

Université de Montréal

**Relations entre la lipolyse adipocytaire, la périlipine et l'obésité dans une perspective de
physiopathologie telle le diabète de type II**

par
Pascal Collin

Département de kinésiologie

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en sciences de l'activité physique

Juin, 2005

© Pascal Collin, 2005



GV

201

U54

2005

V. 015

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Relations entre la lipolyse adipocytaire, la périlipine et l'obésité dans une perspective de
physiopathologie telle le diabète de type II**

présenté par :

Pascal Collin

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

M. Luc Léger, *président-rapporteur*

M. Jean-Marc Lavoie, *directeur de recherche*

M. Yan Burelle, *membre du jury*

RÉSUMÉ

L'obésité est souvent associée à un déséquilibre métabolique à l'origine de nombreuses physiopathologies telles que le diabète de type II et les maladies cardio-vasculaires. À cet égard, la «théorie portale» propose que le tissu adipeux viscéral est responsable de l'insulino-résistance périphérique dû à des fluctuations lipolytiques importantes avec l'obésité. La périlipine A est une phosphoprotéine impliquée directement dans le métabolisme lipolytique adipocytaire en exerçant un obstacle entre les lipases intracellulaires et les lipides contenus dans les gouttelettes lipidiques. Cette étude a donc pour objet de déterminer, s'il y a lieu, un lien entre les changements lipolytiques adipocytaires, le contenu de périlipine A ainsi que l'infiltration lipidique au foie en réponse à une diète riche en lipides. Des rates Sprague-Dawley ont été soumises à une diète riche en lipides (HF; 42% des kcal) ou une diète standard (SD) pendant 1, 2, 3 ou 8 semaines. Dès la première semaine, la concentration des triglycérides hépatiques sont significativement supérieures ($p < 0.05$) pour la condition HF par rapport à la condition SD, atteignant un sommet à la deuxième semaine. De la même façon, le poids du tissu mésentérique ainsi que la concentration plasmatique des acides gras libres sont supérieurs ($p < 0.05$) avec la diète HF et ce, de la première à la huitième semaine. Aucun changement ne survient, dans le tissu mésentérique, tant pour la lipolyse basale que stimulée (isoproterenol : 10^{-7} , 10^{-5} et 10^{-4} M) au cours des 3 premières semaines, quelle que soit la composition de la diète. Par contre, la lipolyse basale (10.86 ± 3.5 vs 4.4 ± 0.95 μ moles glycerol/million cells/h) et stimulée (10^{-4} : 35.2 ± 9.6 vs 15.3 ± 3.4 μ moles glycerol/million cells/h) sont significativement plus élevées à la semaine 8 lors d'un régime HF par rapport à SD. Lorsqu'exprimées en unités arbitraires, les données de périlipine, dans le tissu mésentérique, ne démontrent aucun effet tant pour la diète que pour le temps. Toutefois, si les valeurs sont converties en unités arbitraires par unité de poids du tissu mésentérique, celles-ci s'avèrent significativement plus basses pour les animaux de la condition HF et ce, pour tous les temps. En conclusion, ces résultats n'indiquent aucune relation particulière entre la lipolyse du tissu mésentérique ainsi que son contenu en périlipine et l'infiltration rapide (semaines 1-2) des lipides au foie chez des rates soumises à une diète riche en lipides.

Mots clés : acides gras libres, isoproterenol, leptine, stéatose hépatique, triglycérides

SUMMARY

Obesity is often associated with metabolic disorders leading to the development of type II diabetes and cardiovascular diseases. The «portal theory» states that visceral adipose tissue is responsible for the development of insulin-resistance of non-adipose tissues through enhanced lipolysis with increased adiposity. Perilipins are phosphoproteins implicated in adipocyte lipolytic metabolism by blocking the access to intra-cytosolic lipases upon their translocation to the lipid droplets. The purpose of the present study was to determine if a change in lipolysis and perilipin content in adipose tissue may be associated with liver lipid infiltration induced by a high-fat diet regimen. Female Sprague-Dawley rats were submitted to a high-fat (HF; 42% as kcal) or a standard diet (SD) for 1, 2, 3, or 8 wk. Liver triglyceride concentrations were significantly ($P < 0.01$) higher in HF than in SD fed rats as soon as 1 wk and throughout the experiment, the highest values being reached at wk 2 of the diet. Similarly, fat accretion in the mesenteric tissue and plasma FFAs levels were higher ($P < 0.05$) in HF than in SD fed rats as soon as 1 wk after the beginning of the diet, this difference being maintained throughout the following wk. On the opposite, basal and stimulated (isoproterenol: 10^{-7} , 10^{-5} and 10^{-4} M) lipolysis in the mesenteric fat depot was not changed during the first 3 wk, whether under the HF or the SD diet condition. Lipolysis in the mesenteric adipose tissue in the basal (10.8 ± 3.5 vs 4.4 ± 0.9 umoles glycerol/million cells/h) and stimulated (10^{-4} M: 35.2 ± 9.6 vs 15.3 ± 3.4 umoles glycerol/million cells/h) states was, however, higher ($P < 0.01$) in HF than in SD fed rats after 8 wk of the diets. There were no significant ($P > 0.05$) effects of diet and time on perilipin content of mesenteric tissue expressed in arbitrary units. However, perilipin content, expressed in arbitrary units per unit of mesenteric fat weight, was significantly ($P < 0.01$) lower in HF than in SD fed rats at all time points. These results do not provide any evidence that an increased lipolysis is responsible for the rapid increase in liver lipid infiltration upon the undertaken of a high-fat diet in animals.

Key words: hepatic steatosis, isoproterenol, leptin, plasma free fatty acids, triglycerides

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	iii
Summary	iv
Liste des tableaux	vii
Liste des figures	viii
Liste des abréviations	x
Remerciements	xii

Revue de littérature (1 à 53)

1 Introduction aux «lipid droplet-associated proteins»	2
1.1 ADRP	5
1.2 TIP 47 / S3-12	6
2 Périlipine	8
2.1 Aspects mécanistes	8
2.1.1 Comportement et fonctions cellulaires de la périlipine	8
2.1.2 Périlipine «knock-out»	16
2.1.3 Périlipine et activation de la lipolyse (cellules CHO)	22
2.2 Obésité et régulation	26
2.2.1 Périlipine, lipolyse et obésité	26
2.2.2 Périlipine et régulation	30
3 Lipolyse adipocytaire	33
3.1 Aspects mécanistes	33
3.2 Lipolyse et obésité	38
3.2.1 Impact de l'obésité sur la lipolyse adipocytaire	39
3.2.2 Lipolyse viscérale et «théorie portale»	47

Article (54 à 79)

Abstract.....	56
Introduction.....	57
Methods.....	59
Results.....	64
Discussion.....	66
Legends.....	72
Tables.....	74
Figures.....	75
Références.....	80

LISTE DES TABLEAUX

Revue de littérature :

- Tableau I. Séquestration des TG chez des fibroblastes exprimant la périlipine (p.12).
- Tableau II. Activité des lipases chez des fibroblastes exprimant la périlipine (p.14).
- Tableau III. Lipolyse basale et stimulée chez les adipocytes des souris n'exprimant pas la HSL (p.44).

Article :

- Table I. Poids corporel des rates contrôles, des rates soumises à une diète standard ainsi que des rates soumises à une diète riche en lipides, les diètes étant administrées pour 1, 2, 3 et 8 semaines (p.74).

LISTE DES FIGURES

Revue de littérature :

- Figure 1. Immunofluorescence des gouttelettes lipidiques contenues dans les adipocytes (p.3).
- Figure 2. Identité et similarité des protéines PAT (p.4).
- Figure 3. Immunofluorescence des gouttelettes lipidiques contenues dans les fibroblastes (p.5).
- Figure 4. Translation des deux protéines, HSL et périlipine, suite à diverses stimulations lipolytiques induites par l'isoproterenol dans les adipocytes matures de rats Wistar (p.10).
(A et B)
- Figure 5. Inhibition de l'estérification (TG), par la triacine C, dans les pré-adipocytes 3T3-L1 exprimant la périlipine A ainsi que les contrôles (p.13).
- Figure 6. Accroissement de la séquestration des TG dû à la diminution du taux d'hydrolyse dans les cellules exprimant la périlipine (p.14).
- Figure 7. Absence d'activation lipolytique chez les souris n'exprimant pas la périlipine (p.19).
- Figure 8. Substitution de la périlipine à l'ADRP lors de la différenciation adipocytaire des souris n'exprimant pas la périlipine (p.20).
- Figure 9. Absence de translation de la HSL lors d'une stimulation lipolytique dans les adipocytes des souris n'exprimant pas la périlipine (p.21).
- Figure 10. Cinétique lipolytique chez des cellules (CHO) contrôles, exprimant la périlipine ou exprimant une «périlipine mutée» (p.23).
(A, B et C)
- Figure 11. Activation lipolytique chez plusieurs lignées de cellules génétiquement modifiées telles que les contrôles, HSL seulement, périlipine seulement et HSL / périlipine (p.25).
(A, B, C et D)
- Figure 12. Relation entre l'ARNm et la périlipine dans le tissu adipeux sous-cutané par rapport au degré d'obésité, en l'occurrence le pourcentage de graisse corporelle (p.28).
- Figure 13. Principaux rouages de l'activation lipolytique adipocytaire (p.37).
- Figure 14. Corrélation entre la lipolyse adipocytaire et le volume cellulaire (p.40).
- Figure 15. Sélectivité et rendement lipolytique de l'ATGL (p.44).
- Figure 16. Rôle des AGL dans la contribution à la stéatose hépatique et l'insulino-résistance (p.52).

Article :

- Figure 1. Mesures des TG hépatiques et des divers paramètres plasmatiques tels que les AGL, la leptine et le glucose sanguin chez les rates nourries à l'aide d'une diète riche en lipides ou standard pendant 1, 2, 3 ou 8 semaines (p.75).
(A, B, C et D)
- Figure 2. Poids relatif (g/100g de poids corporel) des dépôts adipeux mésentérique et rétropéritonéal chez les rates nourries à l'aide d'une diète riche en lipides ou standard pendant 1, 2, 3 ou 8 semaines (p.76).
- Figure 3. Lipolyse adipocytaire du dépôt adipeux mésentérique chez les rates contrôles ainsi que les rates nourries à l'aide d'une diète riche en lipides ou standard pendant 1, 2, 3 ou 8 semaines (p.77).
(A, B, C et D)
- Figure 4. Lipolyse adipocytaire du dépôt adipeux rétropéritonéal chez les rates contrôles ainsi que les rates nourries à l'aide d'une diète riche en lipides ou standard pendant 1, 2, 3 ou 8 semaines (p.78).
(A, B, C et D)
- Figure 5. Les taux de périlipine absolu (AU) et relatif (AU/g fat) mesurés dans le dépôt adipeux mésentérique des rates contrôles ainsi que les rates nourries à l'aide d'une diète riche en lipides ou standard pendant 1, 2, 3 ou 8 semaines (p.79).

LISTE DES ABRÉVIATIONS

aa	acide aminé
ACC-1 et 2	acetyl-CoA carboxylase-1 et 2
ADRP	adipose differentiation-related protein
AGL	acide gras libre
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATGL	adipose triglyceride lipase
AU	arbitrary units
CHO	chinese hamster ovary
CPT-1	carnitine palmitoyltransferase-1
DG	diglycérine
DGAT-1 et 2	diacylglycerol acyltransferase-1 et 2
DO	densité optique
FABP	fatty acid-binding protein
FDPase	fructose-1,6-diphosphatase
FFAs	free fatty acids
G-6-Pase	glucose-6-phosphatase
L-3-HACD	L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase
HDL	high-density lipoprotein
HF	high-fat
HSL	hormone-sensitive lipase
HSL ⁺	HSL knock-out gene
IBMX	3-isobutyl-1-methylxanthine

IMC	indice de masse corporelle
KO	kock-out
LDAPs	lipid droplet-associated proteins
LDL	low-density lipoprotein
LPL	lipoprotein lipase
LSD-1 et 2	drosophila lipid storage droplet-1 et 2
MAPKs	mitogen-activated protein kinases
MG	monoglycérade
MGL	monoglyceride lipase
PEPCK	phosphoenolpyruvate carboxykinase
Pi	phosphate inorganique
PKA	protein kinase A
PLIN ^{-/-}	perilipin kock-out gene
PPARs	peroxisome proliferator-activated receptors
PPRE	PPAR-responsive element
SD	standard
TG	triglycérade
TIP 47	tail-interacting protein of 47 kDa
TNF- α	tumour necrosis factor-alpha
TZD	thiazolidinedione
UCP-1, 2 et 3	uncoupling protein-1, 2 et 3
VLDL	very-low-density lipoprotein

REMERCIEMENTS

Mes remerciements les plus spontanés sont dirigés à l'endroit de mon directeur de recherche, M. Jean-Marc Lavoie, lequel m'a guidé admirablement, tout au long de mon cheminement au cycle supérieur. Son encadrement soutenu fut, très certainement, l'un des outils essentiels à la réalisation de ce mémoire ainsi qu'au développement de mes intérêts pour la recherche. Sa curiosité, sa simplicité et son sens de l'interprétation lui sont des qualités indéniables, lesquelles j'espère tirer profit dans mes éventuelles aspirations professionnelles.

Mes remerciements les plus amicaux sont à l'endroit de cette belle équipe qui, tantôt travaille avec acharnement, tantôt rit aux éclats, dans les laboratoires du département de kinésiologie. La science peut paraître austère lorsque l'on tente de la comprendre mais elle devient si rafraîchissante lorsqu'on l'exécute avec des gens créatifs, fiables et compréhensifs. Vous me permettrez de saluer et de remercier, plus particulièrement, Natalie Chapados, qui fut ma collègue immédiate, tout au long de notre projet de recherche. Je crois que je me souviendrai toujours de nos esprits vifs dans nos corps de mort vivant, au sixième étage, avant même que le soleil se pointe le bout du nez. Merci pour tous ces rires, Nat!

Mes remerciements les plus chaleureux sont destinés à mes parents, Michel et Thérèse Collin, lesquels ont fait preuve d'une compréhension et d'une patience exemplaire tout au long de cette épopée étudiante dont les débuts remontent à bien longtemps déjà. L'accomplissement de ce mémoire n'aurait su aboutir sans leur soutien moral et les précieux conseils, particulièrement dans le fonctionnement de certains logiciels. Cette fierté d'avoir complété ce mémoire est partagée avec chacun de vous deux. Merci mille fois!

Mes remerciements les plus amoureux sont destinés à Annie Fournier, une charmante jeune femme qui m'a séduit, il y a cinq ans déjà. À cette époque, tu m'aurais fuit en courant en sachant que mon parcours d'étudiant s'allongerait encore de cinq bonnes années. Je crois bien que ta patience fut enfin récompensée malgré tout ces hauts et ces bas. Tu m'as tendu la main lorsque j'étais au plancher, tu m'as remis sur le droit chemin lorsque je me suis égaré et, par-dessus tout, tu as toujours respecté les décisions que j'ai prises, quelle qu'en soit l'envergure. Simplement, merci pour tout, Annie!

REVUE DE LITTÉRATURE

1 Introduction aux «lipid droplet-associated proteins»

Bien que «lipide» soit le premier mot qui nous vient à l'esprit lorsque l'on évoque l'adipocyte, l'ère de la biologie moléculaire nous incite fortement à investiguer davantage le rôle des protéines adipocytaires dans une perspective d'obésité associée à diverses pathologies. À ce propos, l'adipocyte suscite l'intérêt de nombreux chercheurs depuis une quinzaine d'années; lui qui s'est avéré plutôt négligé durant la période octante. À la défense de la communauté scientifique, le fléau de l'obésité ne constituait pas le même fiasco économique qu'aujourd'hui. C'est donc au tout début des années 90' que l'intérêt scientifique pour l'adipocyte s'accroît et que l'on constate que cette cellule possède des fonctions beaucoup plus élaborées qu'un simple site d'entreposage pour les lipides en excès. À titre d'exemple, l'adipocyte sécrète plusieurs cytokines et facteurs peptidiques, lesquels sont des messagers importants pour de nombreux tissus cibles. Plus exactement, en 1991, Greenberg et al.²⁵ découvrent la première protéine d'une série de quatre qui mène vers une compréhension plus exhaustive et à la fois mécaniste du fonctionnement métabolique de l'adipocyte. Cette protéine, qui fait maintenant partie de la grande famille communément appelée «lipid droplet-associated proteins» (LDAPs), se nomme: périlipine.

La périlipine est une protéine de 517aa (62kDa) codée par un seul gène et qui, potentiellement, peut être transcrite (tronquée) sous trois isoformes différents, soit la périlipine A, B et C^{41,42}. L'isoforme A est d'emblée le plus abondant et ainsi on le retrouve dans les tissus adipeux et stéroïdogéniques (glande corticosurrénale, testicules et ovaires)^{41,42}. L'isoforme B est plutôt spécifique aux adipocytes alors que l'isoforme C est associé aux cellules stéroïdogéniques exclusivement^{41,42}. Puisque l'adipocyte s'avère le principal champ

d'intérêt de cet ouvrage, le terme «péripiline» fera référence à l'isoforme A pour le restant de cette rédaction puisqu'il est de loin le plus impliqué dans le métabolisme adipocytaire.

Brièvement, la péripiline est une protéine qui confère une certaine structure aux gouttelettes lipidiques contenues dans l'adipocyte en s'agglomérant à la surface de celles-ci (Figure 1). Il est important de rappeler que la source de lipides dans les adipocytes consiste en de petites gouttelettes (~50µm), regroupant, essentiellement, des triglycérides et des esters de cholestérol entourées d'une monocouche de phospholipides. Très tôt après sa découverte, on découvre que la péripiline est une phosphoprotéine et, du même coup, une cible du système AMPc dépendant, celui même impliqué dans le processus de la lipolyse²⁶. L'expression de la péripiline étant propre aux adipocytes, il est intéressant de s'interroger sur son rôle exact dans la cellule ainsi qu'à sa participation dans l'activation de la lipolyse en présence d'un agent stimulant. Évidemment, le métabolisme adipocytaire étant considéré comme une cause possible expliquant l'apparition du syndrome métabolique, il devient impératif de déterminer si la péripiline constitue un point de contrôle important pour la mise en circulation d'AGL et/ou la séquestration d'AGL. Pour répondre à cette question de façon exhaustive, une section complète de ce chapitre sera accordée à la péripiline et à son implication dans le métabolisme adipocytaire (section 2). Auparavant, il est nécessaire de décrire brièvement les autres membres des LDAPs afin de mieux comprendre le lien unissant toutes ces protéines, leur impact sur le métabolisme ainsi que les éventuelles recherches à considérer.

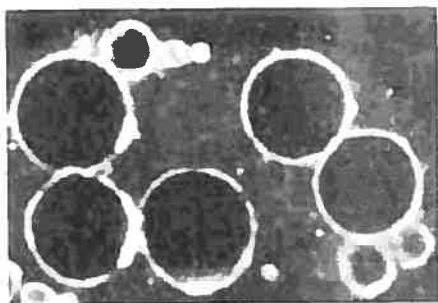


Figure 1. Les gouttelettes lipidiques consistent en de volumineuses sphères (dans ce cas-ci, 15-20µm) «tapissées» de péripiline. à l'état basal⁴². Elles sont beaucoup plus grosses dans les adipocytes matures (~50µm) que dans tous les autres types de tissu (< 0.5µm). Ces résultats sont obtenus par immunofluorescence, en l'occurrence un anticorps spécifique à la péripiline portant une teinte fluorescente et visible au microscope.

Outre la périlipine, il existe trois autres protéines classées dans la même famille: adipose differentiation-related protein (ADRP), tail-interacting protein of 47kDa (TIP 47) et S3-12⁴². On retrouve aussi d'autres protéines aux caractéristiques similaires chez certains insectes, LSD-1 et LSD-2, suggérant un rôle possible, pour ces protéines, dans le courant de l'évolution⁵⁰. Toutes ces protéines possèdent une certaine similarité quant à leur structure primaire sans compter qu'elles sont toutes exprimées majoritairement dans le tissu adipeux (Figure 2)^{28,42,50}. Néanmoins, le véritable lien unissant chacune d'entre elles réside dans leur capacité de liaison avec les gouttelettes lipidiques contenues dans les cellules, principalement les adipocytes. À ce jour, on considère ces quatre protéines comme étant membre de la famille PAT (Périlipine, ADRP et TIP 47; S3-12 étant une découverte plus récente)^{28,42}. Il se pourrait bien que ce soit un des nouveaux filons de la recherche en vertu du lien apparent entre ces protéines et le diabète de type II. À cet égard, la périlipine est sans doute la plus connue. Toutefois, pour mieux assimiler le fonctionnement de ces protéines ainsi que leur complémentarité, les trois autres méritent aussi qu'on y jette un oeil.

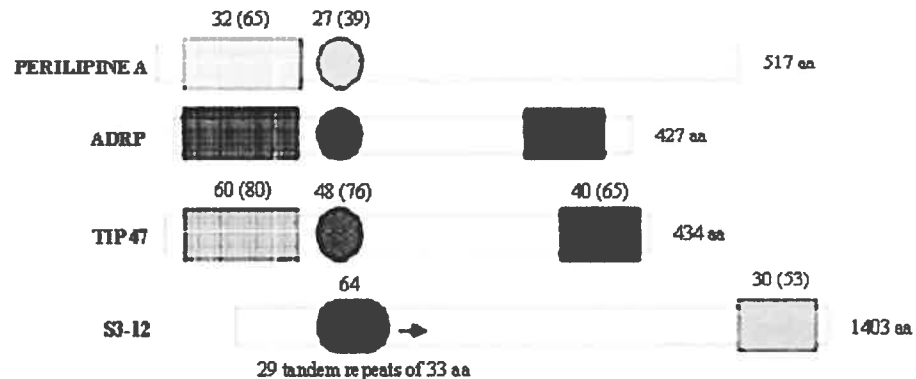


Figure 2. Les trois régions identifiées dans l'ADRP possèdent certaines séquences similaires avec les trois autres protéines membres de la famille PAT⁴². Le premier chiffre au-dessus de chaque région représente un pourcentage de leur identité tandis que le chiffre entre parenthèse équivaut au pourcentage de similarité avec la protéine ADRP. Le degré de similitude avec l'ADRP est aussi représenté par les teintes, en l'occurrence une homogénéité supérieure pour une teinte foncée.

1.1 ADRP

L'ADRP est un peptide de 425 aa (50kDa), environ 20% plus petit que la périlipine (il n'est pas rare de rencontrer le terme adipophiline, cet homologue étant la version humaine de l'ADRP)³². Découverte en 1992, ceci fait de l'ADRP la plus étudiée avec la périlipine dans le domaine des protéines de la famille PAT. Cette protéine est exprimée dans tous les tissus pouvant contenir des gouttelettes lipidiques, ainsi on en retrouve particulièrement dans les fibroblastes, le foie, les poumons, les cellules stéroïdogéniques et les macrophages pour ne nommer que ceux-ci^{10,50}. Malgré que le tissu adipeux soit de loin le plus important en matière de quantité de gouttelettes lipidiques, l'ADRP n'y est pas exprimée, du moins pas dans les adipocytes matures (Figure 3). Désormais, il est connu que l'ADRP et la périlipine, en règle générale, ne sont pas coexprimées dans les adipocytes^{10,42}. Par contre, il existe une certaine complémentarité entre les deux protéines de sorte que l'ADRP est exprimée en grande quantité dans les fibroblastes (adipocytes immatures) et elle semble se rétracter avec la croissance des cellules pour laisser place à la périlipine dans les adipocytes matures^{10,42}. De fait, l'ADRP semble favoriser la différenciation des fibroblastes en adipocytes en augmentant la séquestration des lipides qui entrent dans la cellule par le biais de la LPL. Curieusement, on ne sait toujours pas si cette protéine PAT est indispensable à la différenciation de certaines cellules qui nécessitent un apport important en lipides pour le développement foetal. L'ADRP n'a jamais été désactivée dans le patrimoine génétique d'un rongeur (gène «knock-out»).

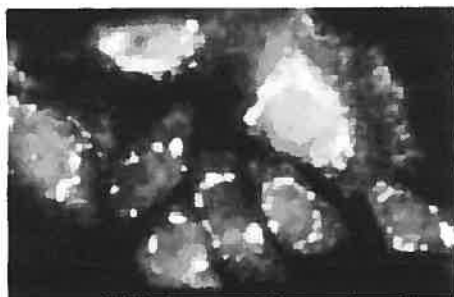


Figure 3. Immunofluorescence d'ADRP effectuée sur des gouttelettes lipidiques de cellules CHO (Chinese Hamster Ovary)⁴². Ces cellules sont des fibroblastes et donc non différenciées. Les zones particulièrement éclaircies sont parsemées de gouttelettes lipidiques < 0.5µm.

Par ailleurs, l'ADRP n'étant pas une phosphoprotéine comme la périlipine, son rôle semble confiné à la séquestration des lipides pour les besoins ultérieurs de la cellule^{10,22,50}. Vraisemblablement, l'ADRP ne participe pas activement à la libération d'AGL mais bien à la conservation de ceux-ci. En ce sens, il n'y a plus de doute que l'ADRP facilite la séquestration des lipides autant dans les fibroblastes que dans les autres cellules où elle est transcrite (hépatocytes, par exemple). Malgré tout, plusieurs interrogations restent en suspens concernant le rôle exact de cette protéine.

À titre d'exemple, une seule étude met directement en relief le foie et l'ADRP⁶⁶. Dans cette étude⁶⁶, des rats traités à l'etomoxir (inhibiteur de la carnitine palmitoyl transférase-1) ont développé, sans surprise, un certain degré de stéatose hépatique mais étonnamment un contenu en ADRP beaucoup plus élevé que les rats contrôles. On peut donc affirmer qu'une accumulation de lipides dans le foie provoque une expression accrue d'ADRP. Par conséquent, cette protéine ayant la propriété d'emprisonner les lipides à l'intérieur du tissu, ceci instaure un cycle favorable à la stéatose. D'ailleurs, il serait possible que les PPAR- γ soient responsables de l'activation génique de l'ADRP dans les tissus où le gène est actif, particulièrement le foie⁶¹. Sachant que les lipides hépatiques induisent une insulino-résistance qui réduit l'inhibition de la production de glucose causée par l'insuline, l'ADRP pourrait jouer un rôle dans le développement du syndrome métabolique.

1.2 TIP 47 / S3-12

Enfin, les deux dernières protéines PAT, TIP 47 et S3-12, sont de récentes découvertes (1998) de telle sorte que peu d'informations sont répertoriées dans la littérature à leur sujet. Leur rôle exact dans le métabolisme des lipides adipocytaires est inconnu, bien que l'on sache,

depuis peu, que ces protéines ont la possibilité de s'associer aux gouttelettes lipidiques. La principale fonction de TIP 47 semble bien établie puisqu'elle participe activement dans l'endocytose du récepteur au mannose 6-phosphate¹⁷. D'autre part, il se pourrait qu'elle soit impliquée, de même que S3-12, dans la formation de nouvelles gouttelettes lipidiques par le biais d'un mécanisme que l'on ignore à l'heure actuelle^{73,74}. Toutefois, Wolins et al.⁷², dans une étude récente, suggèrent qu'il existe déjà des «réservoirs cytosoliques» de S3-12 et de TIP 47, dans les pré-adipocytes, pouvant rapidement incorporer des TG dans de toutes nouvelles gouttelettes lipidiques. Par ailleurs, l'expression de S3-12 pourrait être contrôlée par les PPAR- γ et ainsi l'obésité abaisserait le contenu de S3-12 dans l'adipocyte¹⁶. Si l'on reste conséquent avec l'hypothèse de départ qui stipule que certaines protéines PAT sont impliquées dans la formation des gouttelettes lipidiques, on pourrait affirmer qu'un adipocyte mature déjà infiltré par une grande quantité de lipides (constitué de gouttelettes lipidiques volumineuses) ne fabrique plus de nouvelles gouttelettes lipidiques mais emmagasine plutôt les lipides par le biais des autres déjà formées. Peut-être ceci explique-t-il la faible expression de S3-12 chez les rats obèses? Somme toute, des études subséquentes doivent être considérées pour mieux établir les effets et la régulation des protéines PAT sur la formation et le métabolisme des gouttelettes lipidiques.

2 Périlipine

2.1 Aspects mécanistes

2.1.1 Comportement et fonctions cellulaires de la périlipine

La périlipine semble participer dans le métabolisme de la lipolyse adipocytaire. D'une part, elle s'avère la protéine plus abondante à la surface des gouttelettes lipidiques. D'autre part, il est démontré que l'activation de la HSL par phosphorylation *in vitro* est de loin moins efficace que son activation *in vivo*, par le biais des récepteurs β -adrénergiques⁴¹. Évidemment, ce dernier constat suggère que la lipolyse est stimulée non seulement par la HSL mais aussi par d'autres mécanismes cellulaires. À ce sujet, Clifford et al.¹⁵ se sont penchés sur la question en développant une étude sur la translation des deux protéines en cause (HSL et périlipine) dans le milieu cellulaire lors d'une stimulation lipolytique. De façon plus détaillée, l'objectif de cette étude¹⁵ était d'élucider le mécanisme lipolytique adipocytaire (prélevé de la graisse épидидymale de rats Wistar) en analysant le trajet cellulaire des deux protéines ci-mentionnées lors d'un état lipolytique basal (sans stimulation β -adrénergique) ainsi que stimulé (isoproterenol 0.01 μ M, 0.1 μ M et 1 μ M). De plus, cette expérimentation¹⁵ compare l'activité lipolytique de jeunes rats (180-220g de masse corporelle) à des rats plus âgés (230-280g de masse corporelle).

Brièvement, leur astuce fut de mesurer la lipolyse basale et stimulée sur des adipocytes isolés pour ensuite séparer, dans chacune des conditions, la phase cytosolique de la phase lipidique de ces mêmes cellules en vue de mesurer la périlipine et la HSL (Western blot) dans chaque phase. Ainsi, on peut s'attendre à ce qu'une grande proportion de la HSL totale se trouve dans le cytosol à l'état basal. À l'opposé, une grande quantité de HSL doit se retrouver dans la phase lipidique à l'état stimulé puisque le résultat même de son action résulte en

l'hydrolyse des TG formant les gouttelettes lipidiques. Mais qu'en est-il réellement? La périlipine change-t-elle aussi de compartiment cellulaire?

Les résultats confirment l'hypothèse selon laquelle l'enzyme lipolytique migre vers les gouttelettes lipidiques en présence d'isoproterenol puisque 80% de la HSL totale se retrouve dans la phase lipidique (gouttelettes lipidiques) lors d'une stimulation maximale d'isoproterenol (1 μ M) en partant de 40% à l'état basal. Qui plus est, l'inhibition de la HSL (orlistat) n'affecte pas cette translation malgré que la lipolyse maximale soit diminuée par plus de 50%, ce qui implique que la phosphorylation de l'enzyme n'est pas nécessaire à son déplacement cellulaire. Par ailleurs, on retrouve cette translation enzymatique seulement chez les jeunes rats (Figure 4A). Les rats plus âgés ne possèdent pas ce schéma mécaniste de la lipolyse alors que la HSL, avec stimulation ou non, reste dans la phase cytosolique comme en témoigne les 80% de la HSL totale dans le cytosol, autant à l'état basal que stimulé. Pourtant la lipolyse est bel et bien augmentée suite à la présence des diverses concentrations d'isoproterenol et ce, malgré qu'elle soit environ quatre fois moins élevée à stimulation maximale que les jeunes rats. Il est à noter que l'augmentation relative de la stimulation maximale par rapport à l'état basal, pour chacun des groupes d'animaux, n'est pas précisé.

Clifford et al.¹⁵ révèlent également une compartimentation différente de la protéine PAT selon le degré de stimulation cellulaire. En effet, il existe bel et bien une relocalisation de la périlipine à l'intérieur même de l'adipocyte de telle sorte que celle-ci transfère significativement de la phase lipidique (gouttelettes lipidiques) au cytosol en présence d'un stimulant β -adrénergique tel que l'isoproterenol (environ 40% de la périlipine totale subit une relocalisation cellulaire). Par contre, cet effet n'est constaté que chez les rats plus âgés (Figure 4B) laissant ainsi présager la présence de deux mécanismes lipolytiques distincts selon le

degré de vieillissement des rats : d'une part, une translation de la HSL du cytosol vers les gouttelettes lipidiques en bas âge et d'autre part, une translation de la périlipine des gouttelettes lipidiques vers le cytosol avec le vieillissement.

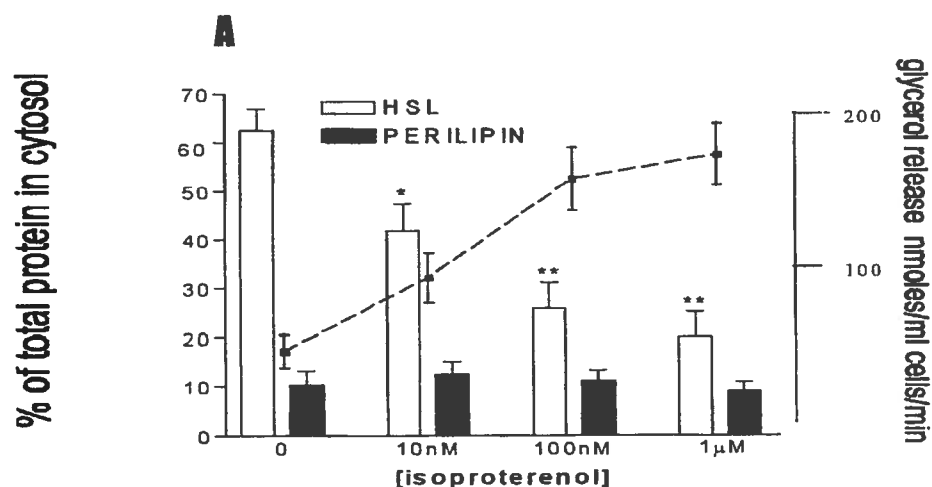


Figure 4A. Translation de la HSL suite à diverses stimulations lipolytiques induites par l'isoproterenol dans les adipocytes de jeunes rats Wistar (180-220g)¹⁵. Après cinq minutes d'incubation, les cellules furent brisées afin de séparer les phases lipidique et cytosolique. Les protéines furent mesurées par Western blot.

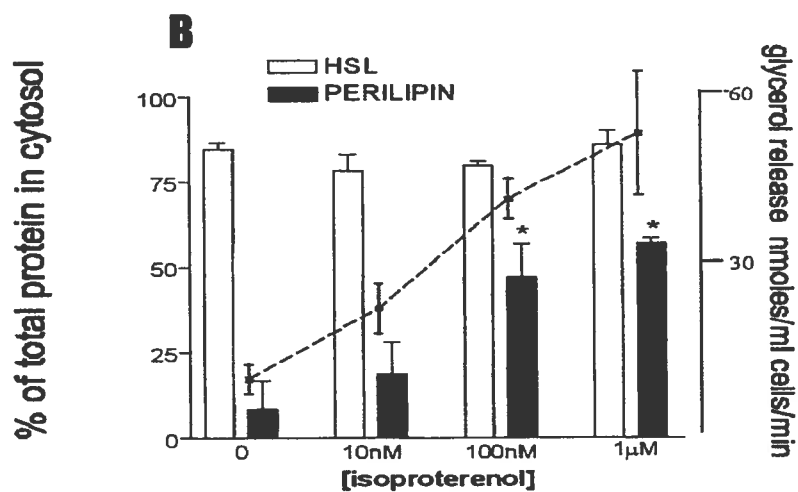


Figure 4B. Translation de la périlipine suite à diverses stimulations lipolytiques induites par l'isoproterenol dans les adipocytes de rats matures Wistar (230-280g)¹⁵. Après cinq minutes d'incubation, les cellules furent brisées afin de séparer les phases lipidique et cytosolique. Les protéines furent mesurées par Western blot.

Il est à noter que les deux protéines en cause (HSL et périlipine) ont été mesurées par Western blot utilisant un anticorps spécifique pour chacune d'elles. L'anticorps reconnaît la protéine phosphorylée et non phosphorylée. Afin de s'assurer que la phosphorylation est véritablement la cause de la translation de la périlipine, Clifford et al.¹⁵ ont ajouté une forte concentration de [³²P]Pi. Par exemple, la phosphorylation maximale de la périlipine (isoproterenol 1 μM) survient après deux minutes selon les bandes visibles. Le Western blot nous permet d'affirmer que la périlipine, dans cette condition, se retrouve majoritairement dans le cytosol. Enfin, la lipolyse stimulée atteint son plein potentiel après seulement deux minutes, ce délai temporel correspondant parfaitement au degré de phosphorylation maximale de la périlipine.

En outre, il serait possible que la périlipine affecte non pas la lipolyse comme telle, mais bien l'estérification des AGL en TG. Une diminution momentanée de l'estérification des AGL pourrait avoir les mêmes répercussions que la lipolyse. Cette étude¹⁵ n'en fait pas mention mais il faut bien comprendre que cela est peu probable. Effectivement, les enzymes estérifiantes (DGAT-1 et 2, par exemple) se retrouvent au niveau des membranes du réticulum endoplasmique, donc dans une phase lipidique. Or, Clifford et al.¹⁵ indiquent que la lipolyse est plus élevée lorsque la périlipine passe de la phase lipidique à la phase cytosolique. Par conséquent, la périlipine cytosolique ne peut, d'aucune façon, inhiber les enzymes estérifiantes contenues dans la phase lipidique.

D'après cet ouvrage¹⁵, la contribution de la périlipine au mécanisme de la lipolyse adipocytaire semble indubitable (du moins, chez les rats âgés). De façon plus convainquante, Clifford et al.¹⁴ ont reproduit ces résultats chez des femelles matures (Wistar), c'est-à-dire une activité lipolytique accrue, en présence d'isoproterenol, déterminée par une translation de la

périlipine mais non de la HSL; ces manipulations ayant été effectuées sur des adipocytes du tissu viscéral. À l'instar de ces résultats^{14,15}, il semble bien que la périlipine ait un rôle à jouer dans le mécanisme lipolytique des rats matures, autant chez les femelles que les chez mâles. Pourtant, le rôle exact de cette protéine demeure encore nébuleux. Somme toute, plusieurs questions demeurent encore sans réponse. Qu'advient-il de la relation périlipine/lipolyse à l'état basal? La périlipine est-elle nécessaire à la formation des gouttelettes lipidiques? De quelle façon tous ces événements de la cascade enzymatique interviennent-ils dans la lipolyse?

Pour tenter d'y répondre en partie, Brasaemle et al.¹⁹ ont élaboré une étude comparative entre une série de cellules contenant le gène actif de la périlipine et une autre série de cellules ne contenant pas ce gène. En fait, ils ont exprimé la périlipine dans des pré-adipocytes du type 3T3-L1 (qui expriment l'ADRP mais pas le gène de la périlipine avant leur différenciation) à l'aide d'un vecteur viral contenant le gène de la périlipine ou encore avec ce même vecteur vide (pour les mesures contrôles). Ils ont ensuite incubé ces cultures cellulaires dans un sérum lipidique pendant 24 heures pour en venir à la conclusion que les pré-adipocytes exprimant la périlipine peuvent séquestrer davantage de TG (un minimum de six fois plus) que les autres cellules contrôles (Tableau I).

Sample	TG ($\mu\text{g}/\text{mg}$ cellular protein)
Experiment 1: control	5.1 \pm 0.9
Experiment 1: + perilipin A	32.8 \pm 6.3
Experiment 2: control	< 0.5
Experiment 2: + perilipin A	16.5 \pm 5.9

Tableau I. Deux expérimentations identiques ont été effectuées, chaque échantillon étant la moyenne d'au moins un triplicata¹². Les TG sont mesurés par chromatographie quantitative.

Toujours dans cette même étude¹², les auteurs voulaient s'assurer qu'il s'agissait vraiment d'une diminution de la lipolyse et non pas d'une amplification de la synthèse des TG. Ils ont donc répété l'incubation (16h) en ajoutant de la triacsine C (inhibiteur de l'acyl-CoA synthetase) et ils ont constaté d'une part, une réduction des TG intracellulaires pour les deux cultures pré-adipocytaires de l'ordre de 85-90% et d'autre part, cette réduction était équivalente autant pour les cellules génétiquement modifiées que pour les contrôles (Figure 5). Évidemment, si la périlipine avait un impact sur la synthèse des TG, l'effet de l'inhibiteur aurait été plus sévère pour les cellules pouvant exprimer celle-ci.

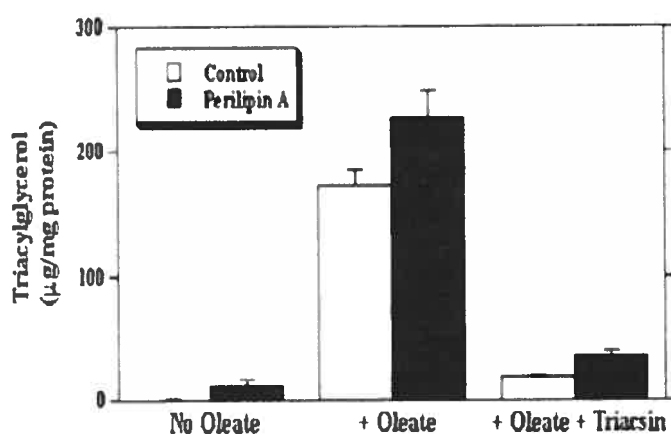


Figure 5. La triacsine C inhibe la synthèse des TG autant dans les pré-adipocytes 3T3-L1 exprimant la périlipine A que les contrôles¹². Les TG sont mesurés par chromatographie quantitative.

Ces auteurs¹² ont aussi effectué une cinétique de l'hydrolyse des TG pour les deux cultures cellulaires en les incubant dans un complexe acide oléique/albumine (16h) afin d'optimiser la synthèse et la séquestration des TG dans les cellules. Cette incubation fut suivie d'une autre incubation, mais cette fois en remplaçant le substrat lipidique par la triacsine C. Enfin, les quantités de TG intracellulaires ont été mesurées à divers temps en partant du temps 0 jusqu'à 35h après l'ajout de la triacsine C. Les résultats (Figure 6) indiquent bien à quel point les pré-adipocytes contenant la périlipine protègent mieux les TG contre les lipases cytosoliques (il est à noter que la HSL n'est pas exprimée dans les pré-adipocytes), les TG étant protégés environ cinq fois plus longtemps dans les cellules contenant la périlipine. À

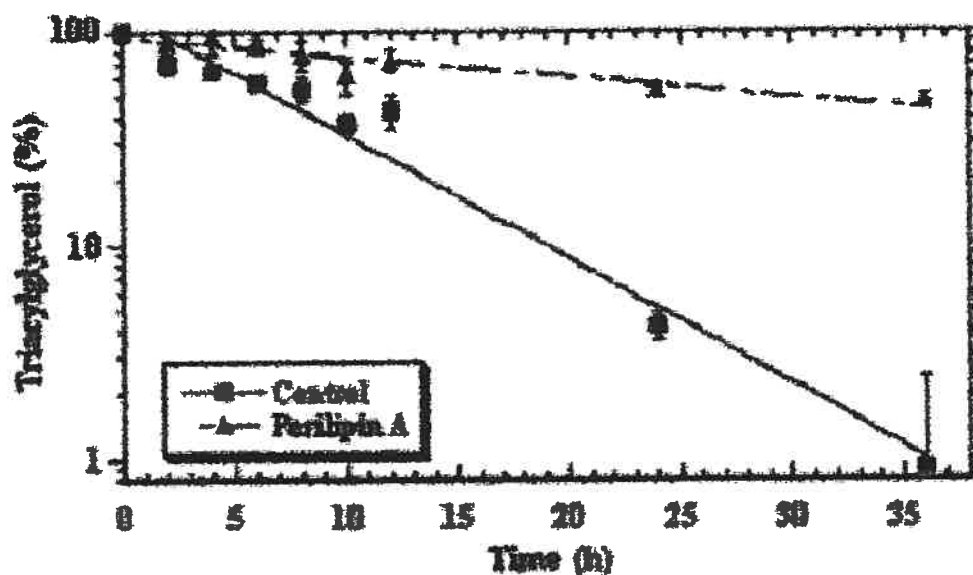


Figure 6. La périlipine A permet d'augmenter la séquestration des TG en diminuant leur taux d'hydrolyse¹². Les TG furent mesurés par chromatographie quantitative. Les TG sont exprimés en fonction du pourcentage de la quantité totale de TG immédiatement après l'incubation des cellules avec l'acide oléique. Les taux d'hydrolyse sont : $T^{1/2} = 6.8\text{h}$ (contrôles) vs $T^{1/2} = 30.5\text{h}$ (+périlipine A).

Experiment	Rate of [³ H] triolein hydrolysis (nmol FFA/mg protein/h)	
	control	+ perilipin A
1	1.35 ± 0.13	1.36 ± 0.01
2	0.81 ± 0.03	0.87 ± 0.02

Tableau II. Le taux d'hydrolyse des TG est identique autant pour les pré-adipocytes exprimant la périlipine A que les contrôles à partir des surnageants post-mitochondriaux incubés avec de la [³H] trioléine et émulsifiés à l'aide de gomme arabique pendant 1h à 30°C¹².

ce stade-ci, deux hypothèses peuvent être émises : soit la périlipine altère l'activité des lipases adipocytaires (par le biais de leur expression génétique, par exemple), soit elle empêche l'hydrolyse des TG par les lipases en créant un obstacle entre l'intérieur des gouttelettes lipidiques et le cytosol. L'équipe de Brasaemle¹² a aussi vérifié laquelle de ces hypothèses s'avère valide. Pour ce faire, ils ont procédé à l'isolation des lipases des deux cultures cellulaires pour ensuite les incuber avec de la [³H] trioléine. Ainsi, le taux d'hydrolyse de la [³H] trioléine a pu être mesuré et comme le démontrent les résultats à la page précédente (Tableau II), il n'y a aucun changement au niveau de l'activité des lipases chez les cellules contrôles par rapport aux cellules génétiquement modifiées (périlipine).

Dans le même ordre d'idée, une étude a été réalisée sur l'impact de la cytokine TNF- α sur la périlipine⁶⁴. À cette effet, les données recueillies convergent toutes vers celles de la publication de Brasaemle et al.¹². D'abord, il est connu que le TNF- α est associé à une diminution de l'expression de la périlipine sans compter qu'il s'avère un activateur de la lipolyse. En ce sens, l'activité lipolytique induite par TNF- α est renversée chez des adipocytes (3T3-L1) surexprimant la périlipine. Ceci va de pair avec l'étude précédente¹² qui démontrait une résistance accrue de l'hydrolyse des TG chez des pré-adipocytes contenant la périlipine. Par ailleurs, aucun changement de l'activité lipolytique ne survient chez des cellules surexprimant la périlipine lorsque soumises à une concentration optimale d'isoproterenol⁶⁴. Il semble, dans cette étude⁶⁴, que la périlipine n'intervienne pas dans la lipolyse stimulée par opposition à la lipolyse basale où elle bloque l'accès aux différentes lipases adipocytaires. La prochaine section portant sur les gènes «knock-out» nous en apprend plus à ce sujet.

2.1.2 Périlipine «knock-out»

Les études ci-dessus^{12,14,15,64} présentent toutes une approche semblable : celle d'incorporer ou encore de surexprimer la protéine afin d'en déduire ses fonctions cellulaires. Dans une optique différente, il est aussi intéressant de se pencher sur les effets que provoque l'absence de périlipine (gène «knock-out») sur la prise pondérale et le métabolisme compensatoire chez les rongeurs. Avec un tel modèle expérimental, on peut s'attendre, possiblement, à ce que des animaux génétiquement modifiés, n'exprimant pas la périlipine, prennent moins de poids que des contrôles puisque la protéine en question favorise le «stokage» des graisses (TG) dans l'adipocyte et réduit substantiellement son activité lipolytique.

Le poids corporel des souris $PLIN^{-/-}$ (périlipine KO) ne semble pas varier outre mesure par rapport à des valeurs contrôles, autant à moyen qu'à long terme (jusqu'à environ quatre mois), lorsque soumises à une diète riche en lipides (55% kcal totale)^{46,69}. De plus, l'alimentation n'est pas un facteur pouvant expliquer ce phénomène puisque les deux types de souris ingèrent sensiblement la même quantité de nourriture (en terme de kcal)⁶⁹. Par contre, les souris $PLIN^{-/-}$ sont beaucoup moins grasses (58% moins de lipides totaux) et davantage musculaires (21% plus de protéines totales) lorsque soumises à une diète standard (lipides 4.5%) de 18 semaines⁴⁶. Tansey et al.⁶⁹ ont aussi remarqué une baisse moyenne, chez les mâles et les femelles $PLIN^{-/-}$, de 68% du tissu adipeux viscéral en comparaison avec les animaux contrôles lorsque soumis à une diète standard (lipides 9%) pendant dix semaines. Ce phénomène s'amplifie lorsque les animaux subissent une diète riche en lipides démontrant, une fois de plus, l'importance de la périlipine dans le métabolisme des lipides⁶⁹. Qu'advient-il alors du métabolisme compensatoire?

La lipolyse basale est accrue dramatiquement chez les souris $PLIN^{-/-}$, soit un taux quatre fois plus élevé que les contrôles (14 semaines sur une diète lipidique-55%)⁶⁹. Cette réponse constitue un des facteurs favorisant le développement du syndrome métabolique. Cette hypothèse est effectivement confirmée dans l'étude de Saha et al.⁵⁹ dans laquelle ces animaux développent une insulino-résistance marquée, particulièrement avec le vieillissement (28-42 semaines). Curieusement, le taux d'AGL plasmatiques ne diffère pas entre les contrôles et les $PLIN^{-/-}$ ^{46,69}. Ceci pourrait, potentiellement, s'expliquer par le fait que les souris $PLIN^{-/-}$ possèdent une masse musculaire supérieure et, du même coup, oxydent davantage de substrats que les souris contrôles (au repos, elles pourraient consommer jusqu'à 20% plus d'oxygène)⁴⁶. Confirmé une fois de plus par Saha et al.⁵⁹, la β -oxydation semble être augmentée autant dans le muscle (soléaire) que dans le foie ainsi que dans l'adipocyte (30%, 60%, 75% respectivement avec $p < 0.02$). Cette augmentation est le résultat du changement (activation ou inhibition) dans l'expression de certains gènes tels que CPT-1 (\uparrow transport d'AGL dans la mitochondrie), ACC-1 et 2 (\downarrow inhibition de CPT-1), L-3-HACD (\uparrow β -oxydation) et UCP-1, 2 et 3 (\uparrow thermogénèse et substrats métaboliques)⁵⁹. D'autre part, ces auteurs⁵⁹ rapportent une certaine divergence entre la production de glucose hépatique des contrôles et celle des souris $PLIN^{-/-}$. Ces dernières présentent de faibles taux de production de glucose par le foie lorsque soumises à une infusion de pyruvate (après un jeûne d'une nuit). La raison de cette disparité s'explique, entre autre, par l'inhibition de certains gènes impliqués dans la voie néoglucogénique, soit la PEPCK et la F2,6Pase. Comme quoi il existe, sans doute, une communication inter-organes (tissu adipeux \rightarrow foie). Dans ce cas-ci, le messager reliant les deux tissus pourrait s'avérer l'adiponectine, sécrété par l'adipocyte⁵⁹. L'adiponectine diminuant l'insulino-résistance et la production de glucose hépatique⁷, il est probable que les souris $PLIN^{-/-}$ (moins grasses que les contrôles⁴⁶) en secrètent davantage (neanmoins, cela reste à confirmer). Enfin, la prise pondérale limitée, la β -oxydation accrue et la faible

production de glucose hépatique chez les souris $PLIN^{-/-}$ semblent être des adaptations plus que bénéfiques dans un contexte d'obésité et d'insulino-résistance comme celui observé dans la société nord-américaine. Néanmoins, la lipolyse basale élevée, chez ce type d'animal, finit par causer bien des ennuis à plus long terme limitant ainsi les solutions pharmacologiques.

Si la lipolyse basale est activée chez les souris $PLIN^{-/-}$, la lipolyse stimulée est altérée de façon différente par rapport aux animaux contrôles. Ainsi, la lipolyse du groupe contrôle, à l'aide d'isoproterenol ($10\mu\text{M}$), est stimulée à un maximum de 3000% alors que le groupe $PLIN^{-/-}$ possède une stimulation maximale de 300% (isoproterenol/basale)⁶⁹. Dans le même ordre d'idées, un jeûne de 48h ne provoque aucune augmentation de la concentration en AGL plasmatiques chez les $PLIN^{-/-}$ par opposition à une augmentation de 173% de la valeur de base chez les contrôles⁴⁶. Il n'est pas surprenant de constater, chez les souris $PLIN^{-/-}$, une lipolyse basale plus élevée, due au simple fait que la barrière entre les lipases (HSL, par exemple) et les gouttelettes lipidiques n'existe pas. Comment se fait-il alors que la lipolyse stimulée, chez ces mêmes souris, subisse une telle diminution? La périlipine serait-elle essentielle dans la translation de la HSL lors d'une stimulation β -adrénergique?

Dans le but de répondre à cette question, Sztalryd et al.⁶⁷ ont repris le schéma des souris $PLIN^{-/-}$. Essentiellement, il s'agit d'une étude⁶⁷ semblable à celles mentionnées ci-dessus^{46,59,69} si ce n'est d'une composante visuelle que l'on surnomme : immunofluorescence (voir Figure 1 pour une courte définition). Cette fois, la cohorte de souris $PLIN^{-/-}$ était âgée de seulement six semaines lors de l'isolation des adipocytes du tissu épидидymal, éliminant ainsi la contribution des lipides cellulaires (grosseur des cellules) dans l'interprétation des résultats. Comme prévu, la lipolyse basale des souris $PLIN^{-/-}$ est anormalement élevée, soit dix fois la valeur des contrôles. À l'opposé, la lipolyse stimulée (isoproterenol $10\mu\text{M}$) chute jusqu'à 75% de la

valeur contrôle, imitant sensiblement les résultats obtenus par Tansey et al.⁶⁹. Afin de s'assurer que l'absence de périlipine dans les adipocytes ne provoque pas une baisse de l'expression des récepteurs β -adrénergiques, ils ont aussi incubé des échantillons cellulaires avec un activateur de l'adénylate cyclase-10 μ M (forskoline). Les résultats (Figure 7) confirment que les souris PLIN^{-/-} possèdent une déféctuosité lipolytique en aval des récepteurs β -adrénergiques⁶⁷. Ce phénomène ne provient pas non plus de la HSL puisque, lorsque mesurée *in vitro* et reportée par unité de quantité (Western blot), son activité s'avère identique quelle que soit la nature de l'animal, c'est-à-dire génétiquement modifié ou non⁶⁷.

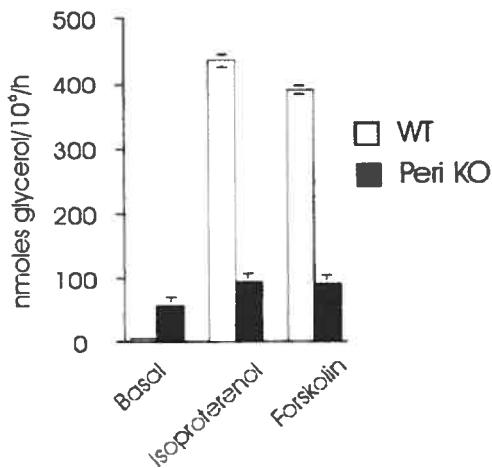


Figure 7. Les adipocytes (fibroblastes) des souris PLIN^{-/-} répondent peu à une stimulation lipolytique, même lors d'un «bypass» des récepteurs membranaires⁶⁷. Les cellules ont été incubées sans ou avec un des effecteurs pendant 60 min. Le glycérol recueilli dans l'infranatant fut utilisé comme indice lipolytique. Il n'existe aucune différence significative entre la grosseur des cellules des deux groupes : 61.7 \pm 9.3 μ m (contrôles) vs 57.9 \pm 2.2 μ m (Peri KO).

La méthode d'immunofluorescence nous révèle des particularités intéressantes sur les adipocytes appartenant aux souris PLIN^{-/-}. D'une part, il semble y exister un phénomène compensatoire impliquant l'ADRP, cette dernière s'exprimant en grande quantité dans les adipocytes n'exprimant pas la périlipine (Figure 8)⁶⁷. Par la même occasion, ceci démontre bien l'absence de fonction régulatoire pour l'ADRP quant à la lipolyse car, malgré son expression génétique, elle ne parvient pas à rétablir l'activité lipolytique des souris PLIN^{-/-}. Il est possible que l'ADRP soit nécessaire ou impliquée dans la formation des gouttelettes lipidiques et peut-être même dans l'uniformisation de celles-ci en leur conférant une forme sphérique.

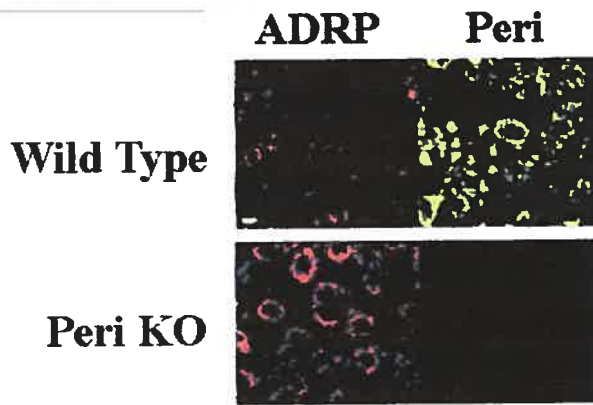


Figure 8. L'ADRP peut substituer à la périlipine lors de la différenciation adipocytaire des souris $PLIN^{-/-}$. Ces images constituent le résultat d'une technique d'immunofluorescence.

D'autre part, des images supplémentaires nous informent sur la localisation de la HSL, lors d'un état basal ou stimulé, chez des souris $PLIN^{-/-}$ ou contrôles⁶⁷. Comme on peut l'observer à la Figure 9, la lipase des contrôles, à l'état basal, semble dispersée à travers le cytosol. Lors d'une stimulation avec l'isoproterenol, les enzymes ont tendance à s'agglomérer autour des gouttelettes lipidiques, formant ainsi des anneaux clairs et uniformes sur les images produites par immunofluorescence. Or, les souris $PLIN^{-/-}$ ne démontrent aucunement cet effet de translation, comme en font foi les images de la Figure 9. Au contraire, les lipases se répartissent dans le cytosol, mais aussi à proximité des gouttelettes lipidiques à l'état basal, ce qui expliquerait les données de lipolyse basale supérieures associées aux souris $PLIN^{-/-}$. De plus, l'état stimulé n'indique aucun indice de translation de la HSL, les anneaux, témoignant du mouvement des lipases, étant inexistant. Sans doute que la perte d'habileté, chez les animaux $PLIN^{-/-}$, à augmenter leur activité lipolytique, s'explique par l'absence de translation de la lipase au niveau des gouttelettes lipidiques. La périlipine pourrait donc être responsable du mouvement intracellulaire de la HSL lors d'une activation lipolytique.

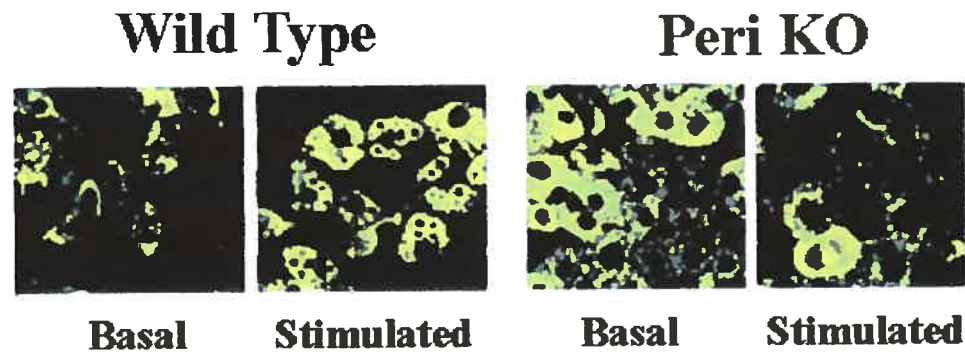


Figure 9. Malgré la faible définition des images, on peut tout de même constater l'absence de translocation de la HSL lors d'une stimulation lipolytique (de par l'absence des anneaux) dans les fibroblastes des souris $PLIN^{-/-67}$. Ces images constituent le résultat d'une technique d'immunofluorescence.

À cet égard, il faut rappeler que les études de Clifford et al.^{14,15} évoquaient la possibilité que seule la périlipine subisse une translocation en association avec la stimulation de l'activité lipolytique chez les rats âgés (8-12 semaines). Il peut donc paraître possible que le patron lipolytique soit modifié avec l'âge (ou encore avec la quantité de lipides à l'intérieur de l'adipocyte). On doit aussi considérer le fait que la lipolyse puisse différer selon l'espèce car les études ci-dessus^{14,15} ont été exécutées avec des rats par opposition aux souris des études $PLIN^{-/-46,59,67,69}$. D'autre part, aucun changement de l'activité lipolytique, en présence d'isoproterenol, n'est perçu chez des fibroblastes 3T3-L1 surexprimant le gène de la périlipine⁶⁴. Par conséquent, il est peut-être encore trop tôt pour affirmer, avec conviction, que la protéine PAT exerce une influence sur le trajet cellulaire de la HSL. Malgré tout, l'hypothèse la plus plausible à l'heure actuelle repose sur la redistribution des gouttelettes lipidiques (modification de la surface de celles-ci) à travers le cytosol, provoquée par la phosphorylation de la périlipine^{67,68}. Ainsi, ce changement de conformation permettrait une accessibilité favorable à la HSL.

2.1.3 Périlipine et activation de la lipolyse (cellules CHO)

Afin de conclure sur les aspects mécanistes de la périlipine dans la lipolyse, un schéma expérimental inverse aux souris $PLIN^{-/-}$ a été utilisé dans deux études. C'est-à-dire des cellules exprimant la périlipine mais en l'absence de la HSL^{67,68}. La première étude⁶⁸ fut effectuée sur des fibroblastes ovariens isolés de hamsters (on les surnomme cellules CHO), où deux formes différentes de périlipine y furent exprimées à l'aide d'un rétrovirus, soit la périlipine telle que l'on connaît ou encore une forme mutée de la périlipine, où les sites de phosphorylation ont été modifiés. Rappelons que les fibroblastes ne possèdent pas encore la faculté d'exprimer la HSL. Les trois lignées de cellules (contrôles, périlipine et «périlipine mutée») ont été incubées dans un sérum lipidique contenant des [³H] acides oléiques afin d'obtenir un «pool de TG» à hydrolyser, à la manière de Brasaemle et al.¹² mentionnée un peu plus tôt. Les cellules ont ensuite été incubées à l'aide de forskoline (activateur de l'adénylate cyclase-10 μ M) et d'IBMX (inhibiteur de la phosphodiesterase-1mM) ou encore sans aucun agent lipolytique pendant plus de trois heures. La triacine C était présente dans toutes les incubations pour prévenir la réestérification des acides gras hydrolysés. Les résultats sont présentés à la Figure 10. Il est évident que les cellules CHO, exprimant la périlipine non modifiée, possèdent une capacité lipolytique supérieure (deux fois plus que les contrôles et quatre fois plus les «périlipine mutée») lorsque stimulées par un effecteur. À première vue, cette étude indique que l'absence de périlipine résulte en une lipolyse basale élevée. D'autre part, la lipolyse stimulée nécessite la présence de périlipine et sa phosphorylation est probablement le mécanisme impliqué dans la cellule. Ceci confirme, une fois de plus, que l'ADRP ne peut relayer la périlipine en matière de fonctionnalité.

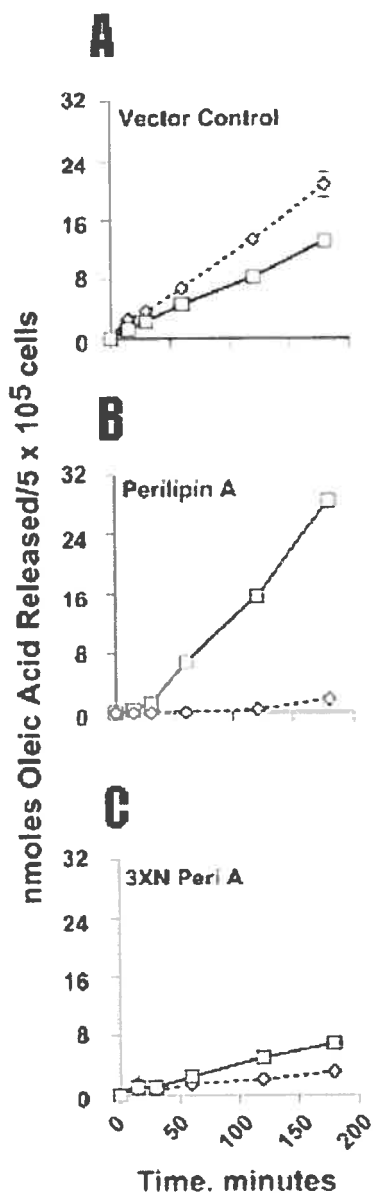


Figure 10A. Les fibroblastes (CHO) n'exprimant pas la périlipine A ont une lipolyse basale élevée et même une lipolyse stimulée en deçà des valeurs basales (pas vraiment d'explications)⁶⁸. Les cellules furent incubées pendant 3h.

Figure 10B. Les fibroblastes (CHO) exprimant la périlipine A répondent de façon optimale en présence d'un effecteur⁶⁸. La période de stimulation lipolytique optimale semble toutefois précédée d'un délai (inertie) s'échelonnant sur 30min. Les cellules furent incubées à l'aide d'IBMX (1mM) et d'isoproterenol (10 μ M) pendant 3h.

Figure 10C. La mutation des 3 plus importants sites de phosphorylation chez la périlipine A affecte grandement la réponse associée à un effecteur lipolytique⁶⁸. La lipolyse basale n'est toutefois pas touchée par la manipulation génétique. Malgré la faible stimulation, une période de latence de 30min est aussi observable. Les cellules furent incubées à l'aide d'IBMX (1mM) et d'isoproterenol (10 μ M) pendant 3h.

----- Lipolyse basale
 ——— Lipolyse stimulée

Toujours avec les cellules CHO, Sztalryd et al.⁶⁷ nous proposent un deuxième volet à l'étude mentionnée précédemment. Ils ont préparé quatre cohortes différentes de cellules CHO : 1-contrôle (n'exprimant ni la HSL ni la périlipine), 2-exprimant que la HSL, 3-exprimant que la périlipine et finalement, 4-exprimant la HSL et la périlipine (Figure 11). Concernant l'état lipolytique basal, les deux lignées de cellules exprimant la périlipine réduisent considérablement l'hydrolyse d'acides gras. Néanmoins, les cellules CHO n'exprimant que la périlipine présentent une lipolyse stimulée (forskoline-10 μ M + IBMX-1mM) fort appréciable, résultant d'une augmentation approximative de 100% par rapport à l'état basal. Ceci s'avère d'autant plus révélateur qu'une augmentation d'environ 25% est observée chez les cellules CHO n'exprimant que la HSL. De plus, les cellules CHO exprimant les deux protéines combinées présentent un effet additif comme en témoigne l'augmentation beaucoup plus rapide et accrue de la lipolyse, de l'ordre de 300% environ.

Somme toute, une lipase s'avère nécessaire pour générer une activation quelconque de la lipolyse. Par conséquent, il est probable que la périlipine ait un impact similaire sur une autre lipase inconnue, peut-être même par le biais d'une toute autre cascade enzymatique que celle impliquant la PKA. Cette dernière affirmation repose aussi sur le fait que l'étude ci-dessus⁶⁷ démontre une activité lipolytique peu commune en l'absence de HSL. En effet, on peut constater une période de latence (environ 30 minutes) après l'incubation des cellules en présence de forskoline chez la lignée de cellules n'exprimant que la périlipine. D'ailleurs, des résultats identiques sont observables dans l'étude précédente⁶⁸ faisant allusion à une forme de périlipine mutée. Ce constat consolide davantage l'hypothèse selon laquelle la périlipine n'active pas directement les lipases mais change plutôt la conformation des gouttelettes lipidiques afin de permettre l'accès à celles-ci^{67,68}. Toutefois, on ne doit pas exclure la possibilité que la périlipine puisse initier la translation de la HSL (ou d'autres lipases) par le biais

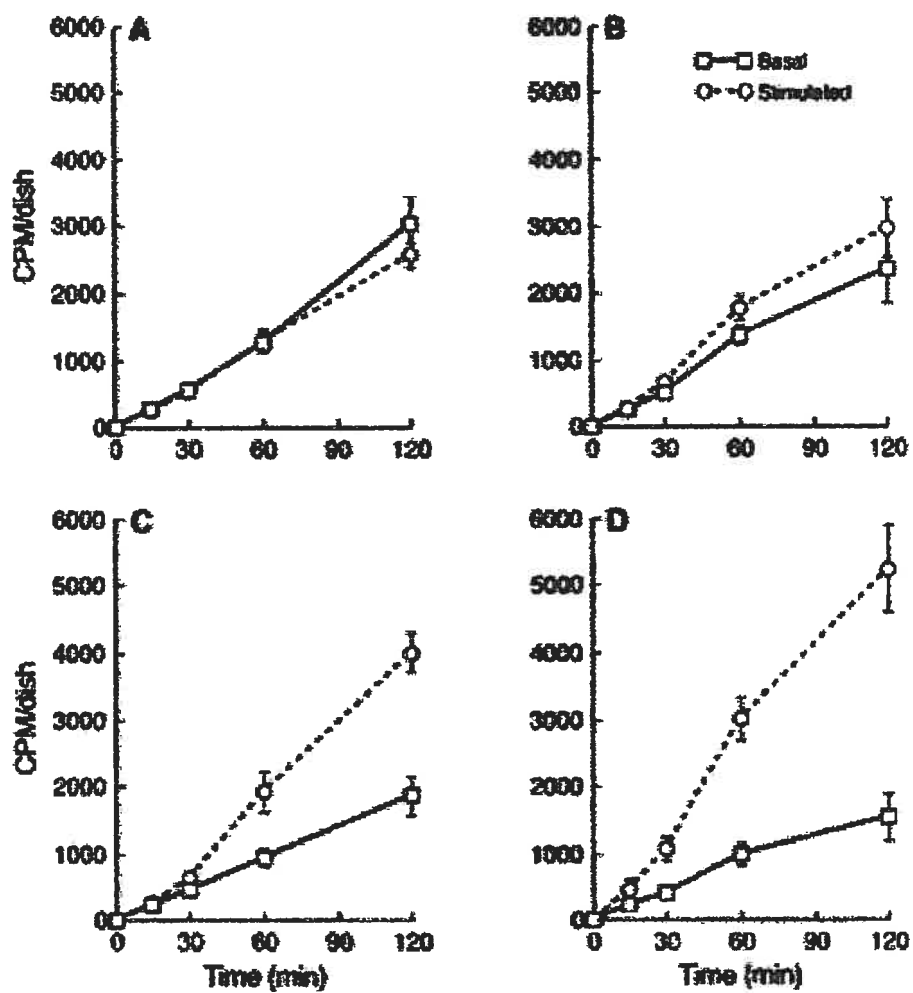


Figure 11. La lipolyse stimulée est optimale lorsque la HSL et la périlipine cohabitent dans les cellules⁶⁷. Les stimulations lipolytiques ont été effectuées à partir d'IBMX et de forskoline. Dans la lignée de cellules où seule la périlipine est exprimée, la lipolyse stimulée survient seulement après une période latente de 30min. (A) vecteur vide; (B) HSL seulement; (C) périlipine seulement; (D) HSL + périlipine.

de protéines intermédiaires ou en synergie avec celles-ci. Il a été démontré, tout récemment, que la stimulation lipolytique est accompagnée d'un changement majeur dans la composition protéique des gouttelettes lipidiques (autant pour certaines enzymes que des protéines de structure : adipophiline, S3-12, cavéoline-1...etc) suggérant la participation de plusieurs protéines dans le déroulement de la lipolyse¹¹. Naturellement, bien d'autres recherches sont nécessaires en vue d'identifier, à juste titre, les rôles de la périlipine par rapport à la lipolyse stimulée.

2.2 Obésité et régulation

2.2.1 Périlipine, lipolyse et obésité

Étant donné la participation inhérente de la périlipine, autant dans la lipolyse basale que stimulée, il devient légitime de s'interroger sur sa régulation génétique dans un modèle d'obésité. Malgré toute l'importance de cette protéine dans le métabolisme des lipides et dans le développement potentiel du diabète de type II, très peu d'études sont répertoriées dans la littérature, particulièrement chez l'humain. Toutefois, trois études^{34.51.71} nous révèlent quelques indices quant à la régulation de la périlipine chez l'obèse ainsi que les effets qui s'en suivent.

L'obésité est généralement accompagnée d'un désordre métabolique qui, concrètement, s'observe par une quantité accrue de certaines cytokines et une concentration d'AGL plasmatiques anormalement élevée⁵⁷. Il est désormais documenté que les obèses ont une expression de TNF- α supérieure aux non obèses⁵⁷. Or, cette cytokine possède un impact sur la périlipine en diminuant son expression génétique⁶⁴. Le TNF- α pourrait donc s'avérer un des responsables de l'augmentation de la concentration des AGL plasmatiques en réduisant la quantité de périlipine dans la cellule adipeuse.

Dans l'étude de Mottagui-Tabar et al.⁵¹, on compare justement la densité de périlipine cellulaire et la lipolyse des femmes obèses (IMCmoyen=40±1) à des non obèses (IMCmoyen=23±1). Les mesures ont toutes été effectuées à partir d'un prélèvement de graisse sous-cutané dans la cavité abdominale. Lorsque reportée par unité de surface cellulaire (DO/mm²), la périlipine (mesurée par Western blot) est deux fois moins élevée chez les obèses que les sujets contrôles. Par ailleurs, la lipolyse basale s'avère quatre fois plus élevée chez les obèses, mettant ainsi en relation directe, une fois de plus, le niveau de périlipine et la lipolyse. Les mêmes résultats sont observables *in vivo* alors qu'il existe une corrélation négative pour chacun des paramètres suivants : périlipine vs glycérol plasmatique (R=-0.617, p=0.0001) et périlipine vs AGL plasmatiques (R=-0.485, p=0.03). De plus, il existe une altération de la lipolyse stimulée chez les obèses puisque l'on constate une stimulation relative (exprimée en pourcentage de la lipolyse basale) d'environ 460% pour les non obèses versus 125% pour les obèses malgré une lipolyse stimulée plus importante de 70% chez les obèses en valeur absolue. Ceci correspond avec les résultats obtenus par Sztalryd et al.⁶⁷ qui stipulent que la protéine PAT phosphorylée est essentielle dans la translation de la HSL ou encore pour l'accessibilité des lipides à la lipase.

Sensiblement les mêmes résultats ont été révélés dans l'étude de Wang et al.⁷¹ dans laquelle on compare aussi des sujets obèses (IMCmoyen=53±2) à des contrôles (IMCmoyen=25±1) pour le même dépôt adipeux. Les contenus en périlipine ont été exprimés sous deux formes différentes, soit par quantité de protéines totales (AU/40µg protéines) ou, comme dans l'étude précédente⁵¹, par unité de surface cellulaire (AU/surface cellulaire). On y retrouve, respectivement, des valeurs supérieures de l'ordre de 100% et 50% chez les non obèses par rapport aux obèses. Il semble aussi que l'expression d'ARNm de la périlipine soit significativement augmentée chez les contrôles dans une proportion du double de celui des

sujets obèses bien qu'il n'y ait pas de corrélation nette, dans cette étude⁷¹, entre les contenus en ARNm et en périlipine. D'autres résultats s'avèrent d'autant plus révélateurs alors que la quantité de périlipine reportée par quantité de protéines totales est réduite chez les obèses malgré une quantité de protéines totales accrue lorsque reportée par quantité d'adipocytes. Ce constat implique que les adipocytes subissent une inhibition spécifique de la transcription de périlipine parallèlement à leur augmentation de volume inhérente à l'obésité.

Malheureusement, les deux études précédentes^{51,71} ne présentent aucune mesure de TNF- α pouvant évoquer une corrélation concernant les quantités relatives réduites de périlipine. Pourtant, celles-ci en émettent toutes deux l'hypothèse. Kern et al.³⁴ tentent de remédier à la situation en effectuant une étude transversale à partir de 44 sujets non diabétiques (39 femmes et 5 hommes) sélectionnés selon une échelle allant de non obèse à très obèse (étendue d'IMC partant de 21 à 65). À l'image des deux autres études^{51,71}, les échantillons de graisse ont été prélevés dans le tissu adipeux sous-cutané abdominal. Les résultats, présentés à la Figure 12, démontrent que la périlipine subit une corrélation positive avec le pourcentage de graisse corporelle autant pour les mesures d'ARNm ($R=0.55$, $p<0.01$) que pour la protéine elle-même ($R=0.50$, $p<0.01$)³⁴. Curieusement, les auteurs prétendent obtenir des résultats tout-à-fait à l'encontre de ceux de Mottagui-Tabar⁵¹ et Wang⁷¹ quant aux variations de la périlipine dans le tissu adipeux avec l'obésité.

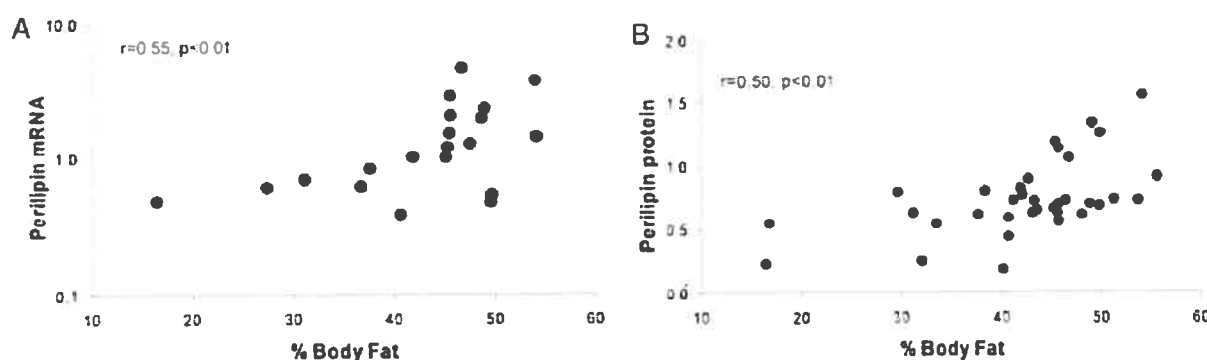


Figure 12. Relation entre l'ARNm (A) et la périlipine (B) dans le tissu adipeux sous-cutané par rapport au degré d'obésité, en l'occurrence le pourcentage de graisse corporelle³⁴.

Leur interprétation des résultats nous laisse un peu perplexe. D'une part, le pourcentage de graisse corporelle ne s'avère peut-être pas le meilleur indice pour établir une corrélation avec la périlipine, laquelle a été prélevée dans un seul dépôt adipeux. Or, la graisse corporelle n'est pas nécessairement distribuée uniformément dans le corps humain. Ces résultats pourraient être biaisés, particulièrement dans les tranches d'IMC plus basses où certains individus sont qualifiés d'androïdes (hommes) alors que d'autres sont plus de type gynoïde (femmes). Il aurait peut-être été préférable de corréler la périlipine au volume cellulaire sachant que, de façon générale, plus le degré d'obésité est important, plus les adipocytes sont volumineux⁵⁵. D'autre part, les mesures de périlipine ont été quantifiées de façon absolue. Ceci ne correspond pas aux résultats obtenus par Mottagui-Tabar⁵¹ et Wang⁷¹ car ces derniers présentent leurs données sous forme relative à la quantité de lipides dans le tissu. La périlipine étant intimement liée aux lipides (dans son métabolisme), un individu obèse pourrait avoir une expression de périlipine plus élevée qu'un autre individu non obèse, malgré que cette augmentation soit insuffisante pour obtenir les mêmes répercussions sur le métabolisme (lipolyse).

Les auteurs³⁴ ont toutefois mesuré les AGL plasmatiques ainsi que plusieurs cytokines, dont le TNF- α . Ils ont ensuite vérifié la corrélation entre ceux-ci et la périlipine. Aucune corrélation n'a pu être établie, pas même pour les AGL plasmatiques qui constituent un indice de la lipolyse basale. Cependant, les mesures de périlipine étant un peu douteuses, d'autres recherches sont nécessaires pour éclaircir le lien unissant l'obésité, les cytokines, la périlipine, et le syndrome métabolique.

Par ailleurs, les trois études mentionnées ci-dessus^{51,71,34} ont toutes présenté les mesures de périlipine dans un seul dépôt adipeux, en l'occurrence le sous-cutané. En vertu des

différences métaboliques associées aux divers dépôts adipeux, il est nécessaire d'investiguer la régulation de la périlipine dans un contexte inter-tissulaire. Par exemple, il est démontré que l'obésité «androïde», caractérisée par une adiposité tronquée et viscérale (surtout chez l'homme), est perçue comme un signe physiopathologique, de par une lipolyse accrue et un drainage des AGL directement au foie par la veine porte³ (voir section 3.2.2). Dans cette optique, l'expression génétique de la périlipine, dans les différents dépôts adipeux, s'avère peut-être un aspect clé quant au processus d'insulino-résistance associé au diabète de type II. Chez l'humain, il semble effectivement y avoir une divergence dans la transcription de la périlipine (ARNm) entre les dépôts viscéral et sous-cutané. L'expression d'ARNm semble être inférieure dans le dépôt viscéral par rapport au sous-cutané chez les obèses^{5,71}. Malgré tout, ces résultats ne résultent pas en une moindre expression de la périlipine puisque le contenu de la protéine est identique dans les deux compartiments adipeux et ce, même si l'expression de la protéine est reporté par unité de surface cellulaire^{5,71}. D'ailleurs, le fait que plusieurs études ne dénotent aucune corrélation entre l'ARNm et la périlipine suggère que cette protéine possède une régulation post-transcriptionnelle⁹. Enfin, le nombre restreint de publications, à cet effet, ne nous permet pas encore de tirer une conclusion claire concernant la périlipine et sa contribution au désordre métabolique par le biais des divers dépôts adipeux.

2.2.2 Périlipine et régulation

Pour compléter cette section sur la périlipine, voici quelques informations portant sur la régulation de cette protéine. Ces renseignements sont importants, particulièrement dans le cadre de la physiologie clinique et pharmacologique. Le premier facteur de régulation connu, pour la périlipine, s'avère le TNF- α . Comme mentionné un peu plus tôt, cette cytokine a pour conséquence de freiner la transcription de la périlipine et, du même coup, accroître l'activité lipolytique des adipocytes⁶⁴. Les adipocytes des individus obèses sécrétant davantage de TNF- α (dû à une trop grande quantité de lipides dans les adipocytes) pourraient voir leur profil

métabolique se détériorer en conséquence d'une concentration d'AGL trop élevée dans les tissus périphériques (plasma, foie, muscles squelettiques...). Sans trop s'attarder sur les mécanismes, il est nécessaire de comprendre par quel intermédiaire la cytokine parvient à inhiber la transcription de la périlipine. L'inhibition de la protéine PAT survient au niveau de sa transcription et non de sa traduction (ou peut-être les deux) puisque non seulement la protéine subit une baisse substantielle mais son expression en ARNm aussi⁵⁸. Pour ce faire, le TNF- α agit vraisemblablement par le biais des «mitogen-activated protein kinases» (MAPKs) qui sont impliqués dans des cascades phosphorylantes menant à l'activation de certains facteurs de transcription⁵⁸. Dans ce cas-ci, deux MAPKs sont ciblés dans la régulation de la périlipine : p44/42 et JNK⁵⁸. Pour le bien des patients obèses atteints du syndrome métabolique, on pourrait donc penser qu'il est possible de bloquer la cascade enzymatique au niveau de ces deux protéines et limiter les dégâts causés par le TNF- α en relation avec la périlipine. Toutefois, le problème le plus probant, empêchant ce type de procédé, réside dans le blocage collatéral de plusieurs autres cascades enzymatiques. En effet, les MAPKs ne sont pas seulement impliqués dans la régulation du gène de la périlipine, mais également dans l'expression d'innombrables gènes tels que ceux favorisant la production de cytokines, l'apoptose, la croissance et la différenciation des cellules⁵⁸.

Toujours dans les régulateurs de la périlipine, les «peroxisome proliferator-activated receptors» (PPARs) sont considérés comme les principaux acteurs de la différenciation adipocytaire et sont impliqués dans la régulation des gènes appartenant au métabolisme des lipides^{2,16}. En fait, les PPARs sont des récepteurs nucléaires jumelés à des facteurs de transcription qui ciblent une vaste étendue de gènes^{2,16}. À cet effet, on compte trois isoformes différents de PPARs, soit le PPAR- α , le PPAR- β et le PPAR- γ ^{2,16}. Dans le cas qui nous concerne, le PPAR- γ est sans doute le plus intéressant puisqu'il est majoritairement exprimé dans le tissu adipeux^{2,16}. Tout récemment, il a été démontré que l'expression de la périlipine est

régulée par le PPAR- γ 2, lequel est un isoforme exprimé exclusivement dans les adipocytes, particulièrement lors de l'amorce de la différenciation cellulaire des adipocytes^{2,16}. De plus, on a pu identifier un facteur de transcription que l'on surnomme le «PPAR- γ -Responsive Element» (PPRE) qui est responsable de l'amorce de la transcription de la périlipine^{2,16}. Il s'agit d'une séquence bien précise de bases azotées située en amont de l'extrémité 5' du gène PLIN (la séquence étant identique chez le rat et l'humain)^{2,16}. Il est à noter que la LDAP, S3-12, est aussi sous le contrôle des PPAR- γ dans les adipocytes, suggérant ainsi que ces récepteurs nucléaires sont primordiaux pour la formation des gouttelettes lipidiques adipocytaires et la séquestration des lipides dans le tissu adipeux¹⁶.

Par conséquent, les PPAR- γ s'avèrent plutôt intéressants en regard avec les alternatives pharmacologiques. Lorsqu'il est activé, le récepteur induit la transcription du gène PLIN par le biais du PPRE^{2,16}. Or, les individus obèses possèdent généralement une lipolyse basale anormalement élevée qui contribue davantage au problème d'insulino-résistance⁵¹. À ce jour, il existe une classe de médicaments (agonistes au PPARs) que l'on nomme thiazolidinediones (TZD). Les TZD sont responsables d'une plus grande séquestration des TG en activant les PPAR- γ , lesquels favorisent la transcription de la périlipine et S3-12 en plus d'une série d'autres gènes tels que la lipoprotéine lipase (LPL) et les «fatty acid-binding proteins» (FABPs)^{2,16}.

3 Lipolyse adipocytaire

3.1 Aspects mécanistes

Il est inutile d'insister sur les conséquences délétères d'une forte adiposité dans la contribution au développement du syndrome métabolique. Dans cette perspective, la lipolyse est possiblement responsable de la mise en circulation excessive d'AGL par les adipocytes, pouvant ainsi altérer l'homéostasie de certains organes tels le foie, le muscle squelettique et le rein. Par contre, on ignore toujours dans quelle mesure la lipolyse s'avère pathologique. À cet effet, les principaux facteurs contribuant aux dommages périphériques sont la diète, le bagage génétique et les caractéristiques des différents dépôts adipeux. Ces derniers influent sur l'activation lipolytique par l'intermédiaire de plusieurs récepteurs et seconds messagers ainsi que divers agents activateurs et inhibiteurs empruntant des stratégies métaboliques différentes. Dans cette section, il sera question de démystifier tous ces facteurs afin de déterminer, s'il y a lieu, un lien étroit entre la lipolyse adipocytaire et le phénomène d'insulino-résistance tant observé chez les individus obèses.

Il est nécessaire de couvrir les rudiments de la lipolyse adipocytaire afin de mieux assimiler les effets que provoquent les diverses variables mentionnées ci-dessus. La lipolyse s'avérant un terme général désignant l'hydrolyse des triglycérides (principalement), certains aspects méritent d'être clarifiés. D'entrée de jeu, on doit différencier la lipolyse des lipoprotéines (chylomicrons et VLDL essentiellement) de la lipolyse hormono-sensible (gouttelettes lipidiques exclusivement). En effet, lors d'une situation post-prandiale, les chylomicrons produits par les entérocytes sont largués de la lymphe vers le plasma et, par le fait même, emportés par la circulation et exposés à une première enzyme lipolytique : la lipoprotéine lipase (LPL). Cette lipase est exprimée majoritairement dans le tissu adipeux, le

cœur, les muscles squelettiques et les glandes mammaires⁴⁷. Par ailleurs, il est aussi important de nuancer le fait suivant : la transcription et la traduction de la LPL sont effectuées dans les cellules des tissus ci-mentionnés, mais son action (hydrolyse des TG) se déroule dans la face luminale de l'endothélium des capillaires sanguins⁴⁷. Donc, une première lipolyse s'exécute dans les tissus exprimant la LPL (capillaires) alors que la lipase agit littéralement à l'image d'une perceuse sur les chylomicrons (les VLDL également) en hydrolysant les TG situés au cœur du ballon que forment les lipoprotéines. En prenant comme exemple le tissu adipeux, les acides gras résultant de cette hydrolyse pénètrent à l'intérieur des adipocytes par le biais de transporteurs endoplasmiques ou par diffusion passive et sont réestérifiés aussitôt en vue d'augmenter les réserves énergétiques (stockage).

La lipolyse se déroule aussi dans cette réserve adipeuse. Lorsque les organes en périphérie nécessitent un apport énergétique important (par exemple, lors d'un jeûne prolongé), le tissu adipeux intervient en libérant des AGL en circulation par l'intermédiaire d'une autre lipase que l'on surnomme la lipase hormono-sensible (HSL). Cette lipolyse est hautement régulée par l'association de certaines hormones à des récepteurs situés à la surface des adipocytes, ce qui explique que l'on qualifie cette lipase d'hormono-sensible. C'est ce type de lipolyse qui fera l'objet de cette section sur la lipolyse adipocytaire.

Comme mentionné plus tôt (section 2.1), la HSL est une enzyme essentielle de la lipolyse adipocytaire et elle agit en synergie avec la périlipine, en la présence d'un effecteur. La cascade enzymatique permettant l'activation de la lipase implique les rouages suivant : les récepteurs membranaires, les protéines G, l'adénylate cyclase et les protéines kinases A (PKA). Brièvement, les agents lipolytiques se fixent aux récepteurs β -adrénergiques, lesquels sont couplés à des protéines G stimulantes (Gs) qui activent l'adénylate cyclase adipocytaire.

Cette enzyme convertit ensuite l'AMP cytosolique en AMP cyclique, ce dernier substrat étant essentiel dans l'activation des PKA qui elles, en phosphorylant la HSL et la périlipine, provoquent une hydrolyse accrue des TG contenus dans les gouttelettes lipidiques.

Chez l'humain, les principaux agents activateurs de la lipolyse s'avèrent les catécholamines : l'adrénaline (circulation) et la noradrénaline (neurones)³⁷. D'autre part, il existe plusieurs autres effecteurs de moindre importance (sauf peut-être dans certaines physiopathologies où leurs effets peuvent s'avérer considérables) tels le glucagon, le cortisol, la cholecystokinine (CCK), la thyrotrophine (TSH), l'hormone de croissance (GH), les hormones thyroïdiennes, les hormones stéroïdiennes ainsi que le TNF- α (voir section 2.2.2)³⁷. Dans le même ordre d'idées, l'insuline est le régulateur antilipolytique le plus puissant dans tous les tissus. Son mécanisme d'action principal réside dans l'activation de la phosphodiesterase-3B (PDE-3B) qui diminue la concentration intracellulaire d'AMPc en convertissant l'AMPc en AMP³⁷. D'autres stratégies métaboliques sont peut-être envisageables concernant l'insuline mais celles-ci sont peu documentées et de moindre importance³⁷. Parmi les autres, on retrouve le insulin-like growth factor-1 (IGF-1), l'adénosine, les prostaglandines E1 et E2, le neuropeptide Y, le peptide YY, les corps cétoniques et les cathécolamines³⁷.

À ce jour, on dénote cinq récepteurs adrénergiques distincts exprimés dans le tissu adipeux³⁷. Trois types de récepteurs se retrouvent dans la catégorie β -adrénergiques ($\beta_{1,2,3}$) et sont couplés à des protéines Gs par opposition aux récepteurs α_2 -adrénergiques qui sont couplés à des protéines G inhibitrices (Gi)³⁷. C'est la raison pour laquelle les catécholamines sont considérées à la fois comme des agents activateurs et inhibiteurs; la stimulation nette étant la différence entre les récepteurs β -adrénergiques et les α_2 -adrénergiques³⁷. Dans

l'adipocyte la stimulation des β -adrénergiques prédominent largement sur l'inhibition des α 2-adrénergiques³⁷. Le cinquième récepteur adrénergique (α 1) n'est pas couplé à l'adénylate cyclase, éliminant toute possibilité d'implication dans le métabolisme lipolytique³⁷. Ceci étant clair pour la lipolyse stimulée, il est difficile d'expliquer la lipolyse basale. Il est désormais documenté que des adipocytes isolés et incubés, *in vitro*, en l'absence de tout effecteur, libèrent des quantités non négligeables de glycérol qui s'avèrent le résultat de ce que l'on surnomme la lipolyse basale. D'ailleurs, l'activité lipolytique des adipocytes ne peut être totalement supprimée malgré l'ajout simultané d'antagonistes aux récepteurs β (propranolol) et α (phentolamine) adrénergiques¹. Quoiqu'il en soit, l'activité lipolytique basale et stimulée sont toutes deux sujets à des variations importantes dans l'optique des physiopathologies telles l'obésité et le syndrome métabolique. Par conséquent, l'influence de ces fluctuations lipolytiques sur les autres tissus s'avère un champ d'étude essentiel dans le cadre du développement général de l'insulino-résistance. La Figure 13 démontre le portrait général de la lipolyse adipocytaire (stimulée) en l'absence de pathologie quelconque.

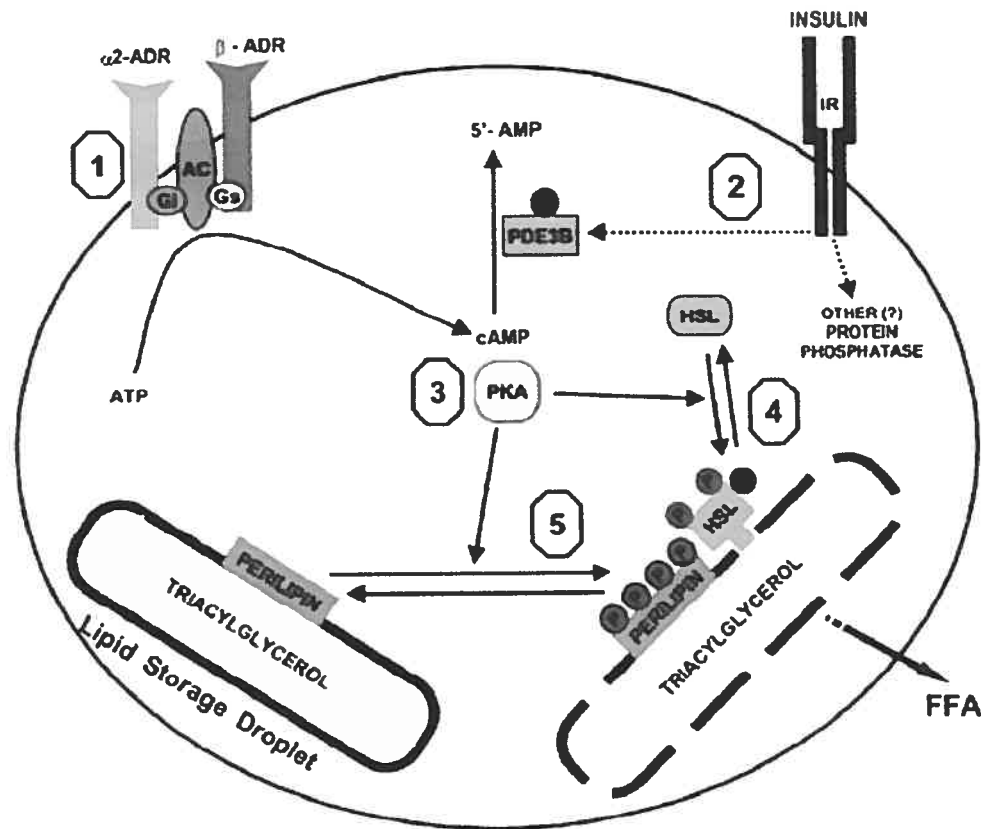


Figure 13. Il existe cinq points de contrôle importants dans le mécanisme de la lipolyse adipocytaire identifiés par des octogones numérotés de 1 à 5⁴¹. (1) Réponse de la lipolyse par le biais des effecteurs se fixant aux récepteurs, lesquels activent (Gs) ou inhibent (Gi) l'adénylate cyclase. (2) L'insuline, par le biais de la phosphodiesterase-3B, convertit l'AMPc en 5'-AMP et donc, réduit l'activité lipolytique. (3) L'AMPc active la protéine kinase A, laquelle phosphoryle deux substrats importants, soit la lipase hormono-sensible et la périlipine A. (4) La phosphorylation de la HSL favorise sa translation vers les gouttelettes lipidiques ou, du moins, permet une plus grande accessibilité à celles-ci. (5) La périlipine phosphorylée permet une plus grande accessibilité pour la HSL aux TG à l'intérieur des gouttelettes lipidiques.

3.2 Lipolyse et obésité

La prévalence des individus obèses parmi tous ceux souffrant du diabète de type II est de 80%³⁷. Il est donc indéniable qu'il existe un lien entre la masse adipeuse et le syndrome d'insulino-résistance. En outre, plusieurs autres facteurs métaboliques sont corrélés au phénomène d'insulino-résistance tels l'hyperlipidémie (AGL et TG, post-prandial et à jeûn), une faible concentration de HDL, de nombreuses petites particules de LDL denses, l'hypertension, etc³⁷. En fait, la principale difficulté concernant toutes ces corrélations est de discerner quel facteur est bel et bien la cause de l'insulino-résistance. À ce jour, trois hypothèses majeures sont à considérer²⁰. D'une part, une augmentation de la masse adipeuse viscérale pourrait comprimer certains viscères (tel le foie) et en affecter leur métabolisme. D'autre part, la capacité du tissu adipeux (surtout chez les obèses) à sécréter certains facteurs métaboliques, tels les cytokines, pourrait initier le désordre périphérique. Toutefois, il est généralement bien accepté, aujourd'hui, que l'hyperlipidémie, presque inhérente à l'obésité, s'avère une des causes les plus plausibles pour expliquer le développement du syndrome métabolique en vertu des fluctuations lipolytiques des adipocytes. Il n'est pas exclu, néanmoins, que ces trois dernières prémisses puissent simultanément contribuer au phénomène d'insulino-résistance. Seule la troisième hypothèse sera mise en valeur dans cette section sur la lipolyse adipocytaire.

Il semble y avoir une certaine confusion quant à l'interprétation des résultats de la lipolyse en vue d'obtenir le flux lipolytique exact. Effectivement, on retrouve plusieurs dénominateurs différents (glycérol/X/unité de temps) selon les études, soit par nombre de cellules adipeuses, par quantité de lipides, par quantité de protéines et par unité de surface cellulaire^{37,40}. De ce fait, il devient parfois difficile de comparer plusieurs études sur la seule

base de l'interprétation du métabolisme lipolytique selon les auteurs. Tout de même, le volume important d'études portant sur la lipolyse en relation avec l'obésité nous permet de croire que la lipolyse basale adipocytaire est proportionnelle à la masse adipeuse et, plus particulièrement, à la grosseur des cellules adipeuses. D'autre part, un dilemme se pose lorsque vient le temps d'interpréter les résultats de la lipolyse stimulée. Certains auteurs suggèrent de présenter ceux-ci en pourcentage de la lipolyse basale (stimulée/basale x 100)³⁹ alors que d'autres proposent de soustraire la lipolyse basale de la lipolyse stimulée²⁹ afin de comparer différents groupes. Dans ce cas-ci, il pourrait être préférable d'inclure les deux valeurs puisqu'il semble très difficile, voire impossible, de déterminer laquelle se rapproche davantage de la réalité. À partir de ces informations, deux questions pertinentes méritent d'être soulevées : 1. Comment les voies métaboliques de la lipolyse, basale et stimulée, répondent-elles chez les obèses? 2. Les disparités lipolytiques inter-tissulaires (principalement viscéral vs sous-cutané) sont-elles d'une importance suffisante afin d'identifier un «tissu cible» quant aux dangers associés à la prise pondérale?

3.2.1 Impact de l'obésité sur la lipolyse adipocytaire

Dans l'étude de Mottagui-Tabar et al.⁵¹ précédemment mentionnée (section 2.2.1), la lipolyse basale adipocytaire était nettement plus élevée chez les individus obèses que chez les non obèses (de l'ordre de 400%). De même, Hoffstedt et al.²⁹ ont obtenu des résultats similaires alors que la lipolyse basale s'avère au moins deux fois plus élevée chez les obèses en comparaison avec des sujets contrôles et ce, autant dans le dépôt adipeux viscéral que sous-cutané. Vraisemblablement, la lipolyse réagit de la même façon chez les rats nourris à l'aide d'une diète riche en lipides, non seulement à long terme mais aussi à moyen terme (environ deux mois)⁸. D'ailleurs, Berger et Barnard⁸ démontrent une corrélation significative entre le

volume adipocytaire et la lipolyse (basale et stimulée) chez des rates Spragues-Dawley. La Figure 14 illustre bien à quel point la lipolyse semble être tributaire au volume cellulaire⁸.

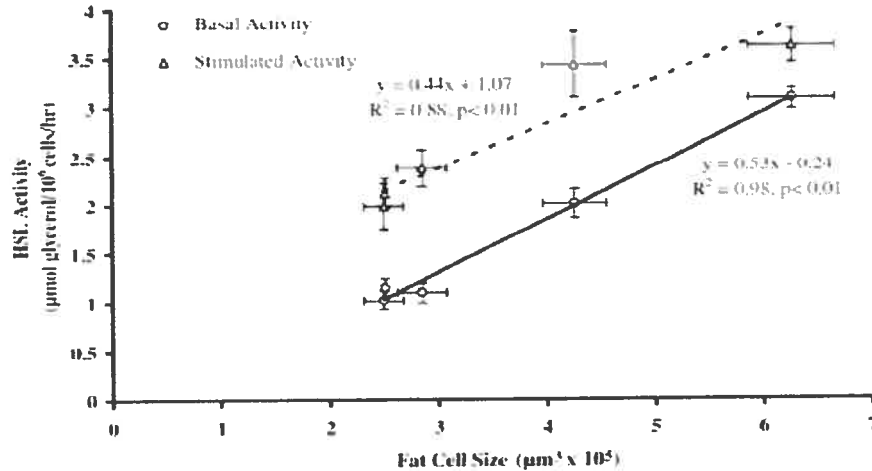


Figure 14. Il existe une forte corrélation entre le volume des adipocytes et le taux lipolytique, particulièrement à l'état basal⁸. Cette corrélation implique autant de rates nourries à l'aide d'une diète standard que de rates nourries à l'aide d'une diète riche en lipides.

Par ailleurs, l'analyse de la lipolyse stimulée s'avère un peu plus complexe à effectuer, particulièrement avec l'obésité, puisqu'elle semble réagir différemment selon la localisation des graisses (viscérale vs sous-cutanée) en plus d'être gérée par deux effecteurs bien distincts, soit l'insuline et les catécholamines. Pour cette raison, chacun des principaux rouages de l'activation lipolytique seront analysés afin d'éclaircir les fluctuations lipolytiques en regard à l'obésité.

Pérlipine. Comme mentionné dans la section 2, la protéine PAT semble influencer le métabolisme lipolytiques. Celle-ci ne semble pas accompagner l'augmentation du volume cellulaire de telle sorte que les nombreux lipides en surplus sont de moins en moins bien «protégés» contre la HSL^{51,71}. Ce résultat provoque essentiellement une lipolyse basale accrue. Dans ce cas-ci, on doit se souvenir que la pérlipine induit une diminution de la lipolyse basale

par opposition à une augmentation de la lipolyse stimulée (voir section 2.1.2, Figure 7)⁶⁷. Or, il est démontré, chez les individus obèses, que l'activité basale de la lipolyse est élevée alors que la capacité à répondre à une stimulation est réduite. Ceci est observé dans le tissu adipeux sous-cutané qui s'avère le dépôt adipeux le plus imposant chez l'humain : stimulée/basale : non-obèses=9.5 ± 1.9 vs obèses=3.9 ± 0.4, $p < 0.001$ ³⁹. Le dépôt adipeux viscéral répond différemment chez les obèses, il en sera question dans la section 3.2.2. Naturellement, de multiples autres variables, outre la périlipine, sont responsables de la réponse lipolytique (surtout que l'on ignore toujours les causes de la lipolyse basale). Toutefois, il est probable que le faible taux de périlipine observé chez les obèses explique les réponses lipolytiques différentes entre la lipolyse basale et la lipolyse stimulée. D'autre part, il est démontré que certains agents pharmacologiques, soit les TZD (agonistes aux PPARs; voir section 2.2.2), améliorent le profil métabolique des obèses, de façon non négligeable, en induisant une expression accrue de la périlipine¹⁶. Sachant que l'augmentation de l'expression de périlipine concorde avec une forte diminution de la concentration en AGL plasmatiques et de l'insulino-résistance, il est probable que la lipolyse basale joue un rôle de premier plan quant au syndrome métabolique.

HSL. La HSL est une protéine de 84 kDa capable d'hydrolyser des TG, des DG, des MG ainsi que la plupart des esters telles que les esters de cholestérol et les esters de stéroïdes³⁰. Cependant, la HSL est dépourvue d'une fonction phospholipasique³⁰. L'action de cette lipase est considérée comme une étape limitante dans le métabolisme de la lipolyse, ce qui en fait peut-être le chaînon le plus important dans la cascade enzymatique. À cet effet, Large et al.³⁸ ont mesuré la lipolyse stimulée du tissu sous-cutané abdominal chez 16 individus obèses. Ils ont ensuite classé ces individus sous deux catégories différentes en prenant soin de jumeler les volumes cellulaires identiques : «faible lipolyse» et «forte lipolyse» (la lipolyse

était au moins 50% plus élevée dans le groupe «forte lipolyse» par rapport au groupe «faible lipolyse»). L'activité (mU/mg protéine) ainsi que la densité ($DO \times mm^2$) de la HSL furent presque deux fois plus élevées pour le groupe «forte lipolyse» en comparaison avec le groupe «faible lipolyse». L'importance de la HSL pour la lipolyse stimulée fut ensuite interprétée à l'aide de corrélations impliquant la lipolyse maximale avec, d'une part, l'activité de la HSL et, d'autre part, la densité de la HSL. Des résultats statistiques de $R^2=0,746$ et $R^2=0,636$ ont été obtenus, respectivement, pour chacune des deux corrélations confirmant ainsi le rôle prépondérant de la lipase dans le métabolisme lipolytique.

Évidemment, ceci s'avère uniquement dans le cadre de la lipolyse stimulée où la HSL doit être phosphorylée pour augmenter son activation à un niveau optimal et ainsi permettre un effet lipolytique maximal. Très peu d'informations sont disponibles au sujet des motifs de son activation à l'état basal (sans aucune stimulation adrénergique). Sachant que la HSL nécessite une phosphorylation en vue d'effectuer l'hydrolyse des TG, plusieurs hypothèses sont à considérer. Tout d'abord, il est probable que son activité soit modulée par l'adénylate cyclase et/ou encore la PKA à l'état basal. Il est aussi démontré que la «GMPc-dependant protein kinase» possède la capacité de phosphoryler la HSL³⁰. Néanmoins, les enzymes présentées ci-dessus (l'adénylate cyclase, PKA et GMPc-dependant protein kinase) nécessitent habituellement une activation par les agonistes β -adrénergiques et l'ANP (atrial natriuretic peptide) respectivement³⁰. Sans compter que la «GMPc-dependant protein kinase» n'est présente qu'en très faible quantité dans l'adipocyte³⁰. Enfin, la «Ca²⁺/calmoduline-dependant protein» pourrait aussi être impliquée dans la phosphorylation de la HSL en présence de calcium³⁰. Toutefois, le calcium est maintenant reconnu comme un inhibiteur potentiel de la lipolyse³⁰. Il semble bien que le mécanisme de la lipolyse basale soit quelque peu nébuleux et

bien que toutes ces enzymes sont soupçonnées d'y intervenir, l'objet de cette activation demeure inconnu.

Jusqu'à tout récemment, la communauté scientifique se doutait bien que la HSL, bien que l'enzyme régulatrice la plus importante, fonctionnait en synergie avec d'autres lipases cytosoliques. Les études impliquant l'inactivation du gène de la HSL (HSL KO) constituaient la meilleure preuve de cette affirmation puisque les souris HSL^{-/-} persistaient tout de même à hydrolyser des TG^{53,70}. La «monoglyceride lipase» (MGL) était déjà identifiée, depuis plusieurs années, à titre de lipase responsable d'hydrolyser, en partie, le dernier lien constituant les monoglycérides afin d'aider la HSL à ne laisser aucun substrat cellulaire derrière elle³⁰. Évidemment, elle ne peut être responsable de l'effet compensatoire chez les souris HSL^{-/-} car elle ne possède qu'une seule fonction hydrolytique pour les monoglycérides, ceux-ci ne constituant que la dernière étape de l'hydrolyse totale des TG. Désormais, l'«adipose triglyceride lipase» (ATGL) est perçue comme une troisième lipase, majoritairement exprimée dans l'adipocyte des rats et des humains, ayant des caractéristiques bien particulières dans la sélection du substrat à hydrolyser⁷⁵. En effet, il semble que cette lipase ait une préférence pour les TG au détriment des DG et des MG⁷⁵. La Figure 15 illustre, de diverses façons, la sélectivité de cette lipase ainsi que son rendement lipolytique par rapport à la HSL⁷⁵. Les souris HSL^{-/-} démontrent une accumulation de DG (impliqués dans les problèmes d'insulino-résistance) et non de TG⁷⁵. De plus, il est bien démontré que la HSL possède jusqu'à dix fois plus d'affinité pour les DG en comparaison avec les TG ou les MG³⁰. Par conséquent, trois lipases distinctes semblent agir en synergie dans le but d'optimiser la réponse lipolytique : l'ATGL (TG), la HSL (TG, **DG** et MG) ainsi que la MGL (MG).

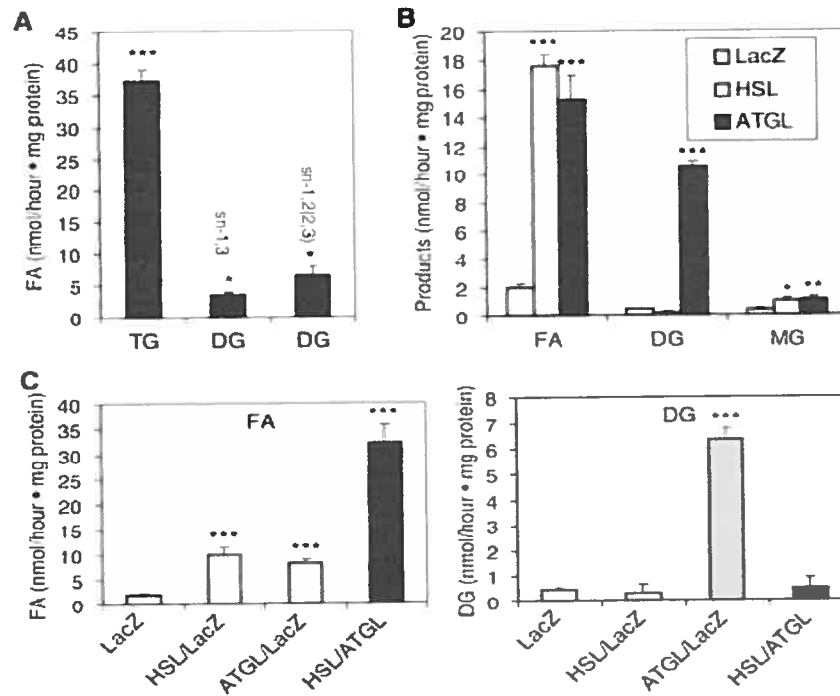


Figure 15. Rôle de l'ATGL dans l'hydrolyse des TG⁷⁵. (A) Des cellules de la lignée HepG2 infectées d'un adénovirus exprimant l'ATGL ont été incubées à l'aide de TG ou de DG radio-actifs. Le taux d'hydrolyse des substrats fut mesuré par la production d'AGL par unité de temps par quantité de protéines. (B) Accumulation de divers substrats pendant une réaction lipolytique induite par la HSL ou l'ATGL. Des cellules de la lignée COS-7 infectées d'un adénovirus exprimant la HSL ou encore l'ATGL (ou un vecteur vide) ont été incubées à l'aide de la trioléine (TG) radio-active. Les lipides furent séparés par chromatographie et quantifiés à l'aide d'un liquide à scintillation. (C) Effet combiné des lipases ATGL et/ou HSL sur l'accumulation des AGL et des DG. Des cellules de la lignée COS-7 ont été conçues pour exprimer soit la HSL, soit l'ATGL ou encore les deux dans le but comparer leur rôle respectif dans l'hydrolyse des substrats. (*p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001)

Diameter and lipolysis of isolated adipocytes

Genotype (HSL)	Diameter (μm)	Lipolysis ($\text{nmol}/10^{10} \mu\text{m}^2/\text{h}$)		Fold increase
		Basal	$\beta 3$ stimulation	
-/-	69.6 ± 1.84	3.49 ± 0.40	3.93 ± 2.67	1.13
+/-	76.3 ± 2.8	2.84 ± 0.63	11.51 ± 2.07	4.05
+/+	80.9 ± 3.79	2.00 ± 0.43	12.30 ± 2.35	6.15

Tableau III. Lipolyse et diamètre des adipocytes en fonction de leur génotype (HSL)⁷⁰. La lipolyse stimulée est déficiente chez les souris ne possédant pas le gène de la HSL, comme en témoigne leur faible augmentation (1.13 x basal) en comparaison aux animaux hétérozygotes +/- (4.05 x basal) et aux animaux homozygotes +/+ (6.15 x basal).

Par ailleurs, les études portant sur l'absence du gène codant la HSL démontrent une altération de la lipolyse stimulée chez les animaux HSL^{-/-} (Tableau III)⁷⁰. D'autre part, des cellules 3T3-L1 exprimant l'ATGL, par l'intermédiaire d'un adénovirus, démontrent une lipolyse basale accrue par rapport aux cellules ne l'exprimant pas⁷⁵. Le même constat est observable lorsque les cellules sont incubées à l'aide d'isoproterenol. Ceci implique que l'ATGL participe autant à la lipolyse basale qu'à la lipolyse stimulée. Il est aussi démontré que l'activité, l'expression et l'ARNm de la HSL sont tous diminués dans le tissu adipeux sous-cutané des individus obèses en comparaison avec les non obèses^{18,39}. Sachant que les souris HSL^{-/-} et les obèses ayant de faible taux de HSL présentent une incapacité à stimuler la lipolyse convenablement, il se pourrait que la HSL soit la principale lipase régulatrice de la lipolyse stimulée. À l'inverse, la lipolyse basale des souris HSL^{-/-} demeurant presque inchangée et celle des individus obèses étant accrue, ces constats nous permettent de croire qu'une autre lipase, outre la HSL, est impliquée dans la régulation de la lipolyse basale. Évidemment, l'ATGL peut être perçue comme étant cette enzyme, par contre, sa capacité à répondre davantage en présence d'isoproterenol présume d'un mécanisme un peu plus complexe. À ce sujet, il est connu que l'ATGL peut être phosphorylée mais, à l'opposé de la HSL, il semblerait que cette modification ne survient pas par le biais de la PKA⁷⁵. De nombreuses études supplémentaires sont essentielles pour élucider les mécanismes de son activation tant au niveau basal que stimulé, sa coordination avec la HSL (peut-être même d'autres lipases) ainsi que son implication dans certaines physiopathologies.

Récepteurs β -adrénergiques. Les récepteurs β -adrénergiques représentent aussi une étape limitante dans le processus lipolytique en regard au développement de l'obésité et du syndrome métabolique. Il est bien connu que certains polymorphismes de ces récepteurs, particulièrement β 2 et β 3-adrénergiques, sont associés à une faible lipolyse résultant d'une

possède qu'un impact mineur sur l'activation lipolytique du tissu adipeux sous-cutané, quel que soit le degré d'obésité^{29,37}.

Les récepteurs β_1 et β_2 -adrénergiques sont, quant à eux, exprimés à la baisse dans le tissu adipeux sous-cutané des sujets obèses³⁷. Ces récepteurs ont toutefois la possibilité d'activer la lipolyse dans tous les dépôts adipeux chez l'humain³⁷. Cette spécificité des récepteurs pour chaque dépôt adipeux, en regard avec l'obésité, témoigne d'une certaine complexité. La lipolyse du dépôt adipeux viscéral est de plus en plus activée au détriment de la lipolyse du dépôt adipeux sous-cutané. Il faut rappeler que la résistance de la lipolyse stimulée dans le dépôt adipeux sous-cutané a été démontrée à de maintes occasions^{18,39}. Cette cinétique de la lipolyse en rapport aux deux dépôts adipeux fera l'objet de la section suivante.

3.2.2 Lipolyse viscérale et «théorie portale»

Il est généralement bien accepté que l'obésité viscérale (androïde) est associée à un risque plus élevé de désordre métabolique et de problèmes cardio-vasculaires que l'obésité périphérique (gynoïde). Évidemment, les récepteurs adipocytaires constituent une cause majeure du risque accru chez les individus accumulant des TG à l'intérieur du péritoine. Comme l'indique l'étude Hoffstedt et al.²⁹, les récepteurs β -adrénergiques sont beaucoup plus actifs dans le dépôt adipeux viscéral en comparaison avec le dépôt adipeux sous-cutané. Dans cette même étude²⁹, aucun effet n'a été rapporté quant à la sensibilité du récepteur α_2 -adrénergique, chez les obèses, entre les deux dépôts adipeux. Toutefois, il semble que ce récepteur ait une fonction diminuée dans le dépôt adipeux viscéral des individus obèses, accentuant davantage l'activation lipolytique des adipocytes viscéraux³⁷.

L'insuline étant une hormone au coeur même des complications engendrées par le syndrome métabolique, son effet sur les différents dépôts adipeux mérite d'être clarifié, d'autant plus que cette hormone exerce une action antilipolytique majeure dans tous les tissus. Mittelman et al.⁴⁹ ont procédé à une expérimentation visant à mesurer *in vivo* la sensibilité du dépôt adipeux viscéral aux effets antilipolytiques de l'insuline chez des chiens nourris à l'aide d'une diète riche en lipides (4 semaines). Pour ce faire, différentes infusions d'insuline (trois concentrations) ont été administrées dans le tissu adipeux viscéral des animaux par le biais de l'artère supérieure mésentérique. La lipolyse du dépôt adipeux viscéral fut mesurée à l'aide de la différence artério-veineuse d'AGL, caractérisée par un échantillon sanguin de la veine porte et d'un autre prélevé de l'artère carotidienne. Les résultats démontrent que l'effet antilipolytique de l'insuline ne s'observe qu'à une concentration extrêmement élevée de celle-ci et suggèrent que l'insuline ne peut supprimer totalement la lipolyse dans un état post-prandial (là où le taux d'insuline est son paroxysme).

La combinaison de la réponse β -adrénergique activée et de la réponse antilipolytique désactivée provoque une sortie massive d'AGL du dépôt adipeux viscéral vers la circulation. Or, il est bien connu que la concentration en AGL plasmatiques sont fortement corrélés à la défaillance périphérique de la sensibilité à l'insuline^{3,20,40}. À ce sujet, le «danger» le plus probant pourrait bien se trouver dans l'association anatomique du dépôt adipeux viscéral et le foie par le biais de la veine porte³. Cette hypothèse, surnommée la «théorie portale», propose un lien de causalité entre la forte lipolyse viscérale et l'insulino-résistance observée dans le foie des individus obèses (androïdes). Récemment, Kabir et al.³³ ont obtenu des résultats supportant cette théorie en mesurant le ratio d'ARNm de certains gènes dans les différents dépôts adipeux (viscéral/sous-cutané). Chez les chiens nourris à l'aide d'une diète lipidique, le ratio était plus élevé pour des gènes tels que la LPL, la HSL et le PPAR- γ ; lesquels sont tous

grandement impliqués dans la cinétique des lipides. D'autre part, les gènes néoglucogéniques du foie (PEPCK et G-6-Pase) étaient plus activés, chez ces mêmes chiens (diète lipidique), en comparaison avec les contrôles. Par conséquent, l'accroissement du mouvement des lipides (adipocytes) combiné à l'augmentation de la production de glucose hépatique semble associer directement l'infiltration des lipides au foie à la sortie massive et constante d'AGL des adipocytes viscéraux.

L'infiltration importante d'AGL au foie comporte plusieurs conséquences indésirables, toutes reliées au phénomène d'insulino-résistance. La première est la production de glucose hépatique accrue malgré une glycémie normale ou élevée^{3,20,40}. D'autre part, il semble que le foie ne dispose plus de l'insuline, de façon optimale, de telle sorte qu'on observe une hyperinsulinémie, laquelle est présente chez de nombreux patients souffrant du diabète de type II^{3,20,40}. Enfin, les AGL étant les substrats de régulation majeure de la production de VLDL, le foie contribue davantage au désordre métabolique en augmentant la sécrétion de VLDL en circulation, lui compliquant ainsi la tâche dans le retrait des lipoprotéines, autant dans une situation post-prandiale (compétition entre les chylomicrons et les VLDL) qu'en situation de jeûne (surabondance de VLDL simulant une situation post-prandiale continue)^{3,20,40}.

Dans le but de relativiser les effets de la lipolyse du dépôt adipeux viscéral sur le foie, il est nécessaire de comprendre la provenance des diverses sources d'AGL contribuant à l'infiltration hépatique de lipides. Ces lipides proviennent essentiellement de trois sources différentes, soit directement de la circulation (AGL plasmatiques), de la lipogénèse *de novo* ou encore de la lipolyse intra-hépatique (cytosolique) des lipoprotéines endocytées⁴⁰. De ces trois possibilités, la circulation semble approvisionner le foie en lipides en majeure partie^{3,20,40}.

Généralement, la lipogénèse *de novo* contribue faiblement à la sécrétion de VLDL (moins de 5% des lipides proviennent de celle-ci) de telle sorte qu'on peut s'attendre à ce que celle-ci contribue peu dans l'accumulation des lipides hépatiques⁴⁰. Cependant, dans un contexte de forte ingestion de glucides ou d'hyperinsulinémie, la lipogénèse *de novo* est accrue au foie, provoquant un certain degré de stéatose hépatique en raison de l'accumulation des lipides accompagnée d'une baisse de l'oxydation de ceux-ci (le malonyl-CoA induit par la lipogénèse *de novo* inhibe la CTP-1, facteur limitant dans l'oxydation des lipides)⁴⁰. Inversement, dans un contexte de diète riche en lipides, il est relativement bien documenté que la lipogénèse *de novo* est inhibée, entre autres, par la diminution de l'expression de certains gènes participant à l'activation de cette voie métabolique³⁵.

Par ailleurs, on ne connaît pas le degré de contribution, à la stéatose hépatique, des AGL provenant de la lipolyse des lipoprotéines endocytées par le foie⁴⁰. Malgré cette donnée manquante, il est probable que les AGL hépatiques provenant de cette source soient significativement élevés dans une condition post-prandiale, mais de moindre importance en situation de jeûne (aucun chylomicron)⁴⁰. Somme toute, la «théorie portale» prend tout son sens alors que l'infiltration des lipides au foie doit provenir, en grande partie, de la circulation^{3,20,40}. La lipolyse des adipocytes viscéraux étant accentuée avec l'obésité viscérale, il devient particulièrement invitant de cibler ces lipides (AGL) comme responsables du développement de la stéatose hépatique et de l'insulino-résistance du fait qu'environ 80% de l'approvisionnement sanguin du foie provient de la veine porte⁴⁰. De plus, les individus ayant une masse adipeuse importante entre les viscères sont plus susceptibles de développer le syndrome métabolique que les «obèses périphériques» ou les non obèses^{3,20,37,40}. Qui plus est, il est à noter que les AGL plasmatiques ne proviennent pas tous de la lipolyse adipocytaire mais aussi de la LPL, laquelle ne fait qu'hydrolyser les TG (lipoprotéines) sans les transporter

à l'intérieur des adipocytes. Le produit de cette hydrolyse résulte en «stockage adipo-cytaire» et aussi en AGL plasmatiques. La Figure 16 résume la provenance des AGL au foie dans la contribution à la stéatose hépatique et l'insulino-résistance.

Il est toutefois trop tôt pour convertir cette théorie en fait scientifique établi. La forte corrélation entre l'obésité viscérale et l'insulino-résistance n'implique pas nécessairement que le premier soit la cause de l'autre²⁰. L'inverse pourrait être aussi une possibilité bien que peu probable puisque d'une part, l'absence de l'effet antilipolytique de l'insuline favorise la sortie des lipides plutôt que l'entrée de ceux-ci et d'autre part, l'entrée des lipides serait plutôt compromise en raison de la défaillance de l'activation de la LPL par l'insuline due à l'insulino-résistance. De plus, on ne peut écarter la possibilité que l'obésité viscérale et l'insulino-résistance soient corrélées à un autre facteur²⁰.

Alors que toute l'attention de la «théorie portale» est portée vers le dépôt adipeux viscéral, on ne doit pas perdre de vue que le dépôt adipeux le plus imposant chez l'humain est certes le dépôt sous-cutané avec 80% de toute la masse adipeuse chez l'homme et plus de 90% chez la femme⁴⁰. Malgré une lipolyse stimulée (relative à la masse adipeuse) assez faible chez les obèses, l'ensemble de la lipolyse du dépôt adipeux sous-cutané est peut-être sous-estimée et pourrait contribuer davantage à l'infiltration des lipides au foie²⁰.

Somme toute, la compréhension du syndrome métabolique pointe majoritairement vers un désordre lipidique, lequel implique plusieurs tissus tels le tissu adipeux et le foie. Il est probable que «l'hyperactivité lipolytique» des adipocytes viscéraux soit, en partie, responsable de l'insulino-résistance périphérique en redistribuant les lipides vers des tissus non adipeux, le

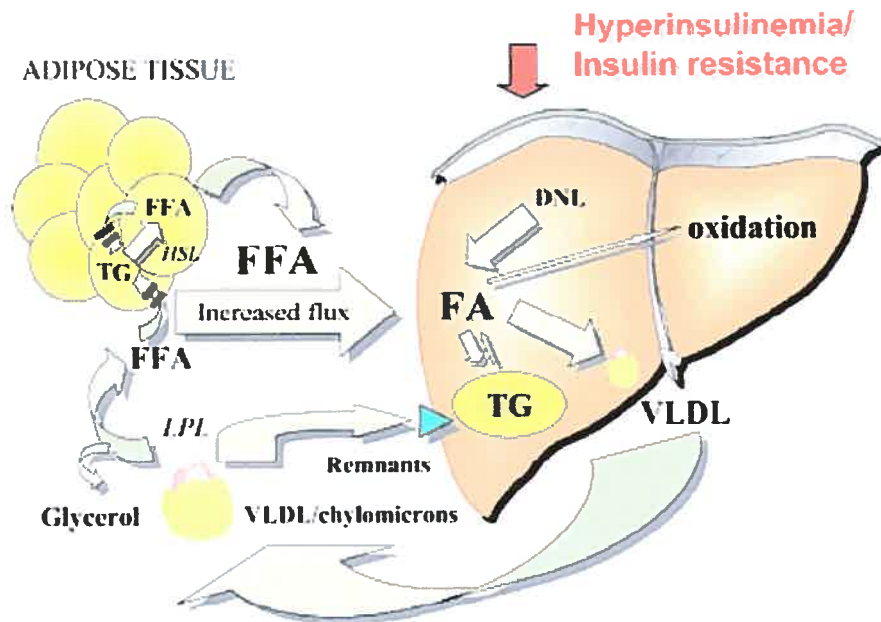


Figure 16. Rôle des AGL dans la contribution à la stéatose hépatique et l'insulino-résistance⁴⁰. Une source majeure d'AGL, dans l'infiltration des lipides au foie, s'avère la circulation. D'une part, un déséquilibre lipolytique adipocytaire peut contribuer, surtout chez les individus obèses, à accroître la mise en circulation d'AGL. D'autre part, la lipolyse des lipoprotéines, par le biais de la LPL (adipocytes), augmente davantage le flot d'AGL vers le foie, particulièrement lorsque beaucoup de lipoprotéines sont en circulation, comme c'est le cas chez les individus atteints du diabète de type II. L'arrivage important d'AGL au foie contribue fortement à augmenter le «pool» de TG hépatiques, lesquels sont soit incorporés dans les VLDL (par lipolyse et réestérification dans le réticulum endoplasmique), soit hydrolysés et réestérifiés dans un cycle futile (stéatose) ou encore oxydés (en plus faible proportion dans les cas de diète riche en glucides et d'hyperinsulinémie). La diète glucidique et l'hyperinsulinémie participent aussi directement à la production d'AGL par le biais de la DNL (lipogénèse *de novo*). Une production accrue de VLDL (due à l'arrivage important d'AGL) augmente la concentration plasmatique de VLDL et, indirectement, la concentration plasmatique de chylomicrons en raison de la compétition entre les deux lipoprotéines pour le captage de celles-ci par le foie. Ainsi, un cycle vicieux s'instaure et contribue toujours davantage au désordre métabolique.

foie et les muscles squelettiques étant les principaux affectés. La périlipine est une phosphoprotéine se logeant sur la face des gouttelettes lipidiques des adipocytes matures et ainsi protège les lipides intra-cytosoliques contre l'action des diverses lipases. On peut donc supposer que le faible taux de périlipine observé chez les obèses contribue à l'augmentation de la lipolyse et au désordre métabolique. Alors que la «théorie portale» propose que la lipolyse stimulée du tissu adipeux viscéral est davantage pernicieuse, la périlipine est, semble-t-il, nécessaire à l'activation lipolytique, laissant présager d'un rôle plutôt secondaire pour cette protéine qui s'exprime en faible quantité chez les obèses. Deux études^{5,71} seulement ont fait l'objet d'une comparaison inter-tissus (sous-cutané vs viscéral) de l'expression de périlipine chez les obèses et toutes deux n'indiquent aucune différence entre les dépôts adipeux. Toutefois, ces études^{5,71} ont été effectuées chez des individus obèses morbides et l'effet de la périlipine, à ce stade, n'est peut-être plus perceptible. À cet égard, une étude cinétique chez l'animal pourrait s'avérer intéressante.

Enfin, un fait majeur reste à déterminer : quel degré d'importance jouent les AGL dans la communication inter-organe entre le tissu adipeux et les autres tissus susceptibles de devenir insulino-résistants? Bien que les AGL sont considérés comme un signal dominant dans le développement de l'insulino-résistance périphérique, il n'en demeure pas moins qu'ils ne sont peut-être pas la cause de ce désordre métabolique. Certes, un des facteurs qui permet encore d'en douter est que les individus obèses ne deviennent pas tous insulino-résistants. On doit porter un intérêt spécial en ce qui a trait aux cytokines et aux autres facteurs protéiques sécrétés par l'adipocyte.

ARTICLE

INTRODUCTION

The pathogenic contribution of obesity to several diseases, namely hypertension and diabetes, is now recognized as a major public health problem worldwide⁵². In recent years, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) has emerged as a new clinical problem among obese patients¹⁹. Although NAFLD is a syndrome with a multifactorial aetiology¹³, obesity is the most common associated factor³¹. The large majority of obese subjects have evidence of fatty liver⁶. Hepatic fat accumulation has been linked to insulin resistance and the development of metabolic diseases⁴⁵. It, thus, becomes imperative to gain as much information as possible on how the liver becomes infiltrated with lipids.

There is little information on the time course of the development of liver lipid infiltration. Studies using an animal model submitted to diets rich in lipids indicate that the liver may accumulate lipids within a few weeks and even a few days^{23,60}. The reason of this rapid liver lipid infiltration, however, is not clear. Increased delivery of FFAs, increased hepatic synthesis of FFAs, decreased FFA *B*-oxidation in the liver and/or decreased synthesis or secretion of very-low-density lipoproteins (VLDL) are key factors¹⁹. Among these factors the increased free fatty acid flow to the liver is generally considered as the most important. The increased FFA flow to the liver may be induced by an increased release of FFAs from adipocytes, excess lipid content in the diet, and increased endogenous synthesis of FFAs in the liver⁴⁰. Animal as well as human studies have suggested that the visceral adipose tissue may be a major source of increased FFA flow to the liver⁶². It is postulated that increased fat accumulation inside the adipocytes results in an increased lipolysis, thus resulting in an increased fat delivery to the liver. It is not known, however, if such a mechanism is compatible with the rapid increase in liver fat accumulation upon the undertaking of a high-fat diet. In the present study we, first, sought to determine if a change in lipolysis in adipocyte may be

ABSTRACT

The purpose of the present study was to examine if changes in lipolysis and in perilipin content in the mesenteric and/or the retroperitoneal fat depots may be associated with changes in liver lipid infiltration induced by a high-fat diet regimen. Female Sprague-Dawley rats were submitted to a high-fat (HF; 42% as kcal) or a standard diet (SD) for 1, 2, 3, or 8 wk. Lipolysis was measured in adipocytes isolated from the mesenteric and retroperitoneal tissues in the basal state and in response to isoproterenol (10^{-4} - 10^{-7} M) and perilipin content was measured in the mesenteric tissue with a Western blot. Liver triglyceride concentrations were significantly ($P < 0.01$) higher in HF than in SD fed rats as soon as 1 wk and throughout the experiment, the highest values being reached at wk 2 of the diet. Similarly, fat accretion in the mesenteric and retroperitoneal tissues along with plasma FFAs and leptin levels were higher ($P < 0.05$) in HF than in SD fed rats as soon as 1 wk after the beginning of the diet, this difference being maintained throughout the following wk. On the opposite, basal and stimulated lipolysis in the mesenteric and retroperitoneal fat depots were not changed during the first 3 wk, whether under the HF or the SD diet condition. Lipolysis in the mesenteric adipose tissue in the basal (10.8 ± 3.5 vs 4.4 ± 0.9 umoles glycerol/million cells/h) and stimulated (10^{-4} M: 35.2 ± 9.6 vs 15.3 ± 3.4 umoles glycerol/million cells/h) states was, however, higher ($P < 0.01$) in HF than in SD fed rats after 8 wk of the diets. There were no significant ($P > 0.05$) effects of diet and time on perilipin content of mesenteric tissue expressed in arbitrary units. However, perilipin content, expressed in arbitrary units per unit of mesenteric fat weight, was significantly ($P < 0.01$) lower in HF than in SD fed rats at all time points. These results do not provide any evidence that an increased lipolysis is responsible for the rapid increase in liver lipid infiltration upon the undertaking of a high-fat diet in animals. The absence of changes in lipolysis and in perilipin content in the first 3 wk upon the undertaking of a high-fat diet suggests that the adipocyte has the ability to rapidly package newly synthesized TG in response to nutrient excess.

Key words: plasma free fatty acids, leptin, hepatic steatosis, isoproterenol

INTRODUCTION

The pathogenic contribution of obesity to several diseases, namely hypertension and diabetes, is now recognized as a major public health problem worldwide⁵². In recent years, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) has emerged as a new clinical problem among obese patients¹⁹. Although NAFLD is a syndrome with a multifactorial aetiology¹³, obesity is the most common associated factor³¹. The large majority of obese subjects have evidence of fatty liver⁶. Hepatic fat accumulation has been linked to insulin resistance and the development of metabolic diseases⁴⁵. It, thus, becomes imperative to gain as much information as possible on how the liver becomes infiltrated with lipids.

There is little information on the time course of the development of liver lipid infiltration. Studies using an animal model submitted to diets rich in lipids indicate that the liver may accumulate lipids within a few weeks and even a few days^{23,60}. The reason of this rapid liver lipid infiltration, however, is not clear. Increased delivery of FFAs, increased hepatic synthesis of FFAs, decreased FFA *B*-oxidation in the liver and/or decreased synthesis or secretion of very-low-density lipoproteins (VLDL) are key factors¹⁹. Among these factors the increased free fatty acid flow to the liver is generally considered as the most important. The increased FFA flow to the liver may be induced by an increased release of FFAs from adipocytes, excess lipid content in the diet, and increased endogenous synthesis of FFAs in the liver⁴⁰. Animal as well as human studies have suggested that the visceral adipose tissue may be a major source of increased FFA flow to the liver⁶². It is postulated that increased fat accumulation inside the adipocytes results in an increased lipolysis, thus resulting in an increased fat delivery to the liver. It is not known, however, if such a mechanism is compatible with the rapid increase in liver fat accumulation upon the undertaking of a high-fat diet. In the present study we, first, sought to determine if a change in lipolysis in adipocyte may be

associated with the time course of changes in liver lipid infiltration observed during the first few weeks in animals undertaking a high-fat diet. We reasoned that a better knowledge of the origin of the lipids responsible for the rapid increase in fat accumulation in liver may be useful to establish a strategy to prevent long term liver lipid infiltration.

In recent years, a new component regulating the activity of hormone-sensitive lipase (HSL)-mediated lipolysis has been identified. Perilipins are phosphoproteins in adipocytes localized at the surface of the lipid droplet²⁵. There is evidence that the access of HSL to the lipid droplets is determined by perilipin A, the main isoform of perilipin^{12,42}. Recent data indicate that perilipin expression is increased in obese subjects³⁴. However, the same authors were unable to establish a relationship between perilipin expression and blood FFAs. The second purpose of the present study was to determine if perilipin content in adipocytes increases with progressive fat accumulation and if these potential changes may be associated with increases in lipolysis, plasma FFA levels, and liver lipid infiltration.

METHODS

Animal care. Female Sprague-Dawley strain rats ($n= 80$), Charles River, St-Constant, PQ, Canada), weighing 180-200g (6 weeks of age) upon their arrival were housed individually and had *ad libitum* access to food and tap water. Their environment was controlled in terms of light (12:12-h light-dark cycle starting at 6:00 AM), humidity and room temperature (20-23°C). All experiments described in this report were conducted according to the directives of the Canadian Council on Animal Care.

Diet protocol. A few days after their arrival, animals were randomly assigned to a standard or a high-fat diet for 1, 2, 3, or 8 wks ($n = 9$ rats/group), while a group of rats were immediately sacrificed to provide for basal values ($T = 0$, $n = 9$). The HF diet consisted of 42% lipids (80% lard, 20% corn oil), 36% carbohydrate, and 22% protein (kcal) and was provided in small pellets from ICN Pharmaceuticals (NY, USA). The standard diet (12.5% lipids, 63.2% carbohydrate, and 24.3 % protein; kcal) consisted of usual pellet rat chow (Agribrands Purina Canada, Woodstock, Ontario). Details of the diets are described elsewhere²⁴.

Blood and tissue sampling. At the end of their respective diet duration, all animals were weighed and sacrificed between 08:30 and 10:30 AM. Food was removed from the animals' cage at least 2 h before sacrifice. After complete anaesthesia (sodium pentobarbital, 50 mg/kg, ip), the abdominal cavity was rapidly opened following the median line of the abdomen. Blood was rapidly (< 45 s) drawn from the abdominal vena cava (~ 4 ml) into syringes pre-treated with EDTA (15%). Blood was centrifuged (4000 RPM for 10 min, 4 °C) and the plasma kept for free fatty acid, glucose, and leptin determinations. Shortly after, liver

was excised, the median lobe freeze-clamped and used for triglyceride determinations. The mesenteric and retroperitoneal fat depots were, thereafter, rapidly excised and weighed. Mesenteric fat pad consisted of adipose tissue surrounding the gastro-intestinal tract from the gastro-oesophageal sphincter to the end of the rectum with special care taken in distinguishing and removing pancreatic cells. Retroperitoneal fat pad was taken as that distinct deposit behind each kidney along the lumbar muscles. Approximately 700 mg of the depots was immediately used for determination of lipolysis. The remaining portion of the mesenteric and retroperitoneal depots as well as plasma and liver samples were stored at -78°C until analyses.

Preparation of isolated adipocytes. Adipocytes were isolated according to the method of Rodbell⁵⁶. Tissue fragments (700 mg) from the mesenteric tissue were minced in polyethylene vials containing Krebs-Ringer bicarbonate buffer in the presence of 1 mg/ml collagenase P (Roche 1213865). Krebs-Ringer bicarbonate buffer also contained fatty acid-free bovine serum albumin 4% (BSA) and 0.5 g/L glucose (KRBA). Thereafter, the atmosphere of the flasks was saturated with 95% O_2 and 5% CO_2 . Adipocytes were then incubated in a shaking water bath at 37°C for 30 min with a shaking frequency of 100 strokes/min. The digested pieces were filtered through a nylon mesh for separation of fat cells from the stroma. The filtrate was collected in a graduated polyethylene tube to avoid cell breakage. The aqueous phase was aspirated with polyethylene pipettes. The floating adipocytes were then resuspended in 5 ml of fresh KRBA. This process was repeated 3 times to eliminate the remaining collagenase. The adipocytes were stored in the KRBA for 2 min between 2 washes.

Incubation of adipocytes and measurement of lipolysis. Basal and stimulated lipolysis were determined in isolated adipocytes (50 μ L) incubated with a 10 μ L solution of distilled water and ascorbic acid (basal) and with isoproterenol adjusted to give concentrations of 10^{-7} , 10^{-5} , and 10^{-4} M. Isoproterenol was used because it is a pure β -agonist and as such it illicitly the greatest lipolytic response⁸. The incubation was performed at 37°C under a 95% O₂- 5% CO₂ atmosphere with gentle shaking (80 strokes/min) for 2 h. The reaction was stopped by adding 50 μ L HCl (1N), and then 50 μ L NaOH (1N) to neutralize the medium. The vials were vortexed and put on ice for 10 min. After a centrifugation of 5 s at 250G, the aqueous phase was removed and stored at -78° C until glycerol determination. Lipolytic activity was measured by glycerol quantification with the use of commercially available kits from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). Glycerol quantification was expressed in millions of cells/h after counting the number of cells in each tested sample.

Cell count. The number of cells in each individual sample was determined by first diluting 100 μ L of the isolated adipocyte preparation into 9.9 ml KRBA (100 μ L) and then dropping 50 μ L of this solution in 25 μ L of trypan blue (0.4% normal saline). The total number of cells in this final suspension was determined with the use of a Nikon-optiphot microscope (10X) and quantified with *Image-Pro plus* version 4.5 (Media Cybernetics).

Measurement of perilipin content. Perilipin content was measured only in the mesenteric tissue. Mesenteric fat depots (~ 100 mg) were homogenized in EDTA-sucrose buffer and centrifuged at 12,000 g, 4°C for 20 min. The infranatant was collected with a blunt-tipped Pasteur pipette and stored at -80° C until perilipin determination. Perilipin A content in adipocytes was determined by Western blotting. All samples were separated on a 10% SDS-polyacrylamide gel followed by protein transfer to a polyvinylidene difluoride membrane by

electroblotting. The membrane was blocked in 5% (wt/vol) skim milk in TBS (100 mM TRIS, 100 mM NaCl, pH 7.5) for 2 h at room temperature before overnight incubation with a rat perilipin A polyclonal antibody (ABR-Affinity Bio Reagents) with 0.05% sodium azide. After three washes in TBS-Triton 0.5%, the membrane was incubated for 1 h with an anti-rabbit IgG peroxidase-conjugated antibody (Jackson Immuno Research Laboratories Inc) diluted to 0.8 µg/ml in 0.1% BSA, 0.1% Tween 20 and 1% (wt/vol) skim milk in TBS. The membrane was washed three times for 10 min each time in TBS-Triton 0.5% before a chemifluorescence substrate (enhanced chemiluminescence, Amersham, Baie D'Urfée, PQ) was applied to the membrane. The resulting signal was detected on enhanced chemiluminescence film (Amersham), scanned with the use of Agfas Arcus II, and quantified with Image-Pro plus 4.5 software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD).

Analytical Procedures. Plasma glucose concentration was determined with the use of a glucose analyser (Yellow Springs Instruments 2300, Yellow Springs, OH). Plasma FFA levels were measured with commercially available kits from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). Leptin levels were measured with commercially available kits from Linco (St-Charles, Missouri, USA). Liver TG concentration was estimated from glycerol released after ethanolic KOH hydrolysis using a commercial kit (Sigma Diagnostics, St-Louis, MO). Although this method does not discriminate between glycerol from phospholipids or TG, Frayn and Maycock²¹ have shown that omitting removal of phospholipids leads to only a ±2% error in the determination of tissue TG.

Statistical Analysis. Values are expressed as means ± SE. Statistical analyses were performed by a two-way ANOVA for non-repeated-measures design with diet and time as main effects at times 1, 2, 3, and 8 weeks, excluding time point 0 (since no diet treatment was

given at that time). In a second step, the effect of time was analyzed separately in high-fat and in standard fed rats using a one-way ANOVA for non-repeated measures over all time points, with the exception of the lipolysis data for which the number of observations obtained at time 0 was too small. This second statistical analysis was performed to better characterize the effect of time in each diet including comparison with time 0. Fisher's post-hoc test was used in the event of a significant ($P < 0.05$) F ratio.

RESULTS

There was no statistical ($P > 0.05$) difference in body weight between SD and HF fed rats at any time points with the exception of time 2 wk (Table 1). Significantly ($P < 0.01$) higher values of liver triglycerides, plasma FFAs, and leptin concentrations were found in HF compared to SD fed rats as soon as one wk and throughout the 8-wk experimental period (Fig. 1A-C). That the HF diet resulted in a rapid and transient liver lipid infiltration is indicated by the significant ($P < 0.05$) increase in liver TG observed only after 1 and 2 wk compared to time 0. There was no change in liver lipid infiltration in SD fed rats. A significant ($P < 0.05$) increase in plasma FFAs and leptin concentrations over time was also found as soon as 2 and 1 wk, respectively, after introducing the HF diet while in SD fed rats a significant ($P < 0.01$) increase over time was found only after 8 wk. Plasma glucose concentrations were significantly ($P < 0.05$) and similarly increased over time in both diet conditions (Fig. 1D).

The HF diet resulted in significantly ($P < 0.01$) higher relative weights of the mesenteric and retroperitoneal fat pad at all times compared to SD fed animals (Fig. 2). Compared to time 0, HF and SD fed rats showed significantly ($P < 0.05$) higher values in the mesenteric fat pad weights after 2 and 8 wk, respectively and after 1 and 8 wk, respectively for the retroperitoneal tissue. Inter-group comparisons of lipolysis in the basal condition and following incubation with isoproterenol in the mesenteric and retroperitoneal fat tissues are presented in Fig. 3 and 4, respectively. There were no differences in basal and stimulated lipolysis between HF and SD fed rats at times 1, 2, and 3 wk in both the mesenteric and the retroperitoneal fat tissues (with 2 exceptions; Fig. 3A and C). Basal and stimulated (10^{-5} , 10^{-4} M) lipolytic activities of the mesenteric tissue were, however, significantly ($P < 0.05$) higher in HF than in SD fed rats at time 8 wk (Fig. 3). There were no effects of time (1 to 8 wk) on

basal and stimulated lipolysis in the mesenteric tissue of rats fed the SD diet. In HF fed rats, however, basal and stimulated lipolytic activities of the mesenteric tissue were significantly ($P < 0.05$) higher at time 8 wk compared to times 1, 2, and 3 wk (Fig. 3). Although no significant differences were found between HF and SD fed rats, basal and stimulated (10^{-7} M) lipolysis in the retroperitoneal tissue was significantly ($P < 0.05$) higher after 8 wk of high-fat feeding compared to time 0 wk and higher significance level ($P < 0.01$ vs 0.05) of increased lipolysis after 8 wk were found in HF than in SD fed rats at 10^{-5} and 10^{-4} M (Fig. 4).

There were no significant ($P > 0.05$) effects of diet and time on perilipin content of the mesenteric tissue expressed in arbitrary units (Fig. 5A). When the perilipin content was expressed taking into account the weight of the mesenteric fat pad, the perilipin/fat ratio was significantly ($P < 0.01$) lower in HF than in SD fed rats at all time points (Fig. 5B). There was no effect of time of perilipin/fat ratio in SD fed rats. However, the perilipin/fat ratio was significantly ($P < 0.01$) lower after 8 wk of HF feeding compared to time 0.

DISCUSSION

Lypolysis and liver lipid infiltration. It has now become notorious that chronic obesity is associated with a state of hepatic steatosis¹⁹. What is not as well-known is the fact that hepatic fat may accumulate rapidly upon the undertaking of a high-fat diet^{23,60}. The significance of this infiltration is not negligible since rapid hepatic fat accumulation, even as a matter of days, has been reported to result in hepatic insulin resistance^{36,60}. The high-fat diet used in the present experiment resulted in a large increase in hepatic fat accumulation as soon as 1 wk after introducing the high-fat diet. Indeed, the difference in hepatic triglycerides between HF and SD fed rats was more important in the first few wk than it was after 8 wk. Increased hepatic fat accumulation is strongly associated with increased circulatory FFA levels and increased adipocyte fat deposition^{24,63}. Accordingly, plasma FFA levels and fat accumulation in the mesenteric and retroperitoneal tissues were rapidly increased after the undertaking of the high-fat diet. However, the origin of the additional circulating FFAs, under this circumstance, is still nebulous. It is generally assumed that fat accumulation in the adipocyte leads to an increased release of fatty acids through an increased lipolytic activity³⁷. To test the hypothesis that an increased lipolytic activity may be responsible for the rapid liver lipid infiltration upon the undertaking of a HF diet, we measured lipolysis *in vitro* and compared the results with those of liver lipid infiltration. Interestingly, basal as well as stimulated lipolysis of the adipocytes of the mesenteric and retroperitoneal tissues were not, as a whole, increased in the first 2 wk of the high-fat diet, at a time where the increase in hepatic fat accumulation was the most significant. This strongly suggests that an increased lipolytic activity was not at the origin of the rapid increase in plasma FFAs and hepatic fat accretion upon the undertaking of a high-fat diet. On the other hand, basal lipolysis was highly increased after 8 wk of high-fat feeding, and very likely, constitutes a source of circulating FFAs that may result in liver lipid infiltration on a longer term basis. The important increase in *in vitro*

lipolysis in the mesenteric and, to a lesser extent the retroperitoneal tissue, after 8 wk of high-fat feeding supports the contention of an increased release of FFAs from adipose tissue in patients with excess weight^{20,51}. On the whole, however, data of the present investigation indicates that even though fat accretion in adipocytes and plasma FFA levels were rapidly increased, an increased lipolysis activity cannot explain the rapid gain in hepatic fat accretion upon the undertaking of a high-fat diet regimen in rats.

The observation that lipolysis is not rapidly (3 wk) increased upon the undertaking of a high-fat diet raises the question as to where do the lipids come from. It is unlikely that intra-hepatic factors such as increased hepatic synthesis of FFAs, decreased FFA β -oxidation in the liver, and/or decreased synthesis or secretion of very-low-density lipoproteins play an important role in developing such a short-term liver lipid infiltration. In absence of a significant increase in lipolysis, the present increase in liver lipid infiltration must be related to the increased lipid content of the diet through the uptake of intestinally derived chylomicron remnants²⁷ and through the spillover of the activity of the lipoprotein lipase and the amount of circulating FFAs generated by this activity⁴⁸. The observation that plasma FFA levels were indeed increased after only one week of HF feeding points toward the direction of an elevated rate of escape of FFAs from esterification in adipose tissue. In this respect, Riemens et al.⁵⁴ have recently suggested that the elevated FFA transport rate during fasting in patients with type 2 diabetes is an elevated rate of escape of FFAs from esterification in adipose tissue.

Perilipin and basal lipolysis. In recent years, phosphorylated proteins (i.e. perilipin) in adipocytes localized at the surface of the lipid droplets have been shown to regulate the activity of the hormone-sensitive lipase and consequently lipolysis^{25,43}. Overexpression of perilipin in adipocytes has been reported to result in decreased lipolysis⁶⁵, while perilipin

knockout mice demonstrated increased levels of basal lipolysis, resulting in a lean mouse that is resistant to diet-induced obesity⁶⁹. Increased basal lipolysis in high-fat fed rats may result from an increase in HSL mass or activity; alternatively, this increase may reflect the absence of a protective coat of perilipin on the lipid droplet⁶⁹. In perilipin null mice, it was found that the increased basal lipolysis may be accounted for by the loss of the protective action of nonphosphorylated perilipin at the droplet surface⁶⁹. In the present study, we reasoned that if perilipin content cannot keep up with the increased fat accretion in adipocytes, this might result in an increased basal lipolysis. It is important to recall that in a previous study conducted in human subcutaneous adipose tissue, it was found that perilipin mRNA levels correlated well with perilipin content measured by Western blotting, suggesting an absence of translational regulation of perilipin³⁴. Interestingly, we did not find any changes in perilipin content in absolute values with the high-fat diet over time (Fig. 5A). As a consequence, when perilipin content values were reported per unit of the mesenteric fat depot, thus taking into account the amount of fat accumulated by the cells, the relative values were significantly lower in high-fat than in SD fed rats throughout the 8-wk period. In spite of this, and in spite of a significant accumulation of fat in the adipocytes, basal lipolysis was not increased in the first few weeks in the high-fat fed rats. This may suggest that the initial perilipin content was sufficient to incorporate newly formed TG and to protect them from being hydrolyzed by HSL. In a recent study, Wolins et al.⁷², using cell cultures of 3T3-L1 preadipocyte cell line treated for 100 min with oleate, reported that inhibition of protein synthesis did not inhibit the emergence of adipophilin-coated lipid droplets. They suggested that non-lipid droplet pools of the members of the evolutionarily related family of PAT proteins (S3-12, adipophilin, and TIP 47) constitute a readily available reservoir of coat proteins to permit rapid packaging of newly synthesized TG. Obviously, coating of lipid droplets in preadipocytes is different than in mature adipocytes; for instance, adipophilin does not exhibit the protective effect of

suppressing basal lipolysis as does perilipin¹². Nevertheless, the work of Wolins et al.⁷² supports the contention that the absence of an increase in lipolysis in the first few weeks after undertaking the high-fat diet in the current study may be explained by the ability of the adipocytes to rapidly package newly synthesized TG in response to nutrient excess without any increase in perilipin content.

It is not until 8 weeks of high-fat feeding that the lowered ratio of perilipin/fat accretion is associated with an increase in lipolysis. This is compatible with a more advanced state of obesity. Accordingly, perilipin mRNA levels expressed per unit surface area have been reported to be lower in obese compared to lean subjects⁷¹. Similarly, Motagui-Tabar et al.⁵¹ reported less perilipin protein in obese than in lean women, and this lower level of adipocyte perilipin was associated with a higher level of lipolysis in the cells. Although Kern et al.³⁴ recently reported higher levels of perilipin content and mRNA in obese than in lean subjects, these authors conclude that the elevated expression of perilipin in obesity was not sufficient to restrain lipolysis to levels seen in leaner subjects. Overall, it appears that perilipin content in the current study was not increased so as to keep up with the increased fat accretion in adipocyte and this may be associated with the increased basal lipolysis observed in the mesenteric tissue after 8 wk of high-fat feeding.

Perilipin and activated lipolysis.

Stimulated lipolysis was not altered by the high-fat diet in the first 3 wk, which is in line with what was observed in the basal state. After 8 wk, however, stimulated lipolysis was higher in HF than in SD fed rats. These results are perfectly in line with those reported by Berger and Barnard⁸ in female Fischer 344 rats fed a high-fat diet for 2 months. These results are not, however, readily reconcilable with what is known about perilipin action under

stimulated conditions. The property of perilipin to suppress lipolysis, presumably by blocking access of lipases to the TG core lipids with the droplets is especially evident under conditions where PKA is not activated⁴⁴. Perilipin-null mice exhibit elevated basal rate of lipolysis but attenuated stimulated lipolytic activity, indicating that perilipin is required for maximal lipolytic activity⁶⁹. It seems that perilipin is essential for the translocation of HSL during lipolytic activation⁶⁷. The present increase in lipolysis in absolute values in rats fed the high-fat diet for 8 wk is rather associated with a decrease, not an increase, in perilipin content. One possible explanation might be that perilipin content in the present study was not measured specifically in the phosphorylated form, which is the form under which perilipin should be associated with activated lipolysis. On the other hand, it is possible that the ability of perilipin to translocate HSL to the lipid droplets may be decreased by the high-fat diet as it has been shown to occur with age in rats¹⁵. It must also be kept in mind that other factors in addition to HSL and perilipin may also contribute to the lipolytic response⁶⁷. The recent finding of the existence of a second enzyme, adipose triglyceride lipase (ATGL), that catalyzes the initial step in triglyceride hydrolysis in mammalian adipose tissue is a potential candidate⁷⁵.

In summary, results of the current study show that basal and stimulated *in vitro* lipolysis are not increased in the first 3 of an 8 wk-high-fat diet regimen in rats at a time where liver lipid infiltration is the most significant. These data do not provide any evidence that an increased lipolysis is responsible for the rapid increase in liver lipid infiltration upon the undertaken of a high-fat diet in animals. It is suggested that the rapid increase in liver lipid infiltration and circulating plasma FFAs results from an elevated rate of escape of FFAs from esterification in adipose tissue. Although fat accretion in adipocytes was rapidly (1-3 wk) increased by the high-fat feeding, the absence of a concomitant increase in lipolysis can not be explained by an increase in perilipin content.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (JML) and from the Canadian Institute of Health Sciences (JML and PI) of Canada.

LEGENDS

Fig. 1. Liver triglycerides (TG), plasma free fatty acids (FFAs), leptin, and glucose concentrations at time 0 (baseline values) and in rats fed a standard (SD) or a high-fat (HF) diet for 1, 2, 3, and 8 weeks. Values are means \pm SE; $n = 7-10$ rats/group ($n = 2$ and 5 rats for leptin at times 0 and HF 1 wk, respectively). ** Significantly different between SD- and HF-fed rats, $P < 0.01$. + Significantly different from basal values (time 0), $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$.

Fig. 2. Mesenteric and retroperitoneal fat weight (WT) relative to 100 g of body weight (BW) at time 0 (baseline values) and in rats fed a standard (SD) or a high-fat (HF) for 1, 2, 3, and 8 weeks. Values are means \pm SE; $n = 9$ rats/group. Values are means \pm SE. ** Significantly different between SD- and HF-fed rats, $P < 0.01$. + Significantly different from basal values (time 0), $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$.

Fig. 3. Adipocyte lipolysis in mesenteric adipose tissue at time 0 (baseline values) and in rats fed a standard (SD) or a high-fat (HF) diet for 1, 2, 3, and 8 weeks. Values are expressed as glycerol production per million of cells per hour (h) in the basal state and in response to isoproterenol (10^{-7} - 10^{-4} M) after 2 h of incubation. Values are means \pm SE; $n = 7-9$ rats/group, with the exception of time 1 wk, $n = 5$. Values at time 0 included only one subject and are given only as a reference value. * Significantly different between SD- and HF-fed rats, $P < 0.05$. & Significantly different from all other time values, $P < 0.05$, && $P < 0.01$.

Fig. 4. Adipocyte lipolysis in retroperitoneal adipose tissue at time 0 (baseline values) and in rats fed a standard (SD) or a high-fat (HF) diet for 1, 2, 3, and 8 weeks. Values are expressed as glycerol production per million of cells per hour (h) in the basal state and in response to isoproterenol (10^{-7} - 10^{-4} M) after 2 h of incubation. Values are means \pm SE; n = 7-9 rats/group. + Significantly different from basal values (time 0), $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$.

Fig. 5. Perilipin content and perilipin/fat ratio measured in mesenteric tissue from rats fed a standard (SD) or a high-fat (HF) diet for 1, 2, 3, and 8 weeks. Values are means \pm SE; n = 8-9 rats/group, n = 6 at time 0. ** Significantly different between SD and HF fed rats, $P < 0.01$. ++ Significantly different from basal values (time 0), $P < 0.01$. Perilipin was measured by Western blotting and expressed in arbitrary units (AU). Perilipin/fat ratio was obtained by dividing the perilipin content by the absolute weight (g) of the mesenteric depot.

TABLES

Table 1. Body weight at time 0 (baseline values) and in rats fed a standard (SD) or a high-fat (HF) diet for 1, 2, 3, and 8 weeks.

	Weeks				
	0	1	2	3	8
Body weight (g)					
SD diet	236±3	244± 2.2++	265± 2.3++	284± 6.4++	320± 14.8++
HF diet	----	258±7.3+	277±3.7**++	293±8.7++	352±13.2++

Values are means ± SE; n = 9 rats/group. ** Significantly different between SD and HF fed rats, $P < 0.01$. . + Significantly different from basal values (time 0), $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$

Figure 1

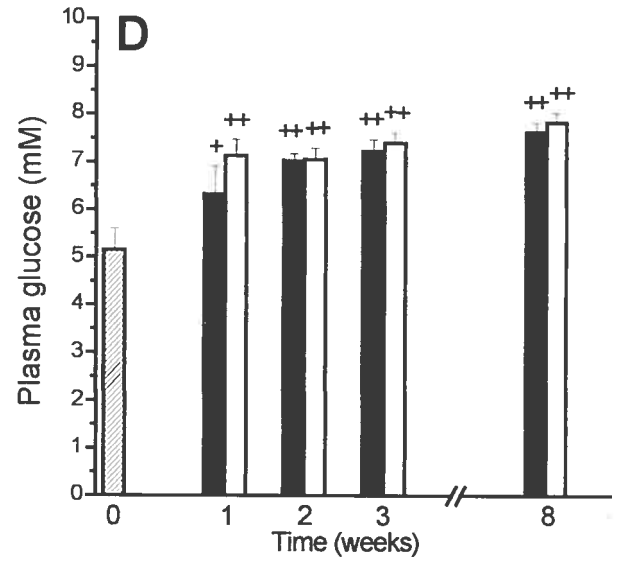
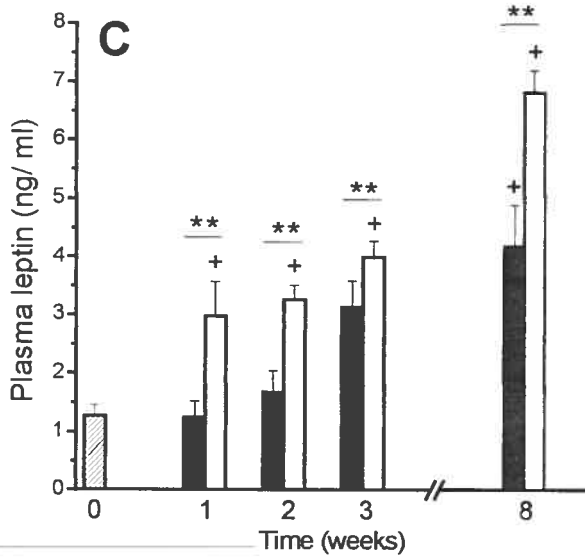
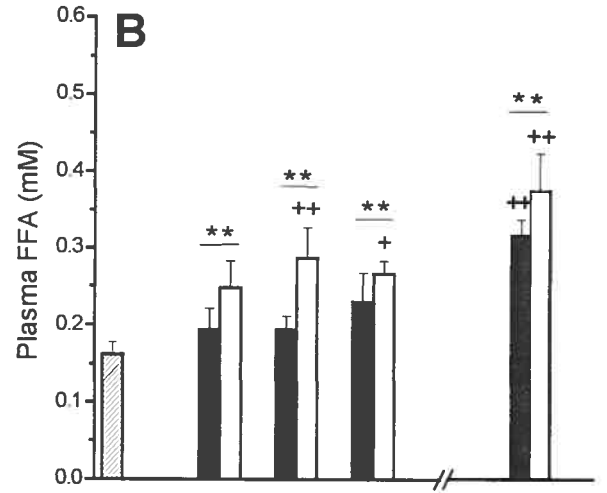
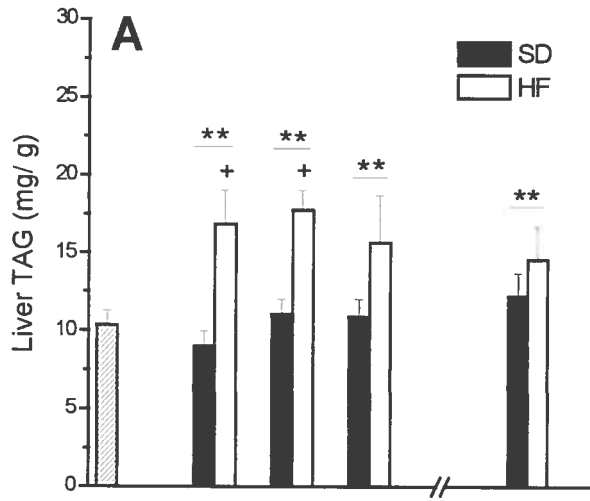


Figure 2

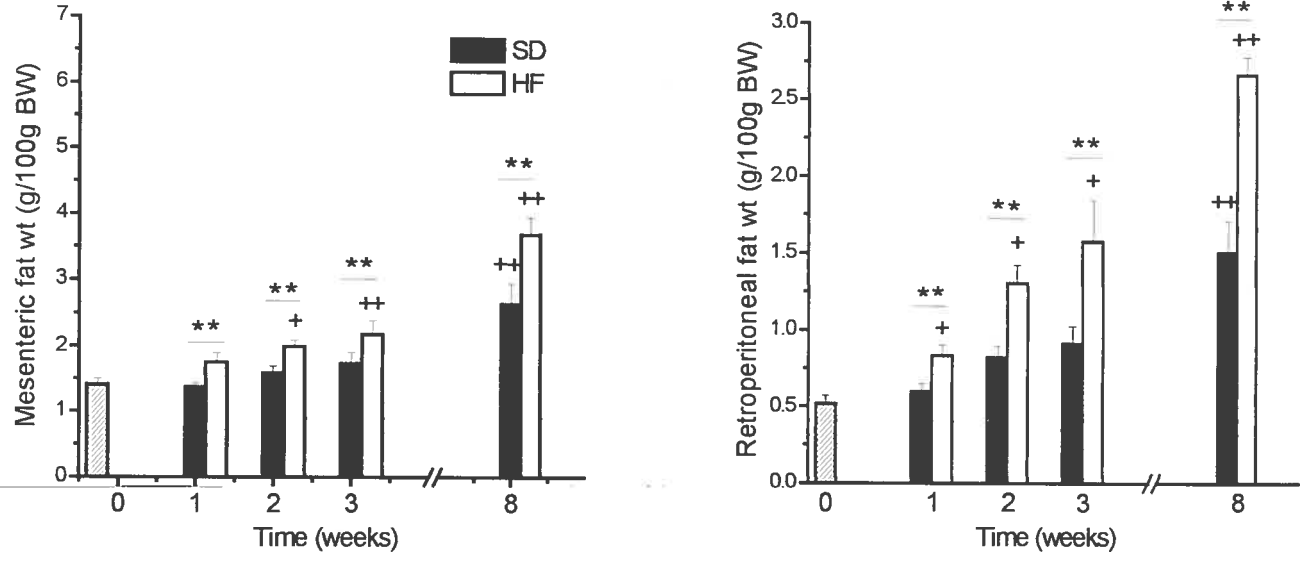


Figure 3

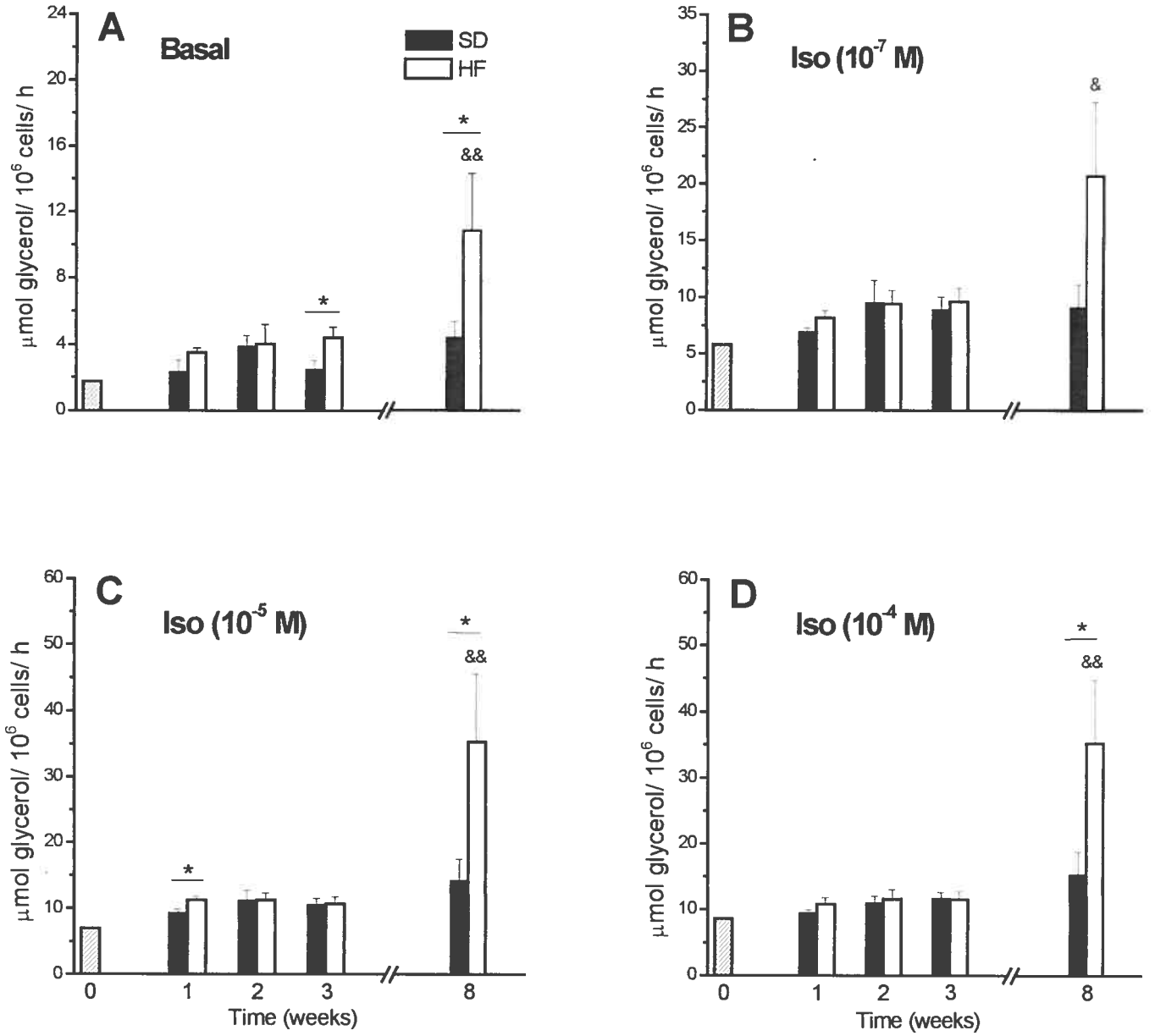


Figure 4

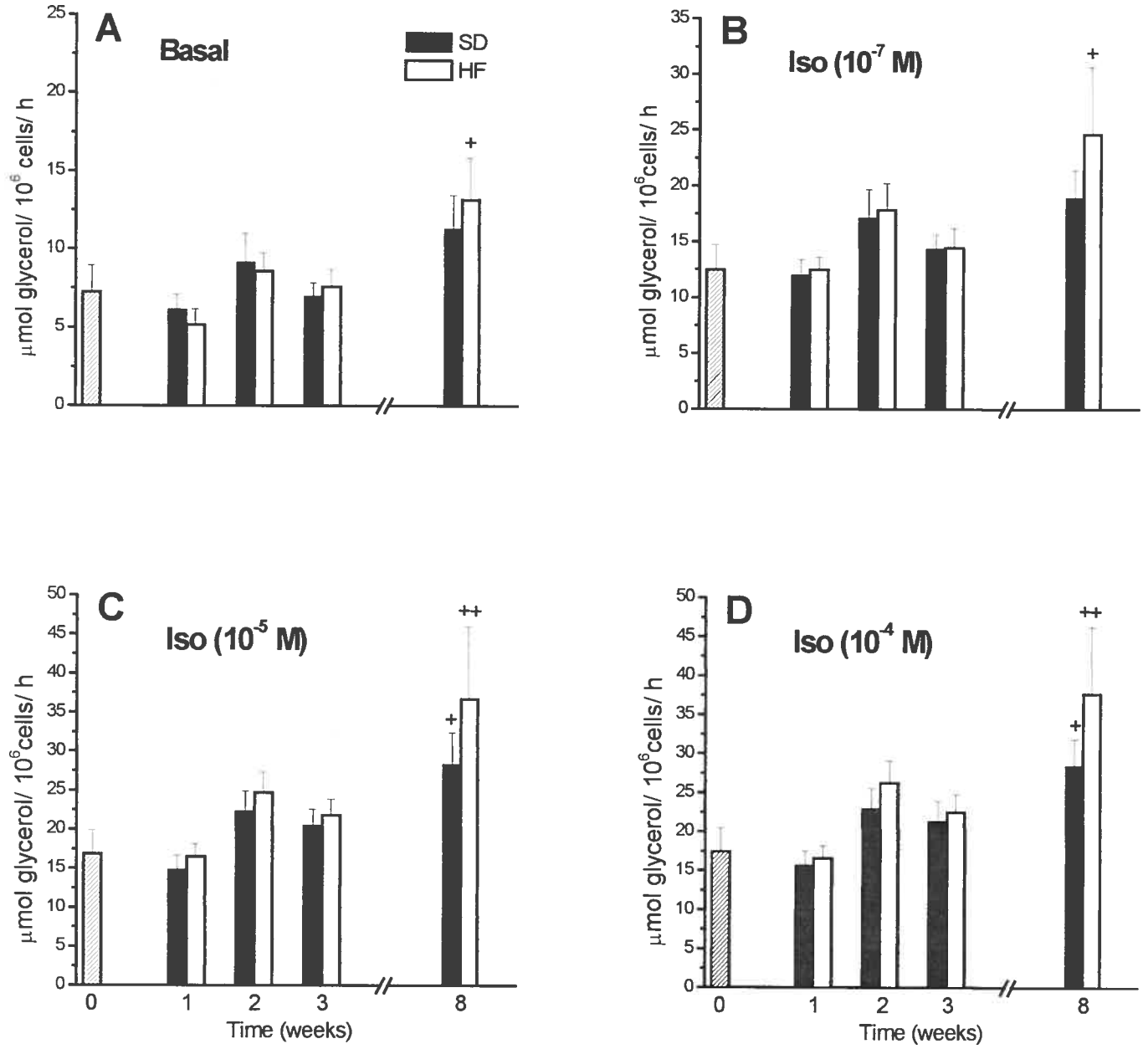
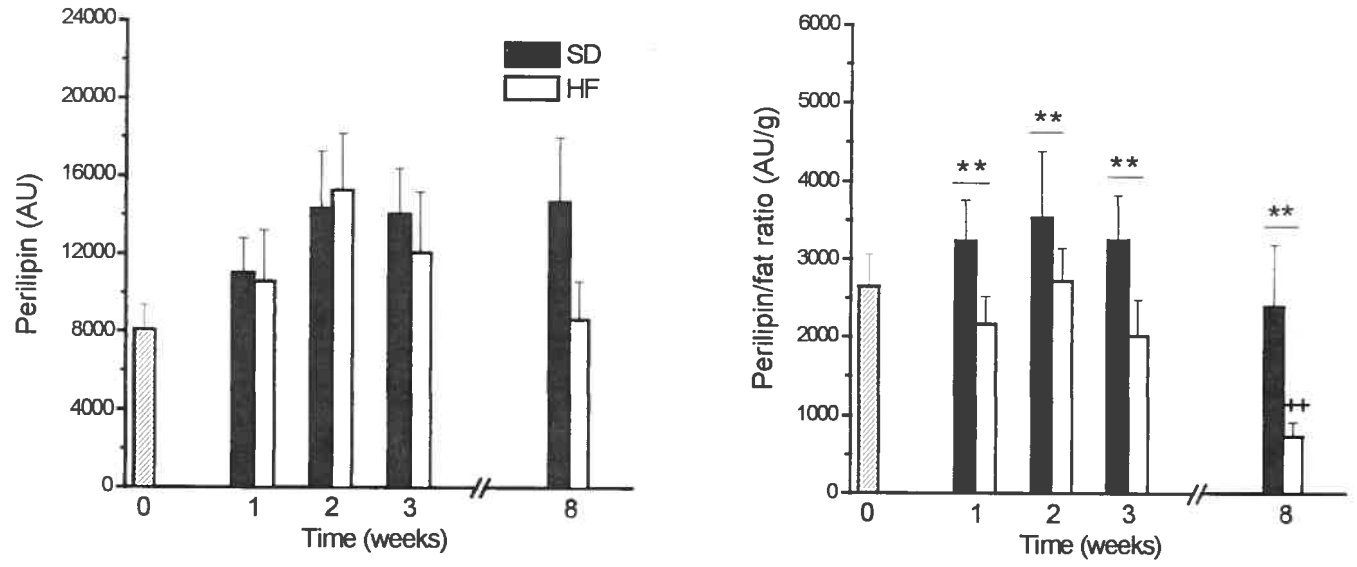


Figure 5



RÉFÉRENCES

1. **Andersson K, Arner P.**
Cholinceptor-mediated effects on glycerol output from human adipose tissue using in situ microdialysis.
Br J Pharmacol. 1995 Aug;115(7):1155-62
2. **Arimura N, Horiba T, Imagawa M, Shimizu M, Sato R.**
The peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates expression of the perilipin gene in adipocytes.
J Biol Chem. 2004 Mar 12;279(11):10070-6
3. **Arner P.**
Insulin resistance in type 2 diabetes: role of fatty acids.
Diabetes Metab Res Rev. 2002 Mar-Apr;18 Suppl 2:S5-9
4. **Arner P.**
Genetic variance and lipolysis regulation: implications for obesity.
Ann Med. 2001 Nov;33(8):542-6
5. **Arvidsson E, Blomqvist L, Ryden M.**
Depot-specific differences in perilipin mRNA but not protein expression in obesity.
J Intern Med. 2004 May;255(5):595-601
6. **Bellentani S, Saccoccio G, Masutti F, Croce LS, Brandi G, Sasso F, Cristanini G, Tiribelli C.**
Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in Northern Italy.
Ann Intern Med. 2000 Jan 18;132(2):112-7
7. **Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE.**
The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action.
Nat Med. 2001 Aug;7(8):947-53
8. **Berger JJ, Barnard RJ.**
Effect of diet on fat cell size and hormone-sensitive lipase activity.
J Appl Physiol. 1999 Jul;87(1):227-32
9. **Brasaemle DL, Barber T, Kimmel AR, Londos C.**
Post-translational regulation of perilipin expression. Stabilization by stored intracellular neutral lipids.
J Biol Chem. 1997 Apr 4;272(14):9378-87
10. **Brasaemle DL, Barber T, Wolins NE, Serrero G, Blanchette-Mackie EJ, Londos C.**
Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein.
J Lipid Res. 1997 Nov;38(11):2249-63

11. **Brasaemle DL, Dolios G, Shapiro L, Wang R.**
Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes.
J Biol Chem. 2004 Nov 5;279(45):46835-42
12. **Brasaemle DL, Rubin B, Harten IA, Gruia-Gray J, Kimmel AR, Londos C.**
Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis.
J Biol Chem. 2000 Dec 8;275(49):38486-93
13. **Chitturi S, Farrell GC.**
Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis.
Semin Liver Dis. 2001;21(1):27-41
14. **Clifford GM, Kraemer FB, Yeaman SJ, Vernon RG.**
Translocation of hormone-sensitive lipase and perilipin upon lipolytic stimulation during the lactation cycle of the rat.
Metabolism. 2001 Nov;50(11):1264-9
15. **Clifford GM, Londos C, Kraemer FB, Vernon RG, Yeaman SJ.**
Translocation of hormone-sensitive lipase and perilipin upon lipolytic stimulation of rat adipocytes.
J Biol Chem. 2000 Feb 18;275(7):5011-5
16. **Dalen KT, Schoonjans K, Ulven SM, Weedon-Fekjaer MS, Bentzen TG, Koutnikova H, Auwerx J, Nebb HI.**
Adipose tissue expression of the lipid droplet-associating proteins S3-12 and perilipin is controlled by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma.
Diabetes. 2004 May;53(5):1243-52
17. **Diaz E, Pfeffer SR.**
TIP47: a cargo selection device for mannose 6-phosphate receptor trafficking.
Cell. 1998 May 1;93(3):433-43
18. **Elizalde M, Ryden M, van Harmelen V, Eneroth P, Gyllenhammar H, Holm C, Ramel S, Olund A, Arner P, Andersson K.**
Expression of nitric oxide synthases in subcutaneous adipose tissue of nonobese and obese humans.
J Lipid Res. 2000 Aug;41(8):1244-51
19. **Festi D, Colecchia A, Sacco T, Bondi M, Roda E, Marchesini G.**
Hepatic steatosis in obese patients: clinical aspects and prognostic significance.
Obes Rev. 2004 Feb;5(1):27-42
20. **Frayn KN.**
Visceral fat and insulin resistance--causative or correlative?
Br J Nutr. 2000 Mar;83 Suppl 1:S71-7

21. **Frayn KN, Maycock PF.**
Skeletal muscle triacylglycerol in the rat: methods for sampling and measurement, and studies of biological variability.
J Lipid Res. 1980 Jan;21(1):139-44
22. **Gao J, Serrero G.**
Adipose differentiation related protein (ADRP) expressed in transfected COS-7 cells selectively stimulates long chain fatty acid uptake.
J Biol Chem. 1999 Jun 11;274(24):16825-30
23. **Gauthier MS, Couturier K, Charbonneau A, Lavoie JM.**
Effects of introducing physical training in the course of a 16-week high-fat diet regimen on hepatic steatosis, adipose tissue fat accumulation, and plasma lipid profile.
Int J Obes Relat Metab Disord. 2004 Aug;28(8):1064-71
24. **Gauthier MS, Couturier K, Latour JG, Lavoie JM.**
Concurrent exercise prevents high-fat-diet-induced macrovesicular hepatic steatosis.
J Appl Physiol. 2003 Jun;94(6):2127-34
25. **Greenberg AS, Egan JJ, Wek SA, Garty NB, Blanchette-Mackie EJ, Londos C.**
Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets.
J Biol Chem. 1991 Jun 15;266(17):11341-6
26. **Greenberg AS, Egan JJ, Wek SA, Moos MC Jr, Londos C, Kimmel AR.**
Isolation of cDNAs for perilipins A and B: sequence and expression of lipid droplet-associated proteins of adipocytes.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Dec 15;90(24):12035-9
27. **Havel RJ, Hamilton RL.**
Hepatic catabolism of remnant lipoproteins: where the action is.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004 Feb;24(2):213-5
28. **Hickenbottom SJ, Kimmel AR, Londos C, Hurley JH.**
Structure of a lipid droplet protein; the PAT family member TIP47.
Structure (Camb). 2004 Jul;12(7):1199-207
29. **Hoffstedt J, Arner P, Hellers G, Lonnqvist F.**
Variation in adrenergic regulation of lipolysis between omental and subcutaneous adipocytes from obese and non-obese men.
J Lipid Res. 1997 Apr;38(4):795-804
30. **Holm C, Osterlund T, Laurell H, Contreras JA.**
Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis.
Annu Rev Nutr. 2000;20:365-93
31. **James O, Day C.**
Non-alcoholic steatohepatitis: another disease of affluence.
Lancet. 1999 May 15;353(9165):1634-6

32. **Jiang HP, Serrero G.**
Isolation and characterization of a full-length cDNA coding for an adipose differentiation-related protein.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Sep 1;89(17):7856-60
33. **Kabir M, Catalano KJ, Ananthnarayan S, Kim SP, Van Citters GW, Dea MK, Bergman RN.**
Molecular evidence supporting the portal theory: a causative link between visceral adiposity and hepatic insulin resistance.
Am J Physiol Endocrinol Metab. 2005 Feb;288(2):E454-61
34. **Kern PA, Di Gregorio G, Lu T, Rassouli N, Ranganathan G.**
Perilipin expression in human adipose tissue is elevated with obesity.
J Clin Endocrinol Metab. 2004 Mar;89(3):1352-8
35. **Kim S, Sohn I, Ahn JI, Lee KH, Lee YS, Lee YS.**
Hepatic gene expression profiles in a long-term high-fat diet-induced obesity mouse model.
Gene. 2004 Sep 29;340(1):99-109
36. **Kraegen EW, Clark PW, Jenkins AB, Daley EA, Chisholm DJ, Storlien LH.**
Development of muscle insulin resistance after liver insulin resistance in high-fat-fed rats.
Diabetes. 1991 Nov;40(11):1397-403
37. **Large V, Arner P.**
Regulation of lipolysis in humans. Pathophysiological modulation in obesity, diabetes, and hyperlipidaemia.
Diabetes Metab. 1998 Nov;24(5):409-18
38. **Large V, Arner P, Reynisdottir S, Grober J, Van Harmelen V, Holm C, Langin D.**
Hormone-sensitive lipase expression and activity in relation to lipolysis in human fat cells.
J Lipid Res. 1998 Aug;39(8):1688-95
39. **Large V, Reynisdottir S, Langin D, Fredby K, Klannemark M, Holm C, Arner P.**
Decreased expression and function of adipocyte hormone-sensitive lipase in subcutaneous fat cells of obese subjects.
J Lipid Res. 1999 Nov;40(11):2059-66
40. **Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, Giacca A**
Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes.
Endocr Rev. 2002 Apr;23(2):201-29

41. **Londos C, Brasaemle DL, Schultz CJ, Adler-Wailes DC, Levin DM, Kimmel AR, Rondinone CM.**
On the control of lipolysis in adipocytes.
Ann N Y Acad Sci. 1999 Nov 18;892:155-68

42. **Londos C, Brasaemle DL, Schultz CJ, Segrest JP, Kimmel AR.**
Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells.
Semin Cell Dev Biol. 1999 Feb;10(1):51-8

43. **Londos C, Gruia-Gray J, Brasaemle DL, Rondinone CM, Takeda T, Dwyer NK, Barber T, Kimmel AR, Blanchette-Mackie EJ.**
Perilipin: possible roles in structure and metabolism of intracellular neutral lipids in adipocytes and steroidogenic cells.
Int J Obes Relat Metab Disord. 1996 Mar;20 Suppl 3:S97-101

44. **Londos C, Sztalryd C, Tansey JT, Kimmel AR.**
Role of PAT proteins in lipid metabolism.
Biochimie. 2005 Jan;87(1):45-9

45. **Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Forlani G, Melchionda N.**
Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome.
Diabetes. 2001 Aug;50(8):1844-50

46. **Martinez-Botas J, Anderson JB, Tessier D, Lapillonne A, Chang BH, Quast MJ, Gorenstein D, Chen KH, Chan L.**
Absence of perilipin results in leanness and reverses obesity in *Lepr(db/db)* mice.
Nat Genet. 2000 Dec;26(4):474-9

47. **Mead JR, Irvine SA, Ramji DP.**
Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease.
J Mol Med. 2002 Dec;80(12):753-69

48. **Miles JM, Park YS, Walewicz D, Russell-Lopez C, Windsor S, Isley WL, Coppack SW, Harris WS.**
Systemic and forearm triglyceride metabolism: fate of lipoprotein lipase-generated glycerol and free fatty acids.
Diabetes. 2004 Mar;53(3):521-7

49. **Mittelman SD, Van Citters GW, Kirkman EL, Bergman RN.**
Extreme insulin resistance of the central adipose depot in vivo.
Diabetes. 2002 Mar;51(3):755-61

- 50. Miura S, Gan JW, Brzostowski J, Parisi MJ, Schultz CJ, Londos C, Oliver B, Kimmel AR.**
Functional conservation for lipid storage droplet association among Perilipin, ADRP, and TIP47 (PAT)-related proteins in mammals, *Drosophila*, and *Dictyostelium*.
J Biol Chem. 2002 Aug 30;277(35):32253-7
- 51. Mottagui-Tabar S, Ryden M, Lofgren P, Faulds G, Hoffstedt J, Brookes AJ, Andersson I, Arner P.**
Evidence for an important role of perilipin in the regulation of human adipocyte lipolysis.
Diabetologia. 2003 Jun;46(6):789-97
- 52. Must A, Spadano J, Coakley EH, Field AE, Colditz G, Dietz WH.**
The disease burden associated with overweight and obesity.
JAMA. 1999 Oct 27;282(16):1523-9
- 53. Osuga J, Ishibashi S, Oka T, Yagyu H, Tozawa R, Fujimoto A, Shionoiri F, Yahagi N, Kraemer FB, Tsutsumi O, Yamada N.**
Targeted disruption of hormone-sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy, but not in obesity.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Jan 18;97(2):787-92
- 54. Riemens SC, Sluiter WJ, Dullaart RP.**
Enhanced escape of non-esterified fatty acids from tissue uptake: its role in impaired insulin-induced lowering of total rate of appearance in obesity and Type II diabetes mellitus.
Diabetologia. 2000 Apr;43(4):416-26
- 55. Roberts CK, Berger JJ, Barnard RJ.**
Long-term effects of diet on leptin, energy intake, and activity in a model of diet-induced obesity.
J Appl Physiol. 2002 Sep;93(3):887-93
- 56. Rodbell M.**
Metabolism of isolated fat cells. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis.
J Biol Chem. 1964 Feb;239:375-80
- 57. Ruan H, Lodish HF.**
Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor- α .
Cytokine Growth Factor Rev. 2003 Oct;14(5):447-55
- 58. Ryden M, Arvidsson E, Blomqvist L, Perbeck L, Dicker A, Arner P.**
Targets for TNF- α -induced lipolysis in human adipocytes.
Biochem Biophys Res Commun. 2004 May 21;318(1):168-75

59. **Saha PK, Kojima H, Martinez-Botas J, Sunehag AL, Chan L.**
Metabolic adaptations in the absence of perilipin: increased beta-oxidation and decreased hepatic glucose production associated with peripheral insulin resistance but normal glucose tolerance in perilipin-null mice.
J Biol Chem. 2004 Aug 20;279(34):35150-8
60. **Samuel VT, Liu ZX, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, Romanelli AJ, Shulman GI.**
Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease.
J Biol Chem. 2004 Jul 30;279(31):32345-53
61. **Schadinger SE, Bucher NL, Schreiber BM, Farmer SR.**
PPARgamma2 regulates lipogenesis and lipid accumulation in steatotic hepatocytes.
Am J Physiol Endocrinol Metab. 2005 Jun;288(6):E1195-205
62. **Scheen AJ, Luyckx FH.**
Obesity and liver disease.
Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2002 Dec;16(4):703-16
63. **Sniderman AD, Cianflone K, Arner P, Summers LK, Frayn KN.**
The adipocyte, fatty acid trapping, and atherogenesis.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1998 Feb;18(2):147-51
64. **Souza SC, de Vargas LM, Yamamoto MT, Lien P, Franciosa MD, Moss LG, Greenberg AS.**
Overexpression of perilipin A and B blocks the ability of tumor necrosis factor alpha to increase lipolysis in 3T3-L1 adipocytes.
J Biol Chem. 1998 Sep 18;273(38):24665-9
65. **Souza SC, Muliro KV, Liscum L, Lien P, Yamamoto MT, Schaffer JE, Dallal GE, Wang X, Kraemer FB, Obin M, Greenberg AS.**
Modulation of hormone-sensitive lipase and protein kinase A-mediated lipolysis by perilipin A in an adenoviral reconstituted system.
J Biol Chem. 2002 Mar 8;277(10):8267-72
66. **Steiner S, Wahl D, Mangold BL, Robison R, Raymackers J, Meheus L, Anderson NL, Cordier A.**
Induction of the adipose differentiation-related protein in liver of etomoxir-treated rats.
Biochem Biophys Res Commun. 1996 Jan 26;218(3):777-82
67. **Sztalryd C, Xu G, Dorward H, Tansey JT, Contreras JA, Kimmel AR, Londos C.**
Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation.
J Cell Biol. 2003 Jun 23;161(6):1093-103

68. **Tansey JT, Huml AM, Vogt R, Davis KE, Jones JM, Fraser KA, Brasaemle DL, Kimmel AR, Londos C.**
Functional studies on native and mutated forms of perilipins. A role in protein kinase A-mediated lipolysis of triacylglycerols.
J Biol Chem. 2003 Mar 7;278(10):8401-6
69. **Tansey JT, Sztalryd C, Gruia-Gray J, Roush DL, Zee JV, Gavrilova O, Reitman ML, Deng CX, Li C, Kimmel AR, Londos C.**
Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 May 22;98(11):6494-9
70. **Wang SP, Laurin N, Himms-Hagen J, Rudnicki MA, Levy E, Robert MF, Pan L, Oligny L, Mitchell GA.**
The adipose tissue phenotype of hormone-sensitive lipase deficiency in mice.
Obes Res. 2001 Feb;9(2):119-28
71. **Wang Y, Sullivan S, Trujillo M, Lee MJ, Schneider SH, Brolin RE, Kang YH, Werber Y, Greenberg AS, Fried SK.**
Perilipin expression in human adipose tissues: effects of severe obesity, gender, and depot.
Obes Res. 2003 Aug;11(8):930-6
72. **Wolins NE, Quaynor BK, Skinner JR, Schoenfish MJ, Tzekov A, Bickel PE.**
S3-12, Adipophilin, and TIP47 package lipid in adipocytes.
J Biol Chem. 2005 May 13;280(19):19146-55
73. **Wolins NE, Rubin B, Brasaemle DL.**
TIP47 associates with lipid droplets.
J Biol Chem. 2001 Feb 16;276(7):5101-8
74. **Wolins NE, Skinner JR, Schoenfish MJ, Tzekov A, Bensch KG, Bickel PE.**
Adipocyte protein S3-12 coats nascent lipid droplets.
J Biol Chem. 2003 Sep 26;278(39):37713-21
75. **Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, Lass A, Neuberger G, Eisenhaber F, Hermetter A, Zechner R.**
Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase.
Science. 2004 Nov 19;306(5700):1383-6



Handwritten text at the bottom right of the page, which is mostly illegible due to fading and blurring. Some faint characters are visible, possibly including a date or a signature.