

Le chien, modèle de grand animal pour l'étude de l'insulinorésistance associée à l'obésité

Dogs used as a large animal model of obesity-related insulin resistance

Par Patrick NGUYEN^{(2) (4)}, Constance GAYET⁽²⁾, François BRIAND^{(2) (3)},
Edwige BAILHACHE^{(2) (3)}, Véronique LERAY⁽²⁾, Samuel SERISIER^{(2) (3)},
Khadija OUGUERRAM⁽³⁾, Thierry MAGOT⁽³⁾, Brigitte SILIART⁽²⁾
(communication présentée le 7 octobre 2004)

RÉSUMÉ

Pour des raisons notamment éthiques, il n'est pas possible d'étudier chez l'homme les phénomènes physiopathologiques associés à l'évolution conjointe de l'obésité et de la baisse de sensibilité à l'insuline. L'établissement de modèles animaux reflétant la pathologie humaine paraît donc indispensable. Le chien soumis à un régime hyperlipidique semblait répondre aux critères de sélection d'un modèle adapté à l'étude de ce syndrome. Il n'avait cependant été que peu exploré. Le but de notre travail a été d'une part, d'étudier le métabolisme des lipoprotéines et le transport inverse du cholestérol chez le chien sain, puis chez le chien insulinorésistant (IR) et d'autre part, de caractériser l'évolution des modifications plasmatiques associées à l'insulinorésistance, puis de quantifier, au sein de certains tissus cibles de l'insuline (tissus adipeux viscéral et musculaire), l'expression de gènes impliqués dans ce désordre métabolique.

Chez le chien sain, l'apo B100 (apolipoprotéine B100) apparaît exclusivement dans les VLDL dont la production élevée est associée à un catabolisme important, égal à 5 fois celui de l'homme. Ces lipoprotéines subissent une lipolyse partielle, formant les LDL qui contiennent donc aussi de l'apoB100. L'apoB100 des LDL a un métabolisme similaire à celui de l'homme. Le chien sain ne manifeste pas d'activité CETP (*cholesterol ester transfer protein*) *in vivo*, mais présente un transport inverse du cholestérol très actif, notamment associé à une importante capture sélective du cholestérol estérifié des HDL. Le chien pourrait donc s'avérer le meilleur modèle pour l'étude de la modulation de cette voie de retour du cholestérol. Les profils lipidiques des lipoprotéines, obtenus par chromatographie FPLC chez le chien obèse IR, ont montré les mêmes perturbations que chez l'homme IR. La production d'apo B100 dans les VLDL est augmentée et la lipolyse diminuée. La concentration en apo B100 des LDL est diminuée, conséquence d'une production réduite et d'un catabolisme augmenté. Les résultats obtenus aux niveaux transcriptionnel et plasmatique sont également conformes aux observations effectuées chez l'homme (surexpression du gène de la leptine, sous-expression de celui de l'adiponectine, du GLUT4, de la lipoprotéine lipase, des PPAR et des UCP notamment). Sur les deux plans de l'étude, nos résultats confirment que le chien pourrait constituer un bon modèle d'étude, notamment pour l'élucidation des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de l'insulinorésistance et des dyslipidémies.

Mots-clés : chien, obésité, insulinorésistance, lipoprotéines, apo B100, cholestérol, adipo-cytokines, PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor*), UCP (*uncoupling protein* ou protéine découplante).

(1) Les travaux présentés sont le résultat d'une collaboration suivie entre l'Unité de nutrition et endocrinologie de l'École nationale vétérinaire de Nantes et l'Unité INSERM U539 dans le cadre du Centre de recherche en nutrition humaine de Nantes.

(2) Unité de nutrition et endocrinologie, École nationale vétérinaire de Nantes, B.P. 40706, 44307 Nantes Cedex 3

(3) Unité INSERM U539, Centre hospitalier universitaire de Nantes

(4) Correspondance à P. Nguyen (pnguyen@vet-nantes.fr)

SUMMARY

As for ethical and other reasons, studies of the pathophysiological mechanisms of obesity and its association with insulin resistance (IR) cannot be performed in man, researchers have to use appropriate animal models. Although dogs fed on a high-fat diet seem to meet the requirements to study this human syndrome, the canine model has hardly been used. Our objective was to study the lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport in healthy dogs, then in dogs with insulin resistance. We also aimed to describe the plasmatic changes associated with insulin resistance, and quantify the expression of genes involved in this disorder, in insulin target tissues (visceral adipose tissue and skeletal muscle).

In healthy dogs, apoB100 exclusively appears in VLDL, whose high production is associated with a high fractional catabolism (5-fold greater than that of human). LDL-apoB100 metabolism is similar in dogs and humans. Our results showed that the healthy dog does not exhibit any CETP activity in vivo, and that reverse cholesterol transport is very active, with substantial selective uptake of HDL esterified cholesterol. Consequently, among species with no CETP activity, dogs provide an adequate model to study changes in this selective cholesterol uptake. The anomalies observed in lipoprotein profiles produced by FPLC in IR obese dogs were identical to those seen in IR man. Insulin resistance is associated with a decreased production of LDL apo B100, due to a reduced production, despite the increased catabolism. Both transcription and plasmatic results confirmed those found in man (overexpression of leptin mRNA, underexpression of adiponectin, GLUT4, LPL, PPAR and UCP mRNAs). Therefore, dogs could provide a useful research model, particularly to elucidate the molecular mechanisms involved in the development of insulin resistance and dyslipidemia.

Key words: : dog, obesity, insulin resistance, lipoproteins, apo B100, cholesterol, adipocytokine, PPAR, UCP.

• INTRODUCTION-OBJECTIFS

La littérature scientifique est riche de données expérimentales concernant les relations physiopathologiques entre l'obésité et ses troubles associés comme l'insulinorésistance (IR). Par une approche transversale, les études réalisées chez l'Homme ont permis de caractériser les modifications endocriniennes, métaboliques et cardiovasculaires observées chez les obèses. Souvent assez exhaustives, ces études ne sont cependant souvent que faiblement explicatives des liens entre obésité et baisse de sensibilité à l'insuline.

Leurs résultats sont, souvent encore, parcellaires et parfois contradictoires. Ces ambiguïtés reposent, en partie au moins, sur la difficulté de constituer des groupes de patients, obèses et insulinorésistants, parfaitement homogènes, en particulier dans l'historique de leur surcharge pondérale. De nombreuses données proviennent d'études longitudinales menées en cours d'amaigrissement. L'utilisation de ces résultats expérimentaux pour la compréhension des phénomènes survenant lors de l'acquisition de l'obésité postule que la mise en place des troubles se fait en miroir de leur réversibilité. Cette hypothèse peut se vérifier pour certains phénomènes, mais de nombreux autres processus n'apparaissent pas réversibles lors d'une perte de poids. La connaissance des processus liant l'obésité à son cortège de troubles (dont la baisse de sensibilité à l'insuline) reste donc souvent extrapolée à partir de données contradictoires. Pour des raisons éthiques évidentes, il est impossible d'étudier, chez l'Homme, les phénomènes physiopathologiques survenant lors de l'acquisition de l'obésité et de l'évolution vers l'insulinorésistance. Pour mieux comprendre les liens entre les éléments du syndrome d'insulinorésistance, une approche longitudinale apparaît plus prometteuse. Pour la mener à bien et observer la succession des événements lors de l'acquisition

de l'obésité, l'établissement d'un modèle expérimental nous a paru constitué un élément des plus utiles.

En plus des critères de faisabilité et de reproductibilité que doit posséder tout modèle expérimental, celui-ci devait présenter obésité et insulinorésistance. La littérature scientifique mentionne un grand nombre de modèles rongeurs présentant cette association. Toutefois, dans le choix d'un modèle proche de l'homme, la sélection d'une espèce de rongeur ne semble pas la plus judicieuse. À l'inverse de l'obésité spontanée liée à une atteinte génétique, l'obésité induite par manipulation nutritionnelle semble mieux adaptée pour tenter d'approcher au plus près l'étiologie de l'obésité « spontanée » de l'Homme.

L'espèce animale choisie devait en outre permettre l'investigation itérative d'un même individu. D'aucuns avaient déjà suggéré que le chien soumis à un régime hyperlipidique pourrait présenter un « profil » proche de l'association obésité-insulinorésistance de l'homme (ROCCHINI *et al.*, 1987) et répondrait aux critères de sélection d'un modèle adapté à l'étude de ce syndrome.

Le chien a été utilisé dans le cadre de nombreuses études concernant la physiologie de l'insuline, l'obésité et certains troubles associés ou encore les différences tissulaires de sensibilité à l'insuline. En revanche, les perturbations endocriniennes et métaboliques relatives au développement de l'insulinorésistance n'avaient été que très peu décrites dans cette espèce. C'est ce qui, outre notre intérêt intrinsèque pour le chien et même pour le chien obèse en particulier (un malade trop souvent ignoré), a motivé nos travaux qui ont consisté à développer un modèle d'obésité presque comparable au syndrome spontané. Nous avons, sur ce modèle, étudié parallèlement les perturbations du

métabolisme des lipoprotéines et les modifications plasmatiques et cellulaires associées à l'installation de l'obésité et de l'insulinorésistance. Nous continuons de le faire, ce qui explique pourquoi nous nous référons aussi à des communications récentes et à des travaux en cours de publication dans leur continuité.

• TRAVAUX ANTÉRIEURS UTILISANT UN MODÈLE CANIN

Le chien modèle d'étude de l'hypertension

Depuis 1987, le groupe d'A. Rocchini (University of Michigan) a développé un modèle de chiens rendus obèses, insulinorésistants et hypertendus par un régime hyperlipidique hypersodique de 5 à 7 semaines (ROCCHINI *et al.*, 1987, 1989 ; ROCCHINI, MARKER et CERVENKA, 1997 ; ROCCHINI *et al.*, 1999). Les régimes administrés dans leurs études représentaient environ 5 fois l'apport énergétique recommandé et près de 80% de l'apport énergétique total était sous forme de lipides, alors que l'apport calorifique protéique était d'à peine 5%. Les chiens ont pris 15 à 20 % de leur poids initial, étaient hyperinsulinémiques, insulinorésistants et présentaient des variations significatives des paramètres relatifs à l'hypertension, telle une augmentation du volume plasmatique, de la pression sanguine et des modifications des concentrations d'hormones impliquées dans la régulation de la pression sanguine (adrénaline, aldostérone). Parmi les facteurs pouvant être responsables, au moins en partie, de la rétention sodique, l'insulinorésistance, une altération du système rénine-angiotensine ou une altération du système nerveux sympathique sont fréquemment citées. Verwaerde et collaborateurs ont repris et modifié le modèle de chien obèse, développé par l'équipe de Rocchini, afin d'étudier les modifications de l'activité du système nerveux autonome et du métabolisme du tissu adipeux au cours du développement d'une obésité nutritionnelle et de l'insulinorésistance (VERWAERDE *et al.*, 1996, 1997 ; MASSABUAU *et al.*, 1997). La période d'engraissement par un régime gras normosodique avait été fixée à 20 semaines et la répartition des calories lipidiques et protéiques étaient quasiment similaires à celle décrite dans les études de Rocchini. Ces auteurs ont montré que chez le chien, comme chez l'homme, une augmentation du poids corporel d'environ 20% s'accompagnait d'une augmentation de la pression artérielle, de la fréquence et du débit cardiaques. Leurs travaux ont permis de spécifier que l'hypertension développée par des chiens soumis au même régime hypergras était de type volodépendante. Par ailleurs, l'activité orthosympathique augmentait lors de la phase d'installation de l'obésité et de l'hypertension artérielle, alors que le tonus parasympathique diminuait dès le début de la prise de poids. Enfin, l'évaluation *in vivo* de l'activité lipolytique a montré que la lipomobolisation β -adrénergique augmentait pendant la période d'installation de l'obésité.

VILLA *et al.* (1998) se sont intéressés à l'évolution de l'insulinorésistance et à ses conséquences vasculaires et cardiaques. Ils ont observé que la prise de poids s'ac-

compagnait d'une hyperglycémie, d'une hyperinsulinémie et d'une dyslipidémie (teneurs en triglycérides et en cholestérol total élevées) et comme cela avait déjà été montré, d'une augmentation de la pression sanguine. Ils ont, de plus, mis en évidence une hypertrophie vasculaire et cardiaque secondaire au développement de l'insulinorésistance et de l'obésité. À notre connaissance, c'est la seule équipe à avoir travaillé sur un modèle de chien rendu obèse suite à une longue période de suralimentation, de plus d'un an. On ne peut toutefois que souligner le caractère excessif du régime utilisé.

Le chien modèle d'étude de la physiologie de l'insulinorésistance

Peu d'équipes, en dehors de celles qui ont étudié l'hypertension, ont utilisé le chien comme modèle d'étude de l'obésité et des maladies associées. L'équipe de R. Bergman (University of South California) a publié de nombreux travaux menés sur un modèle chien présentant spécifiquement une obésité viscérale, afin d'étudier l'implication de ce type de tissu adipeux dans l'insulinorésistance et l'homéostasie glucidique. Dans leurs études, les chiens étaient devenus modérément obèses suite à un régime d'une durée de 4 à 12 semaines, dont l'apport de calories lipidiques représentait 33 à 38 % de l'apport calorifique total (de 3900-4300 kcal/jour selon les études). Des perfusions d'insuline directement au niveau omental ou au niveau porte leur ont permis de montrer que le tissu adipeux abdominal, drainé par la veine porte, constituait un site très insulinorésistant (MITTLEMAN *et al.*, 2002). Néanmoins, la tolérance au glucose chez les animaux obèses n'est pas diminuée, la réponse au glucose des cellules β -pancréatiques étant augmentée pour compenser la résistance à l'insuline (MITTLEMAN *et al.*, 2000). Dans une étude plus récente, le même groupe a montré qu'avec un apport énergétique non accru, l'augmentation de 36 à 44 % de la part des lipides dans cet apport, était susceptible de provoquer, sans augmentation significative du poids des chiens, un accroissement de quelque 75 % de la masse adipeuse viscérale et de 180 % du tissu adipeux sous-cutané (KIM *et al.*, 2003). Les animaux étaient hyperinsulinémiques, l'insulinorésistance au niveau périphérique était modérée ; en revanche, pendant les clamps, l'insuline était incapable de supprimer la production hépatique de glucose, suggérant que la résistance du foie à l'insuline serait une des premières anomalies dans le développement de cette maladie.

Autres études concernant la sensibilité à l'insuline

Nous avons donné quelques détails sur les études antérieures ayant eu trait aux relations insulinorésistance-hypertension ou à la physiologie de l'insulinorésistance, parce que ces études ont porté sur des chiens dont le régime avait été modifié, de façon plus ou moins drastique et pour une durée plus ou moins longue, dans le même sens que ce que nous avons projeté. Il conviendrait sans doute d'en ajouter quelques autres (KAIYALA *et al.*, 1999, notamment) mais elles ont eu les mêmes objectifs et des modalités proches des essais de Rocchini par exemple. Il nous faut encore mentionner, sans pour autant prétendre à

l'exhaustivité, certains autres travaux également relatifs à l'un ou l'autre des domaines que nous avons envisagés, ainsi le modèle d'insulinorésistance induite par le fructose. Recevant un régime apportant 60 % de l'énergie sous forme de fructose pendant 28 jours, les chiens deviennent insulinorésistants sans hyperinsulinémie, ni hypertension ni modification de la fonction rénale (MARTINEZ, RIZZA et ROMERO, 1994). Le modèle ne semble pas avoir été davantage utilisé, peut-être en raison de l'inconstance de l'hypertension (PAMIES-ANDREU *et al.*, 1995).

Ainsi devons-nous également mentionner les nombreuses études de l'équipe d'A. Cherrington (Vanderbilt University), qui a choisi le chien comme terrain d'étude de la physiologie de la sécrétion et de l'action de l'insuline : les chiens étaient en général normaux et recevaient une alimentation qui n'était pas davantage au cœur de la question étudiée (notamment MOORE *et al.*, 2000, 2002 ; IGAWA *et al.*, 2002).

• DÉVELOPPEMENT DU MODÈLE CHIEN OBÈSE INSULINORÉSISTANT

Dans le cadre de deux projets régionaux pilotés par le Centre de recherche en nutrition humaine de Nantes concernant les lipoprotéines et le HDL-cholestérol, nous avons cherché à développer et caractériser un modèle de grand animal obèse, insulinorésistant et à taux réduit de HDL-cholestérol.

Nous avons procédé à deux séries de travaux, en tenant compte des critiques que l'on pouvait faire aux travaux précédemment publiés (tableau 1), c'est-à-dire principalement en améliorant la « qualité » des régimes et en ne cherchant pas une prise de poids trop rapide pour mimer l'évolution spontanée que connaît en général l'obésité.

Dans la première étude (BAILHACHE *et al.*, 2003c ; GAYET *et al.* 2004a), nous avons utilisé des Beagle mâles, âgés de 2 à 7 ans, et leur avons distribué pendant 6 à 9 mois un aliment hyperénergétique à quelque 54 pour cent de calories d'origine lipidique et 24 d'origine protéique.

Les animaux ont consommé à volonté, à un niveau qui, sur l'ensemble de la période, s'est situé à environ 1,9 fois la recommandation d'apport énergétique pour l'entretien (NRC, 1985), déterminé sur la base du poids en début d'essai. La prise de poids des animaux a été de $43 \pm 5\%$. Elle ne fut pas accompagnée d'une quelconque augmentation de la glycémie à jeun, alors que l'insulinémie fut significativement accrue (passant de 10 à 24 $\mu\text{U/mL}$ entre l'état initial et le stade obèse). L'insulinorésistance a été confirmée par la méthode du clamp euglycémique hyperinsulinémique, qui a révélé une baisse de l'ordre de 43 % de la sensibilité à l'insuline (taux de perfusion de glucose pour maintenir l'euglycémie, diminué de 28 à 16 mg/kg/min). Nous avons par ailleurs montré, en utilisant une perfusion constante de glucose deutéré, que la production hépatique de glucose était totalement inhibée pendant la perfusion d'insuline, ce qui confirmait que le taux de perfusion de glucose pendant le clamp était bien le reflet direct de la sensibilité à l'insuline.

La seconde étude a porté sur des Beagle femelles ovariectomisées, âgées d'environ un an et demi (GAYET *et al.*, 2003b ; GAYET *et al.*, 2004b). Nous avons utilisé un régime un peu moins hyperénergétique que précédemment, dont la structure énergétique était de 45 % de calories d'origine lipidique et 25 % d'origine protéique. Dans ce régime destiné à « promouvoir » l'insulinorésistance au moins autant que l'obésité, nous avons cherché à cumuler certains facteurs (dé)favorables. Ainsi, les lipides étaient-ils plutôt riches en acides gras saturés (55 %) et mono-insaturés (30 %), tandis que le rapport $\omega 3/\omega 6$ était de l'ordre de 0,25. Les glucides

Auteurs	Nb semaines	Prise de poids totale	Prise de poids hebdomadaire	Ingéré énergétique (multiple de l'entretien)	% calories lipidiques	% calories protéiques	Objectifs des études
Verwaerde <i>et al.</i> 1996	7	13%	1,70%	4,8	78%	3%	Insulinorésistance Hypertension artérielle
Massabuau <i>et al.</i> 1997	20	28%	1,23%	5,3	81%	3%	
Verwaerde <i>et al.</i> 1998	10	22%	2,05%	5,1	80%	3%	
Rocchini <i>et al.</i> 1997	6	16%	2,45%	5,7 (+ 8100 kcal/j)	78%	5%	
Rocchini <i>et al.</i> 1999	6	17%	2,70%	5,4	76%	6%	
Villa <i>et al.</i> 1998	13	45%	2,90%	13	94%	2%	Obésité Insulinorésistance Hypertension
Kaiyala <i>et al.</i> 1999	7	18%	2,40%	2,2	80%		Obésité Insulinorésistance
Mittelman <i>et al.</i> 2000-02	12	n.s.	—	(+500 kcal/j)	23% ? 33%	n.i.	Insulinorésistance du tissu adipeux viscéral
Kim <i>et al.</i> 2003	12	n.s.	—	n.s.	36% ? 44%	n.i.	
Bailhache <i>et al.</i> 2002...	28	43%	1,30%	1,9	54%	24%	Obésité Insulinorésistance Paramètres plasmatiques Paramètres moléculaires
Gayet <i>et al.</i> 2003...	78	44%	0,67%	1,36	55%	20%	

Tableau 1 : Résumé des principales études ayant eu pour but d'induire l'insulinorésistance chez le chien en le soumettant à des régimes hyperénergétiques et/ou hyperlipidiques.

assimilables avaient quant à eux, été choisis pour leur indice glycémique élevé (saccharose 30 %, amidon prégélatinisé 70 %) et le taux de fibre n'excédait pas 6 %.

Pendant une période de 18 mois, la prise de poids des animaux a été en moyenne de 44%, ce qui représentait un taux hebdomadaire de l'ordre de 0,66%. La consommation énergétique des chiens avait été de l'ordre de 1,4 fois la recommandation NRC. Bien que la prise de poids ait été du même ordre que dans la première étude, la baisse de sensibilité à l'insuline fut moindre, le taux de perfusion du glucose nécessaire à l'euglycémie au cours du clamp ne diminuant que de quelque 30 % (de 21 à 15 mg/kg/min).

Outre ces variations de poids et de sensibilité à l'insuline, les animaux ont, dans les deux études, présenté une hypertriglycéridémie (augmentation de 0,26 à 0,76 et de 0,43 à 0,76 mmol/L respectivement dans la première et la seconde étude). L'hypertriglycéridémie est la plus commune des anomalies du métabolisme lipidique associées à l'insulinorésistance (y compris chez l'homme). Par ailleurs, contrairement à un certain nombre des études antérieures que nous avons citées, les animaux obèses ne présentèrent qu'une modeste (et non significative) hypertension.

Le chien rendu obèse et insulinorésistant, de manière « douce », comparable à ce qui se passe spontanément avec un régime qui n'avait rien à envier à certains autres

communément utilisés, nous a donc paru constituer un bon modèle pour l'étude des modifications du métabolisme des lipoprotéines associées à l'insulinorésistance, indépendamment des modifications vasculaires.

Nous avons également pour objectifs d'une part, d'identifier des marqueurs précoces et sensibles de la baisse de la sensibilité à l'insuline et d'autre part, dans le cadre d'une induction par un régime riche en lipides et riche en glucides à fort index glycémique, d'évaluer la cinétique de la baisse de la sensibilité à l'insuline, et de caractériser les perturbations métaboliques et hormonales qui précèdent ou accompagnent celles des lipoprotéines.

À plus long terme, il s'agissait aussi d'examiner, dans notre modèle, quels pouvaient être les facteurs aggravant de la baisse de la sensibilité à l'insuline et des modifications du métabolisme des lipoprotéines en examinant l'influence des apports glucidique et lipidique (taux d'incorporation, ratio glucides/lipides, nature des glucides, équilibre des acides gras).

• LIPOPROTÉINES, CHOLESTÉROL ET INSULINORÉSISTANCE

Les profils lipoprotéiques du chien sain sont connus depuis longtemps (MAHLEY et WEISGRABER, 1974 ; ROGERS, 1977 ; JULIEN, FONG et ANGEL, 1988 ; MALDONADO *et al.*, 2001 ; MALDONADO, CASANAVE et AVELDANO, 2002) et il est bien établi que les HDL sont les principales lipoprotéines et les transporteurs majoritaires du cholestérol chez le chien contrairement à l'homme où ce sont les LDL (CHAPMAN, 1986). Cependant, malgré un profil lipidique basal très différent

de l'homme, le chien pourrait être un bon modèle d'études des perturbations du métabolisme des lipoprotéines et du cholestérol consécutives à l'insulinorésistance.

L'analyse cinétique du métabolisme de l'apo B100 (apolipoprotéine B100) des chiens sains nous a permis de caractériser la voie du métabolisme de l'apo B100, qui apparaît être moins complexe que chez l'homme. Chez celui-ci en effet, une cascade de délipidation des VLDL, une synthèse séquentielle d'apo B100-VLDL, une hétérogénéité cinétique des VLDL et LDL ainsi qu'une synthèse directe d'IDL et de LDL compliquent la modélisation. Chez le chien, pour lequel on n'a pas mis en évidence d'IDL, un modèle simple comportant 3 compartiments permet de caractériser cette voie. Seules deux études très partielles avaient porté sur le métabolisme de l'apo B100 chez le chien (KOVANEN *et al.*, 1981 ; MAHLEY *et al.*, 1981) et elles n'avaient fourni d'informations que sur le métabolisme de l'apo B100 des LDL.

Métabolisme des lipoprotéines à apolipoprotéine B100

Chez le chien sain

Nous avons étudié le métabolisme du cholestérol, des VDL et des LDL par des études cinétiques comportant un double marquage isotopique (¹³C-acétate pour le cholestérol, leucine deutérée pour l'apo B100). Nous avons calculé des paramètres cinétiques après caractérisation du modèle concernant les esters de cholestérol des lipoprotéines à apo B100, ce qui nous a permis de modéliser simultanément le métabolisme de l'apo B100 des VLDL et LDL et celui du cholestérol.

Pour tenir compte de l'hétérogénéité des VLDL, nous avons inclus un compartiment de *VLDL remnants*, comme cela est classiquement décrit chez l'homme (BELTZ *et al.*, 1985). L'apo B100 entre dans la circulation plasmatique exclusivement par les VLDL, dont la production est deux fois celle de l'homme. Néanmoins, le catabolisme (*fractional catabolic rate*) très élevé (5 à 7 fois celui de l'homme) a pour conséquence une très faible concentration plasmatique d'apo B100 des VLDL, ce qui explique les difficultés d'analyse de cette classe de lipoprotéines. Ce catabolisme avait la même valeur dans le cas de l'apo B100 et des esters de cholestérol. En ce qui concerne les VLDL, la sortie du pool correspondait pour un quart environ, à une capture directe des particules, les trois autres quarts correspondant à la conversion des VLDL en LDL qui représentait la seule source de LDL (BAILHACHE *et al.*, 2004). L'apo B100 des LDL a, quant à elle, un métabolisme (production, catabolisme et concentration) similaire à celui des LDL de l'homme et nos résultats sont en accord avec ceux de MAHLEY *et al.* (1981) et de KOVANEN *et al.* (1981).

Chez le chien insulinorésistant

Nous avons mentionné qu'une faible sensibilité à l'insuline était associée à une élévation de la triglycéridémie. Celle-ci est la conséquence d'une augmentation des VLDL-

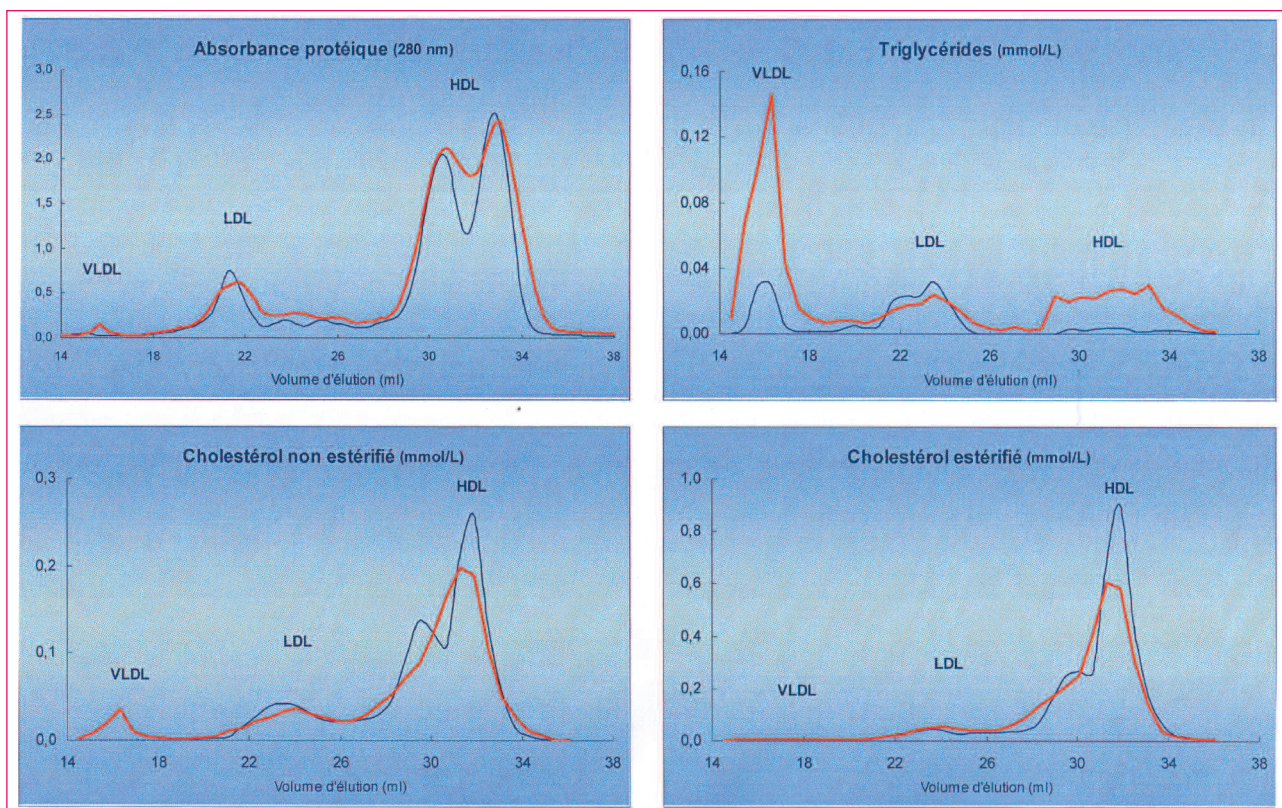


Figure 1 : Modification des profils lipoprotéiques chez le chien insulinorésistant, (en bleu : profils lipoprotéiques du chien sain ; en rouge : du chien insulinorésistant).

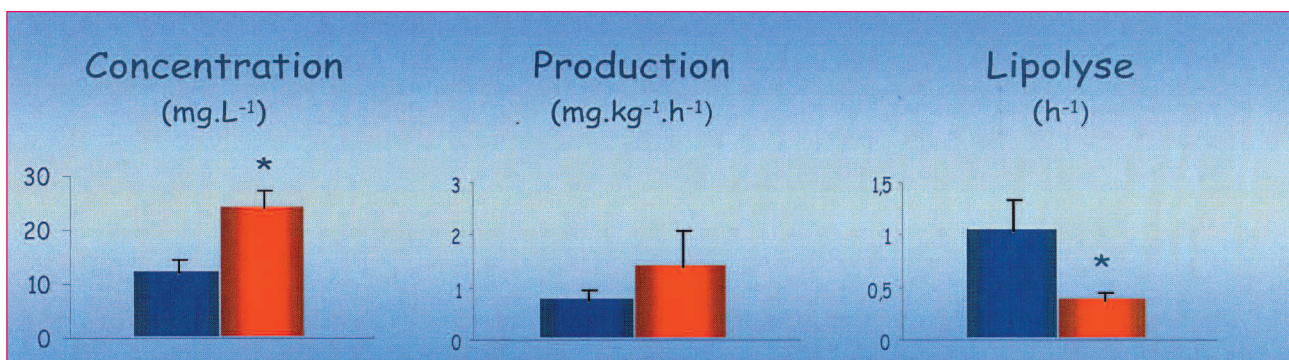


Figure 2 : Modification du métabolisme des VLDL chez le chien insulinorésistant, (en rose : profils lipoprotéiques du chien sain ; en bleu : du chien insulinorésistant). [Différence significative, $p < 0,05$, $n = 6$]

triglycérides (de 0,071 à 0,382 mmol/L) et des HDL-triglycérides (de 0,025 à 0,242 mmol/L). Les autres anomalies lipidiques communes chez l'homme insulinorésistant étaient aussi présentes chez le chien obèse : diminution du HDL-cholestérol (de 4,69 à 3,94 mmol/L) et nette augmentation des acides gras non estérifiés circulants (de 0,974 à 1,590 mmol/L) (BAILHACHE *et al.*, 2003a). La **figure 1** montre les principales modifications des profils lipoprotéiques chez le chien insulinorésistant.

Notre modèle d'étude du métabolisme des lipoprotéines contenant l'apolipoprotéine B100 a été appliqué aux mêmes chiens après installation de l'insulinorésistance. Les cinétiques de l'apolipoprotéine B100 dans les VLDL et les LDL ont été étudiées par modélisation compartimentale chez le chien sain, puis insulinorésistant, en utilisant l'incorporation de la leucine au cours d'une perfusion de leucine deutérée (BAILHACHE *et al.*, 2003b ; résultats en cours de publication).

Les concentrations en apoB100 étaient supérieures (doubles) dans les VLDL mais moindres (50 %) dans les LDL des chiens insulinorésistants. L'analyse cinétique a mis en évidence une légère augmentation (de 40%, mais non significative) de la production totale d'apoB100, liée à une surproduction de VLDL (de 85 %, non significative non plus). Les chiens insulinorésistants étaient encore caractérisés par un moindre catabolisme des VLDL (50%) principalement associé à une diminution de la lipolyse (de quelque 65%). La surproduction associée à un taux de catabolisme réduit des VLDL aboutit à un nombre deux fois plus élevé de ces particules. La moindre teneur en LDL-apoB100 chez le chien insulinorésistant aurait résulté, malgré un catabolisme accru (doublé), d'une production également réduite (de 25%). La **figure 2** montre l'évolution du métabolisme des VLDL et la **figure 3** résume les modifications de la voie apo B100 chez le chien insulinorésistant.

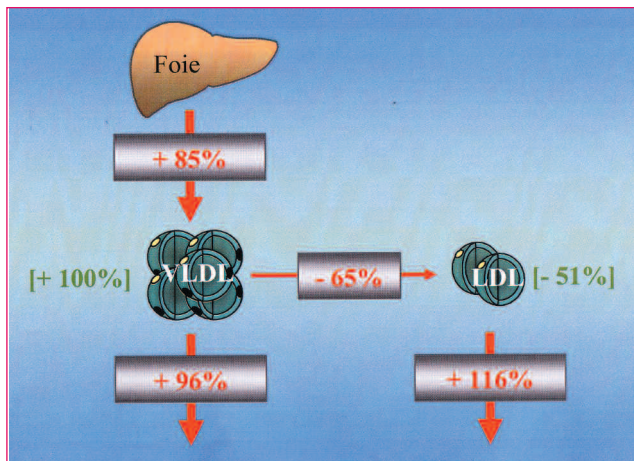


Figure 3 : Conséquences de l'insulinorésistance sur la filière à apo B100 (en vert : concentrations ; en rouge : débits). (L'insulinorésistance est caractérisée, chez le chien, par une surproduction hépatique de VLDL. Bien que leur capture directe soit augmentée, la diminution significative de la lipolyse entraîne une augmentation de la concentration de l'apo B 100 qui leur est associée. Cette baisse de la lipolyse provoque, dans les LDL, la diminution de la concentration en apo B100, phénomène accentué par un catabolisme augmenté.)

Ces résultats montraient que chez le chien, la baisse de sensibilité à l'insuline était responsable de profondes modifications du métabolisme des lipoprotéines à apo B100 et que les mécanismes en cause étaient identiques à ceux décrits chez l'homme dans la même situation (DUVILLARD *et al.*, 2000 ; CHAN *et al.*, 2002 ; PONT *et al.*, 2002), notamment la perte de l'effet stimulant de l'insuline à l'égard de la dégradation de l'apo B100 nouvellement synthétisée (SPARKS et SPARKS, 1990 ; SPARKS et SPARKS, 1994 ; MASON, 1998). De plus, la baisse de la stimulation du PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor*) sous contrôle de l'insuline, entraîne, en situation d'insulinorésistance, une diminution de la synthèse de LPL (lipoprotéine lipase) et une augmentation d'apo CIII (CHAN *et al.*, 2002), l'inhibiteur de la LPL (WANG *et al.*, 1985) et contribue ainsi à l'accumulation de VLDL.

Métabolisme du cholestérol

Chez le chien sain

Chez l'homme, le transport des esters de cholestérol du plasma au foie (transport inverse) implique trois modalités. Il s'agit en premier lieu de deux voies directes faisant intervenir soit l'apolipoprotéine A-I, soit le récepteur SRB-I hépatique, responsable de la capture sélective des esters de cholestérol des HDL. La troisième voie est une voie indirecte comportant des transferts d'esters de cholestérol des HDL aux VDL et LDL grâce à une protéine (de transfert) la CETP (*cholesterol ester transfer protein*). Parmi ces modalités, la capture sélective des esters de cholestérol fait l'objet d'un intérêt croissant parce que particulièrement utile pour réduire le risque athérogène. Le chien a souvent été décrit comme une espèce à très faible activité CETP. Bien que cette activité *in vitro* ait le plus souvent été estimée comme étant négligeable (CHEUNG, WOLFBAUER et ALBERS, 1996 ;

GUYARD-DANGREMONT *et al.*, 1998 ; TSUTSUMI, HAGI et INOUE, 2001), une étude a cependant montré qu'elle pourrait être égale à 27% de celle de l'homme (HA et BARTER, 1982), ce qui ne serait plus négligeable.

Nous avons donc cherché à quantifier cette voie d'épuration chez le chien, réputé pour n'avoir qu'une faible (voir nulle) activité du CETP. Pour ce faire, nous avons procédé à des études cinétiques et isotopiques, en utilisant du ^{13}C -acétate et de la D 3 -leucine comme marqueur précurseur du cholestérol et de l'apo A-I respectivement. Les résultats cinétiques ont fait l'objet d'une analyse compartimentale. Celle-ci a en premier lieu révélé que, chez les chiens normaux (non obèses), on ne pouvait mettre en évidence de transfert d'esters de cholestérol des HDL aux lipoprotéines moins denses, ce qui confirmait l'absence d'activité CETP, dans cet état physiologique au moins (OUGUERRAM *et al.*, 2004).

L'épuration du cholestérol ne concerne donc chez le chien sain que les voies directes, capture sélective ou prélèvement tissulaire apo A-I dépendant. Les résultats de notre étude ont révélé que la capture sélective (par l'intermédiaire du récepteur SR-BI) représentait quelque 60% du turnover total des esters de cholestérol des HDL (OUGUERRAM *et al.*, 2004 ; BAILHACHE *et al.*, 2002 ; BAILHACHE *et al.*, 2003d), ce qui confère au chien une caractéristique très originale. Chez l'homme, en effet, les transferts dépendant de la CETP représentent 82% du turnover, la capture sélective 11% seulement. Chez le rat et la souris, également dépourvus d'activité CETP, le prélèvement apo A-I dépendant représente entre 70 et 75% du turnover et la capture sélective 25 à 30% (OUGUERRAM *et al.*, 2004).

Nos résultats renforçaient l'idée que le chien, malgré son profil lipoprotéique, compte tenu des modifications mises en évidence lors d'insulinorésistance, pourrait se révéler extrêmement utile pour l'étude de la capture sélective du cholestérol et de sa modulation dans des situations pathologiques ou en réponse à des agents pharmacologiques ou à des manipulations nutritionnelles.

Dans une étude simultanée, nous avons étudié en parallèle le métabolisme de l'apo B100 et des esters de cholestérol des VLDL et des LDL, en utilisant les mêmes méthodes isotopiques. Pour l'essentiel, cette exploration cinétique du métabolisme du cholestérol de la filière à apo B100 nous a permis de montrer (BAILHACHE *et al.*, 2003e) qu'il n'était pas nécessaire d'introduire de mouvements de cholestérol estérifié des HDL vers les VLDL et les LDL pour modéliser le devenir du cholestérol estérifié des lipoprotéines à apo B100. Par ailleurs, les sorties de VLDL- et LDL-CE se faisaient au même rythme que l'apo B100, c'est-à-dire sans sortie de cholestérol estérifié dissociée de celle de l'apo B100. Par cette étude *in vivo*, nous avons donc obtenu une preuve cinétique, renforcée par les données massiques, que le chien sain ne possède pas d'activité CETP *in vivo*.

Chez le chien insulinorésistant

Nous n'avons pas encore publié nos résultats concernant d'éventuelles modifications du métabolisme du cho-

lestérol en rapport avec l'insulinorésistance. Néanmoins, nos études ont montré une baisse de la capture sélective du cholestérol estérifié des HDL. Cette baisse s'accompagne d'une augmentation de la production et du catabolisme de l'apo A-I des HDL, comme on a pu le constater également chez l'homme (FRENAIS *et al.*, 1997; DUVILLARD *et al.*, 2000).

En résumé, nos résultats ont donc globalement confirmé, qu'au moins sur le plan du métabolisme des lipoprotéines (et donc du transport inverse du cholestérol), le chien pourrait constituer un bon modèle d'évaluation des traitements susceptibles de compenser la baisse de sensibilité à l'insuline. Toutefois, s'il semble être un bon modèle pour ses similitudes avec l'homme, il est important de souligner que c'est peut-être en tant que contre-modèle que le chien trouve tout son intérêt. En effet, c'est une espèce *a priori* protégée vis-à-vis de l'athérosclérose, les HDL étant les principaux transporteurs de cholestérol. Du fait de mouvements de cholestérol estérifié de très faible intensité (absence ou faible activité de la CETP), le chien privilégie la capture du cholestérol estérifié des HDL et la capture directe des HDL par le foie, éléments clairement antiathérogènes dans le transport inverse du cholestérol. Ce modèle pourrait donc être utile pour des études concernant spécifiquement la modulation pharmacologique ou nutritionnelle de cette voie.

• INSULINORÉSISTANCE : PERTURBATIONS HUMORALES ET CELLULAIRES

Peu d'études avaient porté sur le chien obèse insulinorésistant, et aucune d'entre elles n'avait décrit de façon synthétique les modifications endocriniennes et métaboliques associées à l'insulinoésistance (ROCCHINI *et al.*, 1987; VERWAERDE *et al.*, 1997; BERGMAN *et al.*, 2001). Si ces perturbations, lorsqu'elles sont installées, ont été relativement bien étudiées chez l'homme, aucune étude n'a, en revanche,

porté sur la chronologie de leur apparition au cours du développement de ce syndrome complexe. Nous avons suivi pendant quelque 70 semaines, chez les chiens soumis à un régime hyperénergétique, plusieurs paramètres plasmatiques liés au métabolisme énergétique, ce qui devait nous permettre de caractériser les perturbations associées au développement de l'insulinorésistance induite par l'obésité.

Paramètres plasmatiques

Nous avons déjà mentionné l'évolution de la triglycémie et des teneurs plasmatiques en acides gras non estérifiés. Parallèlement à ces modifications du métabolisme lipidique, la sécrétion (et le métabolisme) d'autres facteurs sont susceptibles d'être modifiés parallèlement à la prise de poids. Il s'agit d'hormones, comme les hormones thyroïdiennes, le cortisol, la prolactine, les stéroïdes sexuels ainsi que leurs facteurs de régulation. Certaines cytokines produites par le tissu adipeux, la leptine, l'adiponectine et le TNF α seraient également fortement impliquées dans le processus d'insulinorésistance.

Au cours de notre première étude, nous avons montré que la baisse de sensibilité à l'insuline s'accompagnait d'une augmentation des teneurs plasmatiques en IGF1 (de 110 à 270 mg/ml) en TNF α (de 5 à 40 pg/ml) et en acides gras non estérifiés (de 0,97 à 1,59 mmol/L) (GAYET *et al.*, 2004a).

L'hyperproduction de TNF α par l'adipocyte chez le sujet obèse et/ou insulinorésistant est bien connue (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1995). Chez le chien, nous avons montré que l'augmentation de la masse grasse s'accompagnait également d'une augmentation des concentrations de TNF α . Il est cependant difficile encore de déterminer si cette augmentation est l'une des causes ou des conséquences de l'insulinorésistance, de l'obésité ou des deux. Le TNF α pourrait induire l'insulinorésistance indirectement en stimulant la lipolyse adipocytaire et donc la pro-

	T0	T0 + 5mois	T0 + 10mois	T0 + 15mois	T0 + 18mois
Poids (kg)	10,7 \pm 0,7	12,6 \pm 1,1	14,3 \pm 1,2	15,4 \pm 1,4	15,3 \pm 1,3
Insuline (μ U/ml)	20 \pm 2	20 \pm 4	19 \pm 3	28 \pm 4	27 \pm 3
TPG* (mg/kg/min)	21,3 \pm 2,8	-	16,9 \pm 2,1	-	14,9 \pm 1,8
Triglycérides (mmol/L)	0,42 \pm 0,04	1,01 \pm 0,13	1,21 \pm 0,17	0,87 \pm 0,14	0,93 \pm 0,17
Cortisol (mmol/l)	34 \pm 3	46 \pm 7	35 \pm 3	42 \pm 4	75 \pm 10
IGF1 (mg/ml)	90 \pm 6	85 \pm 12	139 \pm 16	102 \pm 12	162 \pm 19
Leptine (ng/ml)	7,3 \pm 2,5	23,6 \pm 6,0	35,5 \pm 9,1	57,6 \pm 13,6	56,1 \pm 10,4
Adiponectine (mg/ml)	94 \pm 12	90 \pm 13	60 \pm 12	24 \pm 8	17 \pm 6

Tableau 2 : Évolution, chez le chien soumis à un régime hyperénergétique hyperlipidique, des paramètres plasmatiques pouvant être associés à l'évolution vers l'insulinorésistance. (Ces paramètres ont été mesurés avant le régime à T0, puis 5, 10, 15 et 18 mois après que les chiens eurent commencé à le consommer et à prendre du poids) [* TPG : taux de perfusion de glucose pour maintenir l'euglycémie au cours du clamp].

duction d'acides gras libres (FEINGOLD *et al.*, 1992), mais aussi par un effet direct en bloquant la capture du glucose sanguin par inhibition de l'expression du gène du transporteur de glucose GLUT4 (HAUNER *et al.*, 1995). Nous avons observé ces deux anomalies chez les chiens obèses et insulino-résistants.

Notre seconde étude fut, nous l'avons indiqué, en partie associée à l'étude de marqueurs potentiels de variation de la sensibilité à l'insuline. Ces marqueurs auraient pu constituer des alternatives au clamp hyperinsulinémique, difficile à mettre en œuvre dans le cadre d'un dépistage précoce en milieu hospitalier. Ils auraient également pu permettre de vérifier de façon simple l'efficacité des mesures thérapeutiques ou nutritionnelles visant chez les animaux ou patients malades à restaurer une meilleure sensibilité à l'insuline.

Nous avons suivi les paramètres les plus directement associés à notre étude : sensibilité à l'insuline (appréciée par la méthode du clamp), insulinémie postprandiale et triglycéridémie. Nous avons étudié simultanément l'évolution de la concentration plasmatique d'un certain nombre d'hormones, cortisol, prolactine, IGF1 mais aussi la leptine et l'adiponectine ainsi que le TNF α qui, d'origine adipocytaire, participeraient à l'état inflammatoire que représente l'obésité.

Les principaux résultats de ce suivi sont résumés dans le **tableau 2** (GAYET *et al.*, 2004b ; GAYET *et al.*, 2004c).

L'hypertriglycéridémie serait, vers la 20^e semaine de ce régime, l'une des premières anomalies détectables. On sait qu'elle peut modifier la régulation du métabolisme des lipoprotéines en cas de baisse de sensibilité à l'insuline (LEWIS *et al.*, 1995). Réciproquement, l'insulino-résistance pourrait aussi contribuer à l'hypertriglycéridémie, via la diminution de l'activité et de la synthèse de la LPL (PYKÄLİSTO, SMITH et BRUNZELL, 1975), entraînant une baisse de l'hydrolyse des triglycérides au sein des chylomicrons et des VLDL et générant alors des perturbations du métabolisme des lipoprotéines. Il existe effectivement une diminution importante de l'expression de la LPL à la fois dans le tissu adipeux viscéral et dans le muscle strié des chiens insulino-résistants. En revanche, les concentrations

plasmatiques de HDL-cholestérol ne sont pas modifiées, ce qui suggère que les perturbations lipoprotéiques apparaissent secondairement à l'insulino-résistance.

Nos résultats montrent aussi une évolution inverse de l'adiponectinémie et de la leptinémie, tout à fait conforme aux données de la littérature et au rôle qu'on leur a imputé ; ces deux hormones, ainsi que la valeur postprandiale de l'insulinémie, pourraient certainement constituer de bons indicateurs de la modification du bilan énergétique et de la sensibilité à l'insuline. Il faut noter que simultanément à l'hypertriglycéridémie, les chiens développaient une hyperleptinémie. Ceci pourrait traduire une résistance à la leptine puisque, parmi les multiples effets métaboliques qui lui sont attribués, cette cytokine limiterait la synthèse de triglycérides (MUOIO *et al.*, 1997) et inhiberait l'expression et la sécrétion pancréatique d'insuline (SEUFERT, KIEFFER et HABENER, 1999).

La diminution de l'adiponectinémie pourrait aussi être un des facteurs responsables du développement de l'insulino-résistance, comme cela a été décrit chez d'autres espèces dont l'homme (YAMAUCHI *et al.*, 2001 ; ARITA *et al.*, 1999), notamment en ce qu'elle inhiberait la synthèse ou la libération du TNF α (MASAKI *et al.*, 2004). L'adiponectine pourrait aussi être impliquée dans la régulation de la dépense énergétique en modifiant l'expression de l'UCP1 (MASAKI *et al.*, 2003).

Bien que des altérations de la fonction thyroïdienne soient souvent associées à l'obésité et à l'insulino-résistance, nous n'avons pas observé de variation de la concentration plasmatique de thyroxine, variation que l'on ne retrouve pas non plus chez l'homme en cas de suralimentation (ROTI, MINELLI et SALVI, 2000). De même, s'il est connu que, dans certains modèles animaux, un excès de glucocorticoïdes peut participer à l'induction de l'insulino-résistance, nous n'avons pas observé de variation des concentrations plasmatiques de cortisol au cours du processus morbide. Ces données ne contredisent toutefois pas de nombreuses études réalisées chez l'homme, qui n'ont pas mis en évidence de relation entre cortisolémie et insulino-résistance.

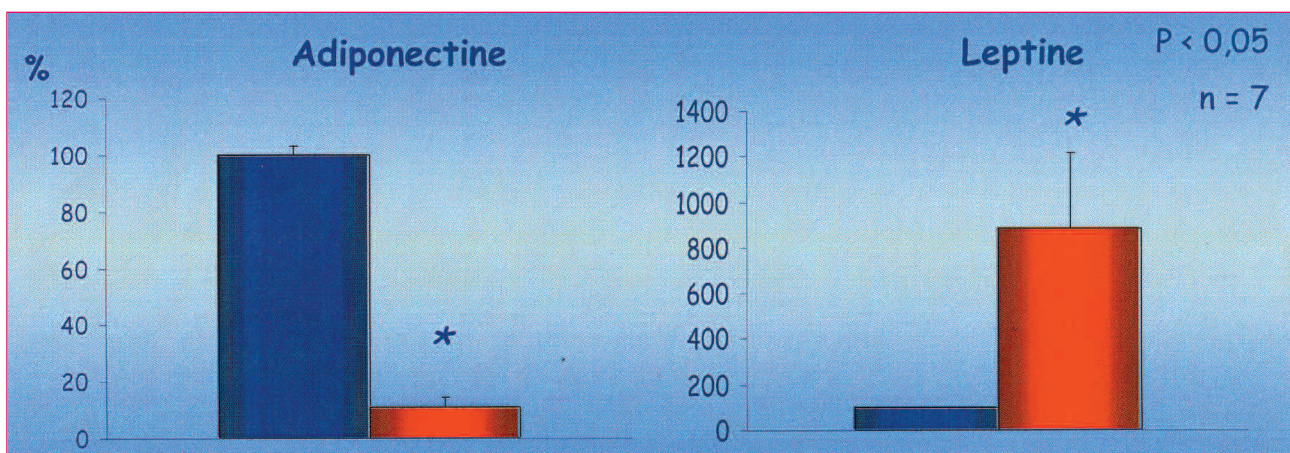


Figure 4 : Modification de l'expression des gènes de l'adiponectine et de la leptine dans le tissu adipeux viscéral du chien insulino-résistant, (en bleu : chien sain ; en rouge : chien obèse insulino-résistant ; 100% représente l'expression chez l'animal sain)

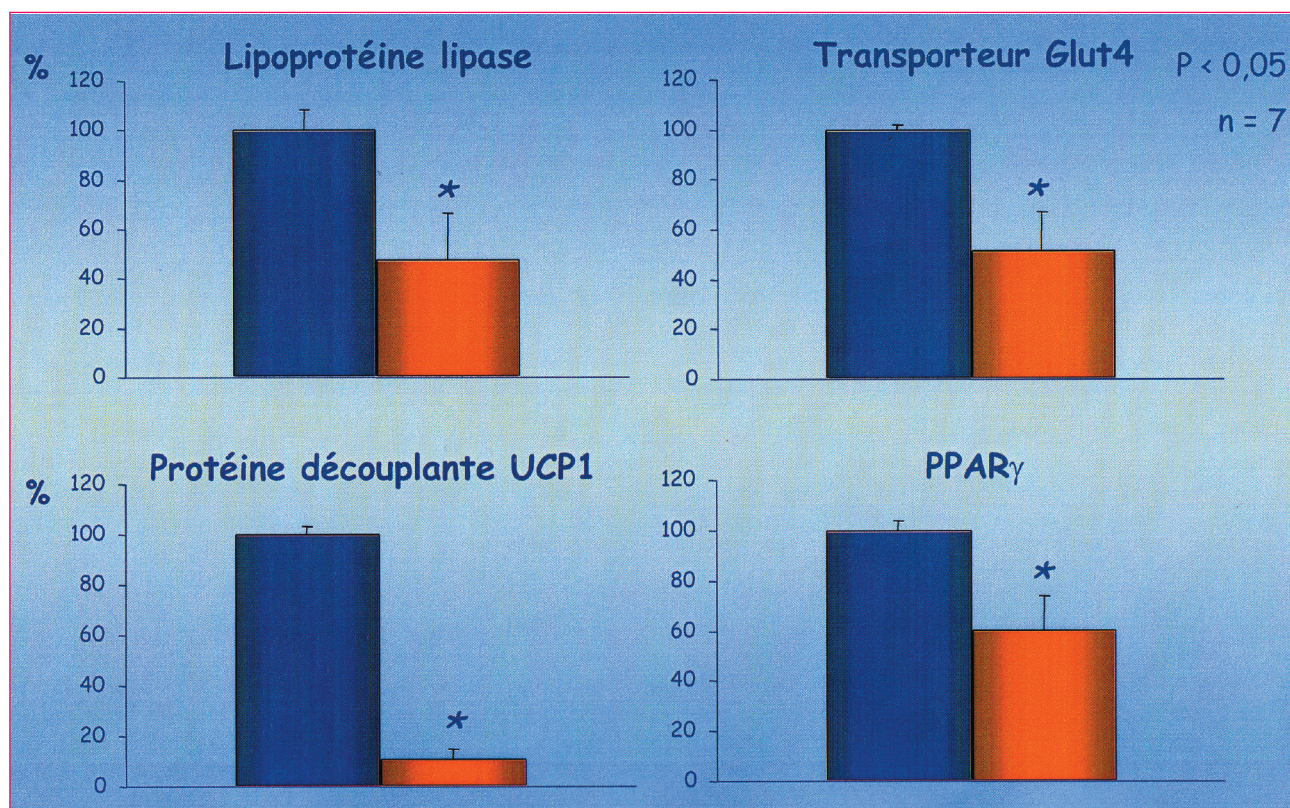


Figure 5 : Modification de l'expression des gènes de la lipoprotéine lipase, du transporteur GLUT4, de la protéine découplante UCP1 et du PPAR γ dans le tissu adipeux viscéral du chien insulino-résistant, (en bleu : chien sain ; en rouge : chien obèse insulino-résistant ; 100% représente l'expression chez l'animal sain)

Paramètres cellulaires

Parmi les mécanismes responsables de l'insulinorésistance, on a évoqué le relargage d'acides gras et la production d'hormones telles que la leptine par le tissu adipeux. La lipoprotéine lipase est une enzyme-clé dans la lipolyse et la capture adipocytaire des acides gras non estérifiés libérés. Dans l'insulinorésistance, la production d'adipocytokines serait la cause d'une diminution de l'expression du gène de la lipoprotéine lipase. Nous avons donc étudié l'expression des gènes correspondants chez les chiens, alors qu'ils étaient maigres et après qu'ils furent devenus obèses et insulinorésistants.

Des études menées tant chez l'homme que chez les rongeurs, ont indiqué que le tissu adipeux blanc sécrète une grande quantité de « signaux » de nature protéique, les adipocytokines (adipokines) qui sont impliquées dans les complications de l'obésité. Récemment, l'expression d'un certain nombre de ces facteurs a été mise en évidence dans le tissu adipeux blanc du chien. Il s'agit notamment de la leptine, de l'interleukine 6, de l'angiotensine, du PAI-1, de l'interleukine 6, de l'haptoglobine, des métallothionéines 1 et 2 et du NGF (*nerve growth factor*) (EISELE *et al.*, 2004). Ces ARNm ont été détectés dans tous les tissus adipeux examinés (sous-cutané, péri-rénal, omental, notamment) et les gènes de ces adipokines étaient bien exprimés dans les adipocytes matures, indépendamment du stroma vasculaire. Par ailleurs, l'ARNm du TNF α n'a pu être mis en évidence que dans les adipocytes isolés.

Nous nous sommes dans un premier temps intéressés à l'expression des gènes de PPARs (*peroxisome proliferator-activated receptor*), de la lipoprotéine lipase, du transporteur de glucose GLUT 4, de la leptine et de l'adiponectine, dans le tissu adipeux viscéral et dans le muscle squelettique. Dans l'ensemble, nous avons mesuré une expression de ces gènes diminuée de moitié sauf dans le cas de la leptine dont l'expression était au contraire multipliée par 8 (figures 4 et 5) (GAYET *et al.*, 2003b ; résultats en cours de publication).

Nous avons mentionné que, simultanément à l'hypertriglycéridémie, les chiens devenaient hyperleptinémiques et nous avons constaté que la quantité d'ARNm de leptine augmentait dans le tissu adipeux des chiens obèses insulinorésistants. De nombreux travaux ont montré que les patients obèses hyperleptinémiques sont résistants à la leptine qu'ils produisent. Nos résultats confirment donc l'hypothèse d'une résistance à la leptine, qui pourrait en partie contribuer à l'hypertriglycéridémie et à l'augmentation de l'insulinémie (que nous n'avons mise en évidence qu'un peu plus tardivement).

Nous nous sommes encore intéressés à l'expression des protéines découplantes dans les différents tissus concernés, en cherchant à voir si leur expression était ou non corrélée à celle des PPARs. Les protéines découplantes (*uncoupling proteins*, UCPs) sont en effet impliquées dans le bilan énergétique et leur expression est modifiée par le statut nutritionnel dans certains états pathologiques tels que l'obésité ou le

diabète. Le récepteur nucléaire PPAR γ joue, quant à lui, un rôle clé dans le stockage des lipides. Chez le rat, l'activation des PPARs peut réduire le gain de poids et augmenter la sensibilité à l'insuline (LARSEN *et al.*, 2003). Ceci pourrait être la conséquence d'une augmentation de l'expression des protéines découplantes.

Ni l'expression des protéines découplantes, ni celle des récepteurs nucléaires PPAR n'étaient connues chez le chien. Nous avons donc, dans un premier temps, mesuré l'expression des gènes du PPAR γ et de l'UCP1 dans le tissu adipeux viscéral. Dans les deux cas, l'expression des deux gènes a été moindre (de 73 % pour l'UCP1 et de 90 % pour le PPAR γ) chez les chiens rendus obèses (LERAY *et al.*, 2004). Ces résultats suggèrent la possibilité d'une relation entre activation du PPAR γ et expression de l'UCP1.

Plus récemment, nous avons étendu notre exploration aux trois UCPs et aux PPAR α et γ dans les tissus hépatique, musculaire et adipeux des chiens devenus obèses et insulino-résistants (Résultats non publiés).

- L'expression des protéines découplantes était significativement diminuée par rapport à l'état sain. L'expression de l'UCP1 et de l'UCP2 était divisée par six dans le tissu adipeux et le tissu hépatique respectivement. Dans le tissu musculaire, seul tissu exprimant les 3 formes d'UCP, l'expression de l'UCP1 et de l'UCP2 était trois fois moindre, celle de l'UCP3, cinq fois.

- L'expression du PPAR α était cinq fois moindre dans le foie, celle du PPAR γ , trois fois moindre dans le muscle et cinq fois moindre dans le tissu adipeux.

Cette diminution de l'expression des protéines découplantes qui interviennent dans la production d'énergie par la cellule, pourrait s'expliquer par la diminution de l'expression des PPARs et par le métabolisme lipidique et glucidique au sein des tissus, capable de contrôler l'expression de certains gènes, dont ceux des protéines découplantes.

Nous avons indiqué que l'adiponectine pourrait modifier l'expression de l'UCP1. La corrélation positive établie entre les quantités d'ARNm d'adiponectine et d'UCP1 pourrait confirmer le lien entre adiponectine, thermogénèse et probablement dépense énergétique.

L'hypothèse selon laquelle le TNF α induirait l'insulino-résistance pour limiter l'obésité, pourrait également s'expliquer, au moins en partie, par l'effet inhibiteur de cette cytokine sur l'expression du PPAR γ , démontré précédemment chez la souris et le rat (HILL *et al.*, 1997 ; TANAKA *et al.*, 1999). Nous avons effectivement observé que l'expression du PPAR γ était également fortement diminuée dans le tissu adipeux viscéral des chiens obèses et insulino-résistants. Cependant, les résultats obtenus sur des patients obèses et/ou insulino-résistants restent contradictoires : dans certaines études (RIEUSSET *et al.*, 1999 ; VIDALPUIG *et al.*, 1996), l'expression du PPAR γ était augmentée, tandis que MONTAGUE *et al.* (1997) ont montré une corrélation négative avec l'augmentation de l'adiposité. Il faut souligner que la plupart des travaux réa-

lisés chez l'homme ont porté sur le tissu adipeux sous-cutané, alors que nos résultats concernaient aussi le tissu adipeux viscéral et que les deux tissus avaient une activité métabolique très différente (LEBOVITZ, 2003). L'hypothèse d'une altération de l'expression du PPAR γ lors d'insulino-résistance participerait de plus à l'explication des anomalies précédemment décrites (KIM et AHN, 2004). En effet, on sait que le PPAR γ règle, chez l'homme, l'expression de divers gènes dont ceux de la leptine, du GLUT4, de la LPL et de l'adiponectine (DE VOS *et al.*, 1996 ; SCHOONJANS, STAELS et AUWERX, 1996 ; BERG *et al.*, 2001). Les corrélations que nous avons mises en évidence entre l'expression du PPAR γ et celle de ses gènes cibles suggèrent que ces derniers pourraient être régulés par le niveau d'expression du PPAR γ .

• RÉVERSIBILITÉ DES TROUBLES LORS D'AMAIGRISSEMENT

Si nous avons poursuivi la caractérisation de notre modèle et débuté les études visant à moduler la sensibilité à l'insuline des animaux obèses, nous avons également entrepris, à la suite de notre première étude, de faire maigrir les animaux pour voir si cette résolution de l'excès de poids (et essentiellement de leur masse grasse) permettait de restaurer la sensibilité à l'insuline et d'assurer le retour à la normale de certains des troubles que nous avons mis en évidence.

Les chiens ont été soumis à un régime relativement sévère destiné à permettre un amaigrissement rapide. Ils ont reçu un aliment hypoénergétique, spécialement conçu à cette fin, l'allocation énergétique représentant environ 45 % du besoin estimé par rapport au poids cible (celui qui présentaient les animaux avant leur prise de poids). Compte tenu d'un excédent de poids très variable (25 à 80 %, moyenne 40 %), les animaux ont retrouvé leur poids initial en 6 à 23 semaines (moyenne de 14), le taux d'amaigrissement étant en moyenne de 2,6 % par semaine. Au terme de cette période, tous les animaux avaient retrouvé leur poids initial. La masse maigre, appréciée par dilution isotopique, n'était pas non plus différente de ce qu'elle était initialement (BLANCHARD *et al.*, 2004). Les différents paramètres ont été mesurés au moins huit semaines plus tard.

Sensibilité à l'insuline

La sensibilité à l'insuline était significativement accrue par rapport à ce qu'elle était chez les animaux obèses. Elle avait diminué de 43 % au terme de la prise de poids et ne fut que partiellement rétablie 8 semaines après la fin de la période d'amaigrissement, demeurant inférieure de 17 % à ce qu'elle était avant la prise de poids (perfusion de glucose nécessaire au maintien de l'euglycémie : 28,8, 15,3 et 22,7 mg/kg/min, chronologiquement) (BLANCHARD *et al.*, 2004).

Profils lipoprotéiques

Nous avons précédemment mis en évidence d'importantes modifications du métabolisme des lipoprotéines : augmentation des taux circulants d'acides gras non estérifiés, de VLDL-triglycérides, de HDL-triglycérides et de

VLDL-cholestérol, diminution du HDL-cholestérol.

Au terme de l'amaigrissement, nous avons constaté que le taux de HDL-cholestérol avait significativement augmenté et celui de HDL-triglycérides significativement diminué. Le taux d'acides gras non estérifiés avait aussi significativement baissé. En revanche, la diminution des VLDL-triglycérides n'était pas statistiquement significative (figure 6) (BURBAN *et al.*, 2003 ; GAYET *et al.*, 2003a). Globalement, seul le taux de HDL-cholestérol avait retrouvé une valeur normale, les autres paramètres évoquant davantage un retour progressif à la normale qu'une normalisation achevée. Ceci est probablement à mettre en rapport avec une sensibilité à l'insuline, non intégralement récupérée. Globalement, ces résultats suggèrent qu'un retour à une sensibilité normale à l'insuline pouvait être associé à un rétablissement de la composition lipidique des lipoprotéines.

In fine, nous avons constaté que le taux de HDL-cholestérol, accru ($4,775 \pm 0,096$ mmol/L), et celui de HDL-triglycérides, réduit ($0,062 \pm 0,013$ mmol/L), avaient retrouvé des valeurs identiques à ce qu'elles avaient été chez les animaux avant la prise de poids. S'agissant des acides gras non estérifiés, leur teneur ($0,662 \pm 0,122$ mmol/L) a même atteint une valeur significativement plus faible que la valeur initiale.

Paramètres plasmatiques

Au terme de la période d'amaigrissement, l'insulinémie postprandiale et les taux plasmatiques d'IGF1, de TNF α , d'acides gras non estérifiés et de triglycérides présentaient des valeurs non différentes de celles relevées avant la prise de poids (GAYET *et al.*, 2003a). Nous avons suivi l'évolution de ces paramètres toutes les six semaines au cours de l'amaigrissement (BLANCHARD *et al.*, 2004). La chute des teneurs en TNF α , en IGF1, en acides gras non estérifiés et triglycérides a été constatée très pré-

cocement, dès le premier contrôle, six semaines après le début de la perte de poids qui semble l'élément déterminant à cet égard. En revanche, l'insulinémie postprandiale n'a diminué que graduellement (BLANCHARD *et al.*, 2004), parallèlement à la perte de poids et probablement, à l'augmentation de la sensibilité à l'insuline, que nous n'avons malheureusement directement évaluée qu'en début et fin de protocole.

En résumé, l'ensemble de ces résultats ont montré que l'amaigrissement des animaux obèses permettait un retour vers une sensibilité normale à l'insuline, probablement graduelle, tout comme la normalisation du profil lipoprotéique. En revanche, les paramètres, du moins ceux que nous avons mesurés, témoins soit de l'état inflammatoire que constitue l'obésité, soit du bilan énergétique, retrouvent rapidement des valeurs au minimum normales, dès le début de la perte de poids (bilan énergétique négatif). Ces éléments confirment encore l'intérêt du modèle pour évaluer des modalités de traitement des dyslipidémies et de l'insulinorésistance associées à l'obésité.

• CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le choix du chien, comme modèle d'obésité, présente évidemment des avantages et des inconvénients qui ne doivent pas être sous-estimés. En plus des obstacles éthiques, le chien présente le désavantage, en comparaison avec d'autres espèces de laboratoires plus usuelles, d'avoir un génome moins bien connu, ce qui limite momentanément les possibilités d'exploration de certains mécanismes moléculaires. Cependant, au delà de ce désavantage, le modèle chien obèse/insulinorésistant offre de multiples avantages.

Les études antérieures menées sur le chien soumis à un régime hyperlipidique (ROCCHINI *et al.*, 1989 ; VERWAERDE *et al.*, 1997) avaient montré que l'hypertension

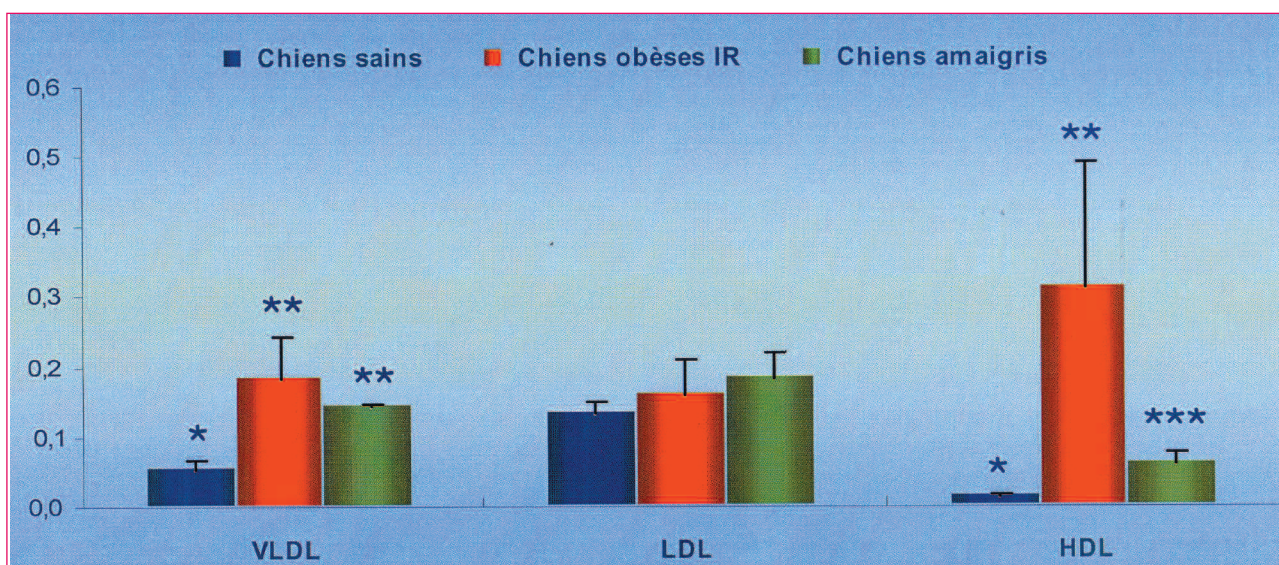


Figure 6 : Distribution des triglycérides (mmol/L) dans les lipoprotéines de chiens sains, obèses puis amaigris (Au terme de l'amaigrissement, la teneur en triglycérides des HDL avait diminué, sans revenir à sa valeur initiale, d'avant prise de poids ; celle des VLDL avait également décliné, mais de manière non significative par rapport à l'état obèse. Ceci pourrait être mis en parallèle avec une sensibilité à l'insuline non intégralement rétablie bien que le poids initial ait été restauré.) [Les étoiles indiquent des différences significatives, $p < 0,05$, $N = 6$]

artérielle développée par ces animaux, présentait les mêmes caractéristiques hémodynamiques que l'hypertension artérielle secondaire à l'obésité de l'homme. Des anomalies cardiaques comparables entre chiens obèses et hypertendus et l'homme en surcharge pondérale ont également été décrites (VILLA *et al.*, 1998). Nous avons montré que l'insulinorésistance associée à l'obésité entraînait les mêmes perturbations lipidiques au sein des lipoprotéines que celles décrites chez l'homme. D'un point de vue endocrinien et métabolique, nous avons montré que ce modèle expérimental reproduit également l'ensemble des perturbations plasmatiques et tissulaires décrites dans la littérature scientifique, si ce n'est l'hypertension artérielle. En outre, l'hyperinsulinémie observée chez le chien pendant une longue période sans apparition d'hyperglycémie lui confère une singularité méthodologique car la plupart des modèles d'obésité et d'insulinorésistance d'origine nutritionnelle développés chez les rongeurs présentent rapidement un diabète non insulino-dépendant.

Les rongeurs semblent tout particulièrement adaptés à l'étude de l'aspect génétique de la maladie, ou bien à l'étude d'un mécanisme précis, notamment grâce aux modèles transgéniques. Pourtant, les études menées chez l'Homme démontrent que la part de l'origine génétique dans l'obésité n'est pas prépondérante, même si elle peut constituer un facteur de risque non négligeable (BOUCHARD, 1991). Il faut remarquer également que le rongeur a la particularité de posséder un tissu adipeux brun, spécialisé dans la production de chaleur et donc susceptible d'interférer dans la genèse de l'obésité et la régulation du métabolisme énergétique.

La longévité du chien permet à la fois d'envisager des études à long terme simulant la maladie humaine, bien que développée plus rapidement, et d'étudier la chronologie de l'apparition des perturbations liées au développement de l'obésité et de l'insulinorésistance, afin de mieux comprendre la pathogénie de ces affections. En outre, l'approche possible du syndrome d'insulinorésistance dans sa globalité, en tenant compte des facteurs environnementaux, en fait un modèle tout à fait original.

En plus de ces similitudes, les modifications moléculaires que nous avons observées sont en majorité similaires chez le chien obèse insulinorésistant et l'homme atteint du même syndrome. En effet, l'insulinorésistance s'accompagne chez le chien d'une diminution de l'expression du gène de la LPL, de l'adiponectine, du transporteur GLUT4 et de l'UCP1 et d'une augmentation de celle du gène de la leptine. Tous ces paramètres sont impliqués dans le développement de l'insulinorésistance, aussi bien chez l'homme que chez le chien, et sont notamment régulés par un même facteur de transcription, le PPAR γ . Le chien pourrait donc constituer un bon modèle, aussi bien pour l'exploration des mécanismes moléculaires impliqués dans l'insulinorésistance, que pour des études d'interventions nutritionnelles destinées à la prévention et au traitement de l'obésité et de ses complications métaboliques.

Ainsi actuellement, la recherche thérapeutique se penche sur de nouvelles classe de médicaments, fibrates et thiazolidinediones, qui en modulant l'activité des PPARs α et γ amélioreraient le bilan énergétique, la sensibilité à l'insuline et le métabolisme lipoprotéique. Étudiés sur un grand nombre de modèles animaux, essentiellement des rongeurs, les mécanismes d'action de ces molécules ne sont pas pour autant complètement élucidés. Des travaux réalisés sur des souris transgéniques déficientes en PPAR γ mettent en évidence l'aspect paradoxal de ce récepteur, puisqu'elles ont montré que les conséquences d'une augmentation ou d'une diminution de l'activité et/ou de l'expression du PPAR γ étaient similaires (KUBOTA *et al.*, 1999; MILES *et al.*, 2000). Nous avons observé que chez le chien obèse et insulinorésistant, l'expression du PPAR γ était altérée dans le muscle comme dans le tissu adipeux viscéral, tandis que les concentrations plasmatiques de TNF α étaient augmentées. Des travaux récents ont montré que le TNF α inhibait l'expression du PPAR γ et que les thiazolidinediones renversaient cet effet négatif (TANAKA *et al.*, 1999). Il a, par ailleurs, été récemment montré que le chien constituait un modèle intéressant d'étude des agonistes pour les PPAR α humain (NAGASAWA *et al.*, 2004). Bien qu'il reste à vérifier que chez le chien aussi, fibrates, thiazolidinediones et autres molécules agissent en augmentant l'expression des PPARs, nos résultats confirment ces observations et le chien pourrait constituer un modèle intéressant pour l'étude des différents mécanismes d'action de ces agonistes.

Enfin, si ce modèle canin est intéressant dans la phase de genèse de la maladie, il se révèle tout aussi riche pour aborder l'étude des conséquences de la perte de poids. Nous avons ainsi mis en évidence que la réduction pondérale, chez le chien, entraînait aussi une amélioration de la sensibilité à l'insuline et un retour aux valeurs usuelles des concentrations plasmatiques d'IGF1, de TNF α et d'acides gras libres.

Comme cela avait déjà été suggéré par les premières études réalisées sur le chien obèse insulino-résistant, dyslipidémique et hypertendu, le chien suralimenté constitue un bon modèle de la pathologie humaine, notamment parce qu'il développe des perturbations métaboliques, tant plasmatiques que moléculaires, similaires à celles retrouvées chez l'homme malade. Il pourrait ainsi constituer un modèle de choix pour l'élucidation au sein des différents tissus cibles, des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement du syndrome d'insulinorésistance aussi bien que pour l'étude chronologique des anomalies survenant lors de l'installation de ce syndrome. L'originalité et l'intérêt de ce modèle résident aussi beaucoup dans le fait qu'il est particulièrement bien adapté pour des études d'interventions nutritionnelles et d'effet de la perte de poids sur la réversibilité des nombreux troubles associées à l'insulinorésistance et à l'obésité. La durée moyenne de vie lui confère également un avantage pour l'étude d'effets chroniques de médicaments et il pourrait devenir le sujet privilégié d'études précliniques, notamment pour l'évaluation pharmacologique et toxicolo-

BIBLIOGRAPHIE

- ARITA Y, KIHARA S, OUCHI N, TAKAHASHI M, MAEDA K, MIYAGA WAJ, HOTTA K, SHIMOMURA I, NAKAMURA T, MIYAOKA K, KURIYAMA H, NISHIDA M, YAMASHITA S, OKUBO K, MATSUBARA K, MURAGUCHI M, OHMOTO Y, FUNAHASHI T, MATSUZAWA Y (1999) Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **257**, 79-83.
- BAILHACHE E, BRIAND F, NGUYEN P, KREMPF M, MAGOT T, OUGUERRAM K (2004) Metabolism of cholesterol ester of apolipoprotein B100-containing lipoproteins in dogs: evidence for disregarding cholesterol ester transfer. *Eur. J. Clin. Invest.*, **34**, 527-534.
- BAILHACHE E, NGUYEN P, KREMPF M, SILIART B, MAGOT T, OUGUERRAM K (2003a) Lipoproteins abnormalities in obese insulin-resistant dogs. *Metabolism*, **52**, 559-564.
- BAILHACHE E, OUGUERRAM K, GAYET C, KREMPF M, SILIART B, MAGOT T, NGUYEN P (2003c) An insulin-resistant hypertriglyceridaemic normotensive obese dog model: assessment of insulin resistance by the euglycaemic hyperinsulinaemic clamp in combination with the stable isotope technique. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, **87**, 86-95.
- BAILHACHE E, OUGUERRAM K, MAUGÈRE P, KREMPF M, SILIART B, NGUYEN P, MAGOT T (2002) High density lipoproteins cholesteryl esters turnover in dogs using stable isotopes with an improved lipoproteins isolation method. In: KOSTNER, editor. *Atherosclerosis: risk factors, diagnosis, and treatment*. Monduzzi Editore, Bologne (Italie), 345-352.
- BAILHACHE E, OUGUERRAM K, MAUGÈRE P, SILIART B, KREMPF M, NGUYEN P, MAGOT T (2003d) Reverse cholesterol transport in the dog. Importance of selective uptake of HDL cholesteryl ester in dog. *J. Vet. Int. Med.*, **17**, 417.
- BAILHACHE E, OUGUERRAM K, SILIART B, KREMPF M, MAGOT T, NGUYEN P (2003e) Reverse cholesterol transport in the dog. In vivo evidence that healthy dog is a species lacking of CETP activity. *J. Vet. Int. Med.*, **17**, 417.
- BAILHACHE E., OUGUERRAM K., BRIAND F., KREMPF M., MAGOT T., NGUYEN P (2003b) Effect of obesity on apo B100 metabolism in dogs. In: *Proceedings. Waltham International Science Symposium*, Bangkok (Thaïlande), 28-31 octobre 2003.
- BELTZ WF, KESÄNIEMI YA, HOWARD BV, GRUNDY SM (1985) Development of an integrated model for analysis of the kinetics of apolipoprotein B in plasma very low density lipoproteins, intermediate density lipoproteins, and low density lipoproteins. *J. Clin. Invest.*, **76**, 575-585.
- BERG AH, COMBS TP, DU X, BROWNLEE M, SCHERER PE (2001) The adipocyte-secreted protein Acyrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat. Med.*, **7**, 947-953.
- BERGMAN RN, VAN CITTERS GW, MITTELMAN SD, DEA MK, HAMILTON-WESSLER M, KIM SP, ELLMERER M (2001) Central role of the adipocyte in the metabolic syndrome. *J. Invest. Med.*, **49**, 119-126.
- BLANCHARD G, NGUYEN P, GAYET C, LERICHE I, SILIART B, PARAGON BM (2004) Rapid weight loss with a high-protein low-energy diet allows the recovery of ideal body composition and insulin sensitivity in obese dogs. *J. Nutr.*, **134**, 2148S-2150S.
- BOUCHARD C (1991) Current understanding of the etiology of obesity : genetic : and nongenetic factors. *Am. J. Clin. Nutr.*, **53**, 1561S-1565S.
- BURBAN L, BAILHACHE E, GAYET C, OUGUERRAM K, SILIART S, NGUYEN P. Recovery of insulin sensitivity reverses lipoprotein abnormalities in dogs. In: *Proceedings of European Society of Veterinary and Comparative Nutrition Conference*, Hannover, October 2003.
- CHAN DC, WATTS GF, REDGRAVE TG, MORI TA, BARRETT PH (2002) Apolipoprotein B-100 kinetics in visceral obesity: associations with plasma apolipoprotein C-III concentration. *Metabolism*, **51**, 1041-1046.
- CHAPMAN MJ (1986) Comparative analysis of mammalian plasma lipoproteins. *Methods Enzymol.*, **128** : 70-143.
- CHEUNG MC, WOLFBAUER G, ALBERS JJ (1996) Plasma phospholipid mass transfer rate: relation to plasma phospholipid and cholesteryl ester transfer activities and lipid parameters. *Biochim. Biophys. Acta*, **1303**, 103-110.
- DE VOS P, LEFEBVRE AM, MILLER SG, GUERRE-MILLO M, WONG K, SALADIN R, HAMANN LG, STAELS B, BRIGGS MR, AUWERX J (1996). Thiazolidinediones repress ob gene expression in rodents via activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J. Clin. Invest.*, **98**, 1004-1009.
- DUVILLARD L, PONT F, FLORENTIN E, GALLAND-JOS C, GAMBERT P, VERGÈS B (2000) Metabolic abnormalities of apolipoprotein B-containing lipoproteins in non-insulin-dependent diabetes: a stable isotope kinetic study. *Eur. J. Clin. Invest.*, **30**, 685-694.
- EISELE I, WOOD IS, GERMAN AJ, HUNTER L, TRAYHURN P (2004) Expression of adipokine genes in canine white adipose tissue. *J. Vet. Int. Med.*, **8**, 790.
- FEINGOLD KR, DOERRLER W, DINARELLO CA, FIEERS W, GRUNFELD C (1992) Stimulation of lipolysis in cultured fat cells by tumor necrosis factor, interleukin-1, and the interferons is blocked by inhibition of prostaglandin synthesis. *Endocrinology*, **130**, 10-16.
- FRÉNAIS R, OUGUERRAM K, MAUGEAIS C, MAHOT P, MAUGÈRE P, KREMPF M, MAGOT T (1997) High density lipoprotein apolipoprotein AI kinetics in NIDDM: a stable isotope study. *Diabetologia*, **40**, 578-583.
- GAYET C, BAILHACHE E, DUMON H, MARTIN L, SILIART B, NGUYEN P (2004a) Insulin resistance and changes in plasma concentration of TNFalpha, IGF1, and NEFA in dogs during weight gain and obesity. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, **88**, 157-165.
- GAYET C, BAILHACHE E, MARTIN L, DUMON H, SILIART B, NGUYEN P (2003a) Changes in plasma tumor necrosis factor (TNFa), insulin-like growth factor 1 (IGF1), non-esterified fatty acids (NEFA) and in insulin sensitivity in overfed and food restricted dogs. *J. Vet. Int. Med.*, **17**, 417.
- GAYET C, LERAY V, NGUYEN P, SILIART B (2003b) Relationship between leptin, lipoprotein lipase (LPL) and insulin resistance (IR) in obese adult dogs. *J. Vet. Int. Med.*, **17**, 744.
- GAYET C, SILIART B, SHIBATA H, HONJOH T, SAITO M, NGUYEN P (2004b) Adiponectin and leptin plasma levels: early markers in the time course of obesity-associated insulin resistance (IR) in dogs. *J. Vet. Int. Med.*, **18**, 421.
- GAYET C, SILIART B, SHIBATA H, HONJOH T, SAITO M, NGUYEN P

(2004c) Adiponectin and leptin: early markers of insulin resistance (IR) in a canine model of obesity. *Int. J. Obesity*, **28** (Suppl.1), S168.

• GUYARD-DANGREMONT V, DESRUMAUX C, GAMBERT P, LALLEMANT C, LAGROST L (1998) Phospholipid and cholesteryl ester transfer activities in plasma from 14 vertebrate species. Relation to atherogenesis susceptibility. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, **120**, 517-525.

• HA YC, BARTER PJ (1982) Differences in plasma cholesteryl ester transfer activity in sixteen vertebrate species. *Comp. Biochem. Physiol. B*, **71**, 265-269.

• HAUNER H, PETRUSCHKE T, RUSS M, ROHRIG K, ECKEL J (1995) Effects of tumor necrosis factor alpha (TNF α) on glucose transport and lipid metabolism of newly-differentiated human fat cells in cell culture. *Diabetologia*, **38**, 764-771.

• HILL MR, YOUNG MD, MCCURDY CM, GIMBLE JM (1997) Decreased expression of murine PPAR γ in adipose tissue during endotoxemia. *Endocrinology*, **138**, 3073-3076.

• HOTAMISLIGIL GS, ARNER P, CARO JF, ATKINSON RL, SPIEGELMAN BM (1995) Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.*, **95**, 2409-2415.

• IGAWA K, MUGAVERO M, SHIOTA M, NEAL DW, CHERRINGTON AD (2002) Insulin sensitively controls the glucagon response to mild hypoglycemia in the dog. *Diabetes*, **51**, 3033-3042.

• JULIEN P, FONG BS, ANGEL A (1988) Composition, morphology and distribution of high density lipoprotein in plasma and peripheral lymph: effect of feeding cholesterol and saturated fat. *Biochim. Biophys. Acta*, **960**, 275-285.

• KAIYALA KJ, PRIGEON RL, KAHN SE, WOODS SC, PORTE D, SCHWARTZ MW (1999) Reduced β -cell function contributes to impaired glucose tolerance in dogs made obese by high-fat feeding. *Am. J. Physiol.*, **277**, E659-E667.

• KIM HI, AHN YH (2004) Role of peroxisome proliferator-activated receptor- γ in the glucose-sensing apparatus of liver and b-cell. *Diabetes*, **53** (Suppl. 1), S60-S65.

• KIM SP, ELLMERER M, VAN CITTERS GW, BERGMAN RN (2003)

Primacy of hepatic insulin resistance in the development of the metabolic syndrome induced by an isocaloric moderate-fat diet in the dog. *Diabetes*, **52**, 2453-2460.

• KOVANEN PT, BILHEIMER DW, GOLDSTEIN JL, JARAMILLO JJ, BROWN MS (1981) Regulatory role for hepatic low density lipoprotein receptors *in vivo* in the dog. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 1194-1198.

• KUBOTA N, TERAUCHI Y, MIKI H, TAMEMOTO H, YAMAUCHI T, KOMEDA K, SATOH S, NAKANO R, ISHII C, SUGIYAMA T, ETO K, TSUBAMOTO Y, OKUNO A, MURAKAMI K, SEKIHARA H, HASEGAWA G, NAITO M, TOYOSHIMA Y, TANAKA S, SHIOTA K, KITAMURA T, FUJITA T, EZAKI O, AIZAWA S, KADOWAKI T, *et al.* (1999) PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol. Cell.*, **4**, 597-609.

• LARSEN PJ, JENSEN PB, SRENSSEN RV, LARSEN LK, VRANG N, WULFF EM, WASSERMANN K (2003) Differential influences of peroxisome proliferator-activated receptors γ and α on food intake and energy homeostasis. *Diabetes*, **52**, 2249-2259.

• LEBOVITZ HE (2003) The relationship of obesity to the metabolic syndrome. *Int. J. Clin. Pract. Suppl.*, **134**, 18-27.

• LERAY V, GAYET C, MARTIN L, DUMON H, SILIART B, NGUYEN P (2004) Modulation of uncoupling protein 1 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in adipose tissue in obese insulin-resistant dogs. *J. Nutr.*, **134**, 2154S-2157S.

• LEWIS GF, UFFELMAN KD, SZETO LW, WELLER B, STEINER G (1995) Interaction between free fatty acids and insulin in the acute control of very low density lipoprotein production in humans. *J. Clin. Invest.*, **95**, 158-166.

• MAHLEY RW, HUI DY, INNERARITY TL, WEISGRABER KH (1981) Two independent lipoprotein receptors on hepatic membranes of dog, swine and man: apo-B/E and apo-E receptors. *J. Clin. Invest.*, **68**, 1197-1206.

• MAHLEY RW, WEISGRABER KH (1974) Canine lipoproteins and atherosclerosis. I- Isolation and characterization of plasma lipoproteins from control dogs. *Circ. Res.*, **35**, 713-721.

• MALDONADO EN, CASANAVE EB, AVELDANO MI (2002) Major plasma lipids and fatty acids in four HDL

mammals. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, **132**, 297-303.

• MALDONADO EN, ROMERO JR, OCHOA B, AVELDANO M (2001) Lipid and fatty acid composition of canine lipoproteins. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, **128**, 719-729.

• MARTINEZ FJ, RIZZA RA, ROMERO JC (1994) High-fructose feeding elicits insulin resistance, hyperinsulinism, and hypertension in normal mongrel dogs. *Hypertension*, **23**, 456-463.

• MASAKI T, CHIBA S, TATSUKAWA H, YASUDA T, NOGUCHI H, SEIKE M, YOSHIMATSU H (2004) Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF- α in KK-Ay obese mice. *Hepatology*, **40**, 177-84.

• MASAKI T, CHIBA S, YASUDA T, TSUBONE T, KAKUMA T, SHIMOMURA I, FUNAHASHI T, MATSUZAWA Y, YOSHIMATSU H (2003) Peripheral, but not central, administration of adiponectin reduces visceral adiposity and upregulates the expression of uncoupling protein in agouti yellow (Ay/a) obese mice. *Diabetes*, **52**, 2266-2273.

• MASON TM (1998) The role of factors that regulate the synthesis and secretion of very low density lipoprotein by hepatocytes. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, **35**, 461-487.

• MASSABUAU P, VERWAERDE P, GALINIER M, FOURCADE J, ROUGÉ P, GALITZKY J, SENARD JM, BERLAN M, BOUNHORE, JP, MONTASTRUC JL (1997) Retentissement ventriculaire gauche d'une hypertension artérielle induite par une surcharge pondérale chez le chien. *Arch. Mal. Coeur Vaiss.*, **90**, 1033-1035.

• MILES PD, BARAK Y, HE W, EVANS RM, OLEFSKY JM (2000) Improved insulin-sensitivity in mice heterozygous for PPAR-gamma deficiency. *J. Clin. Invest.*, **105**, 287-292.

• MITTELMAN SD, VAN CITTERS GW, KIM SP, DAVIS DA, DEA MK, HAMILTON-WESSLER M, BERGMAN RN (2000) Longitudinal compensation for fat-induced insulin resistance includes reduced insulin clearance and enhanced β -cell response. *Diabetes*, **49**, 2116-2125.

• MITTELMAN SD, VAN CITTERS GW, KIRKMAN EL, BERGMAN RN (2002) Extreme insulin resistance of the central adipose depot *in vivo*. *Diabetes*, **51**, 755-761.

- MONTAGUE CT, PRINS JB, SANDERS L, DIGBY JE, O'RAHILLY S (1997) Depot- and sex-specific differences in human leptin mRNA expression: implications for the control of regional fat distribution. *Diabetes*, **46**, 342-347.
- MOORE MC, HSIEH PS, DOSS W, NEAL DW, CHERRINGTON AD (2000) Nonhepatic response to portal glucose delivery in conscious dogs. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **279**, E1271-E1277.
- MOORE MC, SATAKE S, BARANOWSKI B, HSIEH PS, NEAL DW, CHERRINGTON AD (2002) Effect of hepatic denervation on peripheral insulin sensitivity in conscious dogs. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **282**, E286-E296.
- MUOIO DM, DOHM GL, FIEDOREK FT Jr, TAPSCOTT EB, COLEMAN RA, DOHN GL (1997) Leptin directly alters lipid partitioning in skeletal muscle. *Diabetes*, **46**, 1360-1363.
- NAGASAWA M, IDE T, SUZUKI M, TSUNODA M, AKASAKA Y, OKAZAKI T, MOCHIZUKI T, MURAKAMI K (2004) Pharmacological characterization of human specific PPAR α agonist in dogs. *Biochem. Pharmacol.*, **67**, 2057-2069.
- NRC, National Research Council (1985) *Nutrient Requirements of Dogs*. National Academy Press, Washington, DC.
- OUGUERRAM K, NGUYEN P, KREMPF M, POUTEAU E, BRIAND F, BAILHACHE E, MAGOT T (2004) Selective uptake of high density lipoproteins cholesteryl ester in the dog, a species lacking in cholesteryl ester transfer protein activity; An *in vivo* approach using stable isotopes. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, **138**, 339-45.
- PAMIES-ANDREU E, FIKSEN-OLSEN M, RIZZA RA, ROMERO JC (1995) High-fructose feeding elicits insulin resistance without hypertension in normal mongrel dogs. *Am. J. Hypertension*, **8**, 732-738.
- PONT F, DUVILLARD L, FLORENTIN E, GAMBERT P, VERGES B (2002) Early kinetic abnormalities of apoB-containing lipoproteins in insulin-resistant women with abdominal obesity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **22**, 1726-1732.
- PYKALISTO OJ, SMITH PH, BRUNZELL JD (1975) Determinants of human adipose tissue lipoprotein lipase. Effect of diabetes and obesity on basal- and diet-induced activity. *J. Clin. Invest.*, **56**, 1108-1117.
- RIEUSSET J, ANDREELLI F, AUBOEUF D, ROQUES M, VALLIER P, RIOU JP, AUWERX J, LAVILLE M, VIDAL H (1999) Insulin acutely regulates the expression of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in human adipocytes. *Diabetes*, **48**, 699-705.
- ROCCHINI A, MOOREHEAD C, DEREMER S, BONDIE D (1989) Pathogenesis of weight-related changes in blood pressure in dogs. *Hypertension*, **13**, 922-928.
- ROCCHINI A, MOOREHEAD C, WENTZ E, DEREMER S (1987) Obesity-induced hypertension in dogs. *Hypertension*, **9**, III64-III68.
- ROCCHINI AP, MAO HZ, BABU K, MARKER P, ROCCHINI AJ (1999) Clonidine prevents insulin resistance and hypertension in obese dogs. *Hypertension*, **33**, 548-553.
- ROCCHINI AP, MARKER P, CERVENKA T (1997) Time course of insulin resistance associated with feeding dogs a high-fat diet. *Am. J. Physiol.*, **272**, E147-154.
- ROGERS WA (1977) Lipemia in the dog. *Vet. Clin. North Am.*, **7**, 637-647.
- ROTI E, MINELLI R, SALVI M (2000) Thyroid hormone metabolism in obesity. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, **24** (Suppl 2), S113-115.
- SCHOONJANS K, STAELS B, AUWERX J (1996) The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biophys. Acta.*, **1302**, 93-109.
- SEUFERT J, KIEFFER TJ, HABENER JF (1999) Leptin inhibits insulin gene transcription and reverses hyperinsulinemia in leptin-deficient ob/ob mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 674-679.
- SPARKS JD, SPARKS CE (1990) Insulin modulation of hepatic synthesis and secretion of apolipoprotein B by rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, **265**, 8854-8862.
- SPARKS JD, SPARKS CE (1994) Insulin regulation of triacylglycerol-rich lipoprotein synthesis and secretion. *Biochim. Biophys. Acta*, **1215**, 9-32.
- TANAKA T, ITOH H, DOI K, FUKUNAGA Y, HOSODA K, SHINTANI M, YAMASHITA J, CHUN TH, INOUE M, MASATSUGU K, SAWADA N, SAITO T, INOUE G, NISHIMURA H, YOSHIMASA Y, NAKAO K. (1999) Down regulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ expression by inflammatory cytokines and its reversal by thiazolidinediones. *Diabetologia*, **42**, 702-710.
- TSUTSUMI K, HAGI A, INOUE Y (2001) The relationship between plasma high density lipoprotein cholesterol levels and cholesteryl ester transfer protein activity in six species of healthy experimental animals. *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 579-581.
- VERWAERDE P, GALINIER M, FOURCADE J, MASSABUAU P, GALITZKY J, SENARD JM, TRAN MA, BERLAN M, MONTASTRUC JL (1997) Autonomic nervous system abnormalities in the initial phase of insulin resistance syndrome. Value of the study of variability of cardiac rate and blood pressure on a model of nutritional obesity. *Arch. Mal. Coeur Vaiss.*, **90**, 1151-1154.
- VERWAERDE P, GALINIER M, ROUGE P, MASSABUAU P, GALITZKY J, SENARD JM, BERLAN M, MONTASTRUC JL (1996) Experimental hypertension induced by hypercaloric diet. *Arch. Mal. Coeur Vaiss.*, **89**, 1019-1023.
- VIDAL-PUIG A, JIMENEZ-LINAN M, LOWELL BB, HAMANN A, HU E, SPIEGELMAN B, FLIER JS, MOLLER DE (1996) Regulation of PPAR γ gene expression by nutrition and obesity in rodents. *J. Clin. Invest.*, **97**, 2553-2561.
- VILLA E, RABANO A, ALBARAN OG, RUILOPE LM, GARCIA-ROBLES R (1998) Effect of chronic combined treatment with captopril and pravastatin on the progression of insulin resistance and cardiovascular alterations in an experimental model of obesity in dogs. *Am. J. Hypertension*, **11**, 844-851.
- WANG C-S, Mc CONATHY WJ, KLOER HU, ALAUPOVIC P (1985) Modulation of lipoprotein lipase activity by apolipoproteins: effect of apolipoprotein C-III. *J. Clin. Invest.*, **75**, 384-390.
- YAMAUCHI T, KAMON J, WAKI H, TERAUCHI Y, KUBOTA N, HARA K, MORI Y, IDE T, MURAKAMI K, TSUBOYAMA-KASAOKA N, EZAKI O, AKANUMA Y, GAVRILOVA O, VINSON C, REITMAN ML, KAGECHIKA H, SHUDO K, YODA M, NAKANO Y, TOBE K, NAGAI R, KIMURA S, TOMITA M, FROGUEL P, KADOWAKI T (2001) The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat. Med.*, **7**, 941-946.