toxicity in myoblast. *Biochemical and biophysical research communications* 424:301-307
- Oike Y, Akao M, Yasunaga K, Yamauchi T, Morisada T, Ito Y, Urano T, Kimura Y, Kubota Y, Maekawa H, Miyamoto T, Miyata K, Matsumoto S, Sakai J, Nakagata N, Takeya M, Koseki H, Ogawa Y, Kadowaki T, Suda T (2005) Angiopoietin-related growth factor antagonizes obesity and insulin resistance. *Nature medicine* 11:400-408
- Olza J, Mesa MD, Aguilera CM, Moreno-Torres R, Jimenez A, Perez de la Cruz A, Gil A (2010) Influence of an eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid-enriched enteral nutrition formula on plasma fatty acid composition and biomarkers of insulin resistance in the elderly. *Clinical nutrition* 29:31-37
- Oosterveer MH, Matakci C, Yamamoto H, Harach T, Moullan N, van Dijk TH, Ayuso E, Bosch F, Postic C, Groen AK, Auwerx J, Schoonjans K (2012) Lrh-1-dependent glucose sensing determines intermediary metabolism in liver. *The Journal of clinical investigation* 122:2817-2826
- Orellana-Gavaldá JM, Herrero L, Malandrino MI, Paneda A, Sol Rodríguez-Pena M, Petry H, Asins G, Van Deventer S, Hegardt FG, Serra D (2011) Molecular therapy for obesity and diabetes based on a long-term increase in hepatic fatty-acid oxidation. *Hepatology* 53:821-832

- Ou HY, Yang YC, Wu HT, Wu JS, Lu FH, Chang CJ (2011) Serum fetuin-a concentrations are elevated in subjects with impaired glucose tolerance and newly diagnosed type 2 diabetes. *Clinical endocrinology* 75:450-455
- Ou HY, Wu HT, Hung HC, Yang YC, Wu JS, Chang CJ (2012) Endoplasmic reticulum stress induces the expression of fetuin-a to develop insulin resistance. *Endocrinology* 153:2974-2984
- Oyadomari S, Harding HP, Zhang Y, Oyadomari M, Ron D (2008) Dephosphorylation of translation initiation factor 2 α enhances glucose tolerance and attenuates hepatosteatosis in mice. *Cell metabolism* 7:520-532
- Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, Furuhashi M, Vaillancourt E, Smith RO, Gorgun CZ, Hotamisligil GS (2006) Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* 313:1137-1140
- Pagadala M, Kasumov T, McCullough AJ, Zein NN, Kirwan JP (2012) Role of ceramides in nonalcoholic fatty liver disease. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 23:365-371
- Pagano C, Pilon C, Olivieri M, Mason P, Fabris R, Serra R, Milan G, Rossato M, Federspil G, Vettor R (2006) Reduced plasma visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in obesity is not related to insulin resistance in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 91:3165-3170
- Pal D, Dasgupta S, Kundu R, Maitra S, Das G, Mukhopadhyay S, Ray S, Majumdar SS, Bhattacharya S (2012) Fetuin-a acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. *Nature medicine* 18
- Park H, Kaushik VK, Constant S, Prentki M, Przybytkowski E, Ruderman NB, Saha AK (2002) Coordinate regulation of malonyl-coa decarboxylase, sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, and acetyl-coa carboxylase by AMP-activated protein kinase in rat tissues in response to exercise. *The Journal of biological chemistry* 277:32571-32577
- Park JW, Jeong G, Kim SJ, Kim MK, Park SM (2007) Predictors reflecting the pathological severity of non-alcoholic fatty liver disease: Comprehensive study of clinical and immunohistochemical findings in younger Asian patients. *Journal of gastroenterology and hepatology* 22:491-497
- Parker-Barnes JM, Das T, Bobik E, Leonard AE, Thurmond JM, Chaung LT, Huang YS, Mukerji P (2000) Identification and characterization of an enzyme involved in the elongation of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:8284-8289
- Parrish CC, Pathy DA, Angel A (1990) Dietary fish oils limit adipose tissue hypertrophy in rats. *Metabolism: clinical and experimental* 39:217-219
- Pasarin M, La Mura V, Gracia-Sancho J, Garcia-Caldero H, Rodriguez-Vilarrupla A, Garcia-Pagan JC, Bosch J, Abraldes JG (2012) Sinusoidal endothelial dysfunction precedes inflammation and fibrosis in a model of NAFLD. *PLoS one* 7:e32785
- Pelikanova T, Kohout M, Valek J, Kazdova L, Base J (1993) Metabolic effects of omega-3 fatty acids in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Annals of the New York Academy of Sciences* 683:272-278
- Perez-Carreras M, Del Hoyo P, Martin MA, Rubio JC, Martin A, Castellano G, Colina F, Arenas J, Solis-Herruzo JA (2003) Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 38:999-1007

- Perez-Echarri N, Perez-Matute P, Marcos-Gomez B, Martinez JA, Moreno-Aliaga MJ (2009) Effects of eicosapentaenoic acid ethyl ester on visfatin and apelin in lean and overweight (cafeteria diet-fed) rats. *The British journal of nutrition* 101:1059-1067
- Perez-Matute P, Marti A, Martinez JA, Fernandez-Otero MP, Stanhope KL, Havel PJ, Moreno-Aliaga MJ (2005) Eicosapentaenoic fatty acid increases leptin secretion from primary cultured rat adipocytes: Role of glucose metabolism. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 288:R1682-1688
- Perez-Matute P, Perez-Echarri N, Martinez JA, Marti A, Moreno-Aliaga MJ (2007) Eicosapentaenoic acid actions on adiposity and insulin resistance in control and high-fat-fed rats: Role of apoptosis, adiponectin and tumour necrosis factor-alpha. *The British journal of nutrition* 97:389-398
- Perry JR, Weedon MN, Langenberg C, Jackson AU, Lyssenko V, Sparso T, Thorleifsson G, Grallert H, Ferrucci L, Maggio M, Paolisso G, Walker M, Palmer CN, Payne F, Young E, Herder C, Narisu N, Morken MA, Bonnycastle LL, Owen KR, Shields B, Knight B, Bennett A, Groves CJ, Ruukonen A, Jarvelin MR, Pearson E, Pascoe L, Ferrannini E, Bornstein SR, Stringham HM, Scott LJ, Kuusisto J, Nilsson P, Neptin M, Gjesing AP, Pisinger C, Lauritzen T, Sandbaek A, Sampson M, Magic, Zeggini E, Lindgren CM, Steinthorsdottir V, Thorsteinsdottir U, Hansen T, Schwarz P, Illig T, Laakso M, Stefansson K, Morris AD, Groop L, Pedersen O, Boehnke M, Barroso I, Wareham NJ, Hattersley AT, McCarthy MI, Frayling TM (2010) Genetic evidence that raised sex hormone binding globulin (shbg) levels reduce the risk of type 2 diabetes. *Human molecular genetics* 19:535-544
- Pessayre D (2007) Role of mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of gastroenterology and hepatology* 22 Suppl 1:S20-27
- Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI (2004) Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *The New England journal of medicine* 350:664-671
- Pettinelli P, Videla LA (2011) Up-regulation of ppar-gamma mrna expression in the liver of obese patients: An additional reinforcing lipogenic mechanism to srebp-1c induction. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 96:1424-1430
- Phielix E, Schrauwen-Hinderling VB, Mensink M, Lenaers E, Meex R, Hoeks J, Kooi ME, Moonen-Kornips E, Sels JP, Hesselink MK, Schrauwen P (2008) Lower intrinsic adp-stimulated mitochondrial respiration underlies in vivo mitochondrial dysfunction in muscle of male type 2 diabetic patients. *Diabetes* 57:2943-2949
- Phielix E, Szendroedi J, Roden M (2011) The role of metformin and thiazolidinediones in the regulation of hepatic glucose metabolism and its clinical impact. *Trends in pharmacological sciences* 32:607-616
- Piairo P, Moura RS, Nogueira-Silva C, Correia-Pinto J (2011) The apelinergic system in the developing lung: Expression and signaling. *Peptides* 32:2474-2483
- Pitkin SL, Maguire JJ, Bonner TI, Davenport AP (2010) International union of basic and clinical pharmacology. Lxxiv. Apelin receptor nomenclature, distribution, pharmacology, and function. *Pharmacol Rev* 62:331-342
- Pope GR, Roberts EM, Lolait SJ, O'Carroll AM (2012) Central and peripheral apelin receptor distribution in the mouse: Species differences with rat. *Peptides* 33:139-148
- Poschl JM, Leray C, Groscolas R, Ruef P, Linderkamp O (1996) Dietary docosahexaenoic acid improves red blood cell deformability in rats. *Thrombosis research* 81:283-288

- Postic C, Girard J (2008) Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: Lessons from genetically engineered mice. *The Journal of clinical investigation* 118:829-838
- Poudyal H, Panchal SK, Diwan V, Brown L (2011) Omega-3 fatty acids and metabolic syndrome: Effects and emerging mechanisms of action. *Progress in lipid research* 50:372-387
- Poudyal H, Brown L (2013) The role of n-3 polyunsaturated fatty acids in human heart failure. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets* 13:105-117
- Pound LD, Sarkar SA, Benninger RK, Wang Y, Suwanichkul A, Shadoan MK, Printz RL, Oeser JK, Lee CE, Piston DW, McGuinness OP, Hutton JC, Powell DR, O'Brien RM (2009) Deletion of the mouse *slc30a8* gene encoding zinc transporter-8 results in impaired insulin secretion. *The Biochemical journal* 421:371-376
- Poupeau A, Postic C (2011) Cross-regulation of hepatic glucose metabolism via *chrebp* and nuclear receptors. *Biochimica et biophysica acta* 1812:995-1006
- Power GW, Newsholme EA (1997) Dietary fatty acids influence the activity and metabolic control of mitochondrial carnitine palmitoyltransferase i in rat heart and skeletal muscle. *The Journal of nutrition* 127:2142-2150
- Price PT, Nelson CM, Clarke SD (2000) Omega-3 polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. *Current opinion in lipidology* 11:3-7
- Principe A, Melgar-Lesmes P, Fernandez-Varo G, del Arbol LR, Ros J, Morales-Ruiz M, Bernardi M, Arroyo V, Jimenez W (2008) The hepatic apelin system: A new therapeutic target for liver disease. *Hepatology* 48:1193-1201
- Puffer BA, Sharron M, Coughlan CM, Baribaud F, McManus CM, Lee B, David J, Price K, Horuk R, Tsang M, Doms RW (2000) Expression and coreceptor function of *apj* for primate immunodeficiency viruses. *Virology* 276:435-444
- Quant PA, Tubbs PK, Brand MD (1990) Glucagon activates mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coa synthase in vivo by decreasing the extent of succinylation of the enzyme. *European journal of biochemistry / FEBS* 187:169-174
- Racanelli V, Rehermann B (2006) The liver as an immunological organ. *Hepatology* 43:S54-62
- Raclot T, Groscolas R, Langin D, Ferre P (1997) Site-specific regulation of gene expression by n-3 polyunsaturated fatty acids in rat white adipose tissues. *Journal of lipid research* 38:1963-1972
- Ramel A, Martinez A, Kiely M, Morais G, Bandarra NM, Thorsdottir I (2008) Beneficial effects of long-chain n-3 fatty acids included in an energy-restricted diet on insulin resistance in overweight and obese european young adults. *Diabetologia* 51:1261-1268
- Ramirez-Ramirez V, Macias-Islas MA, Ortiz GG, Pacheco-Moises F, Torres-Sanchez ED, Sorto-Gomez TE, Cruz-Ramos JA, Orozco-Avina G, Celis de la Rosa AJ (2013) Efficacy of fish oil on serum of *tnf alpha*, *il-1 beta*, and *il-6* oxidative stress markers in multiple sclerosis treated with interferon beta-1b. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2013:709493
- Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA (1963) The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1:785-789

- Ranganathan S, Davidson MB (1996) Effect of tumor necrosis factor- α on basal and insulin-stimulated glucose transport in cultured muscle and fat cells. *Metabolism: clinical and experimental* 45:1089-1094
- Rasmussen JG, Christensen JH, Schmidt EB (2009) Adiponectin and marine n-3 fatty acids in patients referred for coronary angiography. *International journal of cardiology* 135:248-250
- Ratnayake WM, Galli C (2009) Fat and fatty acid terminology, methods of analysis and fat digestion and metabolism: A background review paper. *Annals of nutrition & metabolism* 55:8-43
- Ratzu V, Giral P, Jacqueminet S, Charlotte F, Hartemann-Heurtier A, Serfaty L, Podevin P, Lacorte JM, Bernhardt C, Bruckert E, Grimaldi A, Poynard T, Group LS (2008) Rosiglitazone for nonalcoholic steatohepatitis: One-year results of the randomized placebo-controlled fatty liver improvement with rosiglitazone therapy (flirt) trial. *Gastroenterology* 135:100-110
- Ratzu V, Charlotte F, Bernhardt C, Giral P, Halbron M, Lenaour G, Hartmann-Heurtier A, Bruckert E, Poynard T, Group LS (2010) Long-term efficacy of rosiglitazone in nonalcoholic steatohepatitis: Results of the fatty liver improvement by rosiglitazone therapy (flirt 2) extension trial. *Hepatology* 51:445-453
- Rawson RB (2003) Control of lipid metabolism by regulated intramembrane proteolysis of sterol regulatory element binding proteins (srebps). *Biochemical Society symposium*:221-231
- Rayalam S, Della-Fera MA, Kasser T, Warren W, Baile CA (2011) Emerging role of apelin as a therapeutic target in cancer: A patent review. *Recent patents on anti-cancer drug discovery* 6:367-372
- Reaux-Le Goazigo A, Morinville A, Bulet A, Llorens-Cortes C, Beaudet A (2004) Dehydration-induced cross-regulation of apelin and vasopressin immunoreactivity levels in magnocellular hypothalamic neurons. *Endocrinology* 145:4392-4400
- Reaux-Le Goazigo A, Bodineau L, De Mota N, Jeandel L, Chartrel N, Knauf C, Raad C, Valet P, Llorens-Cortes C (2011) Apelin and the proopiomelanocortin system: A new regulatory pathway of hypothalamic α -msh release. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 301:E955-966
- Reaux A, De Mota N, Skultetyova I, Lenkei Z, El Messari S, Gallatz K, Corvol P, Palkovits M, Llorens-Cortes C (2001) Physiological role of a novel neuropeptide, apelin, and its receptor in the rat brain. *Journal of neurochemistry* 77:1085-1096
- Reichenbach V, Ros J, Fernandez-Varo G, Casals G, Melgar-Lesmes P, Campos T, Makriyannis A, Morales-Ruiz M, Jimenez W (2012) Prevention of fibrosis progression in ccl4-treated rats: Role of the hepatic endocannabinoid and apelin systems. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 340:629-637
- Ren G, Kim JY, Smas CM (2012) Identification of rifl, a novel adipocyte-enriched insulin target gene with a role in lipid metabolism. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 303:E334-351
- Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JM, Shimomura I, Shan B, Brown MS, Goldstein JL, Mangelsdorf DJ (2000) Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (srebp-1c) by oxysterol receptors, lxr α and lxr β . *Genes & development* 14:2819-2830

Reseland JE, Haugen F, Hollung K, Solvoll K, Halvorsen B, Brude IR, Nenseter MS, Christiansen EN, Drevon CA (2001) Reduction of leptin gene expression by dietary polyunsaturated fatty acids. *Journal of lipid research* 42:743-750

Rieusset J, Fauconnier J, Paillard M, Belaidi E, Tubbs E, Chauvin MA, Durand A, Bravard A, Teixeira G, Bartosch B, Michelet M, Theurey P, Vial G, Demion M, Blond E, Zoulim F, Gomez L, Vidal H, Lacampagne A, Ovize M (2012) Disruption of cyclophilin d-mediated calcium transfer from the er to mitochondria contributes to hepatic er stress and insulin resistance. *Hepatology*

Ringstrom C, Nitert MD, Bennet H, Fex M, Valet P, Rehfeld JF, Friis-Hansen L, Wierup N (2010) Apelin is a novel islet peptide. *Regulatory peptides* 162:44-51

Ritov VB, Menshikova EV, He J, Ferrell RE, Goodpaster BH, Kelley DE (2005) Deficiency of subsarcolemmal mitochondria in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* 54:8-14

Roh C, Thoidis G, Farmer SR, Kandror KV (2000) Identification and characterization of leptin-containing intracellular compartment in rat adipose cells. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 279:E893-899

Ron D, Walter P (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature reviews Molecular cell biology* 8:519-529

Ronkainen VP, Ronkainen JJ, Hanninen SL, Leskinen H, Ruas JL, Pereira T, Poellinger L, Vuolteenaho O, Tavi P (2007) Hypoxia inducible factor regulates the cardiac expression and secretion of apelin. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21:1821-1830

Roy D, Perreault M, Marette A (1998) Insulin stimulation of glucose uptake in skeletal muscles and adipose tissues in vivo is no dependent. *The American journal of physiology* 274:E692-699

Rui L, Yuan M, Frantz D, Shoelson S, White MF (2002) Socs-1 and socs-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of irs1 and irs2. *The Journal of biological chemistry* 277:42394-42398

Rung J, Cauchi S, Albrechtsen A, Shen L, Rocheleau G, Cavalcanti-Proenca C, Bacot F, Balkau B, Belisle A, Borch-Johnsen K, Charpentier G, Dina C, Durand E, Elliott P, Hadjadj S, Jarvelin MR, Laitinen J, Lauritzen T, Marre M, Mazur A, Meyre D, Montpetit A, Pisinger C, Posner B, Poulsen P, Pouta A, Prentki M, Ribel-Madsen R, Ruokonen A, Sandbaek A, Serre D, Tichet J, Vaxillaire M, Wojtaszewski JF, Vaag A, Hansen T, Polychronakos C, Pedersen O, Froguel P, Sladek R (2009) Genetic variant near irs1 is associated with type 2 diabetes, insulin resistance and hyperinsulinemia. *Nature genetics* 41:1110-1115

Sage AT, Walter LA, Shi Y, Khan MI, Kaneto H, Capretta A, Werstuck GH (2010) Hexosamine biosynthesis pathway flux promotes endoplasmic reticulum stress, lipid accumulation, and inflammatory gene expression in hepatic cells. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 298:E499-511

Saha AK, Ruderman NB (2003) Malonyl-coa and amp-activated protein kinase: An expanding partnership. *Molecular and cellular biochemistry* 253:65-70

Saint-Geniez M, Argence CB, Knibiehler B, Audigier Y (2003) The msr/apj gene encoding the apelin receptor is an early and specific marker of the venous phenotype in the retinal vasculature. *Gene expression patterns : GEP* 3:467-472

Saito Y, Takahashi K (2002) Characterization of selenoprotein p as a selenium supply protein. *European journal of biochemistry / FEBS* 269:5746-5751

- Sakamoto Y, Shintani Y, Harada K, Abe M, Shitsukawa K, Saito S (1996) Determination of free follistatin levels in sera of normal subjects and patients with various diseases. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 135:345-351
- Samson SL, Sathyanarayana P, Jogi M, Gonzalez EV, Gutierrez A, Krishnamurthy R, Muthupillai R, Chan L, Bajaj M (2011) Exenatide decreases hepatic fibroblast growth factor 21 resistance in non-alcoholic fatty liver disease in a mouse model of obesity and in a randomised controlled trial. *Diabetologia* 54:3093-3100
- Samuel VT, Liu ZX, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, Romanelli AJ, Shulman GI (2004) Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *The Journal of biological chemistry* 279:32345-32353
- Samuel VT, Liu ZX, Wang A, Beddow SA, Geisler JG, Kahn M, Zhang XM, Monia BP, Bhanot S, Shulman GI (2007) Inhibition of protein kinase cepsilon prevents hepatic insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of clinical investigation* 117:739-745
- Samuel VT, Petersen KF, Shulman GI (2010) Lipid-induced insulin resistance: Unravelling the mechanism. *Lancet* 375:2267-2277
- Samuel VT, Shulman GI (2012) Mechanisms for insulin resistance: Common threads and missing links. *Cell* 148:852-871
- Sanderson LM, de Groot PJ, Hooiveld GJ, Koppen A, Kalkhoven E, Muller M, Kersten S (2008) Effect of synthetic dietary triglycerides: A novel research paradigm for nutrigenomics. *PloS one* 3:e1681
- Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, Luketic VA, Shiffman ML, Clore JN (2001) Nonalcoholic steatohepatitis: Association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 120:1183-1192
- Sanyal AJ, Mofrad PS, Contos MJ, Sargeant C, Luketic VA, Sterling RK, Stravitz RT, Shiffman ML, Clore J, Mills AS (2004) A pilot study of vitamin e versus vitamin e and pioglitazone for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 2:1107-1115
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM (2005) Phosphorylation and regulation of akt/pkb by the rictor-mtor complex. *Science* 307:1098-1101
- Sarruf DA, Thaler JP, Morton GJ, German J, Fischer JD, Ogimoto K, Schwartz MW (2010) Fibroblast growth factor 21 action in the brain increases energy expenditure and insulin sensitivity in obese rats. *Diabetes* 59:1817-1824
- Sawane M, Kajiya K, Kidoya H, Takagi M, Muramatsu F, Takakura N (2013) Apelin inhibits diet-induced obesity by enhancing lymphatic and blood vessel integrity. *Diabetes* 62:1970-1980
- Sawitza I, Kordes C, Reister S, Haussinger D (2009) The niche of stellate cells within rat liver. *Hepatology* 50:1617-1624
- Scarpulla RC, Vega RB, Kelly DP (2012) Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 23:459-466
- Scheuner D, Kaufman RJ (2008) The unfolded protein response: A pathway that links insulin demand with beta-cell failure and diabetes. *Endocrine reviews* 29:317-333

Schmid AI, Szendroedi J, Chmelik M, Krssak M, Moser E, Roden M (2011) Liver atp synthesis is lower and relates to insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes. *Diabetes care* 34:448-453

Schmitz-Peiffer C, Biden TJ (2008) Protein kinase c function in muscle, liver, and beta-cells and its therapeutic implications for type 2 diabetes. *Diabetes* 57:1774-1783

Schraer CD, Lanier AP, Boyko EJ, Gohdes D, Murphy NJ (1988) Prevalence of diabetes mellitus in alaskan eskimos, indians, and aleuts. *Diabetes care* 11:693-700

Schrauwen-Hinderling VB, Kooi ME, Hesselink MK, Jeneson JA, Backes WH, van Echteld CJ, van Engelshoven JM, Mensink M, Schrauwen P (2007) Impaired in vivo mitochondrial function but similar intramyocellular lipid content in patients with type 2 diabetes mellitus and bmi-matched control subjects. *Diabetologia* 50:113-120

Schrauwen P, Walder K, Ravussin E (1999) Human uncoupling proteins and obesity. *Obesity research* 7:97-105

Schultes B, Frick J, Ernst B, Stefan N, Fritsche A (2010) The effect of 6-weeks of aerobic exercise training on serum fetuin-a levels in non-diabetic obese women. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* 118:754-756

Schultz JR, Tu H, Luk A, Repa JJ, Medina JC, Li L, Schwendner S, Wang S, Thoolen M, Mangelsdorf DJ, Lustig KD, Shan B (2000) Role of lxr α in control of lipogenesis. *Genes & development* 14:2831-2838

Selva DM, Hogeveen KN, Innis SM, Hammond GL (2007) Monosaccharide-induced lipogenesis regulates the human hepatic sex hormone-binding globulin gene. *The Journal of clinical investigation* 117:3979-3987

Senoo H, Yoshikawa K, Morii M, Miura M, Imai K, Mezaki Y (2010) Hepatic stellate cell (vitamin a-storing cell) and its relative--past, present and future. *Cell biology international* 34:1247-1272

Serhan CN (2007) Resolution phase of inflammation: Novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annual review of immunology* 25:101-137

Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE (2008) Resolving inflammation: Dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nature reviews Immunology* 8:349-361

Serhan CN, Yang R, Martinod K, Kasuga K, Pillai PS, Porter TF, Oh SF, Spite M (2009) Maresins: Novel macrophage mediators with potent antiinflammatory and proresolving actions. *The Journal of experimental medicine* 206:15-23

Sermondade N, Faure C, Fezeu L, Levy R, Czernichow S, Obesity-Fertility Collaborative G (2012) Obesity and increased risk for oligozoospermia and azoospermia. *Archives of internal medicine* 172:440-442

Sever N, Song BL, Yabe D, Goldstein JL, Brown MS, DeBose-Boyd RA (2003) Insig-dependent ubiquitination and degradation of mammalian 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coa reductase stimulated by sterols and geranylgeraniol. *The Journal of biological chemistry* 278:52479-52490

Sgourakis NG, Bagos PG, Hamodrakas SJ (2005) Prediction of the coupling specificity of gpcrs to four families of g-proteins using hidden markov models and artificial neural networks. *Bioinformatics* 21:4101-4106

- Shaffer EA (2000) Review article: Control of gall-bladder motor function. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 14 Suppl 2:2-8
- Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, Koo SH, Bardeesy N, Depinho RA, Montminy M, Cantley LC (2005) The kinase Ikb1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science* 310:1642-1646
- Shehzad A, Iqbal W, Shehzad O, Lee YS (2012) Adiponectin: Regulation of its production and its role in human diseases. *Hormones* 11:8-20
- Sheibani S, Hanachi P, Refahiat MA (2012) Effect of aerobic exercise on serum concentration of apelin, tnfalpha and insulin in obese women. *Iranian journal of basic medical sciences* 15:1196-1201
- Shimabukuro M, Koyama K, Chen G, Wang MY, Trieu F, Lee Y, Newgard CB, Unger RH (1997) Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:4637-4641
- Shimojo N, Jesmin S, Zaedi S, Maeda S, Soma M, Aonuma K, Yamaguchi I, Miyauchi T (2006) Eicosapentaenoic acid prevents endothelin-1-induced cardiomyocyte hypertrophy in vitro through the suppression of tgf-beta 1 and phosphorylated jnk. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 291:H835-845
- Siddiq A, Lepretre F, Hercberg S, Froguel P, Gibson F (2005) A synonymous coding polymorphism in the alpha2-heremans-schmid glycoprotein gene is associated with type 2 diabetes in french caucasians. *Diabetes* 54:2477-2481
- Siddiquee K, Hampton J, McAnally D, May L, Smith L (2013) The apelin receptor inhibits the angiotensin ii type 1 receptor via allosteric trans-inhibition. *British journal of pharmacology* 168:1104-1117
- Simo R, Barbosa-Desongles A, Hernandez C, Selva DM (2012a) I1beta down-regulation of sex hormone-binding globulin production by decreasing hnf-4alpha via mek-1/2 and jnk mapk pathways. *Molecular endocrinology* 26:1917-1927
- Simo R, Barbosa-Desongles A, Lecube A, Hernandez C, Selva DM (2012b) Potential role of tumor necrosis factor-alpha in downregulating sex hormone-binding globulin. *Diabetes* 61:372-382
- Simoneau JA, Veerkamp JH, Turcotte LP, Kelley DE (1999) Markers of capacity to utilize fatty acids in human skeletal muscle: Relation to insulin resistance and obesity and effects of weight loss. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 13:2051-2060
- Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, Boutin P, Vincent D, Belisle A, Hadjadj S, Balkau B, Heude B, Charpentier G, Hudson TJ, Montpetit A, Pshzhetsky AV, Prentki M, Posner BI, Balding DJ, Meyre D, Polychronakos C, Froguel P (2007) A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 445:881-885
- Sluse FE, Jarmuszkiewicz W, Navet R, Douette P, Mathy G, Sluse-Goffart CM (2006) Mitochondrial ucps: New insights into regulation and impact. *Biochimica et biophysica acta* 1757:480-485
- Sorhede Winzell M, Magnusson C, Ahren B (2005) The apj receptor is expressed in pancreatic islets and its ligand, apelin, inhibits insulin secretion in mice. *Regulatory peptides* 131:12-17

- Soriguer F, Garrido-Sanchez L, Garcia-Serrano S, Garcia-Almeida JM, Garcia-Arnes J, Tinahones FJ, Garcia-Fuentes E (2009) Apelin levels are increased in morbidly obese subjects with type 2 diabetes mellitus. *Obesity surgery* 19:1574-1580
- Souza-Mello V, Gregorio BM, Cardoso-de-Lemos FS, de Carvalho L, Aguilá MB, Mandarim-de-Lacerda CA (2010) Comparative effects of telmisartan, sitagliptin and metformin alone or in combination on obesity, insulin resistance, and liver and pancreas remodelling in c57bl/6 mice fed on a very high-fat diet. *Clinical science* 119:239-250
- Spadaro L, Magliocco O, Spampinato D, Piro S, Oliveri C, Alagona C, Papa G, Rabuazzo AM, Purrello F (2008) Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* 40:194-199
- Sparks JD, Sparks CE, Adeli K (2012) Selective hepatic insulin resistance, vldl overproduction, and hypertriglyceridemia. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 32:2104-2112
- Sparks LM, Johannsen NM, Church TS, Earnest CP, Moonen-Kornips E, Moro C, Hesselink MK, Smith SR, Schrauwen P (2013) Nine months of combined training improves ex vivo skeletal muscle metabolism in individuals with type 2 diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 98:1694-1702
- Speakman JR (2008) Thrifty genes for obesity, an attractive but flawed idea, and an alternative perspective: The 'drifty gene' hypothesis. *International journal of obesity* 32:1611-1617
- Speckmann B, Sies H, Steinbrenner H (2009) Attenuation of hepatic expression and secretion of selenoprotein p by metformin. *Biochemical and biophysical research communications* 387:158-163
- Speliotes EK, Butler JL, Palmer CD, Voight BF, Consortium G, Consortium MI, Nash CRN, Hirschhorn JN (2010) Pnpla3 variants specifically confer increased risk for histologic nonalcoholic fatty liver disease but not metabolic disease. *Hepatology* 52:904-912
- Spencer M, Finlin BS, Unal R, Zhu B, Morris AJ, Shipp LR, Lee J, Walton RG, Adu A, Erfani R, Campbell M, McGehee RE, Jr., Peterson CA, Kern PA (2013) Omega-3 fatty acids reduce adipose tissue macrophages in human subjects with insulin resistance. *Diabetes* 62:1709-1717
- Sprecher H (2000) Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Biochimica et biophysica acta* 1486:219-231
- Staels B, Rubenstrunk A, Noel B, Rigou G, Delataille P, Millatt LJ, Baron M, Lucas A, Tailleux A, Hum DW, Ratziu V, Cariou B, Hanf R (2013) Hepato-protective effects of the dual pparalpha/delta agonist gft505 in rodent models of nafld/nash. *Hepatology*
- Stahl A, Gimeno RE, Tartaglia LA, Lodish HF (2001) Fatty acid transport proteins: A current view of a growing family. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 12:266-273
- Stanley JC, Elsom RL, Calder PC, Griffin BA, Harris WS, Jebb SA, Lovegrove JA, Moore CS, Riemersma RA, Sanders TA (2007) Uk food standards agency workshop report: The effects of the dietary n-6:N-3 fatty acid ratio on cardiovascular health. *The British journal of nutrition* 98:1305-1310
- Stanton MC, Chen SC, Jackson JV, Rojas-Triana A, Kinsley D, Cui L, Fine JS, Greenfeder S, Bober LA, Jenh CH (2011) Inflammatory signals shift from adipose to liver during high fat feeding and influence the development of steatohepatitis in mice. *Journal of inflammation* 8:8
- Stayrook KR, Bramlett KS, Savkur RS, Ficorilli J, Cook T, Christe ME, Michael LF, Burriss TP (2005) Regulation of carbohydrate metabolism by the farnesoid x receptor. *Endocrinology* 146:984-991

Stefan N, Hennige AM, Staiger H, Machann J, Schick F, Krober SM, Machicao F, Fritsche A, Haring HU (2006) Alpha2-heremans-schmid glycoprotein/fetuin-a is associated with insulin resistance and fat accumulation in the liver in humans. *Diabetes care* 29:853-857

Stefan N, Kantartzis K, Haring HU (2008) Causes and metabolic consequences of fatty liver. *Endocrine reviews* 29:939-960

Stefan N, Schick F, Haring HU (2009) Sex hormone-binding globulin and risk of type 2 diabetes. *The New England journal of medicine* 361:2675-2676; author reply 2677-2678

Stefan N, Haring HU (2013) The role of hepatokines in metabolism. *Nature reviews Endocrinology* 9:144-152

Stephens JM (2012) Rfl aims to be a new player in lipid metabolism. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 303:E332-333

Storlien LH, Kraegen EW, Chisholm DJ, Ford GL, Bruce DG, Pascoe WS (1987) Fish oil prevents insulin resistance induced by high-fat feeding in rats. *Science* 237:885-888

Stratford S, Hoehn KL, Liu F, Summers SA (2004) Regulation of insulin action by ceramide: Dual mechanisms linking ceramide accumulation to the inhibition of akt/protein kinase b. *The Journal of biological chemistry* 279:36608-36615

Sul HS, Latasa MJ, Moon Y, Kim KH (2000) Regulation of the fatty acid synthase promoter by insulin. *The Journal of nutrition* 130:315S-320S

Sun H, Kawaguchi R (2011) The membrane receptor for plasma retinol-binding protein, a new type of cell-surface receptor. *International review of cell and molecular biology* 288:1-41

Sun Z, Miller RA, Patel RT, Chen J, Dhir R, Wang H, Zhang D, Graham MJ, Unterman TG, Shulman GI, Sztalryd C, Bennett MJ, Ahima RS, Birnbaum MJ, Lazar MA (2012) Hepatic hdac3 promotes gluconeogenesis by repressing lipid synthesis and sequestration. *Nature medicine* 18:934-942

Sun Z, Lazar MA (2013) Dissociating fatty liver and diabetes. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 24:4-12

Sundaresan A, Harini R, Pugalendi KV (2012) Ursolic acid and rosiglitazone combination alleviates metabolic syndrome in high fat diet fed c57bl/6j mice. *General physiology and biophysics* 31:323-333

Sunny NE, Satapati S, Fu X, He T, Mehdibeigi R, Spring-Robinson C, Duarte J, Potthoff MJ, Browning JD, Burgess SC (2010) Progressive adaptation of hepatic ketogenesis in mice fed a high-fat diet. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 298:E1226-1235

Sunny NE, Parks EJ, Browning JD, Burgess SC (2011) Excessive hepatic mitochondrial tca cycle and gluconeogenesis in humans with nonalcoholic fatty liver disease. *Cell metabolism* 14:804-810

Sunter D, Hewson AK, Dickson SL (2003) Intracerebroventricular injection of apelin-13 reduces food intake in the rat. *Neuroscience letters* 353:1-4

Suzuki M, Uehara Y, Motomura-Matsuzaka K, Oki J, Koyama Y, Kimura M, Asada M, Komi-Kuramochi A, Oka S, Imamura T (2008) Betaklotho is required for fibroblast growth factor (fgf) 21 signaling through fgf receptor (fgfr) 1c and fgfr3c. *Molecular endocrinology* 22:1006-1014

Svegliati-Baroni G, Candelaresi C, Saccomanno S, Ferretti G, Bachetti T, Marziani M, De Minicis S, Nobili L, Salzano R, Omenetti A, Pacetti D, Sigmund S, Benedetti A, Casini A (2006) A model of insulin resistance and nonalcoholic steatohepatitis in rats: Role of peroxisome proliferator-activated

receptor-alpha and n-3 polyunsaturated fatty acid treatment on liver injury. *The American journal of pathology* 169:846-860

Szokodi I, Tavi P, Foldes G, Voutilainen-Myllyla S, Ilves M, Tokola H, Pikkarainen S, Piuhola J, Rysa J, Toth M, Ruskoaho H (2002) Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor apj, regulates cardiac contractility. *Circulation research* 91:434-440

Taheri S, Murphy K, Cohen M, Sujkovic E, Kennedy A, Dhillo W, Dakin C, Sajedi A, Ghatei M, Bloom S (2002) The effects of centrally administered apelin-13 on food intake, water intake and pituitary hormone release in rats. *Biochemical and biophysical research communications* 291:1208-1212

Takahashi Y, Ide T (2000) Dietary n-3 fatty acids affect mrna level of brown adipose tissue uncoupling protein 1, and white adipose tissue leptin and glucose transporter 4 in the rat. *The British journal of nutrition* 84:175-184

Taneda S, Honda K, Tomidokoro K, Uto K, Nitta K, Oda H (2010) Eicosapentaenoic acid restores diabetic tubular injury through regulating oxidative stress and mitochondrial apoptosis. *American journal of physiology Renal physiology* 299:F1451-1461

Taniguchi CM, Kondo T, Sajan M, Luo J, Bronson R, Asano T, Farese R, Cantley LC, Kahn CR (2006) Divergent regulation of hepatic glucose and lipid metabolism by phosphoinositide 3-kinase via akt and pklambda/zeta. *Cell metabolism* 3:343-353

Tao J, Zhu W, Li Y, Xin P, Li J, Liu M, Li J, Redington AN, Wei M (2011) Apelin-13 protects the heart against ischemia-reperfusion injury through inhibition of er-dependent apoptotic pathways in a time-dependent fashion. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 301:H1471-1486

Tardivel S, Gousset-Dupont A, Robert V, Pourci ML, Grynberg A, Lacour B (2009) Protective effects of epa and deleterious effects of dha on enos activity in ea hy 926 cultured with lysophosphatidylcholine. *Lipids* 44:225-235

Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, Fujii R, Kakegawa T, Zou MX, Kawamata Y, Fukusumi S, Hinuma S, Kitada C, Kurokawa T, Onda H, Fujino M (1998) Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human apj receptor. *Biochemical and biophysical research communications* 251:471-476

Tatemoto K, Takayama K, Zou MX, Kumaki I, Zhang W, Kumano K, Fujimiya M (2001) The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regulatory peptides* 99:87-92

Taura K, De Minicis S, Seki E, Hatano E, Iwaisako K, Osterreicher CH, Kodama Y, Miura K, Ikai I, Uemoto S, Brenner DA (2008) Hepatic stellate cells secrete angiopoietin 1 that induces angiogenesis in liver fibrosis. *Gastroenterology* 135:1729-1738

Taylor CG, Noto AD, Stringer DM, Froese S, Malcolmson L (2010) Dietary milled flaxseed and flaxseed oil improve n-3 fatty acid status and do not affect glycemic control in individuals with well-controlled type 2 diabetes. *Journal of the American College of Nutrition* 29:72-80

Tayyebi-Khosroshahi H, Houshyar J, Tabrizi A, Vatankhah AM, Razzagi Zonouz N, Dehghan-Hesari R (2010) Effect of omega-3 fatty acid on oxidative stress in patients on hemodialysis. *Iranian journal of kidney diseases* 4:322-326

Teodoro JS, Rolo AP, Palmeira CM (2011) Hepatic fxr: Key regulator of whole-body energy metabolism. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 22:458-466

Terra X, Auguet T, Broch M, Sabench F, Hernandez M, Pastor RM, Quesada IM, Luna A, Aguilar C, del Castillo D, Richart C (2013) Retinol binding protein-4 circulating levels were higher in nonalcoholic fatty liver disease vs. Histologically normal liver from morbidly obese women. *Obesity* 21:170-177

Testa M, Rocca B, Spath L, Ranelletti FO, Petrucci G, Ciabattini G, Naro F, Schiaffino S, Volpe M, Reggiani C (2007) Expression and activity of cyclooxygenase isoforms in skeletal muscles and myocardium of humans and rodents. *Journal of applied physiology* 103:1412-1418

Than A, Cheng Y, Foh LC, Leow MK, Lim SC, Chuah YJ, Kang Y, Chen P (2012) Apelin inhibits adipogenesis and lipolysis through distinct molecular pathways. *Molecular and cellular endocrinology* 362:227-241

Than TA, Lou H, Ji C, Win S, Kaplowitz N (2011) Role of camp-responsive element-binding protein (creb)-regulated transcription coactivator 3 (crtc3) in the initiation of mitochondrial biogenesis and stress response in liver cells. *The Journal of biological chemistry* 286:22047-22054

Theise ND, Saxena R, Portmann BC, Thung SN, Yee H, Chiriboga L, Kumar A, Crawford JM (1999) The canals of hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology* 30:1425-1433

Thomas C, Gioiello A, Noriega L, Strehle A, Oury J, Rizzo G, Macchiarulo A, Yamamoto H, Matakis C, Pruzanski M, Pellicciari R, Auwerx J, Schoonjans K (2009) Tgr5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis. *Cell metabolism* 10:167-177

Thorens B, Mueckler M (2010) Glucose transporters in the 21st century. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 298:E141-145

Tian YF, Hsia TL, Hsieh CH, Huang DW, Chen CH, Hsieh PS (2011) The importance of cyclooxygenase 2-mediated oxidative stress in obesity-induced muscular insulin resistance in high-fat-fed rats. *Life sciences* 89:107-114

Tilg H, Kaser A (2011) Gut microbiome, obesity, and metabolic dysfunction. *The Journal of clinical investigation* 121:2126-2132

Tishinsky JM, Ma DW, Robinson LE (2011) Eicosapentaenoic acid and rosiglitazone increase adiponectin in an additive and ppargamma-dependent manner in human adipocytes. *Obesity* 19:262-268

Tishinsky JM, Robinson LE, Dyck DJ (2012) Insulin-sensitizing properties of adiponectin. *Biochimie* 94:2131-2136

Tolosa L, Bonora-Centelles A, Teresa Donato M, Pareja E, Negro A, Lopez S, Castell JV, Jose Gomez-Lechon M (2011) Steatotic liver: A suitable source for the isolation of hepatic progenitor cells. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 31:1231-1238

Tomiyasu M, Obata T, Nishi Y, Nakamoto H, Nonaka H, Takayama Y, Autio J, Ikehira H, Kanno I (2010) Monitoring of liver glycogen synthesis in diabetic patients using carbon-13 mr spectroscopy. *European journal of radiology* 73:300-304

Tosello-Trampont AC, Landes SG, Nguyen V, Novobrantseva TI, Hahn YS (2012) Kupffer cells trigger nonalcoholic steatohepatitis development in diet-induced mouse model through tumor necrosis factor-alpha production. *The Journal of biological chemistry* 287:40161-40172

Tu WC, Muhlhauser BS, Yelland LN, Gibson RA (2013) Correlations between blood and tissue omega-3 lcpufa status following dietary ala intervention in rats. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 88:53-60

Turpin SM, Hoy AJ, Brown RD, Rudaz CG, Honeyman J, Matzaris M, Watt MJ (2011) Adipose triacylglycerol lipase is a major regulator of hepatic lipid metabolism but not insulin sensitivity in mice. *Diabetologia* 54:146-156

Tyynismaa H, Raivio T, Hakkarainen A, Ortega-Alonso A, Lundbom N, Kaprio J, Rissanen A, Suomalainen A, Pietilainen KH (2011) Liver fat but not other adiposity measures influence circulating fgf21 levels in healthy young adult twins. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 96:E351-355

Ueshima H, Stamler J, Elliott P, Chan Q, Brown IJ, Carnethon MR, Daviglius ML, He K, Moag-Stahlberg A, Rodriguez BL, Steffen LM, Van Horn L, Yarnell J, Zhou B, Group IR (2007) Food omega-3 fatty acid intake of individuals (total, linolenic acid, long-chain) and their blood pressure: Internap study. *Hypertension* 50:313-319

Umeda-Sawada R, Ogawa M, Nakamura M, Igarashi O (2001) Effect of sesamin on mitochondrial and peroxisomal beta-oxidation of arachidonic and eicosapentaenoic acids in rat liver. *Lipids* 36:483-489

Valdivielso P, Rioja J, Garcia-Arias C, Sanchez-Chaparro MA, Gonzalez-Santos P (2009) Omega 3 fatty acids induce a marked reduction of apolipoprotein b48 when added to fluvastatin in patients with type 2 diabetes and mixed hyperlipidemia: A preliminary report. *Cardiovascular diabetology* 8:1

Valle A, Hoggard N, Adams AC, Roca P, Speakman JR (2008) Chronic central administration of apelin-13 over 10 days increases food intake, body weight, locomotor activity and body temperature in c57bl/6 mice. *J Neuroendocrinol* 20:79-84

van den Ouweland JM, Lemkes HH, Ruitenbeek W, Sandkuijl LA, de Vijlder MF, Struyvenberg PA, van de Kamp JJ, Maassen JA (1992) Mutation in mitochondrial trna(leu)(uur) gene in a large pedigree with maternally transmitted type ii diabetes mellitus and deafness. *Nature genetics* 1:368-371

van Dijk TH, van der Sluijs FH, Wiegman CH, Baller JF, Gustafson LA, Burger HJ, Herling AW, Kuipers F, Meijer AJ, Reijngoud DJ (2001) Acute inhibition of hepatic glucose-6-phosphatase does not affect gluconeogenesis but directs gluconeogenic flux toward glycogen in fasted rats. A pharmacological study with the chlorogenic acid derivative s4048. *The Journal of biological chemistry* 276:25727-25735

Vanni E, Bugianesi E, Kotronen A, De Minicis S, Yki-Jarvinen H, Svegliati-Baroni G (2010) From the metabolic syndrome to nafld or vice versa? *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* 42:320-330

Varanasi U, Chu R, Huang Q, Castellon R, Yeldandi AV, Reddy JK (1996) Identification of a peroxisome proliferator-responsive element upstream of the human peroxisomal fatty acyl coenzyme a oxidase gene. *The Journal of biological chemistry* 271:2147-2155

Vassilatou E, Lafoyianni S, Vryonidou A, Ioannidis D, Kosma L, Katsoulis K, Papavassiliou E, Tzavara I (2010) Increased androgen bioavailability is associated with non-alcoholic fatty liver disease in women with polycystic ovary syndrome. *Human reproduction* 25:212-220

Velasco G, Geelen MJ, Guzman M (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* 337:169-175

Ventre J, Doebber T, Wu M, MacNaul K, Stevens K, Pasparakis M, Kollias G, Moller DE (1997) Targeted disruption of the tumor necrosis factor-alpha gene: Metabolic consequences in obese and nonobese mice. *Diabetes* 46:1526-1531

- Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J, Godbout K, Parsons T, Baronas E, Hsieh F, Acton S, Patane M, Nichols A, Tummino P (2002) Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *The Journal of biological chemistry* 277:14838-14843
- Viollet B, Guigas B, Leclerc J, Hebrard S, Lantier L, Mounier R, Andreelli F, Foretz M (2009) Amp-activated protein kinase in the regulation of hepatic energy metabolism: From physiology to therapeutic perspectives. *Acta physiologica* 196:81-98
- Virtue S, Vidal-Puig A (2008) It's not how fat you are, it's what you do with it that counts. *PLoS biology* 6:e237
- Volkmar M, Dedeurwaerder S, Cunha DA, Ndlovu MN, Defrance M, Deplus R, Calonne E, Volkmar U, Igoillo-Esteve M, Naamane N, Del Guerra S, Masini M, Bugliani M, Marchetti P, Cnop M, Eizirik DL, Fuks F (2012) DNA methylation profiling identifies epigenetic dysregulation in pancreatic islets from type 2 diabetic patients. *The EMBO journal* 31:1405-1426
- Walley AJ, Asher JE, Froguel P (2009) The genetic contribution to non-syndromic human obesity. *Nature reviews Genetics* 10:431-442
- Wang B, Jenkins JR, Trayhurn P (2005) Expression and secretion of inflammation-related adipokines by human adipocytes differentiated in culture: Integrated response to tnf-alpha. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 288:E731-740
- Wang G, Anini Y, Wei W, Qi X, AM OC, Mochizuki T, Wang HQ, Hellmich MR, Englander EW, Greeley GH, Jr. (2004) Apelin, a new enteric peptide: Localization in the gastrointestinal tract, ontogeny, and stimulation of gastric cell proliferation and of cholecystokinin secretion. *Endocrinology* 145:1342-1348
- Wang G, Qi X, Wei W, Englander EW, Greeley GH, Jr. (2006) Characterization of the 5'-regulatory regions of the rat and human apelin genes and regulation of breast apelin by usf. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20:2639-2641
- Wang S, Wu D, Lamon-Fava S, Matthan NR, Honda KL, Lichtenstein AH (2009) In vitro fatty acid enrichment of macrophages alters inflammatory response and net cholesterol accumulation. *The British journal of nutrition* 102:497-501
- Wang T, Li M, Chen B, Xu M, Xu Y, Huang Y, Lu J, Chen Y, Wang W, Li X, Liu Y, Bi Y, Lai S, Ning G (2012) Urinary bisphenol a (bpa) concentration associates with obesity and insulin resistance. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 97:E223-227
- Wang Y, Quagliarini F, Gusarova V, Gromada J, Valenzuela DM, Cohen JC, Hobbs HH (2013) Mice lacking angptl8 (betatrophin) manifest disrupted triglyceride metabolism without impaired glucose homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110:16109-16114
- Watanabe M, Houten SM, Matakai C, Christoffolete MA, Kim BW, Sato H, Messaddeq N, Harney JW, Ezaki O, Kodama T, Schoonjans K, Bianco AC, Auwerx J (2006) Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature* 439:484-489
- Wattez JS, Ravallec R, Cudennec B, Knauf C, Dhulster P, Valet P, Breton C, Vieau D, Lesage J (2013) Apelin stimulates both cholecystokinin and glucagon-like peptide 1 secretions in vitro and in vivo in rodents. *Peptides*

- Weaver KL, Ivester P, Seeds M, Case LD, Arm JP, Chilton FH (2009) Effect of dietary fatty acids on inflammatory gene expression in healthy humans. *The Journal of biological chemistry* 284:15400-15407
- Wei Y, Wang D, Topczewski F, Pagliassotti MJ (2006) Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 291:E275-281
- Wellhoener P, Fruehwald-Schultes B, Kern W, Dantz D, Kerner W, Born J, Fehm HL, Peters A (2000) Glucose metabolism rather than insulin is a main determinant of leptin secretion in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 85:1267-1271
- Wendel AA, Li LO, Li Y, Cline GW, Shulman GI, Coleman RA (2010) Glycerol-3-phosphate acyltransferase 1 deficiency in ob/ob mice diminishes hepatic steatosis but does not protect against insulin resistance or obesity. *Diabetes* 59:1321-1329
- Wensaas AJ, Rustan AC, Just M, Berge RK, Drevon CA, Gaster M (2009) Fatty acid incubation of myotubes from humans with type 2 diabetes leads to enhanced release of beta-oxidation products because of impaired fatty acid oxidation: Effects of tetradecylthioacetic acid and eicosapentaenoic acid. *Diabetes* 58:527-535
- Whelan WJ (2009) My favorite enzyme: Glycogenin. *IUBMB life* 61:1099-1100
- White DA, Bennett AJ, Billett MA, Salter AM (1998) The assembly of triacylglycerol-rich lipoproteins: An essential role for the microsomal triacylglycerol transfer protein. *The British journal of nutrition* 80:219-229
- Williams CM, Burdge G (2006) Long-chain n-3 pufa: Plant v. Marine sources. *The Proceedings of the Nutrition Society* 65:42-50
- Wong AT, Chan DC, Barrett PH, Adams LA, Watts GF (2013) Supplementation with n3 fatty acid ethyl esters increases large and small artery elasticity in obese adults on a weight loss diet. *The Journal of nutrition* 143:437-441
- Wu HT, Lu FH, Ou HY, Su YC, Hung HC, Wu JS, Yang YC, Wu CL, Chang CJ (2013) The role of hepassocin in the development of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of hepatology*
- Wu JW, Wang SP, Alvarez F, Casavant S, Gauthier N, Abed L, Soni KG, Yang G, Mitchell GA (2011) Deficiency of liver adipose triglyceride lipase in mice causes progressive hepatic steatosis. *Hepatology* 54:122-132
- Wu X, Ma C, Han L, Nawaz M, Gao F, Zhang X, Yu P, Zhao C, Li L, Zhou A, Wang J, Moore JE, Millar BC, Xu J (2010) Molecular characterisation of the faecal microbiota in patients with type ii diabetes. *Current microbiology* 61:69-78
- Wu Y, Zhang C, Dong Y, Wang S, Song P, Viollet B, Zou MH (2012) Activation of the amp-activated protein kinase by eicosapentaenoic acid (epa, 20:5 n-3) improves endothelial function in vivo. *PLoS one* 7:e35508
- Xia M, Liu Y, Guo H, Wang D, Wang Y, Ling W (2013) Retinol binding protein 4 stimulates hepatic sterol regulatory element-binding protein 1 and increases lipogenesis through the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1beta-dependent pathway. *Hepatology* 58:564-575
- Xu A, Lam MC, Chan KW, Wang Y, Zhang J, Hoo RL, Xu JY, Chen B, Chow WS, Tso AW, Lam KS (2005) Angiopoietin-like protein 4 decreases blood glucose and improves glucose tolerance but induces

hyperlipidemia and hepatic steatosis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:6086-6091

Xu J, Lloyd DJ, Hale C, Stanislaus S, Chen M, Sivits G, Vonderfecht S, Hecht R, Li YS, Lindberg RA, Chen JL, Jung DY, Zhang Z, Ko HJ, Kim JK, Veniant MM (2009) Fibroblast growth factor 21 reverses hepatic steatosis, increases energy expenditure, and improves insulin sensitivity in diet-induced obese mice. *Diabetes* 58:250-259

Xu S, Tsao PS, Yue P (2011) Apelin and insulin resistance: Another arrow for the quiver? *Journal of diabetes* 3:225-231

Yamagata K, Daitoku H, Shimamoto Y, Matsuzaki H, Hirota K, Ishida J, Fukamizu A (2004) Bile acids regulate gluconeogenic gene expression via small heterodimer partner-mediated repression of hepatocyte nuclear factor 4 and foxo1. *The Journal of biological chemistry* 279:23158-23165

Yamaguchi K, Yang L, McCall S, Huang J, Yu XX, Pandey SK, Bhanot S, Monia BP, Li YX, Diehl AM (2007) Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 45:1366-1374

Yamamoto T, Shimano H, Nakagawa Y, Ide T, Yahagi N, Matsuzaka T, Nakakuki M, Takahashi A, Suzuki H, Sone H, Toyoshima H, Sato R, Yamada N (2004) Srebp-1 interacts with hepatocyte nuclear factor-4 alpha and interferes with pgc-1 recruitment to suppress hepatic gluconeogenic genes. *The Journal of biological chemistry* 279:12027-12035

Yamamoto T, Habata Y, Matsumoto Y, Yasuhara Y, Hashimoto T, Hamajyo H, Anayama H, Fujii R, Fuse H, Shintani Y, Mori M (2011) Apelin-transgenic mice exhibit a resistance against diet-induced obesity by increasing vascular mass and mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *Biochimica et biophysica acta* 1810:853-862

Yamashita H, Takenoshita M, Sakurai M, Bruick RK, Henzel WJ, Shillinglaw W, Arnot D, Uyeda K (2001) A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:9116-9121

Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T (2002) Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating amp-activated protein kinase. *Nature medicine* 8:1288-1295

Yang C, Lu W, Lin T, You P, Ye M, Huang Y, Jiang X, Wang C, Wang F, Lee MH, Yeung SC, Johnson RL, Wei C, Tsai RY, Frazier ML, McKeehan WL, Luo Y (2013) Activation of liver fgf21 in hepatocarcinogenesis and during hepatic stress. *BMC gastroenterology* 13:67

Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, Kotani K, Quadro L, Kahn BB (2005) Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 436:356-362

Yang SJ, Hwang SY, Choi HY, Yoo HJ, Seo JA, Kim SG, Kim NH, Baik SH, Choi DS, Choi KM (2011) Serum selenoprotein p levels in patients with type 2 diabetes and prediabetes: Implications for insulin resistance, inflammation, and atherosclerosis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 96:E1325-1329

Yang ZX, Shen W, Sun H (2010) Effects of nuclear receptor fxr on the regulation of liver lipid metabolism in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatology international* 4:741-748

- Yasui O, Miura N, Terada K, Kawarada Y, Koyama K, Sugiyama T (1997) Isolation of oval cells from long-evans cinnamon rats and their transformation into hepatocytes in vivo in the rat liver. *Hepatology* 25:329-334
- Yasuzaki H, Yoshida S, Hashimoto T, Shibata W, Inamori M, Toya Y, Tamura K, Maeda S, Umemura S (2013) Involvement of the apelin receptor apj in fas-induced liver injury. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 33:118-126
- Ye JM, Iglesias MA, Watson DG, Ellis B, Wood L, Jensen PB, Sorensen RV, Larsen PJ, Cooney GJ, Wassermann K, Kraegen EW (2003) Pparalpha /gamma ragaglitazar eliminates fatty liver and enhances insulin action in fat-fed rats in the absence of hepatomegaly. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 284:E531-540
- Yi P, Park JS, Melton DA (2013) Betatrophin: A hormone that controls pancreatic beta cell proliferation. *Cell* 153:747-758
- Yokomori H, Oda M, Yoshimura K, Machida S, Kaneko F, Hibi T (2011) Overexpression of apelin receptor (apj/agtr1) on hepatic stellate cells and sinusoidal angiogenesis in human cirrhotic liver. *Journal of gastroenterology* 46:222-231
- Yokomori H, Oda M, Yoshimura K, Hibi T (2012) Enhanced expressions of apelin on proliferative hepatic arterial capillaries in human cirrhotic liver. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* 42:508-514
- Yoon JC, Chickerling TW, Rosen ED, Dussault B, Qin Y, Soukas A, Friedman JM, Holmes WE, Spiegelman BM (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma target gene encoding a novel angiopoietin-related protein associated with adipose differentiation. *Molecular and cellular biology* 20:5343-5349
- Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, Adelmant G, Stafford J, Kahn CR, Granner DK, Newgard CB, Spiegelman BM (2001) Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator pgc-1. *Nature* 413:131-138
- Young TK, Schraer CD, Shubnikoff EV, Szathmary EJ, Nikitin YP (1992) Prevalence of diagnosed diabetes in circumpolar indigenous populations. *International journal of epidemiology* 21:730-736
- Yuan HD, Yuan HY, Chung SH, Jin GZ, Piao GC (2010) An active part of artemisia sacrorum ledeb. Attenuates hepatic lipid accumulation through activating amp-activated protein kinase in human hepg2 cells. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 74:322-328
- Yue P, Jin H, Aillaud M, Deng AC, Azuma J, Asagami T, Kundu RK, Reaven GM, Quertermous T, Tsao PS Apelin is necessary for the maintenance of insulin sensitivity. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 298:E59-67
- Yue P, Jin H, Xu S, Aillaud M, Deng AC, Azuma J, Kundu RK, Reaven GM, Quertermous T, Tsao PS Apelin decreases lipolysis via gq, gi, and ampk-dependent mechanisms. *Endocrinology*
- Zelber-Sagi S, Lotan R, Shibolet O, Webb M, Buch A, Nitzan-Kaluski D, Halpern Z, Santo E, Oren R (2013) Non-alcoholic fatty liver disease independently predicts prediabetes during a 7-year prospective follow-up. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*
- Zhang D, Liu ZX, Choi CS, Tian L, Kibbey R, Dong J, Cline GW, Wood PA, Shulman GI (2007) Mitochondrial dysfunction due to long-chain acyl-coa dehydrogenase deficiency causes hepatic

steatosis and hepatic insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:17075-17080

Zhang J, Wang C, Li L, Man Q, Meng L, Song P, Froyland L, Du ZY (2012a) Dietary inclusion of salmon, herring and pompano as oily fish reduces cvd risk markers in dyslipidaemic middle-aged and elderly chinese women. *The British journal of nutrition* 108:1455-1465

Zhang K, Li L, Qi Y, Zhu X, Gan B, DePinho RA, Averitt T, Guo S (2012b) Hepatic suppression of foxo1 and foxo3 causes hypoglycemia and hyperlipidemia in mice. *Endocrinology* 153:631-646

Zhang R (2012) Lipasin, a novel nutritionally-regulated liver-enriched factor that regulates serum triglyceride levels. *Biochemical and biophysical research communications* 424:786-792

Zhang R, Abou-Samra AB (2013) Emerging roles of lipasin as a critical lipid regulator. *Biochemical and biophysical research communications* 432:401-405

Zhang Y, Lee FY, Barrera G, Lee H, Vales C, Gonzalez FJ, Willson TM, Edwards PA (2006) Activation of the nuclear receptor fxr improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:1006-1011

Zhang YL, Hernandez-Ono A, Ko C, Yasunaga K, Huang LS, Ginsberg HN (2004) Regulation of hepatic apolipoprotein b-lipoprotein assembly and secretion by the availability of fatty acids. I. Differential response to the delivery of fatty acids via albumin or remnant-like emulsion particles. *The Journal of biological chemistry* 279:19362-19374

Zhao Y, Chen LH (2005) Eicosapentaenoic acid prevents lipopolysaccharide-stimulated DNA binding of activator protein-1 and c-jun n-terminal kinase activity. *The Journal of nutritional biochemistry* 16:78-84

Zhen EY, Higgs RE, Gutierrez JA (2013) Pyroglutamyl apelin-13 identified as the major apelin isoform in human plasma. *Analytical biochemistry* 442:1-9

Zhong JC, Huang DY, Liu GF, Jin HY, Yang YM, Li YF, Song XH, Du K (2005) Effects of all-trans retinoic acid on orphan receptor apj signaling in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovascular research* 65:743-750

Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE (2001) Role of amp-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *The Journal of clinical investigation* 108:1167-1174

Zhu S, Sun F, Li W, Cao Y, Wang C, Wang Y, Liang D, Zhang R, Zhang S, Wang H, Cao F (2011) Apelin stimulates glucose uptake through the pi3k/akt pathway and improves insulin resistance in 3t3-l1 adipocytes. *Molecular and cellular biochemistry* 353:305-313

Zierath JR, He L, Guma A, Odegaard Wahlstrom E, Klip A, Wallberg-Henriksson H (1996) Insulin action on glucose transport and plasma membrane glut4 content in skeletal muscle from patients with niddm. *Diabetologia* 39:1180-1189

Zimmer L, Delpal S, Guilloteau D, Aioun J, Durand G, Chalon S (2000) Chronic n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency alters dopamine vesicle density in the rat frontal cortex. *Neuroscience letters* 284:25-28

Zuijdgheest-Van Leeuwen SD, Dagnelie PC, Wattimena JL, Van den Berg JW, Van der Gaast A, Swart GR, Wilson JH (2000) Eicosapentaenoic acid ethyl ester supplementation in cachectic cancer patients and healthy subjects: Effects on lipolysis and lipid oxidation. *Clinical nutrition* 19:417-423