

Université de Montréal

Stéatose hépatique non-alcoolique et exercice

par

Marie-Soleil Gauthier

Département de kinésiologie

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Philosophiae Doctor (Ph.D.)

en Sciences de l'activité physique

Octobre, 2005

© Marie-Soleil Gauthier, 2005



GV
201
U54
2006
v.003

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

Cette thèse intitulée :
Stéatose hépatique non-alcoolique et exercice

Présentée par :
Marie-Soleil Gauthier

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

.....Claude Alain.....
Président-rapporteur

.....Jean-Marc Lavoie.....
Directeur de recherche

.....François Péronnet.....
Membre du jury

.....François Haman.....
Examineur externe

.....Marielle Ledoux.....
Représentant du doyen de la FES

Résumé

La stéatose hépatique non-alcoolique (SHNA) est caractérisée par l'accumulation excessive de lipides intrahépatiques. Elle représente un problème médical d'envergure qui est fortement associé à l'obésité et au diabète de type 2. Les causes exactes de la SHNA sont encore méconnues. Il semble que la SHNA soit principalement due à l'augmentation des lipides circulants et la stimulation des voies de synthèse des lipides hépatiques, accompagnées d'un mauvais ajustement de l'oxydation des lipides hépatiques et de la sécrétion de VLDL. Par ailleurs, de plus en plus d'évidences suggèrent que l'accumulation de lipides intrahépatiques entraîne une diminution de la sensibilité à l'insuline au niveau hépatique. L'exercice représente un moyen potentiel de prévention et de traitement de la SHNA et de l'insulino-résistance hépatique qui en découle. L'activation de l'AMPK hépatique pourrait être un mécanisme par lequel l'exercice exerce ses effets bénéfiques sur la SHNA et l'insulino-résistance hépatique.

Le modèle expérimental utilisé au cours de cette thèse fut le rat nourri avec une diète riche en lipides (HF). L'objectif de la première étude était d'évaluer si l'entraînement entrepris de façon concomitante à 8 sem de diète HF permettrait de prévenir la SHNA qui survient normalement lors de l'ingestion chronique de diètes HF. Les résultats de cette étude révélèrent que la diète HF induisit une SHNA, qui fut complètement prévenue par la réalisation simultanée d'un programme d'entraînement. La 2^e étude visait à évaluer si un programme d'entraînement de 8 sem, débuté à la 9^e sem d'un total de 16 sem de diète HF, permettrait de favoriser la résorption de la SHNA déjà présente. Dans cette étude, les effets de l'entraînement furent difficiles à évaluer puisque suite à 16 sem de diète HF et de sédentarité, les rats ne présentèrent pas de SHNA significative, contrairement à ce qui avait été observé après 8 sem de diète HF. Ces résultats entraînèrent ainsi l'élaboration de l'hypothèse de recherche de la 3^e étude, selon laquelle l'accumulation de lipides intrahépatiques, lors de l'ingestion chronique d'une diète HF, ne se ferait pas de façon linéaire. Les résultats de cette étude confirmèrent cette hypothèse et montrèrent que l'accumulation de lipides intrahépatiques était drastique (~27 mg/g vs ~13 mg/g; rats HF vs rats nourris avec une diète standard (SD), respectivement) dans les 2 premières sem de

diète HF et que la SHNA se résorbait ensuite d'elle-même pendant les sem suivantes, pour ré-augmenter à des niveaux plus bas après 16 sem de diète HF (~20 mg/g vs ~13 mg/g; rats HF vs rats SD).

La dernière étude visait à évaluer si l'exercice aigu améliore l'insulino-résistance hépatique liée à la SHNA et si cette amélioration pourrait être associée à l'activation de l'AMPK hépatique par l'exercice. Les résultats de cette étude montrèrent que les rats HF souffraient d'insulino-résistance hépatique et avaient des niveaux de phospho-AMPK (la forme active de l'AMPK) 30% plus faibles que les rats SD. L'exercice aigu eut pour effet d'améliorer la sensibilité hépatique à l'insuline des rats HF, ce qui était associé au retour à la normale des niveaux de phospho-AMPK.

En somme, les résultats de nos études soulignent l'intérêt d'inclure la pratique d'exercice dans la prévention et le traitement de la stéatose hépatique et de l'insulino-résistance hépatique induite par les lipides. Ils suggèrent de plus que les effets bénéfiques de l'exercice sur ces affections hépatiques pourraient être engendrés par l'activation de la voie de l'AMPK hépatique.

Mots-clés

Foie

Diète riche en lipides

Obésité

Insulino-résistance

Exercice

Entraînement

Métabolisme des lipides

Production hépatique de glucose

Adenosin-monophosphate activated protein kinase (AMPK)

Foie gras

Summary

Nonalcoholic hepatic steatosis is characterized by an excessive accumulation of lipids within the hepatic parenchyma. It is now recognized as the hepatic component of the metabolic syndrome and is tightly linked with obesity and type 2 diabetes. The exact mechanisms leading to hepatic steatosis still remain elusive. However, it seems that hepatic steatosis is mainly due to the increase in circulating fatty acids and stimulation of lipid synthesis in the liver, but an insufficient adjustment of liver lipids oxidation and VLDL secretion. An increasing body of evidence suggests that hepatic steatosis leads to liver insulin resistance. Exercise is an interesting potential tool in the prevention and treatment of hepatic steatosis and lipid-induced liver insulin resistance. Exercise could exert its beneficial effects on hepatic steatosis and liver insulin resistance via the activation of the signaling pathway of hepatic AMPK.

The 4 studies conducted during this thesis were done using the rat model of high-fat (HF) diet-induced hepatic steatosis. The aim of the first study was to assess the preventive effects of concurrent exercise training on HF diet-induced hepatic steatosis. The results of this study revealed that when conducted concurrently to a HF diet regimen, exercise training completely prevented the induction of hepatic steatosis. The second study aimed at determining if exercise training conducted during the last 8 weeks of a 16-week HF diet regimen could reverse hepatic steatosis. In this study, the effects of exercise training on hepatic steatosis were difficult to assess because 16 weeks of HF feeding and sedentarism resulted in no significant hepatic steatosis, contrary to what had been found after 8 weeks of HF feeding. However, these results led us to postulate that HF diet-induced liver lipid infiltration does not progress linearly over time. We confirmed this hypothesis in the 3rd study, in which liver lipid content increased rapidly in the first 2 weeks of HF feeding (~27 mg/g vs ~13 mg/g; HF-fed vs standard-fed rats (SD), respectively), decreased almost to baseline levels between week 2 and 6, and re-increased by 17% between week 6 and 16 (~20 mg/g vs ~13 mg/g; HF-fed vs SD-fed, respectively).

The purpose of the last study was to determine whether an acute bout of treadmill running could improve HF diet-induced hepatic insulin resistance in rats, and if this could be associated with liver AMPK activation by exercise. Insulin-induced suppression of hepatic glucose output was altered in HF-fed rats, which also showed levels of hepatic phospho-AMPK (the active form of AMPK) that were 30% less than in SD-fed rats. An acute bout of exercise resulted in enhanced hepatic insulin sensitivity, associated with the restoration of phospho-AMPK to the levels of SD-fed rats.

In summary, the results of our work emphasize the interest in considering exercise as an important tool for the management of fatty liver and hepatic insulin resistance. Our results also suggest that liver AMPK activation could be a mechanism by which exercise mediates its beneficial effects on these hepatic affections.

Keywords

Liver

Hepatic steatosis

Obesity

High-fat diet

Insulin resistance

Exercise

Exercise training

Adenosin-monophosphate-activated protein kinase (AMPK)

Lipid metabolism

Hepatic glucose production

Tables des matières

Résumé	iii
Mots-clés	v
Summary	vi
Keywords.....	viii
Tables des matières	ix
Liste des tableaux	xi
Liste des figures	xii
Liste des sigles et abréviations.....	xv
Dédicace.....	xix
Remerciements.....	xx
Introduction générale de la thèse	1
1. Chapitre 1 : Revue de la littérature	3
1.1. Introduction	3
<i>1.1.1. Généralités sur le NAFLD.....</i>	<i>4</i>
<i>1.1.2. Historique.....</i>	<i>6</i>
<i>1.1.3. Le développement du NAFLD : le « two-hit model » de Day.....</i>	<i>6</i>
<i>1.1.4. La stéatose hépatique non-alcoolique (SHNA).....</i>	<i>7</i>
1.1.4.1. L'imagerie médicale.....	11
1.1.4.2. La biopsie hépatique.....	12
<i>1.1.5. Stéatohépatite non-alcoolique (NASH).....</i>	<i>19</i>
1.2. Les causes de la stéatose hépatique non-alcoolique d'origine primaire (SHNA).....	20
<i>1.2.1. Les voies d'accumulation des lipides hépatiques</i>	<i>22</i>
1.2.1.1. La prise d'AGL plasmatiques par le foie.....	22
1.2.1.2. La lipogenèse <i>de novo</i> hépatique.....	26
<i>1.2.2. Les voies d'élimination des lipides hépatiques.....</i>	<i>32</i>
1.2.2.1. L'oxydation des lipides hépatiques	32
1.2.2.2. La formation et la sécrétion de VLDL par le foie.....	40
1.3. Conséquences de la stéatose hépatique : l'insulino-résistance hépatique.....	47
<i>1.3.1. Régulation par l'insuline de la production hépatique de glucose</i>	<i>47</i>
<i>1.3.2. La stéatose hépatique : une cause vraisemblable de l'insulino-résistance hépatique.....</i>	<i>50</i>

1.3.3.	<i>Mécanismes d'altération des fonctions de l'insuline par les lipides : activation de PKCs</i>	59
1.4.	Exercice et stéatose hépatique non-alcoolique	63
1.4.1.	L'activation de la voie de l'AMPK hépatique par l'exercice aigu : un mécanisme potentiel de traitement de la stéatose hépatique et de l'insulino-résistance hépatique	71
1.5.	Hypothèses et objectifs des études de la thèse	77
2.	Chapitre 2- études expérimentales	80
2.1.	Étude 1-	80
2.2.	Étude 2-	109
2.3.	Étude 3-	134
2.4.	Étude 4-	161
3.	Chapitre 3- Discussion	190
3.1.	Discussion générale	190
	<i>Réflexion sur l'exercice dans un contexte de stéatose hépatique non-alcoolique et d'insulino-résistance hépatique induites par les lipides.</i>	191
3.2.	Conclusion et perspectives	198
4.	Chapitre 4- Bibliographie	200

Liste des tableaux

Tableau I. Tableau synthèse rapportant les résultats d'analyses biochimiques et histologiques des lipides hépatiques au sein de différents modèles de rongeurs.	9
Tableau II. Catégories de NAFLD proposées par Matteoni et al. (151)	13
Tableau III. Système de score de la stéatose hépatique non-alcoolique et de la NASH proposé et validé par le <i>NASH Clinical Research Network</i> (1). Tiré de Kleiner et al. (117).	14
Tableau IV. Origines du <i>Nonalcoholic fatty liver disease</i> . Adapté de Adams et al. (3).	16
Tableau V. Tableau synthèse des études publiées sur les effets de l'entraînement sur la stéatose hépatique non-alcoolique.....	66
Tableau VI. Comparaison entre l'effet relatif de 8 sem d'entraînement débutées en même temps qu'une diète HF (étude 1) et l'effet relatif de 8 sem d'entraînement conduites durant les 8 dernières sem d'un régime de 16 sem de diète HF (étude 2) sur les AGL plasmatiques, l'adiposité sous-cutanée et intra-abdominale ainsi que sur les TAG intrahépatiques.....	191

Liste des figures

- Figure 1. Schéma illustrant le continuum progressif du NAFLD. 5
- Figure 2. Illustration du *two-hit model* de Day dans la pathogenèse de la NASH. Tiré de Day (49). 7
- Figure 3. Coupes histologiques hépatiques teintées à l'Oil Red O illustrant un foie normal de souris (A) et un foie de souris infiltré de vésicules de lipides (en rouge) (B). Tiré de Grégoire et al. (84). 11
- Figure 4. Mécanisme hypothétique d'accumulation des microvésicules dans le cytosol. Les TAG neutres se feraient émulsifier par un cerceau d'AGL intrahépatiques exposant leur face hydrophile à l'extérieur de la vésicule. NEFA : *Non Esterified Fatty Acids*. Tiré de Fromenty et al. (76). 18
- Figure 5. Voies d'accumulation et d'élimination des lipides par le foie. Adapté de Tamura et al. (216). 21
- Figure 6. Rôle potentiel de l'insulino-résistance périphérique dans la pathogenèse de la SHNA. Tiré de Pessayre et al. (174). 25
- Figure 7. Voies métaboliques de la glycolyse et de la lipogenèse *de novo* hépatiques. Adapté de Dentin et al. (53). 27
- Figure 8. Rôle synergique des facteurs de transcription ChREBP et SREBP-1c dans l'expression des gènes lipogéniques et glycolytiques. Adapté de Dentin et al. (53) et Matsumoto et al. (150). 30
- Figure 9. Modèle illustrant comment l'hyperinsulinémie secondaire à l'insulino-résistance périphérique et/ou hépatique contribue à la formation d'un cercle vicieux au sein des

hépatocytes où la voie néoglucogénique est résistante à l'insuline alors que la voie lipogénique reste sensible aux actions de l'hormone. Adapté de Shimomura et al. (202).	31
Figure 10. Relation entre les différentes voies hépatiques d'oxydation des lipides. Adapté de Angulo (7).....	33
Figure 11. Structure et activation des PPARs. Tiré de Diradourian et al. (55).	36
Figure 12. Figure synthèse illustrant le rôle potentiel des SOCS dans la résistance hépatique à la leptine et la pathogenèse de la SHNA.	38
Figure 13. Figure synthèse illustrant le rôle inhibiteur de l'hyperinsulinémie, de la résistance à la leptine et de l'hypoadiponectinémie sur la β -oxydation mitochondriale hépatique.	39
Figure 14. Représentation schématique de la voie de formation/sécrétion des VLDL par le foie et cibles de régulation de cette voie. Adapté de Gibbons et al. (81).	41
Figure 15. Régulation de la production de glucose hépatique par l'insuline. Adapté de Saltiel et Kahn (191).....	48
Figure 16. Schéma représentant les étapes principales de la cascade de signalisation de l'insuline impliquant PI3K/PKB/Akt.	49
Figure 17. Graphiques tirés de l'étude de Iglesias et al. (105) sur l'effet d'une diète riche en lipides et de l'injection de 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside (AICAR) sur l'insulino-résistance hépatique.	52
Figure 18. Graphiques tirés de l'étude de Kim et al. (115).	55

Figure 19. Graphiques tirés de Samuel et al. (192).....	56
Figure 20. Schéma illustrant les mécanismes putatifs par lesquels les lipides intrahépatiques pourraient mener à l'insulino-résistance hépatique.....	58
Figure 21. Synthèse de TAG <i>de novo</i> à partir de glycérol-3-phosphate et d'acyl-CoA.....	61
Figure 22. Graphique tiré de Tamura et al. (217) illustrant le pourcentage de changement les lipides intrahépatique (IHL) de patients atteints de stéatose hépatique et de diabète de type 2 après 2 sem de diète hypocalorique (histogramme blanc) et de 2 sem de diète hypocalorique combinée à un programme d'entraînement à la marche (histogramme noir).	64
Figure 23. Structure et fonctions de l'AMPK. Voir le texte pour plus d'information. Tiré de Carling (32)	72
Figure 24. Effets de l'activation de l'AMPK par l'exercice aigu sur le métabolisme des lipides au niveau hépatique. Modifié de Ruderman et al. (188).....	73
Figure 25. Lien putatif entre l'activation de l'AMPK par l'exercice et l'amélioration de la stéatose hépatique et de l'insulino-résistance induite par les lipides. Modifié de Ruderman et al. (188).....	196

Liste des sigles et abréviations

¹⁴C:	Carbone 14
³H:	Tritium
6PGDH :	6-Phosphogluconate déshydrogénase
AADA:	Arylacétamide déacétylase
ACC:	Acétyl-CoA carboxylase
AcCoA :	Acétyl-CoA
ADN:	Acide désoxyribonucléique
AF-1:	<i>Activating function-1</i>
AF-2:	<i>Activating function-2</i>
AGL :	Acides gras libres
AGPAT:	1-acylglycérol-3-phosphate acyltransférase
AICAR:	5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside
Akt:	Protéine proto-oncogène Akt (synonyme de PKB)
AMP:	Adénosine monophosphate
AMPK:	<i>Adenosin monophosphate-activated protein kinase</i>
AOX:	Acyl-CoA oxydase
apoB:	Apolipoprotéine B
ARNm:	Acide ribonucléique messenger
ATP:	Adénosine triphosphate
°C:	Degré Celsius
ChREBP :	<i>Carbohydrate response element binding protein</i>
CM Rem :	Chylomicrons résiduels
CM :	Chylomicrons
CoA:	Coenzyme A
CPR:	Cytochrome P450 réductase
CPT-I:	Carnitine palmitoyl transférase I
DBD:	<i>DNA binding domain</i>
DGAT :	Diacylglycérol acyltransférase
DGAT-1 :	Diacylglycérol acyltransférase-1

DGAT-2 :	Diacylglycérol acyltransférase-2
DNL :	Lipogenèse <i>de novo</i>
DNP:	2,4-Dinitrophénol
ER :	Réticulum endoplasmique
Eth:	Éthanol
F1,6P₂ :	Fructose 1,6 Biphosphate
F-1,6-Pase:	Fructose-1,6-bisphosphatase
F6P :	Fructose-6-Phosphate
FA :	<i>Fatty Acids</i>
FAS:	<i>Fatty acid synthase</i>
FAT/CD36:	<i>Fatty acid translocase / cluster of differentiation 36</i>
FFA :	<i>Free fatty acids</i>
FOXA:	<i>Forkhead protein family</i>
G-3-P :	Glycérol-3-phosphate
G-6-P :	Glucose-6-phosphate
G-6-Pase:	Glucose-6-phosphatase
G6PDH :	Glucose-6-phosphate déshydrogénase
GAP :	Glycéraldéhyde phosphate
GK :	Glucokinase
GLUT2 :	<i>Glucose transporter-2</i>
GSK3:	Glycogène synthase kinase 3
h:	Heure
HF:	Diète riche en lipides
HNF:	<i>Hepatic nuclear factor</i>
HSL :	<i>Hormone sensitive lipase</i>
IKKβ:	<i>Inhibitor of kappaB kinase-beta</i>
Ins Res :	<i>Insulin resistance</i>
IRS-2 :	<i>Insulin receptor substrate-2</i>
JAK/STAT:	<i>Janus kinase/signal transducers and activators of transcription</i>
JNK1:	c-Jun N-terminal kinase 1
LBD:	<i>Ligand binding domain</i>

LCFA-CoA:	<i>Long-chain fatty acyl-CoA</i>
LKB1:	Suppresseur de tumeur LKB1
L-PK:	<i>Liver pyruvate kinase</i>
mRNAs :	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
mtGPAT:	Glycérophosphate acyltransférase mitochondriale
mM:	Millimolaire ou mmol/L
MTP :	<i>Microsomal triacylglycerol transfer protein</i>
NAFLD :	<i>Nonalcoholic fatty liver disease</i>
NASH :	<i>Nonalcoholic steatohepatitis</i>
NEFA :	<i>Non esterified fatty acids</i>
NIDDK :	<i>National institute of diabetes & digestive & kidney diseases</i>
PAP:	<i>phosphatidic acid phosphatase</i>
PEP :	Phosphoénolpyruvate
PEPCK:	Phosphoénolpyruvate carboxykinase
PFK:	Phosphofructokinase
PGC1:	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor-g co-activator-1</i>
PI3K:	Phosphatidyl-inositol-3-kinase
PK:	Pyruvate kinase
PKB:	Protéine kinase B
PKC:	Protéine kinase C
PP2A:	Protéine phosphatase 2A
PPAR:	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PPRE:	<i>Peroxisome proliferators response element</i>
RXR:	<i>9-cis retinoic acid receptor</i>
SD:	Diète standard
Sed:	Sédentaire
sem:	Semaine
Ser:	Sérine
Ser⁷⁹:	Résidu sérine 79 de l'ACC
Ser³⁰⁷:	Résidu sérine 307 de IRS-1
SHNA :	Stéatose hépatique non-alcoolique primaire

SOCS:	<i>Suppressors of cytokines signaling</i>
SRE:	<i>Sterol response elements</i>
SREBP-1c :	<i>Sterol regulatory element-binding protein 1c</i>
SRMN:	Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire
TAG :	Triacylglycérols
TGH :	<i>Triglycerides hydrolase</i>
Thr¹⁷²:	Résidu thréonine 172 de AMPK
TNF-α:	<i>Tumour necrosis factor alpha</i>
Tr:	Entraînement physique
TZD:	<i>Thiazolidinediones</i>
UCP-2 :	<i>Uncoupling protein 2</i>
VLDL:	<i>Very-low density lipoprotein</i>
VLDL-TAG:	Very-low density lipoprotein riches en triacylglycérols
X5P :	Xylulose-5-Phosphate
ZDF:	Rats Zucker spontanément obèses et diabétiques de type 2
ZF:	Rats spontanément obèses Zucker fa/fa

Dédicace

À la mémoire de ma grand-mère Gaby...

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de thèse, Jean-Marc Lavoie, pour son support, sa disponibilité, sa générosité et ses conseils judicieux qui ont facilité la réalisation de cette thèse.

J'aimerais aussi remercier les gens avec qui j'ai eu la chance de collaborer et qui m'ont apporté une aide précieuse durant ces années d'études supérieures : François Désy, Patrice Bélanger, Karine Couturier, Pierre Corriveau, Raynald Bergeron, Martin G. Latour, Jean-Gilles Latour, Claudette Léger-Gauthier, Claude Lajoie, Amélie Paquette, Alexandre Charbonneau, Kristina Csukly, Yan Burelle; l'équipe grenobloise : Roland Favier, Blandine Garaît, Grégory Lacraz, Pascaline Clerc, Cécile Batandier, Hervé Dubouchaud. Je remercie aussi les organismes subventionnaires CRSNG et FRSQ pour leur support financier tout au long de mes années de maîtrise et de doctorat.

Projets 1 et 2 : Un énorme merci à Karine Couturier et Marilys Ducharme pour leur patience, leur assiduité, leur amitié et des milliers de moments passés ensemble que je n'oublierai jamais! Projet 3 : Merci à toute l'équipe de feu Fat-Boule : Geneviève Rouillard, Siham Yasari, Mehdi Abdennadher et Sébastien Périgny. Projet 4 : Un énorme merci à Imola Matyas, charmeuse de rats, sans qui les clamps de ce projet n'auraient pas été possibles. Merci aussi à Marc-Étienne Cloutier et Martin Chevrier.

Un merci tout spécial à Amélie Paquette, amie et collègue qui m'a dépannée à plus d'une reprise même par des vendredis ensoleillés du mois de juillet et qui a eu la gentillesse de me corriger et de me ponctuer... Un petit clin d'œil et un grand sourire à mes acolytes du département: princesse OVX, mistress Cyp D, Δ G , King LAGRANGE, Lady VICON, Prince MATLAB, miss MONW, mamzelle PHYSIO-gestion, miss sociopsych-ROBINSON, Leloup et master GLUCAGON.

Finalement un grand merci à mes parents, ma sœur, Jessie et mes amis de m'avoir encouragée et supportée durant ces années d'études, dans des moments plus faciles et joyeux et d'autres moins...

Introduction générale de la thèse

Les travaux de recherche présentés dans cette thèse ont été réalisés entre les années 2001 et 2005 sous la supervision de Jean-Marc Lavoie, au sein du Laboratoire de recherches métaboliques sur le foie et l'exercice, situé au département de kinésiologie de l'Université de Montréal. Depuis sa création, le programme de recherche du laboratoire de Jean-Marc Lavoie a porté principalement sur les adaptations métaboliques du foie suite à l'exercice aigu et chronique, ainsi que sur la contribution hépatique afférente dans la régulation métabolique et hormonale dans différentes situations telles l'exercice, le jeûne et l'obésité. Plus récemment, les intérêts de recherche de Jean-Marc Lavoie se sont plutôt concentrés sur de l'étude de l'obésité et de l'impact de l'exercice dans cette problématique et ce, grâce à l'utilisation de deux modèles d'induction de l'obésité chez le Rat : l'obésité induite par une diète riche en lipides et celle induite par l'ovariectomie. Ses intérêts marqués pour le métabolisme hépatique d'un côté et pour l'obésité d'un autre ont ainsi amené Jean-Marc Lavoie à développer un axe de recherche sur les causes et les conséquences de ce qui est maintenant de plus en plus considéré comme la composante hépatique du syndrome métabolique : la stéatose hépatique non-alcoolique (27, 148).

Les quatre études expérimentales présentées dans le cadre de cette thèse s'inscrivent précisément dans cet axe de recherche. Elles avaient pour objectif général d'élargir les connaissances sur les causes et les conséquences de la stéatose hépatique non-alcoolique associée à l'obésité, ainsi que d'étudier les rôles préventif et curatif possibles de l'exercice physique sur cette affection hépatique. Ceci s'est réalisé à l'aide du modèle d'obésité induite par une diète riche en lipides chez le rat. Afin de mettre ces études en contexte, le premier chapitre de cette thèse sera consacré à la présentation d'une revue de la littérature comportant quatre grands volets, soient : 1) une introduction générale à la stéatose hépatique non-alcoolique, 2) une présentation des causes possibles de cette affection hépatique, ainsi que 3) de sa conséquence principale : l'insulino-résistance hépatique et enfin, 4) le rôle de l'exercice physique dans cette problématique. Au cours de la dernière section de ce premier chapitre, les objectifs distincts ainsi que la démarche menant à l'élaboration des hypothèses de recherche de chacune des études seront présentés. Le

deuxième chapitre sera consacré à la présentation, en ordre chronologique de réalisation, des quatre études expérimentales accomplies dans le cadre de cette thèse. Finalement, le troisième chapitre sera consacré à une discussion générale concernant les résultats obtenus à partir des études expérimentales réalisées dans le cadre de cette thèse.

1. Chapitre 1 : Revue de la littérature

1.1. Introduction

La prévalence de l'obésité est en pleine croissance dans les pays industrialisés mais aussi à travers le monde. Aux États-Unis, plus de 30% de la population répond aux critères de diagnostic d'obésité (211). L'obésité est la cause principale de l'insulino-résistance et de l'hyperinsulinémie, qui, elles, prédisposent à l'intolérance au glucose et éventuellement au diabète de type 2. La combinaison fréquente d'obésité abdominale, d'insulino-résistance et/ou d'intolérance au glucose et/ou de diabète de type 2, de haute pression artérielle et de dyslipidémie athérogénique chez un même individu a entraîné l'élaboration du concept de « syndrome métabolique » que l'on peut également retrouver sous l'appellation de syndrome d'insulino-résistance (178). Aux États-unis, plus d'un quart de la population âgée de plus de 25 ans rencontrerait les critères de diagnostic du syndrome métabolique (71). Somme toute, le syndrome métabolique peut être considéré comme un amalgame des complications dues à l'obésité (71). (108)

Il apparaît maintenant indéniable que l'obésité, les dyslipidémies, l'insulino-résistance et le diabète de type 2 représentent des facteurs de risque sérieux pour le développement de maladies hépatiques reliées au foie gras non-alcoolique, retrouvées dans la littérature scientifique sous l'appellation de langue anglaise *Nonalcoholic fatty liver disease* (NAFLD) (146-148). En effet, jusqu'à 86% des gens souffrant d'obésité et 50% à 75% des patients souffrant de diabète de type 2 sont aussi atteints de NAFLD (14, 41, 49, 87, 146, 153, 193). Les diabétiques obèses sont de manière quasi systématique atteints de NAFLD et les gens atteints de NAFLD sont pratiquement tous insulino-résistants (14, 41, 49, 87, 146, 153, 193). Ce lien entre les différentes composantes du syndrome métabolique et le NAFLD est de plus confirmé par les études conduites chez le modèle animal (52). En effet, les modèles d'obésité et d'insulino-résistance induites par des diètes riches en lipides (18, 63, 107, 128, 157, 200) ou riches en sucrose (11, 157) ainsi que les souris spontanément obèses *ob/ob*, spontanément obèses et diabétiques *db/db*, les rats spontanément obèses Zucker *fa/fa* (ZF), et les rats spontanément obèses et diabétiques Zucker (ZDF), sont tous caractérisés par la présence de NAFLD (52, 118, 128, 200). De ce fait, il a récemment été proposé que le

NAFLD constituerait la composante hépatique du syndrome métabolique (27, 52, 147, 148). Ainsi, suite à l'augmentation en flèche de la prévalence de l'obésité et du diabète de type 2 à travers le monde, le NAFLD représente maintenant un problème médical de plus en plus répandu non seulement en Amérique du Nord (215), en Europe (14), en Australie (180) mais également en Asie (65, 164) et au Moyen-Orient (60). Aux États-unis, le NAFLD est maintenant la maladie hépatique chronique la plus répandue, touchant entre 20% et 34% de la population générale (7, 24, 145, 163, 215). De plus, suite à l'augmentation de la prévalence de l'obésité et du diabète de type 2 chez les enfants et les adolescents, de plus en plus de cliniciens s'intéressent au NAFLD et en rapportent des cas au sein de cette population (27, 47, 225).

1.1.1. Généralités sur le NAFLD

Le *Nonalcoholic fatty liver disease* (NAFLD) est en fait un terme générique englobant un large continuum de dommages hépatiques chroniques et progressifs survenant chez des gens consommant peu ou pas d'alcool, mais dont les caractéristiques de l'histopathologie hépatique ne peuvent se distinguer de la stéatose alcoolique. De son expression la plus bénigne à la plus maligne ainsi qu'en ordre chronologique d'apparition probable, le NAFLD semble progresser de la simple stéatose hépatique, à la stéatohépatite non-alcoolique (NASH; présence de stéatose et d'inflammation). Il peut ensuite dégénérer progressivement vers la nécrose, la fibrose et la cirrhose hépatiques, voire même l'insuffisance hépatique terminale et/ou le carcinome hépatique (Figure 1) (7, 45, 86, 149, 218).

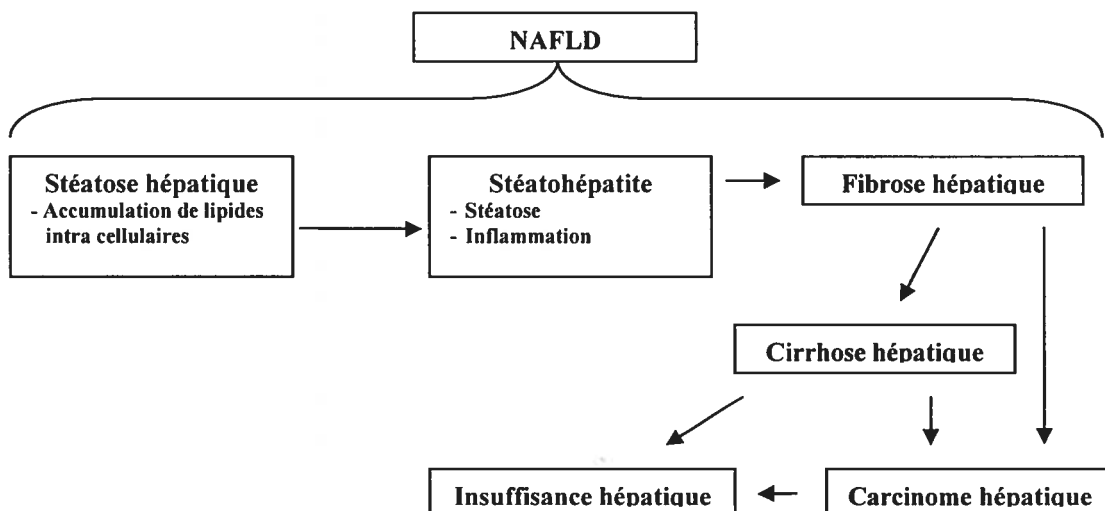


Figure 1. Schéma illustrant le continuum progressif du NAFLD. La première atteinte hépatique du NAFLD est la stéatose hépatique désignant une accumulation de lipides intracellulaires. Entre 20 et 34% de la population générale serait atteinte de stéatose hépatique (7, 24, 64, 145, 163, 215). La stéatose peut ensuite progresser vers la stéatohépatite; 3% de la population générale serait atteinte de stéatohépatite (64). Il semble que parmi les cas de stéatohépatite, 50% progressent vers de la fibrose hépatique, 20% dégénèrent en cirrhose et 3% développent même de l'insuffisance hépatique terminale (86). Il a été suggéré qu'un certain nombre de cas de carcinomes hépatiques seraient dus à la présence initiale de stéatose hépatique (45, 149).

1.1.2. Historique

La reconnaissance de la présence de stéatose hépatique survenant sans consommation d'alcool a été rapportée dès 1938 chez des sujets diabétiques (43) et dès 1958 chez des sujets obèses (240). Plusieurs décennies plus tard, l'acronyme NASH pour *nonalcoholic steatohepatitis* fut crédité à Ludwig et al. (143) à la suite d'une étude du *Mayo Clinic* publiée en 1980 rapportant des caractéristiques histologiques hépatiques ressemblant au type d'hépatite rencontrée chez les alcooliques, mais trouvées chez des patients ne consommant pas d'alcool. En 1999, Matteoni et al. (151) élargirent le concept de NASH à NAFLD pour *nonalcoholic fatty liver disease* afin d'y inclure la stéatose simple sans présence d'inflammation, de nécrose ou de fibrose du tissu hépatique. Depuis, la littérature sur le sujet ne cesse de s'accroître. En l'an 2000, une recherche à l'aide des mots-clés « *Nonalcoholic fatty liver OR non-alcoholic fatty liver* » dans la base de données *Medline* ne rapportait que 202 articles alors qu'elle en rapporte aujourd'hui 1037.

1.1.3. Le développement du NAFLD : le « two-hit model » de Day

Selon la théorie de Day et James, émise pour la première fois en 1998, la pathogenèse du NAFLD se déroule en 2 « coups » (2 « hits ») (51). Le premier coup représente le développement de la stéatose hépatique simple qui, elle, augmente la sensibilité du foie aux « 2^e coups » que sont principalement le stress oxydatif, la présence de cytokines pro-inflammatoires et d'insulino-résistance et, finalement, les besoins énergétiques accrus. Ces « 2^e coups » seraient à l'origine des lésions hépatiques et de l'inflammation menant à la stéatohépatite et, éventuellement dans certains cas, à la fibrose et à la cirrhose hépatique (51). Ainsi selon ce modèle, la stéatose hépatique non-alcoolique simple n'est plus une condition bénigne, mais plutôt la première étape du NAFLD prédisposant à la progression de la maladie vers la NASH et ses complications (50). Selon les quelques études longitudinales de suivis de patients effectuées, environ 50% des gens atteints de NASH développeraient éventuellement de la fibrose, 20% une cirrhose et 3% de l'insuffisance hépatique terminale (86).

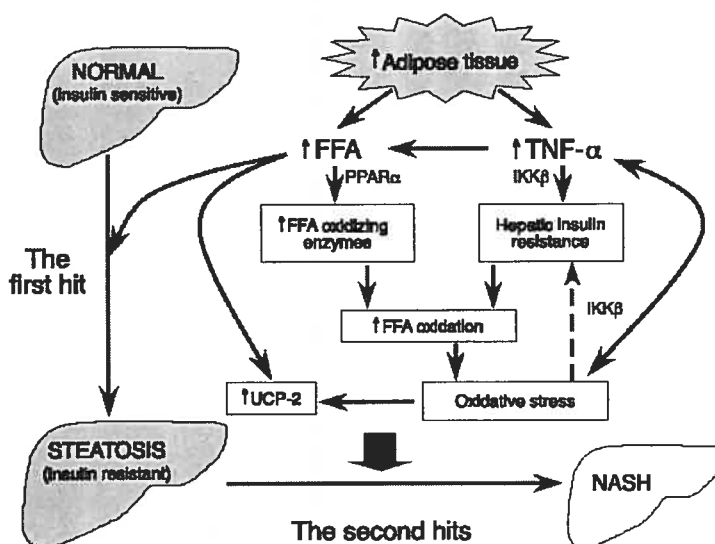


Figure 2. Illustration du *two-hit model* de Day dans la pathogénèse de la NASH. La stéatose liée à l'obésité serait principalement due au relargage accru d'acides gras libres (AGL) dans la circulation par les adipocytes engorgés. Le foie stéatosé devenu insulino-résistant deviendrait ainsi vulnérable aux lésions qu'induisent le stress oxydatif et la peroxydation des lipides qui en résulte, aux effets inflammatoires et à l'insulino-résistance induites par le TNF- α , ainsi qu'aux situations de besoin accru en ATP, induisant ainsi la stéatohépatite. UCP-2 : Uncoupling protein 2; FFA : Free fatty acids; TNF- α : Tumor necrosis factor alpha; PPAR α : Peroxisome proliferator-activated receptor alpha; IKK β : IkappaB kinase-beta; NASH: Nonalcoholic steatohepatitis. Tiré de Day (49).

Le contenu de cette thèse portera principalement sur le « 1^{er} coup », soit la stéatose hépatique non-alcoolique. Seront abordées ses causes et ses conséquences dans un contexte d'obésité et d'insulino-résistance ainsi que le rôle de l'exercice dans cette problématique. La NASH sera brièvement décrite à la section 1.1.4. (Pour de plus amples informations sur la NASH, se référer aux articles synthèse suivants : (26, 27, 40, 49, 153, 163, 174, 193).

1.1.4. La stéatose hépatique non-alcoolique (SHNA)

La stéatose hépatique (ou foie gras) non-alcoolique est un terme médical désignant une infiltration excessive et plus ou moins sévère de lipides au sein du parenchyme hépatique. Elle constitue le premier stade d'atteinte hépatique sur le continuum du NAFLD (151). Chez l'être humain, le premier critère de diagnostic de cette forme de stéatose est déterminé en clinique et repose sur une consommation d'alcool rapportée comme étant inférieure à

20g/jour chez la femme et 40g/jour chez l'homme (27). Le deuxième critère de diagnostic repose sur la détection de la présence excessive de lipides au sein des hépatocytes. Il a récemment été fixé à une infiltration de lipides supérieure à 5% de la surface du parenchyme hépatique ou du poids du foie, selon la technique de mesure utilisée (117, 215). Chez le modèle animal, les critères de diagnostic de la stéatose hépatique ne sont pas très bien définis, probablement en partie à cause du caractère expérimental de la recherche conduite chez l'animal. Ainsi, le diagnostic de la stéatose hépatique chez l'animal repose simplement sur la mesure d'un contenu hépatique en lipides supérieur chez le groupe expérimental comparativement à son groupe contrôle. Chez les rats sains de souche Sprague-Dawley ou Wistar, le contenu en triacylglycérols (TAG) hépatiques se situe normalement entre 2 et 14 mg/g de foie. Ces niveaux peuvent augmenter jusqu'à 70 mg/g suite à l'administration de diète riche en lipides. Chez les souris *ob/ob*, *db/db* et les rats ZDF, ces niveaux peuvent atteindre plus de 150 mg/g de façon spontanée (Tableau I).

Tableau I. Tableau synthèse rapportant les résultats d'analyses biochimiques et histologiques des lipides hépatiques au sein de différents modèles de rongeurs.

Auteurs	Modèle	Traitement	Résultats biochimiques des TAG hépatiques	Analyse histologique hépatique
Yu et al. 2005 (250)	Souris C57BL/6J	-Diminution de l'expression de DGAT2 (DGAT2-ASO) -Diète riche en lipides (HF) (60%, kcal; 8 sem)	Contrôles : ~19 mg/g HF : ~71 mg/g* HF-DGAT2-ASO : ~ 27 mg/g	Analyse histologique qualitative (H&E) : présence de stéatose chez DL, diminution chez DGAT2-ASO
Tovar et al. 2005 (226)	Rats ZDF	Diète riche en soya ou caséine.	ZDF caséine : 0,6 mmol/L ZDF diète soya : 0,3 mmol/L*	Analyse histologique qualitative : présence de stéatose avec caséine, réduite avec protéines de soja.
Neschen et al. 2002 (161)	Rats Sprague-Dawley mâles	Diète HF (huile de poisson riche en acides gras <i>n</i> -3 ou huile de carthame)	Contrôle : 2,58 mg/g Diète HF (huile de poisson) : 7,87 mg/g Diète HF (huile de carthame) : 20,20 mg/g*	ND
Grefhorst et al. 2005 (83)	Souris <i>ob/ob</i>		Contrôles : ~12,1 mg/g <i>ob/ob</i> : ~176,2 mg/g*	ND
Juggi et al. 1979 (107)	Rats albinos femelles	Diète HF (25%, kcal)	Contrôles : 2,27 mg/g HF 1 sem : 6,7 mg/g HF 8 sem : 24,25 mg/g*	Analyse histologique qualitative : présence de stéatose sous forme de fines gouttelettes jusqu'à 4 semaines, ensuite présence de macrovésicules jusqu'à la dernière semaine.
Mit-tendorfer et al. 1998 (157)	Wistar mâles	Diète HF (40%, kcal; 6 jours)	Contrôles : ~ 9 mg/g HF : ~ 25 mg/g*	ND
Bacon et al. 1984 (11)	Sprague-Dawley mâles	Diète riche en sucrose	Contrôles : ~ 8 mg/g 25-35% sucrose : ~ 20 mg/g* 40-50% sucrose : ~ 25 mg/g*	Analyse histologique qualitative : présence de macro- et de microvésicules chez rat 40% sucrose.
Shimomura et al. 1999 (200)	Souris <i>ob/ob</i>		Contrôles : 15,4 mg/g <i>ob/ob</i> : 154 mg/g*	ND
Biddinger et al. 2005 (18)	Souris C57Bl/B6 et souris 129S6/SvEvTac	Diète HF (55% , kcal; 18 sem)	C57Bl/B6 contrôles : ~ 25 mg/g C57Bl/B6 HF : ~ 110 mg/g* 129S6/SvEvTac contrôles: ~ 8 mg/g 129S6/SvEvTac HF: ~ 50 mg/g*	Analyse histologique qualitative : stéatose microvésiculaire chez 129 et macrovésiculaire chez B6

Tableau I. Suite

Auteurs	Modèle	Traitement	Résultats biochimiques des lipides hépatiques	Analyse histologique hépatique
Lee et al. 2001 (128)	Rats Sprague-Dawley, ZDF, Souris <i>ob/ob</i> , <i>db/db</i>	Diète HF (60% lipides, kcal) 10 sem chez rats Sprague-Dawley	Sprague-Dawley SD : ~ 10 mg/g Sprague-Dawley HF : ~ 20 mg/g* ZDF contrôles : ~ 50 mg/g ZDF : ~ 175 mg/g* <i>ob/ob</i> contrôles : ~ 10 mg/g <i>ob/ob</i> : ~ 40 mg/g* <i>db/db</i> contrôles : ~ 10 mg/g <i>db/db</i> : ~ 120 mg/g*	ND
Ran et al. 2004 (182)	Rats ZF	Administration d'olmesartan (Olm; un bloqueur du récepteur de type 1 à l'angiotensine 2)	Contrôles : ~ 2 mg/g Contrôles + olm : ~ 2 mg/g ZF : ~ 22 mg/g* ZF + olmesartan : ~ 12 mg/g	Analyse histologique qualitative : Présence de stéatose chez les rats ZF qui est prévenue avec le traitement à l'olmesartan.
Sasagawa et al. 2001 (194)	Rats obèses OLETF	Diète riche en lard (graisses saturées), en huile <i>n-6</i> AA ou en huile <i>n-3</i> EPA	Contrôle : 27,5 mg/g Diète lard : 39,5 mg/g* Diète huile <i>n-6</i> AA : 37,1 mg/g* Diète huile <i>n-3</i> EPA : 29,7 mg/g	Analyse histologique qualitative : Présence de stéatose macrovésiculaire chez les rats nourris au lard.
Narayan et al., 1975 (160)	Rats Holtzman mâles	Diète HF (65% lipides, kcal) ou SD (9% lipides, kcal) pendant 6 sem	SD-Sed: TAG: 9,27 ± 4,6 mg/g; Lipides: 41,8 ± 4,1 mg/g HF-Sed: TAG: 17,6 ± 5,5 mg/g*; Lipides: 76,1 ± 7,7 mg/g*	ND
Estadella et al., 2004 (63)	Rats Wistar mâles	Diète HF (35% lipides, kcal) ou SD pendant 8 sem	SD: Lipides: 37,4 ± 1.1 mg/g HF: Lipides: 53.0 ± 3.1 mg/g*	ND
Rothfeld et al., 1977 (187)	Rats Sprague-Dawley mâles	Diète HF pendant 3 sem	HF : TAG : 33,8 ± 2,3 mg/g	ND
Stra- czkowski et al., 2001 (212)	Rats Wistar mâles	Diète HF (59% lipides, kcal) ou SD pendant 3 sem	SD-Sed: TAG: ~3 mg/g HF-Sed: TAG: ~8,8 mg/g*	ND
Terao et al., 1988 (221)	Rats Wistar mâles	diète HF (15% lard, 2% cholestérol, 83% de diète SD; kg) 6 sem	Diète HF : ~70 mg/g	ND
Terao et al., 1989 (220)	Rats Wistar mâles	diète HF (15% lard, 2% cholestérol, 83% de diète SD; kg) 6 sem	Diète HF : ~60 mg/g	ND
Donnely et al. (57)	Souris Txnip ^{-/-}		WT : ~8 mg/g Txnip ^{-/-} : ~22 mg/g*	ND

* Significativement différent du groupe contrôle respectif, P < 0,05.

La présence de lipides au sein des hépatocytes se mesure de trois façons : 1) grâce à des techniques d'imagerie médicale, 2) grâce à un dosage biochimique à partir d'un homogénat du tissu, 3) grâce à une analyse histologique du tissu préalablement teinté à l'aide de teintures de routine (hématoxyline et éosine) et/ou de teintures spécifiques aux lipides (Oil red O, Noir Soudan) (Figure 3). Chez l'être humain, les deux dernières techniques requièrent la pratique d'une biopsie hépatique.

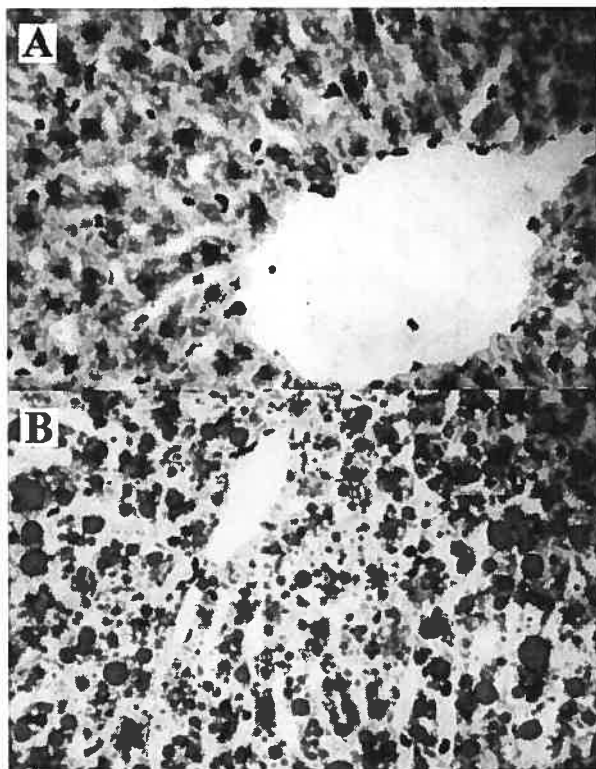


Figure 3. Coupes histologiques hépatiques teintées à l'Oil Red O illustrant un foie normal de souris (A) et un foie de souris infiltré de vésicules de lipides (en rouge) (B). Tiré de Grégoire et al. (84).

1.1.4.1. L'imagerie médicale

Les techniques d'imagerie médicale, telles l'échographie, la tomographie, la résonance magnétique et la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (SRMN) (142, 206, 215) peuvent être utilisées afin de détecter la présence de stéatose hépatique. Leurs avantages sont d'être des techniques *in vivo*, non invasives. De plus, elles permettent une évaluation plus objective de la stéatose que l'analyse histologique ainsi que l'évaluation d'une plus

grande portion du foie que ce que permet la biopsie hépatique, éliminant ainsi un pourcentage d'erreur relié à l'échantillonnage (11, 215). La SRMN serait la technique d'imagerie la plus valide, la plus précise et la seule permettant de quantifier le contenu en triacylglycérols hépatiques, ceci par mesure directe du spectre des protons contenus dans les acides gras les composant (214). C'est d'ailleurs une technique de plus en plus utilisée en recherche. Il semble que l'utilisation des autres techniques d'imagerie ne soient fiable que lorsque l'infiltration hépatique de lipides est supérieure à 33% du volume de l'organe (190), alors que le critère de diagnostic du NAFLD est maintenant le plus souvent fixé à 5% d'infiltration (117, 163, 215). La SRMN serait quant à elle fiable et valide à partir de résultats aussi faibles que 0,1% d'infiltration des hépatocytes (214, 215). Les désavantages majeurs de ces techniques d'imagerie pour le diagnostic du NAFLD sont qu'elles requièrent un budget et un appareillage important. De plus, elles ne permettent pas d'évaluer l'histologie hépatique et donc, de différencier la stéatohépatite de la simple stéatose (3). Par contre, l'utilisation de la SRMN reste une technique d'investigation très intéressante pour la recherche sur la stéatose hépatique chez l'être humain, permettant, de par son caractère *in vivo* et non invasif, l'élaboration de designs expérimentaux et longitudinaux.

1.1.4.2. La biopsie hépatique

La biopsie hépatique est une méthode invasive et douloureuse. Une grande proportion de patients refuse d'avoir recours à la biopsie hépatique comme méthode de dépistage. Son usage dans la recherche expérimentale chez l'être humain est donc limité et les études rapportant des résultats de biopsies hépatiques sont plus souvent qu'autrement à caractère épidémiologique. Ces études sont d'ailleurs basées sur les résultats de cohortes de patients, sans la possibilité d'avoir de réels groupes contrôles. Suite à la biopsie, une analyse biochimique du contenu en lipides hépatiques est envisageable mais, à cause de la petite quantité de tissu recueillie, l'analyse histologique est habituellement pratiquée puisqu'elle fournit de plus amples informations. Cette analyse histologique de l'infiltration des lipides et de la morphologie du tissu est réalisée par un ou plusieurs pathologistes et est généralement à caractère qualitatif et/ou semi-quantitatif. Certains chercheurs ont tenté de réduire la subjectivité du diagnostic de la stéatose en quantifiant les lipides hépatiques

teintés à l'Oil red O à l'aide d'un logiciel informatique de capture et d'analyse d'images (70). Par contre, ce genre de méthode requiert plus de temps de la part du pathologiste et est donc rarement utilisé pour le diagnostic du NAFLD.

Ainsi, malgré son caractère invasif, semi-quantitatif et subjectif, l'analyse de l'histopathologie hépatique reste encore à ce jour le *gold standard* pour le diagnostic du NAFLD (27). C'est de plus la seule méthode qui permette d'identifier la sévérité de la maladie ainsi que le stade d'atteinte des hépatocytes sur le continuum du NAFLD (i.e. stéatose simple, stéatohépatite (NASH), présence de nécrose et de fibrose) et par le fait même, de discriminer la stéatohépatite de la stéatose hépatique (27). Deux des méthodes semi-quantitatives et/ou qualitatives les plus utilisées en clinique et en recherche chez l'être humain pour l'analyse de la sévérité de la stéatose et des différentes lésions retrouvées dans les cas de NASH, sont la méthode suggérée par Matteoni et al. en 1999 (151) et celle validée par le *NASH Clinical Research Network* (1) et présentée sous forme d'article en 2005 par Kleiner et al. (117) (Tableaux II et III).

Tableau II. Catégories de NAFLD proposées par Matteoni et al. (151)

Catégorie 1	Stéatose simple
Catégorie 2	Stéatose + inflammation
Catégorie 3	Stéatose + dégénérescence par ballonnisation
Catégorie 4	Stéatose + fibrose et/ou corps de Mallory

Tableau III. Système de score de la stéatose hépatique non-alcoolique et de la NASH proposé et validé par le *NASH Clinical Research Network* (1). Tiré de Kleiner et al. (117).

Table 1. NASH Clinical Research Network Scoring System Definitions and Scores in Study Set				% Responses in Category for Study Set Cases	
Item	Definition	Score / Code	Adult (n = 576)	Pediatric (n = 162)	
Steatosis					
Grade	Low- to medium-power evaluation of parenchymal involvement by steatosis				
	<5%	0	10%	3%	
	5%-33%	1	34%	29%	
	>33%-66%	2	31%	31%	
	>66%	3	26%	36%	
Location	Predominant distribution pattern				
	Zone 3	0	31%	14%	
	Zone 1	1	1%	12%	
	Azonal	2	37%	22%	
	Panacinar	3	31%	52%	
Microvesicular steatosis*	Contiguous patches				
	Not present	0	90%	96%	
	Present	1	10%	4%	
Fibrosis					
Stage	None	0	40%	29%	
	Perisinusoidal or periportal	1			
	Mild, zone 3, perisinusoidal	1A	15%	4%	
	Moderate, zone 3, perisinusoidal	1B	6%	5%	
	Portal/periportal	1C	6%	27%	
	Perisinusoidal and portal/periportal	2	12%	10%	
	Bridging fibrosis	3	15%	17%	
	Cirrhosis	4	6%	9%	
Inflammation					
Lobular inflammation	Overall assessment of all inflammatory foci				
	No foci	0	14%	15%	
	<2 foci per 200× field	1	53%	60%	
	2-4 foci per 200× field	2	27%	22%	
	>4 foci per 200× field	3	6%	3%	
Microgranulomas	Small aggregates of macrophages				
	Absent	0	57%	53%	
	Present	1	43%	47%	
Large lipogranulomas	Usually in portal areas or adjacent to central veins				
	Absent	0	86%	99%	
	Present	1	14%	1%	
Portal inflammation	Assessed from low magnification				
	None to minimal	0	67%	67%	
	Greater than minimal	1	33%	33%	
Liver cell injury					
Ballooning*					
	None	0	33%	49%	
	Few balloon cells	1	38%	36%	
	Many cells/prominent ballooning	2	29%	15%	
Acidophil bodies					
	None to rare†	0	89%	90%	
	Many	1	11%	10%	
Pigmented macrophages					
	None to rare†	0	87%	82%	
	Many	1	13%	18%	
Megamitochondria*					
	None to rare†	0	86%	95%	
	Many	1	14%	5%	
Other findings					
Mallory's hyaline	Visible on routine stains				
	None to rare†	0	80%	94%	
	Many	1	20%	6%	
Glycogenated nuclei	Contiguous patches				
	None to rare†	0	57%	71%	
	Many	1	43%	29%	
Diagnostic classification‡					
Not steatohepatitis		0	31%	32%	
Possible/borderline		1	26%	33%	
Definite steatohepatitis		2	43%	35%	

*Ballooning classification: few indicates rare but definite ballooned hepatocytes as well as case that are diagnostically borderline; examples are shown in Fig. 1. Examples of patches of microvesicular steatosis and megamitochondria are shown in Fig. 2.

†The "None to rare" category is meant to alleviate the need for time-consuming searches for rare examples or deliberation over diagnostically borderline changes. If the feature is identified after a reasonable search, it should be coded as "many."

‡Diagnostic classification was not available on 2 sets of adult biopsy observations, reducing the total of such observations to 512.

La stéatose hépatique peut être classée selon qu'elle est d'origine primaire ou secondaire (64). En bref, le type primaire est associé au syndrome métabolique, à l'obésité, à l'insulino-résistance et au diabète de type 2. Les causes exactes de la stéatose hépatique de type primaire restent à ce jour inconnues, mais plusieurs mécanismes ont été proposés afin d'expliquer ce phénomène. Ils feront l'objet d'une discussion à la section 1.2 de cette revue de littérature. La stéatose hépatique de type secondaire serait quant à elle due aux effets secondaires de certains médicaments et de certaines procédures chirurgicales, à l'ingestion de toxines, ainsi qu'à des maladies et désordres divers (73).

Tableau IV. Origines du *Nonalcoholic fatty liver disease*. Adapté de Adams et al. (3).

Origine	Associations	Type de stéatose
Primaire	Caractéristiques du syndrome métabolique	Macrovésiculaire
Secondaire		
Nutritionnelle	Nutrition parentérale, perte de poids rapide, famine, chirurgie de déviation intestinale	Macrovésiculaire
Médicaments	Glucocorticoïdes, estrogènes, tamoxifen, metrotrexate, zidovudine	Macrovésiculaire
	Amiodarone, ASA, tétracycline intraveineuse, didanosine, cocaïne, perhexilène, hypervitaminose A, diltiazem	Microvésiculaire
Toxines	Champignons toxiques (amanites phalloïdes, Lepiota)	Macrovésiculaire
	Produits pétrochimiques, phosphore, toxine du <i>Bacillus Cereus</i> maladie des vomissements de la Jamaïque	Microvésiculaire
Métabolique	Lipodystrophie, dysbetalipoprotéïnémie, maladie de Weber-Christian, Maladie de Wolman	Macrovésiculaire
	Syndrome de Reye, stéatose aiguë gravidique de la femme enceinte	Microvésiculaire
Autres	Syndrome du colon inflammable, HIV, diverticulose de l'intestin grêle avec prolifération bactérienne	Macrovésiculaire

Stéatose macro- ou microvésiculaire

L'excédant de lipides au niveau hépatique se retrouve majoritairement sous la forme de triacylglycérols accumulés dans le compartiment cytosolique des cellules du parenchyme sous la forme de macro- ou de microvésicules (26). Les macrovésicules sont de larges vacuoles qui, dans la majorité des cas, décentrent le noyau de la cellule vers la membrane. Les microvésicules sont quant à elles de fines gouttelettes dont la surface est généralement inférieure à $1\mu\text{m}^2$ et qui remplissent les hépatocytes sans en déplacer le noyau (73). Les études épidémiologiques conduites chez l'être humain indiquent que la stéatose hépatique non-alcoolique primaire est majoritairement macrovésiculaire (parfois mixte mais toujours majoritairement macrovésiculaire) et distribuée de façon diffuse au sein de l'organe entier (29). Il est par contre à noter que chez l'être humain, ces mesures sont habituellement faites de façon ponctuelle, alors que la stéatose est souvent déjà bien installée, et ne permettent pas d'identifier la façon dont ces macrovésicules se forment. À notre connaissance, seule l'étude de Juggi et al. (107) conduite en 1979 comporte des données sur le caractère morphologique des vésicules de lipides durant le développement de la stéatose hépatique non-alcoolique induite par une diète riche en lipides. Dans cette étude transversale, un échantillon de foie de rate était analysé chaque semaine durant 8 semaines. Les auteurs rapportent que la stéatose semble au départ caractérisée par l'accumulation de microvésicules et ce, jusqu'à la 4^e semaine. À partir de la 5^e semaine, les vésicules deviennent à prédominance macrovésiculaire, quelques-unes d'entre elles déplaçant le noyau de l'hépatocyte vers la membrane (107). Bien que portant sur un nombre très restreint d'échantillons, ces résultats confirment la théorie selon laquelle les macrovésicules caractéristiques de la stéatose hépatique non-alcoolique primaire découleraient de l'agglomération de microvésicules (29).

La stéatose à prédominance microvésiculaire serait quant à elle secondaire à des maladies affectant la β -oxydation hépatique telles le syndrome de Reye, la stéatose aiguë gravidique de la femme enceinte, la maladie des vomissements de la Jamaïque, etc. (Tableau IV). Leur pronostic serait généralement beaucoup plus grave, se soldant rapidement en insuffisance hépatique terminale dans une grande proportion de cas (27). La raison pour laquelle ce sont des microvésicules qui s'accumulent dans ce cas est encore à ce jour inconnue. Il a été

proposé que ce pourrait être relié à la rapidité avec laquelle les lipides s'accumulent dans ces conditions (30). Fromenty et Pessayre (76) ont quant à eux avancé l'hypothèse selon laquelle lors du mauvais fonctionnement de la β -oxydation caractéristique des cas de stéatose microvésiculaire d'origine secondaire, une augmentation de la quantité d'acides gras libres (AGL) intrahépatiques précéderait l'augmentation de TAG. Les AGL formeraient ainsi un cerceau autour des TAG, avec leur face non-polaire liposoluble à l'intérieur et leur face polaire hydrosoluble exposée vers l'extérieur de cette structure, limitant ainsi l'agrégation de lipides autour des microvésicules (Figure 4).

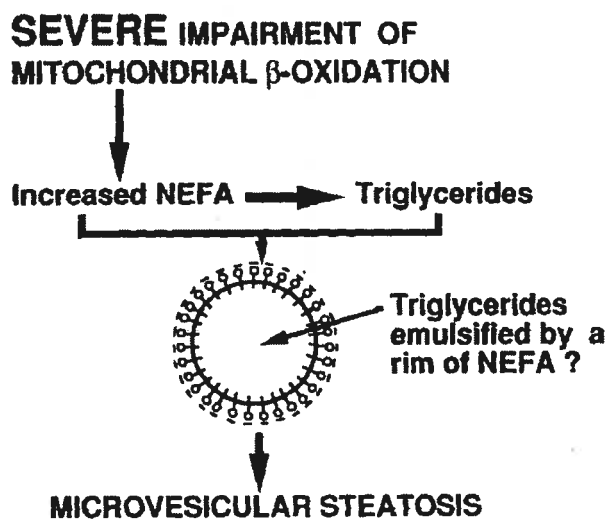


Figure 4. Mécanisme hypothétique d'accumulation des microvésicules dans le cytosol. Les TAG neutres se feraient émulsifier par un cerceau d'AGL intrahépatiques exposant leur face hydrophile à l'extérieur de la vésicule. NEFA : *Non Esterified Fatty Acids*. Tiré de Fromenty et al. (76).

La suite de cette revue portera sur la stéatose hépatique non-alcoolique d'origine primaire. (Pour une revue sur la stéatose d'origine secondaire, se référer aux articles de synthèse suivants : (73, 93). Afin de simplifier la lecture de la suite du texte, l'acronyme SHNA sera utilisé afin de désigner la stéatose hépatique non-alcoolique d'origine primaire associée aux caractéristiques du syndrome métabolique.

La seule technique disponible à ce jour afin de déterminer la nature macro- ou microvésiculaire des lipides infiltrés est l'utilisation de teintures histochimiques et l'analyse

subséquente du tissu hépatique par microscopie. Cette limite contribue vraisemblablement au fait que peu d'études expérimentales examinent le type macro- et/ou microvésiculaire de la SHNA. Lorsque la stéatose est typée, cela est pour ainsi dire toujours fait de façon qualitative ou semi-quantitative (Tableaux II et III) (11, 18, 107, 194). Ainsi, l'analyse semi-quantitative et l'interprétation humaine du degré de stéatose microvésiculaire ($<1\mu\text{m}^2$) par microscopie résultent probablement en une sous-estimation de l'infiltration de microvésicules et par le fait même, de la quantité totale de lipides accumulés au sein du parenchyme hépatique (70). La teinture du tissu à l'aide d'Oil red O ou de Noir Soudan, des teintures spécifiques aux lipides, permet d'augmenter la précision de l'analyse comparativement aux teintures de routine, telles l'hématoxyline et l'éosine (70, 73). Cette analyse est avantageusement favorisée lorsqu'un logiciel de capture et d'analyse d'image est utilisé afin de quantifier l'infiltration lipidique (70). Ce type de quantification des lipides intracellulaires à l'aide d'un logiciel de capture d'image n'a été utilisé que dans une seule étude conduite sur des échantillons humains (70). Aucun auteur ayant étudié la stéatose hépatique chez le modèle animal ne rapporte avoir quantifié les lipides hépatiques de cette façon, que ce soit pour valider les résultats obtenus à la suite d'analyses biochimiques ou pour caractériser et dénombrer le type de vésicules lipidiques se retrouvant dans le parenchyme hépatique des animaux évalués.

1.1.5. Stéatohépatite non-alcoolique (NASH)

La stéatohépatite représente le deuxième stade d'atteinte hépatique sur le continuum du NAFLD et selon le « *Two-hit model* » de Day et James (51), résulterait principalement de la vulnérabilité du foie stéatosé au stress oxydatif et à la réponse inflammatoire provoquée par la cytokine pro-inflammatoire TNF- α . Les critères nécessaires au diagnostic du NASH sont la présence de stéatose non-alcoolique et d'inflammation lobulaire. De l'inflammation portale, de la dégénérescence hépatocellulaire par ballonnisation, des corps de Mallory hyalins ainsi que de la fibrose perisinusoïdale et/ou de la cirrhose sont parfois observées avec l'augmentation de la sévérité de la maladie (151).

1.2. Les causes de la stéatose hépatique non-alcoolique d'origine primaire (SHNA)

D'un point de vue systémique, il est indéniable que le foie joue un rôle majeur dans le métabolisme des lipides, étant à la fois consommateur, producteur et exportateur de lipides. Le foie n'est normalement pas un stockeur de lipides comme l'est l'adipocyte. Il semble par contre que dans certaines conditions où l'influx et/ou le turnover de lipides est augmenté, cet organe emmagasine une portion de lipides plus importante que normalement, par exemple lors de diètes riches en lipides, d'obésité, d'insulino-résistance et/ou de dyslipidémie. Il a ainsi été proposé que le foie pourrait jouer un rôle de tampon des AGL circulants (74, 80) et que l'accumulation de TAG hépatiques, une forme de lipides neutre et bénigne, protégerait l'organe et la périphérie des AGL ayant quant à eux un potentiel cytotoxique élevé (81). Cette accumulation de TAG hépatiques entraîne par contre le développement de la SHNA qui, on le verra à la section 1.3, n'est pas sans conséquences.

Malgré l'augmentation considérable du nombre de recherches conduites sur la SHNA, tant chez l'être humain que chez le modèle animal lors des 5 dernières années, les causes exactes de cette pathologie restent encore inconnues. De façon logique, une augmentation de la quantité de lipides intrahépatiques découle nécessairement d'un déséquilibre entre les voies favorisant l'accumulation des lipides hépatiques et les voies en favorisant l'élimination. La majorité des chercheurs ayant conduit des études sur la SHNA en concluent que le dérèglement majeur et premier menant à l'accumulation de lipides hépatiques d'origine primaire résiderait dans l'augmentation des AGL circulants, suivi d'une stimulation de la lipogenèse hépatique et d'un mauvais ajustement de l'oxydation et de la sécrétion des lipides accumulés par l'organe (119, 151, 176). Cette section sur les causes de la SHNA sera donc divisée en deux sous-sections principales, traitant respectivement des voies d'accumulation des lipides et des voies d'élimination des lipides par le foie.

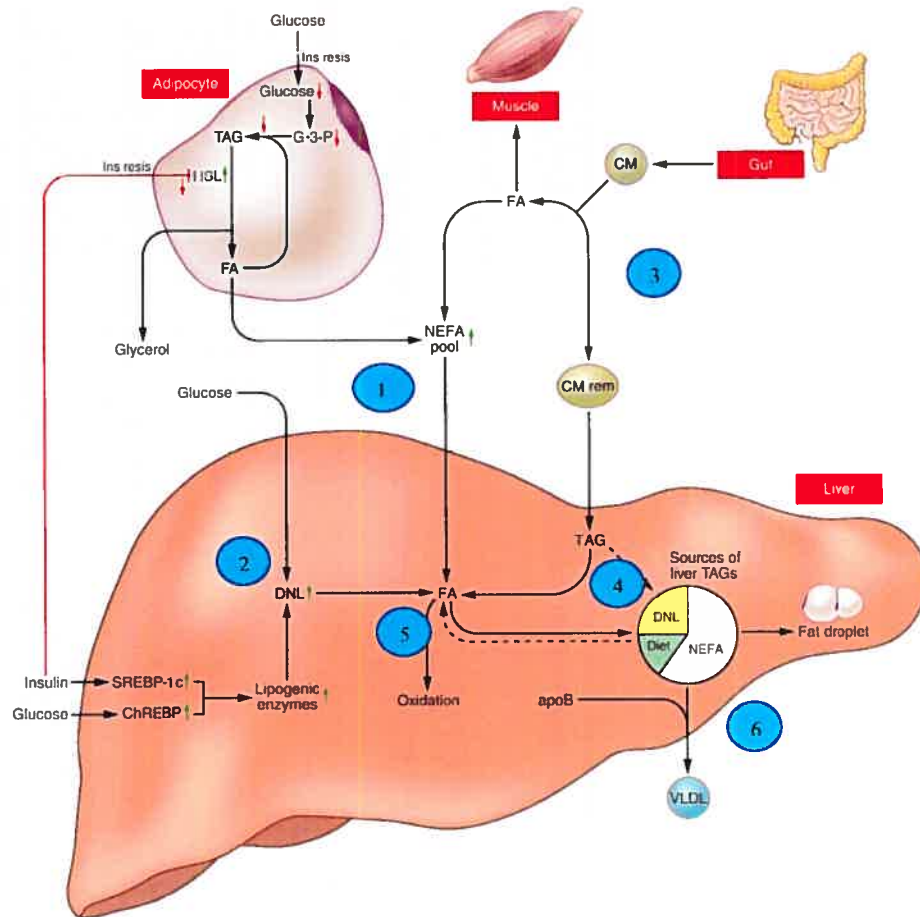


Figure 5. Voies d'accumulation et d'élimination des lipides par le foie. 1) Une augmentation des AGL circulants provenant de la lipolyse adipocytaire et du *spillover* de l'action de la LPL musculaire sur les chylomicrons de provenance intestinale a pour effet d'augmenter la prise d'AGL par les hépatocytes. 2) Une augmentation de l'activité de la lipogenèse *de novo* augmente le pool d'AGL intrahépatiques. 3) Une augmentation de la quantité de lipides ingérés et donc de chylomicrons de provenance intestinale est susceptible d'augmenter la prise de chylomicrons résiduels par le foie. 4) La stimulation des trois voies précédentes favorise l'accumulation de TAG hépatiques. Un mauvais ajustement des voies d'élimination des lipides hépatiques que sont 5) l'oxydation des AGL et 6) la sécrétion de VLDL, provoquera le développement d'une stéatose hépatique. TAG : Triacylglycérols; G-3-P : Glycérol-3-Phosphate; CM : Chylomicrons; CM Rem : *Chylomicron Remnants*; HSL : *Hormone Sensitive Lipase*; Ins Res : *Insulin Resistance*; FA : *Fatty Acids*; NEFA : *Non Esterified Fatty Acids*; SREBP-1c : *Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c*; ChREBP : *Carbohydrate Response Element Binding Protein*; DNL : *De Novo Lipogenesis*; ApoB : *Apolipoprotein B*; VLDL : *Very Low Density Lipoprotein*. Adapté de Tamura et al. (202).

1.2.1. Les voies d'accumulation des lipides hépatiques

Les TAG hépatiques qui s'accumulent lors du développement de la SHNA sont formés à partir d'AGL intracellulaires estérifiés à l'aide de l'enzyme diacylglycérol acyltransférase (DGAT) (voir Figure 14 en page 41) (81). Ces AGL intrahépatiques proviennent principalement de 1) la prise par le foie d'AGL plasmatiques et de 2) la lipogenèse *de novo* à partir de précurseurs à 2 carbones (58). Ainsi, toute augmentation de l'activité de ces voies est susceptible de favoriser l'accumulation de TAG hépatiques et donc d'engendrer le développement de la SHNA.

1.2.1.1. La prise d'AGL plasmatiques par le foie

Les patients souffrant d'obésité, de diabète de type 2 et/ou de syndrome métabolique ont des concentrations d'AGL circulants supérieures à la normale. La prise d'AGL circulants par le foie se fait principalement de façon concentration-dépendante, l'élévation des AGL contribuerait donc directement à la prise et à l'accumulation des lipides intrahépatiques (29, 216). Cette hypothèse est confirmée par de nombreux résultats de recherches conduites tant chez l'être humain que chez l'animal.

Premièrement, la présence de SHNA est souvent associée à une concentration élevée d'AGL circulants chez l'être humain (56, 111) et chez les rongeurs chez qui une SHNA a été induite par une diète riche en lipides (6, 128, 157, 168) ou riche en sucrose (157). De plus, les modèles de souris ou de rats génétiquement obèses chez qui on retrouve la présence de SHNA ont à la fois des concentrations élevées d'AGL circulants tels les souris *ob/ob* (83, 128, 200), *db/db* (128), hyperlipidémiques *Txnip^{-/-}* (57), les rats ZDF (128) et ZF (182). De surcroît, l'augmentation des AGL circulants par l'infusion de lipides et d'héparine (36) et par le jeûne prolongé (92, 96, 138) accroît la concentration de lipides hépatiques. Enfin, les souris A-ZIP/F-1 lipoatrophiques ont des concentrations d'AGL circulants élevées associées à une accumulation importante de lipides dans les tissus insulino-dépendants tels le muscle et le foie (115). Toutefois, lorsqu'on leur transplante du

tissu adipeux de façon à redistribuer les lipides vers les adipocytes, les taux circulants d'AGL reviennent à la normale et la stéatose hépatique est éliminée (115).

Contribution des AGL plasmatiques à la formation de TAG hépatiques

Récemment, une étude réalisée par Donnelly et al. (58) a permis de mesurer *in vivo* la contribution relative des différentes sources d'AGL à la formation de TAG hépatiques chez des patients atteints de SHNA. Grâce à l'utilisation de plusieurs traceurs isotopiques stables infusés pendant 5 jours, suivie d'une biopsie hépatique, cette étude leur a permis de conclure que chez les gens atteints de SHNA, 59% des TAG hépatiques étaient formés à partir des AGL plasmatiques et que de ces AGL plasmatiques 60% provenaient des adipocytes. Dans cette étude, la contribution des AGL provenant de la synthèse de novo était de 26% alors que celle venant de l'alimentation était de 15%. Bien que cette étude n'ait pas compris de sujets contrôles sains, ces résultats mettent en perspective l'importance probable des AGL plasmatiques de provenance adipocytaire dans la pathogenèse de la SHNA. Toutefois, afin d'être recrutés les sujets devaient consommer une diète standard contenant 55% de glucides, 30% de lipides et 15% de protéines. On les faisait ensuite maintenir une telle diète durant les jours d'expérimentation. La consommation de diètes riches en lipides étant une cause bien connue d'induction de la SHNA tant chez l'homme (239) que chez les rongeurs (63, 105, 192, 194, 246), il est fort probable que dans de tels cas la contribution des AGL provenant de la diète à la formation de TAG hépatiques soit augmentée (57).

Ces résultats obtenus par Donnelly et al. (58) chez l'Homme ont été confirmés chez les souris *Txnip*^{-/-} hyperlipidémiques atteintes de SHNA (57). Au contraire, dans l'étude de Diraison et al. (56), les AGL plasmatiques contribuaient moins à la formation de TAG hépatiques chez les patients atteints de SHNA que chez les sujets contrôles. Dans cette étude, la présence de SHNA semblait plutôt due à une lipogenèse de novo 10% plus active que chez les sujets sains (56). Dans cette étude, l'infusion de traceurs isotopiques ne durait par contre que 4 h et les auteurs ont eux-mêmes spécifié que l'approche méthodologique utilisée avait probablement sous-estimé la contribution des AGL circulants à la formation de TAG hépatiques. Ces TAG hépatiques étaient par ailleurs estimés de façon indirecte à

partir de la mesure de *very-low density lipoprotein* (VLDL) riches en TAG (VLDL-TAG) plasmatiques et non à partir d'une biopsie hépatique ce qui rend les résultats moins précis.

Ainsi, malgré ces résultats contradictoires sur la contribution des différentes sources d'AGL à la formation de TAG hépatiques chez les gens atteints de SHNA, la majorité des recherches disponibles à ce jour mènent à penser que des taux élevés d'AGL plasmatiques ont un rôle important à jouer dans le développement de la SHNA. Ainsi, les facteurs responsables de l'élévation des AGL plasmatiques sont susceptibles de contribuer de façon considérable à la pathogenèse de la SHNA.

L'insulino-résistance périphérique élèverait les AGL plasmatiques ce qui contribuerait à la SHNA

Parmi les facteurs responsables de l'augmentation de la concentration d'AGL circulants, le premier à mentionner est l'insulino-résistance périphérique. Les études épidémiologiques conduites chez les humains amènent plusieurs auteurs à convenir que l'insulino-résistance représente un facteur de risque important pour le développement de la SHNA (86, 145, 147). La nature de ces recherches ne permet pas, par contre, de déterminer si l'insulino-résistance est réellement une cause ou une conséquence de la SHNA (56). La section 1.3 de cette revue portera sur l'insulino-résistance en tant que conséquence de la SHNA. Nous verrons dans les prochains paragraphes le raisonnement qui mène certains auteurs à penser que l'insulino-résistance périphérique est une des causes principales de la SHNA.

Normalement, l'insuline a pour effet d'inhiber la lipase hormono-sensible (HSL) adipocytaire, ce qui réduit la lipolyse et donc la relâche d'AGL dans la circulation. Il semble que ceci ne soit plus le cas lors d'insulino-résistance périphérique caractéristique des gens obèses chez qui les adipocytes engorgés relâchent de hauts taux d'AGL dans la circulation, malgré des concentrations plasmatiques d'insuline élevées (174, 216). Cette augmentation d'AGL plasmatiques est susceptible d'augmenter leur captation par les hépatocytes et ainsi de contribuer au développement de la SHNA (Figure 6) (52, 174, 216). Un défaut dans l'effet supprimeur qu'exerce l'insuline sur la lipolyse adipocytaire a d'ailleurs été montré chez des sujets atteints de SHNA et/ou de NASH (193, 197), ainsi que chez des sujets atteints de diabète de type 2 (111). L'amélioration de cet effet supprimeur

chez des sujets diabétiques de type 2 ayant été traités 3 mois à l'aide de rosiglitazone, un médicament de la classe des thiazolidinediones (TZD), a résulté en une diminution du contenu hépatique en lipides, probablement grâce à une diminution des lipides circulants (152). L'insulino-résistance périphérique a donc un rôle potentiel à jouer dans la pathogenèse de la SHNA. Par contre, l'étude du modèle de stéatose induite par une diète riche en lipides chez le rat permet de conclure que l'insulino-résistance périphérique n'est pas essentielle au développement de la SHNA. En effet, ces rats développent une stéatose hépatique en aussi peu que trois jours, bien avant de développer de l'insulino-résistance périphérique (119, 192).

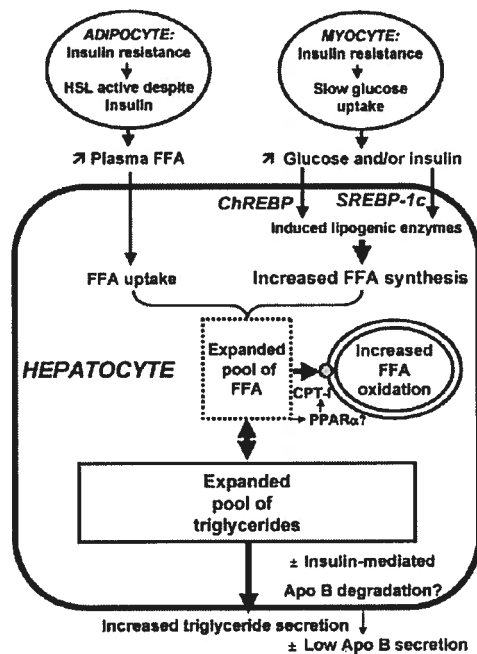


Figure 6. Rôle potentiel de l'insulino-résistance périphérique dans la pathogenèse de la SHNA. Voir le texte pour plus d'explications. HSL : *Hormone Sensitive Lipase*; FFA : *Free Fatty Acids*; SREBP-1c : *Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c*; ChREBP : *Carbohydrate Response Element Binding Protein*; ApoB : *Apolipoprotein B*; PPAR α : *Peroxisome Proliferator-activated Receptor-alpha*; CPT-I : *Carnitin Palmitoyl Transferase-I*. Tiré de Pessayre et al. (174).

Les récepteurs hépatiques aux AGL jouent-ils un rôle dans le développement de la SHNA?

Il est généralement admis que la prise de lipides par le foie n'est pas régulée par des hormones et qu'elle se fait de façon dépendante de la concentration des substrats (216). Malgré cela, Ravikumar et al. (184) ont montré une augmentation de la prise d'AGL par le foie indépendante de la quantité d'AGL circulants. Dans cette étude (184), l'accumulation hépatique de lipides était mesurée par SRMN à la suite de l'ingestion d'un mélange de lipides marqués au ^{13}C chez des sujets atteints à la fois de diabète de type 2 et de SHNA. L'incorporation hépatique maximale des lipides ingérés était considérablement plus rapide (en 4 h vs 6 h) et plus élevée de 50% chez les sujets atteints de SHNA que chez les sujets sains, alors que les concentrations d'AGL plasmatiques marqués et non marqués étaient équivalentes dans les deux groupes. L'augmentation des transporteurs d'AGL sur la membrane des hépatocytes de gens atteints de la SHNA pourrait être une explication potentielle des résultats de Ravikumar et al. (184). Le *Fatty acid translocase / cluster of differentiation 36* (FAT/CD36) est un récepteur *scavenger* de classe B (69) auquel on a, dans les dernières années, attribué un rôle dans le transport des AGL à longues chaînes (2). Ce rôle des FAT/CD36 est maintenant bien établi au niveau du muscle squelettique (19, 68, 104) et des adipocytes (44, 134). Au niveau hépatique, les souris *liver-CPR-null* ont une stéatose hépatique et des taux d'expression de l'ARNm et de la protéine du CD36 plus élevés que leurs contrôles (238). Les souris lipoatrophiques A-ZIP/F1 ont une stéatose hépatique et des niveaux d'ARNm du CD36 hépatique 10 fois plus élevés que leurs contrôles (79). Toutefois, ces articles ne rapportent pas de mesures du transport des lipides à travers la membrane hépatique. Ainsi, il n'apparaît pas encore très clair que les FAT/CD36 hépatiques sont réellement impliqués dans le transport des AGL plasmatiques à travers la membrane des hépatocytes. Bien qu'elle soit attrayante, l'hypothèse d'un rôle particulier de ces transporteurs de lipides dans la pathogenèse de la SHNA reste encore à prouver.

1.2.1.2. La lipogenèse *de novo* hépatique

La lipogenèse *de novo* est un processus anabolique cytosolique au cours duquel des AGL sont nouvellement synthétisés à partir d'acétyl-CoA. Ces acétyl-CoA sont formés à partir

de citrate issu du cycle de Krebs à l'aide de précurseurs générés, pour la plupart, par le métabolisme du glucose. L'enzyme acétyl-CoA carboxylase (ACC) catalyse la formation de malonyl-CoA à partir d'acétyl-CoA. Ces précurseurs sont alors allongés 2 carbones à la fois à l'aide de l'enzyme *fatty-acid synthase* (FAS) afin de former des AGL à plus ou moins longues chaînes (Figure 7). Tant la transcription que l'activité de ces enzymes lipogéniques sont stimulées par l'insuline (53, 116). Ainsi, la lipogenèse *de novo* est normalement active en période post-prandiale et quasi inactive en période de jeûne (56, 216, 222).

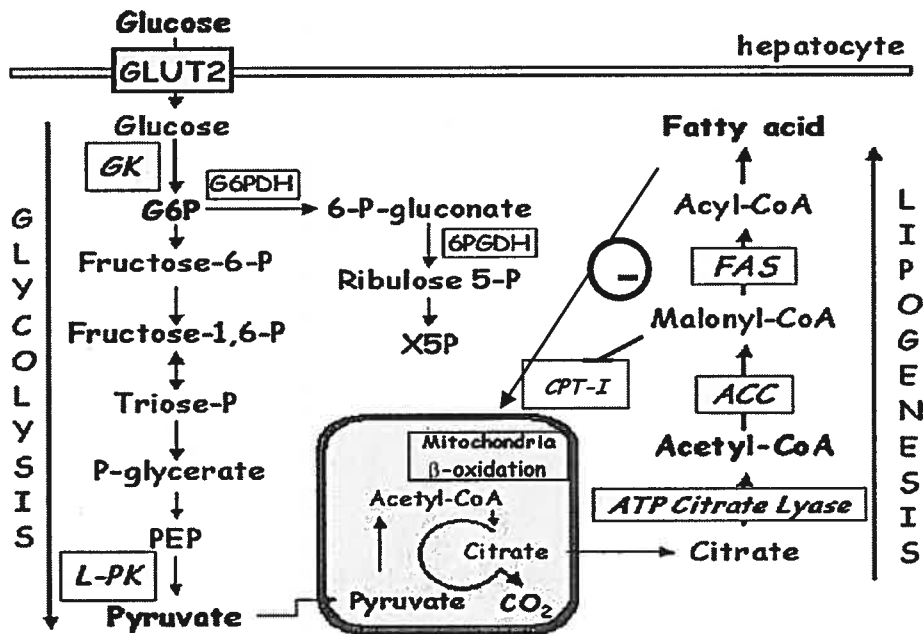


Figure 7. Voies métaboliques de la glycolyse et de la lipogenèse *de novo* hépatiques. L'augmentation de l'expression et/ou de l'activité des enzymes lipogéniques citrate lyase, ACC et FAS favorise la lipogenèse. Le malonyl-CoA est un inhibiteur de l'enzyme CPT-I qui permet l'entrée des acides gras dans la mitochondrie. Ainsi l'activation de la lipogenèse a normalement pour effet d'inhiber l'oxydation des lipides. GLUT2 : *Glucose Transporter-2*; GK : *Glucokinase*; PEP : *Phosphoénolpyruvate*; L-PK : *Liver Pyruvate Kinase*; G6P : *Glucose-6-Phosphate*; G6PDH : *Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase*; 6PGDH : *6-Phosphogluconate Déshydrogénase*; X5P : *Xylulose-5-Phosphate*; CPT-I : *Carnitine Palmitoyl Transférase-1*; ACC : *Acétyl CoA Carboxylase*; FAS : *Fatty Acid Synthase*. Adapté de Dentin et al. (53).

Chez des sujets sains en période post-prandiale, la lipogenèse *de novo* hépatique ne contribue qu'à ~2,5-5% de la formation de TAG hépatiques (56, 195). Cette contribution augmente à la suite d'un repas riche en glucides (195, 222). Deux études rapportent les résultats de mesure *in vivo* de lipogenèse *de novo* hépatique chez des sujets atteints de SHNA. Dans l'étude de Diraison et al. (56), la lipogenèse hépatique post-prandiale des sujets atteints de SHNA contribuait dans une proportion de 14,9% à la formation de TAG hépatiques, comparativement à 4,6% chez les sujets sains. De plus, chez les sujets atteints de SHNA, ces taux restaient élevés durant le jeûne imposé par la prolongation de l'expérimentation (56). Il est à noter que les sujets SHNA de cette étude avaient également des taux circulants d'insuline 2,5 fois plus élevés que les sujets contrôles, ce qui a pu participer au fait qu'ils avaient des taux de lipogenèse plus importants que les sujets sains.

Dans l'étude de Donnelly et al. (58) menée chez des sujets atteints de SHNA, la lipogenèse *de novo* hépatique à jeun contribuait dans une proportion de 26% à la formation de TAG hépatiques, ces taux n'augmentant pas en période post-prandiale. Ces taux étaient 2,5 fois plus importants que ceux rapportés chez des sujets obèses hyperinsulinémiques (195) et 4 à 5 fois plus importants que ceux rapportés chez des sujets sains (56, 195). Ainsi, il semble que la synthèse d'AGL intrahépatiques *de novo* soit plus importante chez les sujets atteints de SHNA et ce, même en période de jeûne ou à la suite de diètes riches en lipides, alors que l'activité de cette voie métabolique est habituellement quasi nulle (58, 195). Il apparaît ainsi y avoir une perte de la régulation de cette voie métabolique en situation de SHNA.

Rôle des facteurs de transcription SREBP-1 et ChREBP dans le développement de la SHNA

Les études conduites chez les rongeurs ont permis d'éclairer les mécanismes moléculaires potentiels pouvant mener à l'activation de la lipogenèse *de novo* dans des cas de SHNA. Ainsi, la stimulation de cette voie passe vraisemblablement par une activité plus importante des facteurs de transcription *Sterol regulatory element-binding protein 1* (SREBP-1) et *Carbohydrate response element binding protein* (ChREBP) au niveau hépatique (174, 216).

Les SREBPs ont été initialement identifiés comme étant des facteurs nucléaires de transcription impliqués dans la régulation du métabolisme du cholestérol (voir Osborne et

al. (167) pour revue). Deux gènes codant pour les SREBPs ont été identifiés, SREBP-1 et SREBP-2. SREBP-2 semble réguler principalement les gènes associés au métabolisme du cholestérol, tandis que SREBP-1 régule les gènes de la synthèse des acides gras (59). Le gène de SREBP-1 contient deux promoteurs qui mènent respectivement à l'expression de SREBP-1a et SREBP-1c. Au niveau hépatique, l'isoforme SREBP-1c est celui qui est le plus exprimé et il a une activité transcriptionnelle plus importante sur les enzymes lipogéniques que sur les enzymes du métabolisme du cholestérol (203). La transcription et l'activité de SREBP-1c sont stimulées par l'insuline via un mécanisme encore obscur qui pourrait impliquer l'activation de la protéine kinase C- λ (PKC λ) par la cascade de signalisation phosphatidyl-inositol-3-kinase/protéine proto-oncogène Akt (PI3K/Akt) (Figure 8) (150). Cette hypothèse est confirmée par le fait que les souris *knock-out* de la PKC λ spécifiquement au foie ont une expression des SREBP-1c et un contenu en TAG hépatiques diminué (150). Lorsque que SREBP-1c est activé, son segment NH₂-terminal est clivé de la membrane du réticulum endoplasmique et est transloqué au noyau afin de se lier à des *sterol regulatory elements* (SRE) se trouvant dans la région promotrice d'une panoplie de gènes dont ceux des enzymes ACC et FAS (201) (200). ChREBP est quant à lui un facteur de transcription activé par le glucose, qui stimule l'expression du gène de la pyruvate kinase hépatique (L-PK), favorisant ainsi la formation de précurseurs de la lipogénèse; il stimule aussi l'expression des gènes lipogéniques ACC et FAS (Figure 8) (53).

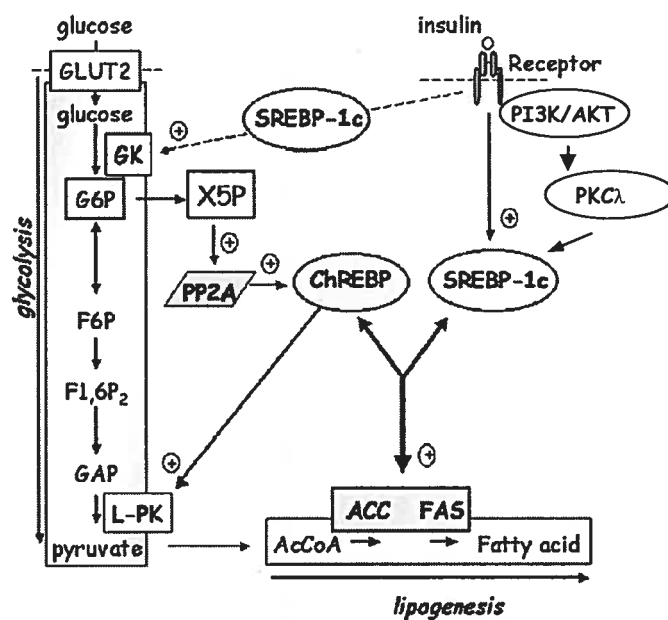


Figure 8. Rôle synergique des facteurs de transcription ChREBP et SREBP-1c dans l'expression des gènes lipogéniques et glycolytiques. ChREBP est activé par des concentrations élevées de glucose et est régulé par un mécanisme de phosphorylation/déphosphorylation déterminé par l'activité de la PP2A régulée par la voie des pentoses. SREBP-1c est stimulé par la liaison de l'insuline à son récepteur, possiblement via l'activation d'une PKC par la voie de signalisation de PI3K/AKT. GLUT2 : *Glucose Transporter-2*; GK : *Glucokinase*; G6P : *Glucose-6-Phosphate*; F6P : *Fructose-6-Phosphate*; F1,6P₂ : *Fructose 1,6 Biphosphate*; GAP : *Glycéraldéhyde Phosphate*; L-PK : *Liver Pyruvate Kinase*; AcCoA : *Acétyl-CoA*; ACC : *Acétyl-CoA Carboxylase*; FAS : *Fatty Acid Synthase*; X5P : *Xylulose-5-Phosphate*; PP2A : *Protein Phosphatase 2A*; SREBP-1c : *Sterol Regulatory Response Element Binding Protein-1c*; ChREBP : *Carbohydrate Response Element Binding Protein*; PI3K/AKT : *phosphatidyl-inositol-3-kinase/protéine proto-oncogène Akt*; PKCλ : *Protein Kinase Lambda*. Adapté de Dentin et al. (53) et Matsumoto et al. (150).

L'hyperinsulinémie souvent retrouvée dans les cas de SHNA est donc susceptible d'induire une activité lipogénique plus importante que la normale et ainsi de contribuer à la pathogenèse de la SHNA (174). La diminution de la prise du glucose par les myocytes et l'augmentation de la production de glucose hépatique qui sont caractéristiques de l'insulino-résistance sont quant à elles susceptibles de créer des hyperglycémies transitoires et ainsi d'activer le facteur de transcription ChREBP (Figures 6 et 8) (23). Il est intéressant de noter que bien que les effets de l'insuline sur le métabolisme du glucose hépatique soient altérés lors de l'insulino-résistance, il semble que les effets activateurs que l'hormone exerce sur la lipogenèse soient quant à eux préservés (23, 59, 66, 202). Ainsi, ceci contribue

à la mise en place d'un cercle vicieux où la stéatose induit une résistance hépatique aux effets suppresseurs de l'insuline sur la production de glucose (comme nous le verrons à la section 1.3), ce qui contribue à l'augmentation de la sécrétion d'insuline et à l'induction d'une insulino-résistance périphérique, ayant de leur côté pour effet d'augmenter la lipogenèse hépatique et d'accroître la stéatose (Figure 9) (200).

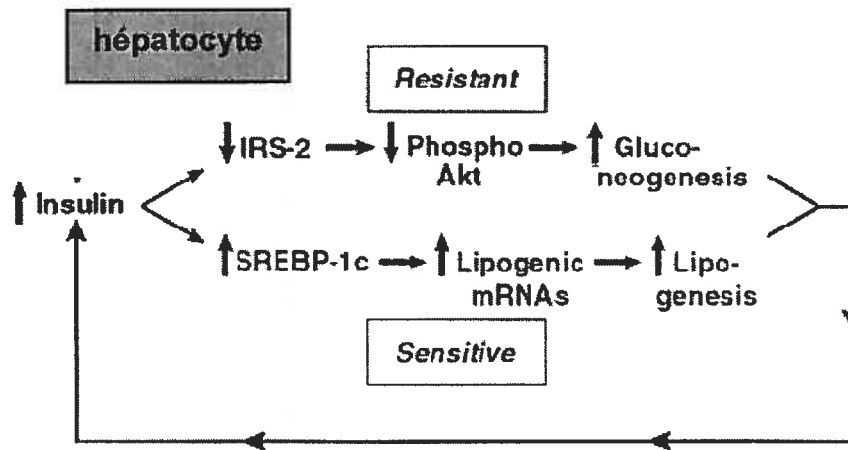


Figure 9. Modèle illustrant comment l'hyperinsulinémie secondaire à l'insulino-résistance périphérique et/ou hépatique contribue à la formation d'un cercle vicieux au sein des hépatocytes où la voie néoglucogénique est résistante à l'insuline alors que la voie lipogénique reste sensible aux actions de l'hormone. IRS-2 : *Insulin Receptor Substrate-2*; SREBP-1c : *Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c*; mRNAs : *messenger Ribonucleic Acid*. Adapté de Shimomura et al. (202).

Ces facteurs de transcription sont-ils activés lors de SHNA?

À l'appui de la théorie selon laquelle le facteur SREBP-1c serait en partie responsable de l'augmentation de la lipogenèse *de novo* dans la SHNA, plusieurs modèles de rongeurs ayant une SHNA ont aussi des niveaux élevés de l'ARNm de SREBP-1c, tels les rats corpulents JCR :LA-cp (59), les souris lipodystrophiques A-ZIP/F1 (79), les souris *ob/ob* (202) et les souris IRS2^{-/-} (223). Les diètes riches en lipides ont aussi pour effet d'augmenter l'expression hépatique de SREBP-1c et son activité chez les souris 129S6/SvEvTac et C57B1/B6 et les rats Sprague-Dawley, ce qui stimule l'expression des gènes lipogéniques et contribue au développement de la stéatose (18, 118). Par contre, dans

une étude d'Estadella et al. (63), malgré une nette accumulation de TAG hépatiques, les taux de lipogenèse *de novo* mesurés *in vivo* à l'aide de $^3\text{H}_2\text{O}$ n'étaient pas augmentés suite à une diète riche en lipides administrée chez des rats Wistar et ce, malgré des taux d'insuline plus élevés que leurs contrôles. La réelle contribution de la lipogenèse *de novo* dans le développement de la SHNA induite par une diète riche en lipides reste donc à confirmer. Par ailleurs, il semble clair qu'une diminution de l'expression et/ou de l'activité des SREBP-1c, et ce à l'aide de diètes riches en soja ou en AGL polyinsaturés *n-3*, a pour effet de diminuer la lipogenèse *de novo* et ainsi, de diminuer la SHNA (8, 112, 226). À la lumière de ces études, une implication des SREBP-1c en tant qu'activateurs de la lipogenèse *de novo* et contributeurs à la pathogenèse de la SHNA semble de plus en plus certaine. Elle reste par contre encore à être confirmée chez l'être humain.

1.2.2. Les voies d'élimination des lipides hépatiques

Il apparaît clair que la SHNA résulte d'une activation des voies d'accumulation des lipides au niveau hépatique. Malgré cela, il semble que le foie ne s'engorge pas de lipides de façon indéfinie, mais plutôt qu'un nouvel état stable puisse être atteint grâce à l'activation des voies hépatiques d'élimination des lipides, telles l'oxydation et la sécrétion de VLDL compensant partiellement l'accumulation excessive de lipides (174).

1.2.2.1. L'oxydation des lipides hépatiques

Au niveau hépatique, l'oxydation des AGL peut se produire au sein des mitochondries et des péroxisomes via la β -oxydation ainsi qu'au sein des microsomes via la ω -oxydation opérée par les membres de la superfamille des cytochromes P450 (Figure 10) (144). Les cytochromes P450 sont des hémoprotéines hépatiques qui jouent un rôle crucial au niveau du métabolisme et de la détoxification en catalysant l'oxydation d'une panoplie de substances hydrophobes endogènes et exogènes dont les acides gras (61). Les acides gras dicarboxyliques résultant de la ω -oxydation microsomale sont ensuite métabolisés via la β -oxydation péroxisomale, qui se spécialise entre autres dans l'oxydation des AGL à très longues chaînes, des acides gras à chaînes branchées ainsi que des éicosanoïdes (7). Les

acyl-CoA à chaînes réduites résultant de la β -oxydation péroxisomale peuvent ensuite être oxydés via la β -oxydation mitochondriale et ainsi générer de l'ATP (144). La majorité des AGL à chaînes courtes, moyennes et longues sont métabolisés par la β -oxydation mitochondriale; il semble par contre que lors de perturbations du métabolisme des lipides, par exemple lors de dyslipidémies, de diabète de type 2 et de stéatose hépatique ou lorsque la β -oxydation mitochondriale est inhibée, l'oxydation microsomale et l'oxydation péroxisomale des lipides joue un rôle plus important que normalement (183). La première étape menant au catabolisme des AGL est celle de leur activation par l'ajout d'un coenzyme A (CoA) grâce à l'enzyme acyl-CoA synthétase. L'étape limitante de la β -oxydation mitochondriale réside dans le passage des acyl-CoA du cytosol vers l'espace intermembranaire grâce à l'enzyme CPT-I, qui est sous la régulation serrée du malonyl-CoA. Ainsi les taux élevés de malonyl-CoA résultant de l'activation de la synthèse des AGL hépatiques par l'insuline ont normalement pour effet d'en inhiber l'oxydation (voir Figure 7).

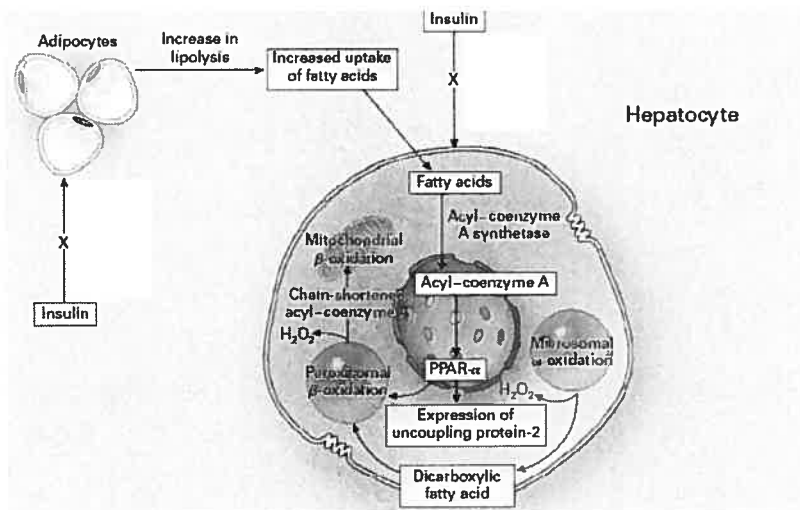


Figure 10. Relation entre les différentes voies hépatiques d'oxydation des lipides. La ω -oxydation microsomale génère des acides gras dicarboxyliques qui sont ensuite oxydés via la β -oxydation péroxisomale. Les acides gras à chaînes réduites en découlant peuvent ensuite être métabolisés par la β -oxydation mitochondriale. Les AGL et leur forme active Acyl-CoA sont des ligands des Peroxisome Proliferator-activated Receptor-alpha (PPAR α). Les PPAR α sont des récepteurs nucléaires activant la transcription de gènes de la ω -oxydation microsomale et de la β -oxydation mitochondriale et péroxisomale. Adapté de Angulo (7).

L'oxydation hépatique des lipides est-elle stimulée lors de SHNA?

L'opinion la plus admise en ce moment en ce qui a trait au rôle de l'oxydation hépatique des lipides dans la pathogenèse de la SHNA est qu'elle serait en fait augmentée lors de la SHNA mais de façon insuffisante pour compenser l'accumulation importante de TAG hépatiques (7, 173-175).

À l'appui de cette hypothèse, quelques études (35, 193) conduites chez l'Homme, mais pas toutes (56), ont montré des taux d'oxydation des lipides au niveau systémique, mesurés à l'aide de calorimétrie indirecte, plus élevés chez les sujets atteints de stéatohépatite comparativement aux sujets contrôles. Ces taux étaient d'ailleurs positivement corrélés avec le niveau de stéatose hépatique (28). De façon plus spécifique, il semble que l'oxydation hépatique des lipides soit plus importante chez les gens atteints de stéatohépatite que chez les sujets normaux telle que reflétée indirectement par les taux circulants de β -OH butyrate (28, 35, 193), par la mesure *in vivo* de l'activité des cytochromes P450 à l'aide de la mesure des taux sériques de 6-hydroxy CHZ suite à l'ingestion de chlorzoxazone (35) ou par la mesure *in vivo* de la β -oxydation hépatique évaluée à partir de l'expiration de $^{13}\text{CO}_2$ suite à l'ingestion de ^{13}C -octanoate (156).

Ces résultats trouvés chez l'Homme sont appuyés par ceux d'études conduites chez les souris *ob/ob* montrant qu'elles ont une β -oxydation mitochondriale et péroxisomale plus élevée que leurs contrôles ainsi qu'une expression plus importante de gènes de l'oxydation microsomale (22, 133) ce qui était aussi vu chez des rats ZF (61). Également, il a été montré que des rats Sprague-Dawley nourris avec une diète riche en lipides ont des niveaux d'ARNm et de protéines des cytochromes P450 deux fois plus élevés (135), ainsi qu'une activité de la β -oxydation hépatique supérieure à leurs contrôles nourris avec une diète standard (228). Par contre, les souris BALB/c et C57BL (138) et les rats ZF (227) sont caractérisés par de la stéatose expliquée en partie par une diminution de la capacité d'oxydation des lipides au niveau hépatique. Un héritage génétique particulier étant

responsable de l'obésité et de la SHNA chez ces souches de rongeurs rend par contre ces résultats difficilement généralisables.

Le rôle potentiel des PPAR α dans la stimulation de l'oxydation hépatique des lipides

En plus de stimuler la β -oxydation péroxisomale et la ω -oxydation microsomale, l'accumulation d'AGL intrahépatiques pourrait donc partiellement surpasser les effets inhibiteurs de l'hyperinsulinémie et de la lipogenèse sur la β -oxydation mitochondriale et permettre ainsi d'oxyder en partie cette surcharge lipidique (173). Un des mécanismes par lequel l'oxydation hépatique des lipides pourrait être augmentée serait l'induction du facteur de transcription *peroxisome proliferator-activated receptor α* (PPAR α) par les AGL intrahépatiques (112). Les AGL sont en effet des ligands endogènes des PPAR α . Ce sous-type de la superfamille des récepteurs nucléaires s'exprime principalement dans le tissu adipeux brun et le foie et est responsable de la transcription d'une série de gènes impliqués dans la prolifération des péroxisomes et l'oxydation des lipides, tels celui de l'enzyme mitochondrial carnitine palmitoyl transférase I (CPT-I) et celui de l'enzyme Acyl-CoA oxydase (AOX) catalysant la première étape de la β -oxydation péroxisomale (Figure 10) (144, 174). Les niveaux d'ARNm des PPAR α sont plus élevés chez les souris *ob/ob* et *db/db* (154) et chez des rats Wistar ou Sprague-Dawley nourris avec une diète riche en lipides (4, 128, 168, 185) que chez leurs contrôles respectifs. Ces niveaux plus élevés sont accompagnés d'une augmentation de l'ARNm de la CPT-I (128, 154) et de l'AOX (185), suggérant une activité transcriptionnelle des PPAR α augmentée de façon parallèle à leur synthèse.

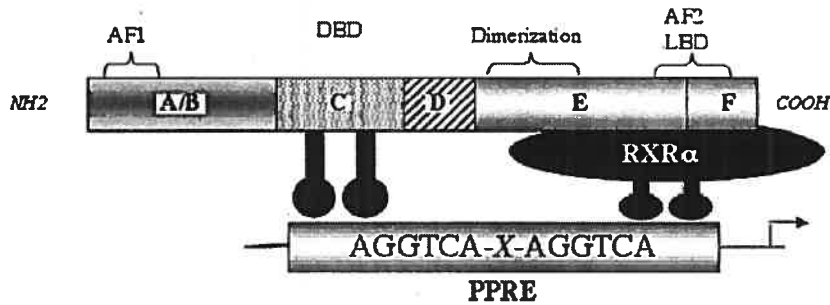


Figure 11. Structure et activation des PPARs. Après la liaison du ligand au *ligand-binding domain* (LBD) du PPAR il y a hétérodimérisation avec le récepteur nucléaire *9-cis retinoic acid receptor* (RXR), ce qui entraîne la liaison de cet hétérodimère avec le *peroxisome proliferator response element* (PPRE) de l'ADN et la régulation de l'expression des gènes cibles. AF1 : *activating function-1*; DBD : *DNA binding domain*; AF-2 : *activating function-2*. Tiré de Diradourian et al. (55).

Il apparaît donc probable qu'en situation d'influx lipidique élevé, l'oxydation hépatique des lipides soit stimulée en réaction à l'accumulation de lipides intrahépatiques. D'ailleurs, les traitements pharmacologiques ou nutritionnels visant à augmenter l'oxydation des lipides hépatiques préviennent la SHNA lors d'influx lipidiques élevés (77, 161, 192, 246). Par contre, telle qu'en témoigne la stéatose, cette voie ne semble pas être activée de façon suffisante pour contrecarrer l'accumulation de lipides intrahépatique.

L'hyperinsulinémie et le profil sanguin en cytokines freineraient l'ajustement de l'oxydation des lipides contribuant ainsi à la SHNA

Le mauvais ajustement de l'oxydation des lipides lors du développement de la SHNA pourrait être dû à plusieurs facteurs. Premièrement, les taux élevés d'insuline souvent rencontrés lors de SHNA participent probablement largement à ce phénomène en inhibant la β -oxydation mitochondriale. En effet, l'insuline a non seulement pour effet de stimuler la synthèse des AGL, comme nous l'avons vu à la section 1.2.2, mais aussi par le fait même d'en inhiber l'oxydation via une inhibition de la CPT-I par les niveaux élevés de malonyl-CoA résultant de la lipogenèse (Figure 12) (116).

Le profil sanguin de cytokines caractéristique de la SHNA est aussi susceptible de contraindre la stimulation optimale de l'oxydation des lipides. En effet, la SHNA, tout

comme l'obésité et l'insulino-résistance, est caractérisée par de l'hyperleptinémie (39, 251) et de l'hypo adiponectinémie (235, 247). Au niveau hépatique, la leptine et l'adiponectine ont normalement pour effet de favoriser l'oxydation des lipides et de prévenir la stéatose (42, 244). Il a même été proposé que le rôle de la leptine au niveau hépatique et β -pancréatique soit celui d'une hormone « anti-stéatose » (128). Ce concept est confirmé par le fait que les niveaux de stéatose hépatique observables chez les modèles de rongeurs ayant des défauts génétiques affectant la fonction normale de la leptine (i.e. souris *ob/ob* et *db/db*, et rats ZF et ZDF) sont très marqués (128). La stimulation de l'oxydation des lipides par la leptine et l'adiponectine serait engendrée par l'effet activateur de ces deux cytokines sur la voie de l'AMPK, résultant en une inhibition de l'ACC, diminuant les niveaux de malonyl-CoA et relevant ainsi la CPT-I de son inhibition (Figure 13) (21, 244). La leptine aurait aussi un effet répresseur sur la transcription des gènes lipogéniques via l'activation de la voie de transmission du signal *Janus kinase/signal transducers and activators of transcription* (JAK/STAT), qui réprime SREBP-1c (Figure 12) (39). Il a ainsi été proposé que l'hyperleptinémie associée à la SHNA reflèterait une tentative de réponse du système, toutefois sans succès, afin de corriger la stéatose (39). Ce manque de succès serait vraisemblablement dû à une résistance hépatique à la leptine (15, 21, 39). À l'appui de ce concept de résistance hépatique à la leptine, l'infusion chronique de leptine pendant 7 jours chez des rats Wistar désensibilisa le foie à l'activation de STAT3 par une injection de leptine (15). Cette désensibilisation pourrait être médiée par une répression des récepteurs hépatiques à cette hormone (21). L'augmentation des *Suppressors of cytokines signaling* (SOCS), des molécules inhibant la transmission du signal des cytokines, pourrait aussi être à l'origine du manque de succès de l'hyperleptinémie à diminuer les niveaux de lipides hépatiques. En effet, il semble que les hauts taux de cytokines stimulent la formation de SOCS qui, de façon rétroinhibitrice, diminuent la transmission du signal des cytokines (Figure 12) (67, 230).

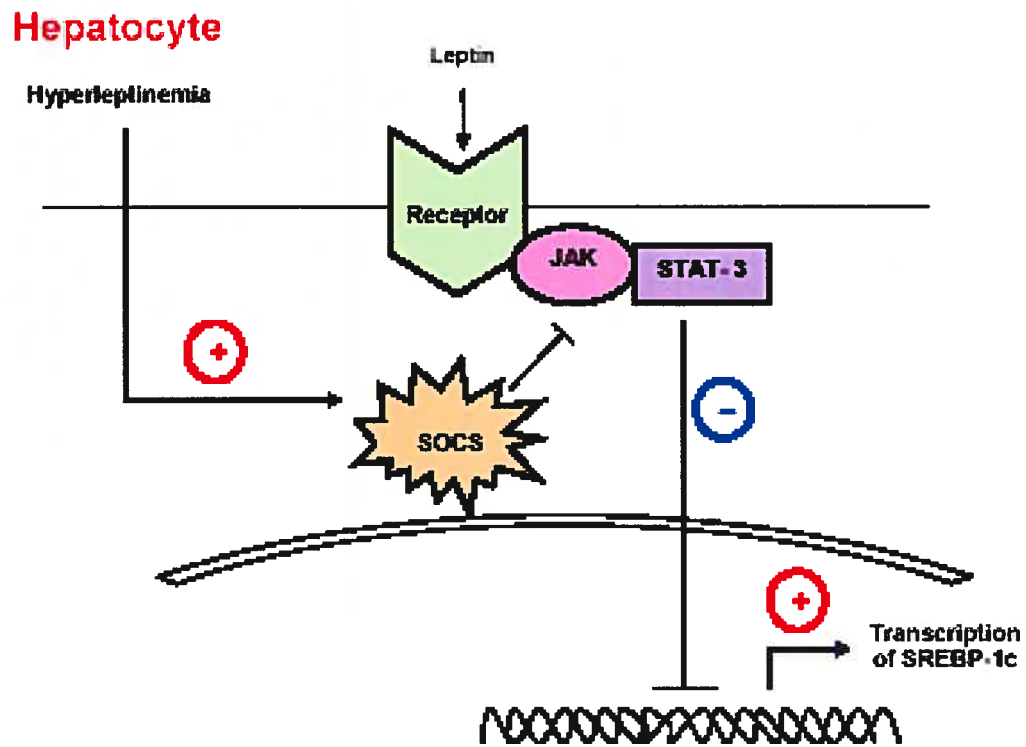


Figure 12. Figure synthèse illustrant le rôle potentiel des SOCS dans la résistance hépatique à la leptine et la pathogenèse de la SHNA. La leptine a normalement pour effet d'inhiber la transcription de SREBP-1c via le système de transduction du signal JAK/STAT. L'hyperleptinémie rencontrée dans les cas de SHNA stimule l'expression des SOCS qui inhibent le signal de la leptine. L'augmentation de SREBP-1c en résultant stimule la lipogenèse *de novo* et inhibe l'oxydation des lipides favorisant ainsi le développement de la SHNA. JAK : *Janus Kinase*; STAT-3: *Signal Transducers and Activators of Transcription*; SOCS : *Supressors Of Cytokines Signalling*; SREBP-1c : *Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c*.

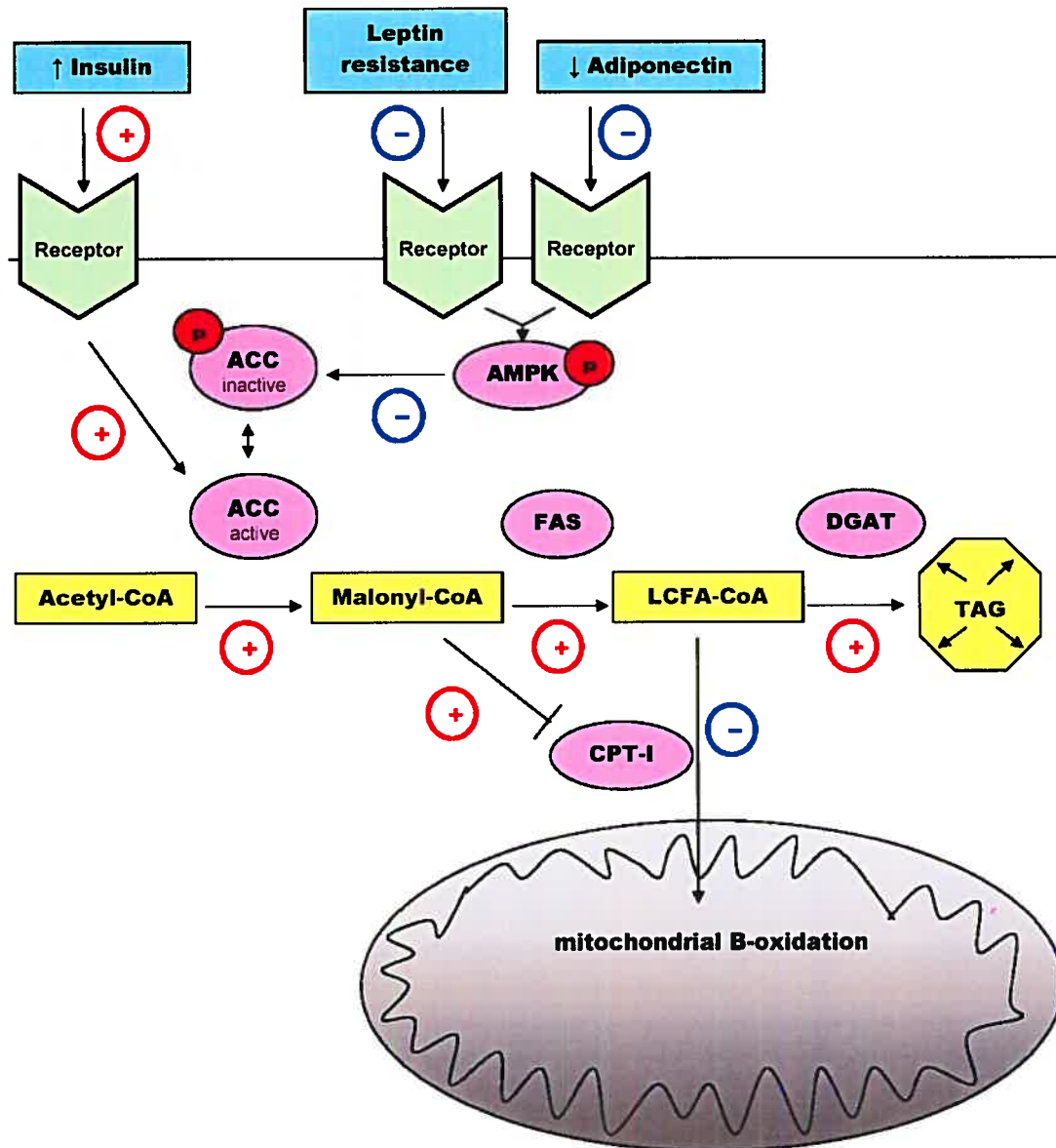


Figure 13. Figure synthèse illustrant le rôle inhibiteur de l'hyperinsulinémie, de la résistance à la leptine et de l'hypoadiponectinémie sur la β -oxydation mitochondriale hépatique. L'insuline active l'ACC ce qui a pour effet d'augmenter les niveaux de malonyl-CoA ce qui inhibe la CPT-I et ainsi l'oxydation des lipides. La résistance à la leptine et l'hypoadiponectinémie diminue l'action de ces deux cytokines au niveau hépatique qui est d'activer l'oxydation des lipides. En effet, en situation normale, ces cytokines entraînent la phosphorylation de l'ACC, vraisemblablement via l'activation de l'AMPK, ce qui inactive l'ACC et diminue les niveaux de malonyl-CoA relevant ainsi la CPT-I de son inhibition et favorisant l'oxydation des lipides. ACC : Acétyl-CoA Carboxylase; AMPK : AMP-Activated Protein Kinase; FAS : Fatty Acid Synthase ; DGAT : Diacylglycerol Acyltransferase; CPT-I : Carnitin Palmitoyl Transferase-I; TAG : Triacylglycérols.

1.2.2.2. La formation et la sécrétion de VLDL par le foie

La formation/sécrétion de VLDL par le foie est une voie de mise en circulation de particules riches en TAG constitant ainsi en une voie d'élimination des lipides hépatiques. Ces lipoprotéines riches en TAG sont des particules de 30 à 100 nm ne contenant qu'une seule molécule d'apolipoprotéine B (apoB) (155). Les aspects cellulaires et moléculaires de la formation et de la sécrétion de VLDL par le foie ont fait l'objet de maintes recherches dans les dernières décennies (155). Ainsi, bien que le processus de formation/sécrétion soit encore compris de façon incomplète, quelques concepts généraux sont de plus en plus acceptés. Une des notions récentes qui mérite d'être soulignée est celle que les TAG hépatiques servant à la formation de VLDL sont issus d'un pool distinct du pool de TAG cytosoliques servant au stockage et par conséquent impliqués dans la stéatose (81, 155).

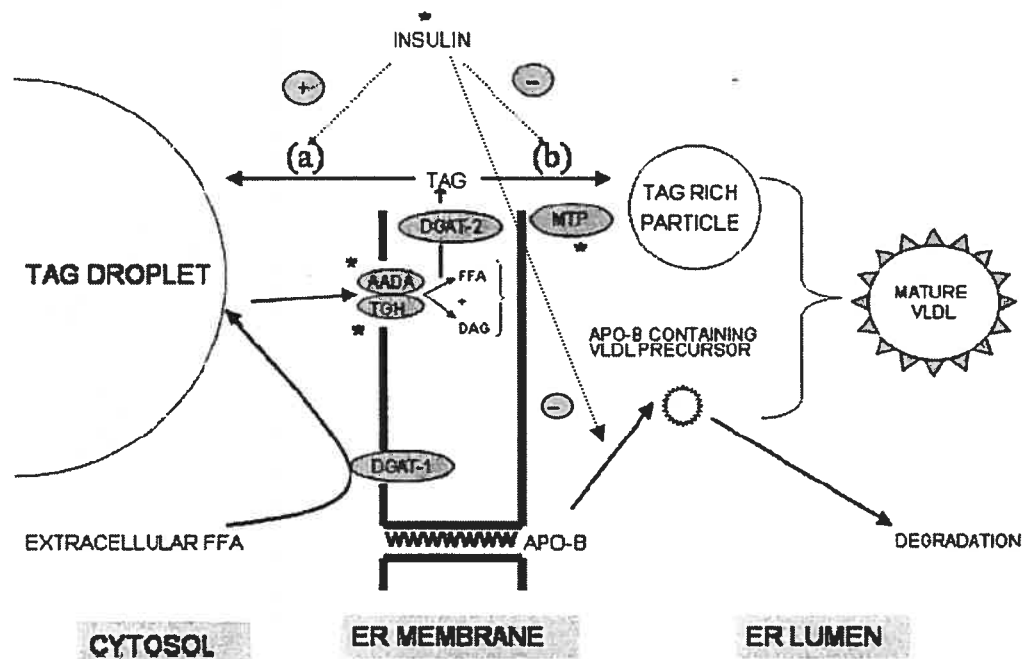


Figure 14. Représentation schématique de la voie de formation/sécrétion des VLDL par le foie et cibles de régulation de cette voie. Voir le texte pour plus d'informations. FFA : *Free Fatty Acids*; ER : *Endoplasmic Reticulum*; AADA : *Arylacetamide Deacetylase*; TGH : *Triglycerides Hydrolase*; ApoB : Apolipoprotéine B; DGAT-1 : *Diacylglycerol Acyltransferase-1*; DGAT-2 : *Diacylglycerol Acyltransferase-2*; MTP : *Microsomal Triacylglycerol Transfer Protein*; TAG : *Triacylglycerol*; VLDL : *Very Low Density Lipoprotein*. Adapté de Gibbons et al. (81).

Découplage entre la régulation des TAG cytosoliques et celle des TAG microsomaux servant à la formation de VLDL

Les TAG cytosoliques ne seraient pas directement incorporés au sein des particules de VLDL, il y aurait plutôt lipolyse des TAG cytosoliques et réestérification des AGL qui en découlent au niveau du réticulum endoplasmique (81, 155). Ces TAG microsomaux seraient ceux à la source de la formation de VLDL (Figure 14) (81, 155). Ainsi, il existe un appareillage enzymatique différent et par conséquent, une régulation métabolique distincte, pour la voie de formation des TAG cytosoliques et celle des TAG microsomaux précurseurs des VLDL. De façon plus précise, la formation des TAG cytosoliques implique l'estérification des AGL intrahépatiques cytosoliques à l'aide de l'enzyme DGAT-1, appelé

aussi *overt* DGAT (81). Ces TAG cytosoliques peuvent ensuite être mobilisés au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique lisse par l'action lipolytique de lipases hépatiques présumées être l'AADA et/ou la TGH (80, 81, 130). Cette lipolyse fournit des AGL et des DAG se retrouvant maintenant à proximité de la membrane du réticulum endoplasmique; il y a par contre incertitude à savoir si cette lipolyse se produit dans la lumière du réticulum ou dans le cytosol (81, 155). Les AGL et les DAG peuvent ensuite être réestérifiés dans les microsomes par l'enzyme DGAT-2, appelé aussi *latent* DGAT (169); cet isoenzyme provient d'un gène distinct de celui de DGAT-1 (34) et son expression est régulée différemment de celle du gène de DGAT-1 (237). Les TAG microsomaux peuvent maintenant être incorporés dans des « *TAG rich particle* » précurseurs de VLDL matures; il apparaît qu'une bonne proportion de ces TAG retournent par contre au cytosol dans ce qui semble former un cycle futile (Figure 14) (81). La voie précise par laquelle ces TAG microsomaux sont recyclés au niveau du cytosol est inconnue (81).

Régulation de la formation de VLDL à partir de TAG microsomaux : rôle de la MTP

Comme il a été mentionné ci-dessus, les TAG microsomaux formés par la DGAT-2 sont soit retournés au cytosol soit incorporés dans des « *TAG rich particle* ». Cette incorporation nécessite l'action de la *Microsomal triacylglycerol transfer protein* (MTP) (181, 236). Ainsi, une étape limitante de l'utilisation des TAG hépatiques pour la formation et la sécrétion des VLDL se trouve vraisemblablement au niveau de l'activité de la MTP. Un défaut ou un dérèglement au niveau de l'activité de cet enzyme pourrait donc potentiellement être à l'origine de la SHNA. Chez des souris, l'inhibition de la MTP (131) et la délétion du gène de la MTP (181) entraînent en effet un défaut dans la formation et la sécrétion de VLDL, ce qui résulte en une stéatose hépatique importante. Chez l'Homme, un polymorphisme fonctionnel a été trouvé au niveau de la région promotrice du gène de la MTP (-493 *G/T*), l'allèle *G*, conférant une activité de transcription du gène moindre que celle de l'allèle *T* (14 de (17)). Il a été trouvé que les gens de type *G/G* atteints de diabète de type 2 ont de plus fortes chances d'être à la fois atteints de stéatohépatite que les gens de type *G/T* ou *T/T* (17). Il a ainsi été postulé que le foie stéatosé de ces gens atteints de NASH serait dû à une activité moindre de la MTP, diminuant la sécrétion de VLDL et

entraînant ainsi une accumulation de TAG hépatiques. De plus amples études sont nécessaires afin de mieux comprendre comment est régulé cet enzyme et l'ampleur de sa contribution dans la pathogenèse de la SHNA.

L'insuline inhibe la sécrétion de VLDL en favorisant le recyclage des TAG microsomaux et en diminuant la formation d'apoB

Le recyclage des TAG microsomaux au niveau du cytosol est quant à lui favorisé par l'insuline, ce qui constituerait un des mécanismes par lesquels l'insuline inhibe la sécrétion des VLDL (Figure 14) (81). Il est d'intérêt de noter que, contrairement à l'inhibition qu'elle exerce au niveau de la HSL adipocytaire, l'insuline n'a pas d'effet inhibiteur sur la lipolyse des TAG cytosoliques hépatiques (81). Il est donc légitime de penser que des taux élevés de cette hormone puissent engendrer une augmentation du cycle de lipolyse/réestérification entre les pools de TAG cytosoliques et microsomaux. Un accroissement de l'activité de ce cycle engendre vraisemblablement une augmentation dans le turnover d'AGL et de DAG, ce qui pourrait possiblement amplifier leur effet cytotoxique et participer à l'induction d'insulino-résistance hépatique par la stéatose (voire section 1.3).

Un deuxième moyen par lequel l'insuline inhibe la sécrétion de VLDL est via la régulation qu'elle exerce sur l'apoB. Lors de la phase de maturation de la particule de VLDL, la « *TAG rich particle* » formée à l'aide de la MTP doit être jointe à un précurseur de VLDL contenant une apoB (Figure 14) (155, 198). L'insuline a pour effet de diminuer la sécrétion d'apoB dans des cellules hépatiques de la lignée HepG2 (137) et dans des hépatocytes de rats (209). Cette inhibition de la sécrétion d'apoB par l'insuline pourrait en fait être due à une augmentation de la dégradation de l'apoB avant qu'elle ne soit sécrétée (210) et/ou à une diminution de la synthèse de l'apoB (37). De façon récapitulative, l'insuline a donc non seulement pour effet de stimuler la lipogenèse *de novo* et d'inhiber indirectement l'oxydation des lipides mais aussi, de favoriser l'accumulation des TAG cytosoliques et d'inhiber la sécrétion des VLDL. Il n'est donc pas surprenant de retrouver une grande association entre la présence d'hyperinsulinémie et de stéatose hépatique. Il est par contre

paradoxal de constater que les animaux et les humains atteints de diabète de type 2 sont insensibles à l'action inhibitrice de l'insuline sur la sécrétion de VLDL (48, 59, 254).

Le rôle de la voie de formation/sécrétion de VLDL dans la pathogenèse de la SHNA

Le découplage dans la régulation des voies de stockage et de sécrétion de TAG hépatiques confère au foie un pouvoir de contrôle des lipides circulants et hépatiques en accord avec la fonction ultime de cet organe qu'est le maintien de l'homéostasie. Ainsi, le foie pourrait activer la voie de stockage des TAG cytosoliques lors d'influx lipidique élevé et ultérieurement, activer la voie de sécrétion des VLDL lorsque les lipides circulants sont ramenés à des niveaux plus bas, ou lorsque la capacité de stockage des lipides au niveau du foie a atteint une certaine limite. Il a d'ailleurs été suggéré qu'une fonction principale de la sécrétion de VLDL par le foie serait d'atténuer ou de prévenir la stéatose hépatique (155). Cette fonction putative et téléologique est mise en valeur par des études faites chez les canards servant à la production de foie gras alimentaire. En effet, les espèces de canard les moins susceptibles à l'induction d'une stéatose sont celles chez qui la sécrétion de VLDL hépatiques est la plus efficace (98).

Dans un même ordre d'idées, Bartels et al. (12) ont proposé que la production accrue de VLDL observée chez les souris *ob/ob* reflèterait une tentative du foie de minimiser l'accumulation importante de TAG hépatiques caractéristique de cette souche de souris. Les rats ZF et JCR :LA-cp sont aussi caractérisés par une stéatose importante, mais présentent une production de VLDL accrue (59, 182). De plus, dans l'étude de Lin et al. (138) qui visait à comparer les niveaux de TAG hépatiques chez différentes souches de souris, les souris présentant les niveaux de stéatose les plus élevés avaient aussi des taux de sécrétion de VLDL plus importants. Il semble donc que les modèles génétiques de rongeurs qui présentent de façon spontanée une stéatose hépatique aient une sécrétion de VLDL accrue. Au contraire, la sécrétion de VLDL semble réduite chez des rats nourris avec une diète riche en lipides, ce qui participerait à la stéatose induite par ce type de diète (72, 109, 110).

Les mécanismes d'induction de la stéatose et de régulation du métabolisme des lipides semblent donc différents entre les modèles génétiques et les modèles nutritionnels de stéatose. Encore une fois, l'interprétation des résultats des rongeurs génétiquement obèses présentant une stéatose sont difficilement généralisables. Les diètes riches en lipides ayant généralement pour effet d'augmenter les lipides circulants, la diminution de la sécrétion de VLDL par le foie est peut-être ainsi une tentative de régulation en vue de minimiser l'accumulation de lipides dans le lit vasculaire.

Le modèle d'induction de la stéatose par une diète riche en lipides est probablement plus près de ce qui est observé chez l'humain lors de la SHNA observée dans les cas d'obésité et d'insulino-résistance dues aux mauvaises habitudes alimentaires et à la sédentarité. Très peu d'études ont été conduites chez l'humain afin de déterminer les taux de sécrétion de VLDL lors de SHNA, mais à notre connaissance, les résultats de deux études confirment cette hypothèse. Diraison et al. (56), après infusion de lipides marqués, n'ont observé aucune différence dans le taux de sécrétion *in vivo* de VLDL entre des sujets atteints de SHNA et des sujets sains. Ces auteurs suggèrent ainsi que les gens atteints de SHNA ont un métabolisme des TAG hépatiques orienté de façon préférentielle vers l'accumulation plutôt que la sécrétion des lipides. Ils expliquent cette orientation métabolique par l'hyperinsulinémie des sujets atteints de SHNA puisque l'insuline, comme cela a d'ailleurs été discuté plus haut, a normalement pour effet d'inhiber la sécrétion de VLDL (Figure 14) (81, 132). Charlton et al. (37) ont quant à eux mesuré la synthèse *in vivo* d'apoB à l'aide de ¹³C-leucine chez des sujets obèses atteints de NASH. Ces sujets avaient un taux de synthèse d'apoB nettement inférieur à celui observé chez des sujets obèses sans NASH et celui des sujets sains, ce qui était peut-être en partie dû aux taux d'insuline qui étaient plus élevés chez les sujets NASH. Puisque la synthèse d'apoB représente une étape limitante dans la formation des VLDL, une synthèse moindre de ce précurseur pourrait donc hypothétiquement être une des causes de la stéatose et éventuellement de la NASH, en limitant l'exportation des lipides hors du foie. Les conclusions à tirer de cette étude sont par contre limitées puisque la sécrétion de VLDL n'y était pas mesurée. Il est également impossible de déterminer si la diminution de la synthèse d'apoB est une cause ou une conséquence de la NASH à l'aide de ce design expérimental.

Pour terminer, à partir des données disponibles à ce jour, il apparaît plutôt difficile de conclure sur l'ampleur du rôle que joue la voie de formation/sécrétion des VLDL au sein de la pathogenèse de la SHNA. De façon évidente, telle qu'en témoigne la SHNA, la régulation de cette voie n'est pas parfaite et ne sert pas simplement à maintenir les TAG hépatiques à des niveaux normaux. D'après les résultats obtenus sur les animaux nourris avec des diètes riches en lipides ainsi que d'après ceux obtenus chez les humains, une diminution de l'activité de cette voie semble participer au développement de la stéatose. Il se pourrait qu'à mesure que la SHNA se développe et s'amplifie, cette voie soit activée de façon à minimiser l'accumulation de lipides hépatiques. Cette hypothèse reste par contre à être vérifiée.

1.3. Conséquences de la stéatose hépatique : l'insulino-résistance hépatique

Il était autrefois admis que la simple présence de stéatose hépatique (sans inflammation) était une condition bénigne, mais il est maintenant clair que l'accumulation de lipides intrahépatique entraîne des conséquences néfastes au bon fonctionnement du foie (132). La principale conséquence de cette accumulation de lipides au sein du parenchyme hépatique, outre sa progression vers la stéatohépatite, est la résistance que développe le foie à la fonction inhibitrice qu'exerce l'insuline sur la production de glucose.

1.3.1. Régulation par l'insuline de la production hépatique de glucose

La production hépatique de glucose est un phénomène métabolique essentiel au maintien de la glycémie en période de demande énergétique (i.e. exercice, jeûne, stress, etc.). Elle se fait grâce à la glycogénolyse des réserves de glycogène hépatique ainsi qu'à la néoglucogenèse à partir de précurseurs carbonés dont les principaux sont le lactate, le pyruvate, l'alanine et le glycérol. Par contre, lorsque du glucose exogène est disponible, la mise en circulation du glucose par le foie doit cesser. L'insuline est la principale hormone qui inhibe la production hépatique de glucose (13, 191). Pour ce faire, l'insuline régule à la fois l'activité et l'expression d'enzymes clés du métabolisme des glucides au niveau hépatique (Figure 15). L'insuline a normalement pour effet de réprimer l'activité et l'expression des enzymes néoglucogéniques phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK), glucose-6-phosphatase (G-6-Pase) et fructose-1,6-bisphosphatase (F-1,6-Pase), ainsi que d'activer l'expression et l'activité d'enzymes de la glycolyse tels la glucokinase (GK), la phosphofructokinase (PFK) et la pyruvate kinase (PK) (177). L'insuline active aussi la glycogène synthase, favorisant ainsi la synthèse de glycogène hépatique plutôt que sa dégradation. L'action génique de l'insuline sur l'expression de ces enzymes se produirait via la régulation de facteurs de transcription tels le sterol-regulatory element binding protein (SREBP-1), le hepatic nuclear factor (HNF), la forkhead protein family (FoxA) et du cofacteur peroxisome proliferator-activated receptor- γ co-activator-1 (PGC1) (Figure 15).

Ces actions de l'insuline se produisent principalement via l'activation de la cascade de signalisation de la PI3K/PKB/Akt (Figure 16). En bref, la liaison de l'insuline à son récepteur provoque l'autophosphorylation du récepteur qui à son tour, provoque la phosphorylation de substrats appelés « insulin receptor substrates » (IRS) sur leurs résidus tyrosines. Les IRS phosphorylés représentent ainsi des sites de liaisons pour plusieurs protéines dont la PI3K. Lorsque liée à IRS, la PI3K active plusieurs protéines dont la PKB/Akt qui elle, régule les activités enzymatiques et transcriptionnelles de l'insuline (Figure 16). Une diminution de l'activité d'un ou plusieurs éléments de cette cascade de signalisation est donc susceptible de diminuer les effets de l'insuline.

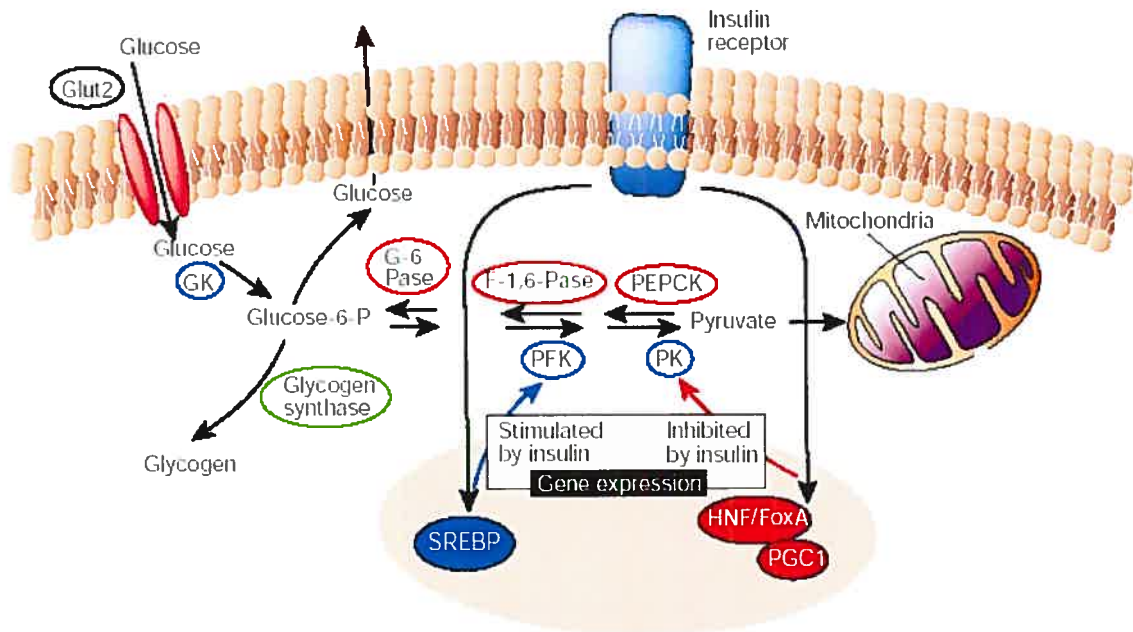


Figure 15. Régulation de la production de glucose hépatique par l'insuline. Au niveau hépatique, l'insuline inhibe l'expression et l'activité des enzymes néoglucogéniques (en rouge) glucose-6-phosphatase (G-6-Pase), fructose-1,6-bisphosphatase (F-1,6-Pase) et phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK). L'insuline active à la fois l'expression des enzymes glycolytiques (en bleu) glucokinase (GK), phosphofructokinase (PFK) et pyruvate kinase (PK). L'action génique de l'insuline sur l'expression de ces enzymes se produirait via la régulation de facteurs de transcriptions tels le *sterol-regulatory element binding protein* (SREBP), le *hepatic nuclear factor* (HNF), la *forkhead protein family* (FoxA) et du cofacteur *peroxisome proliferator-activated receptor- γ co-activator-1* (PGC1). L'insuline régule aussi de façon positive l'activité de l'enzyme glycogène synthase. GLUT2 : *Glucose transporter 2*. Adapté de Saltiel et Kahn (179).

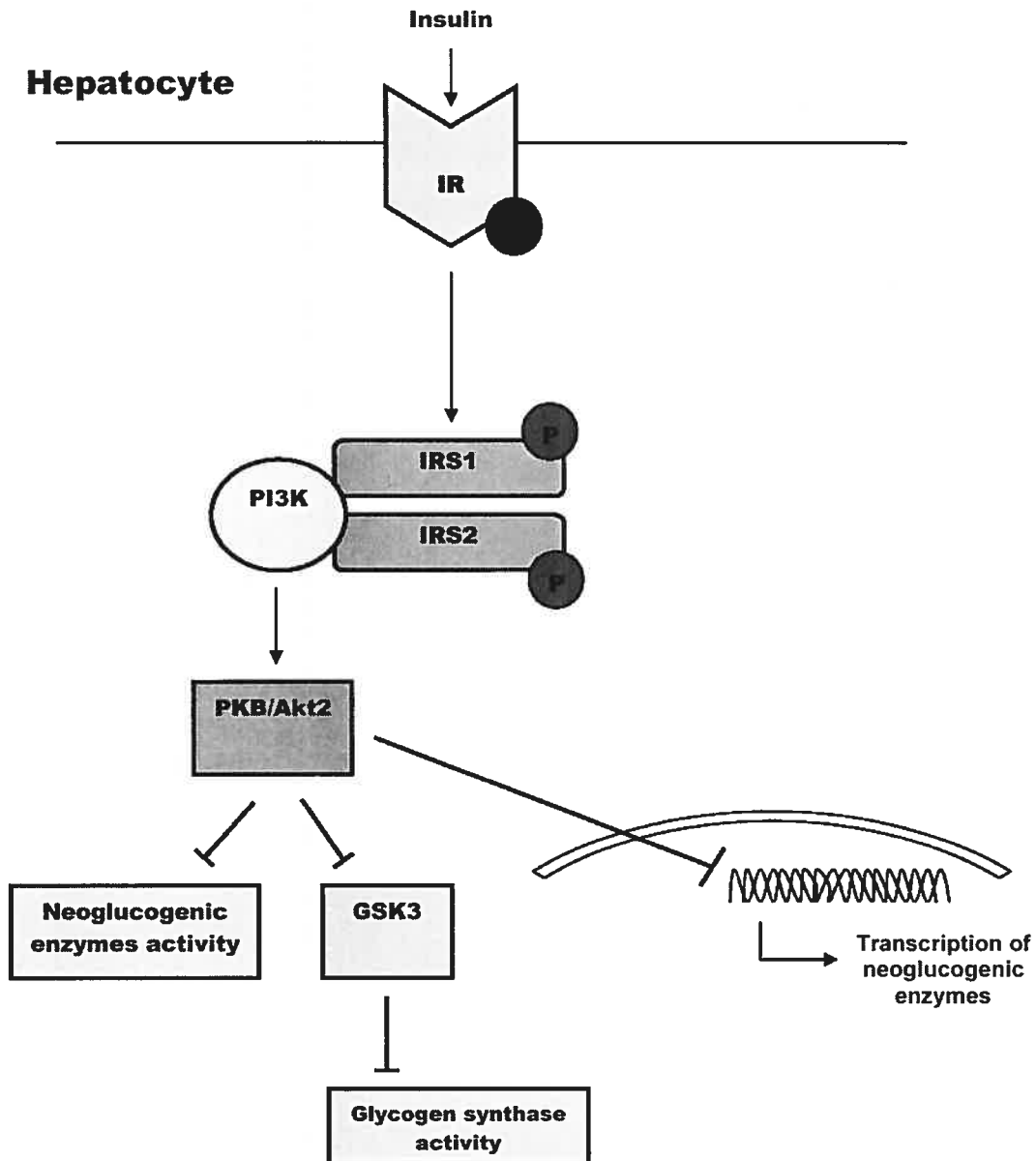


Figure 16. Schéma représentant les étapes principales de la cascade de signalisation de l'insuline impliquant PI3K/PKB/Akt. La liaison de l'insuline à son récepteur entraîne l'autophosphorylation de celui-ci qui à son tour provoque la phosphorylation de substrats appelés « insulin receptor substrates » (IRS) sur leurs résidus tyrosines. Les IRS phosphorylés représentent ainsi des sites de liaisons pour plusieurs protéines dont la PI3K. Lorsque liée à IRS, la PI3K active plusieurs protéines dont la PKB/Akt. PKB/Akt inhibe GSK3 qui elle inhibe la glycogène synthase, le résultat net étant une activation de la glycogène synthase par l'insuline. PKB/Akt inhibe l'activité et la transcription des enzymes néoglucogéniques. IR : récepteur à l'insuline; IRS1 : *insulin receptor substrate 1*; IRS2 : *insulin receptor substrate 2*; PI3K : phosphatidylinositol-3-kinase; PKB/Akt2 : protéine kinase B/protéine proto-oncogène Akt2; GSK3 : glycogène synthase kinase 3.

1.3.2. La stéatose hépatique : une cause vraisemblable de l'insulino-résistance hépatique

Les études épidémiologiques conduites chez l'humain ont permis de mettre en lien la présence de stéatose hépatique et d'insulino-résistance, mais pas de déterminer si la stéatose est une cause ou une conséquence de cette insulino-résistance (147, 148). L'utilisation du modèle animal, particulièrement celui de rats nourris de façon chronique avec une diète riche en lipides, a quant à elle permis de largement appuyer l'opinion selon laquelle la stéatose hépatique serait une cause de la résistance hépatique à l'insuline, ainsi que d'élargir les connaissances sur les mécanismes par lesquels cela se produirait.

Grâce à la mise au point et la validation chez le rat d'une technique de clamp hyperinsulinémique euglycémique, combiné à l'infusion de glucose marqué au ^{14}C ou au ^3H de façon à mesurer la production de glucose hépatique (121-123), il a tout d'abord été montré qu'une diète riche en lipides (HF) administrée chez le rat, comprenant 60% de lipides en terme d'énergie, réduisait l'effet suppresseur qu'exerce normalement l'insuline sur la production de glucose hépatique (119, 123, 124).

Cette insulino-résistance hépatique était appréciable après seulement 3 jours de diète HF alors que l'insulino-résistance musculaire, mesurée à l'aide de l'analyse de la prise par le muscle de [^3H]-2-deoxyglucose, n'était appréciable qu'à la suite de 3 semaines de diète HF (119). Dans cette étude, les auteurs émirent l'hypothèse que l'insulino-résistance musculaire se serait développée de concert avec l'accumulation de TAG intramusculaires (119). En effet, après trois jours de diète, les niveaux de TAG musculaires étaient semblables entre les rats nourris avec la diète standard (SD) et ceux nourris avec la diète HF alors qu'après 3 semaines de diète, les rats HF avaient des niveaux de TAG intramusculaires 2 fois plus élevés que les rats SD (119). Les auteurs ne rapportent malheureusement pas de valeurs de lipides intrahépatiques. Par contre, les résultats qu'ils avaient obtenus dans le muscle squelettique, ainsi que les résultats d'études précédentes dans lesquelles une stéatose hépatique avait été induite par des diètes HF (220, 221),

permettaient de soupçonner l'existence d'un lien entre la stéatose hépatique non-alcoolique et la résistance hépatique à l'insuline.

Par la suite, à l'aide du même protocole de diète HF (60%, kcal; 3 sem) et de clamp hyperinsulinémique euglycémique avec infusion de ^{14}C -glucose, l'équipe du professeur Kraegen (105) démontra cette fois que l'insulino-résistance hépatique observée chez les rats HF était associée à l'accumulation de lipides intrahépatiques. En effet, les niveaux de TAG hépatiques des rats HF étaient 3 fois supérieurs à ceux observés chez les rats SD (Figure 17D) (105). De plus, les rats HF avaient des concentrations hépatiques de malonyl-CoA supérieures aux rats SD (Figure 17E). Par contre, lorsque les rats HF avaient reçu une injection, 24 h avant le clamp, du composé 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside (AICAR), un activateur de l'oxydation des lipides via l'activation de la voie de l'AMPK, les niveaux de TAG et de malonyl-CoA diminuaient significativement et la suppression de la production de glucose lors du clamp revenait au niveau des rats SD (Figure 17 D, E, et C respectivement).

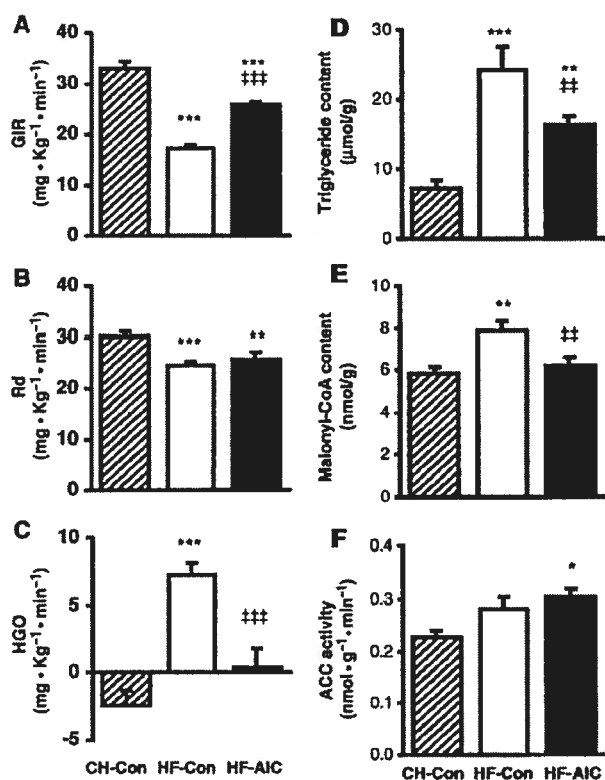


Figure 17. Graphiques tirés de l'étude de Iglesias et al. (105) sur l'effet d'une diète riche en lipides et de l'injection de 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside (AICAR) sur l'insulino-résistance hépatique. Taux d'infusion de glucose (GIR) (A), taux de disparition du glucose (Rd) (B), production de glucose hépatique (HGO) (C) lors des 30 dernières min d'un clamp hyperinsulinémiques euglycémiques; contenu hépatique en triacylglycérols (D), et en malonyl-CoA (E) et activité de l'enzyme acétyl-CoA carboxylase (ACC) hépatique (F) à la fin d'un clamp fait chez des rats nourris pendant 3 semaines à l'aide d'une diète standard (CH-Con), d'une diète riche en lipides (HF-Con), d'une diète riche en lipides 24 h après l'injection d'5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside (AICAR) (HF-AIC). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs CH-Con; †† $P < 0,01$; ††† $P < 0,001$ vs HF-Con.

Malheureusement, ces auteurs n'ont rapporté aucune donnée sur les mécanismes qui pourraient faire le lien entre l'accumulation de lipides intrahépatiques et la sensibilité hépatique à l'insuline. Par ailleurs, cette étude a permis de montrer que les traitements pharmacologiques visant à réduire les niveaux de lipides intrahépatiques rétablissent la sensibilité du foie à l'insuline, ce qui est d'ailleurs observé chez des rats atteints de stéatose et d'insulino-résistance hépatique lorsqu'ils sont traités à l'aide de metformine (136) ou de

ligands synthétiques des PPARs (246). Ainsi, ces résultats d'Iglesias et al. (105) permirent de confirmer l'hypothèse selon laquelle l'accumulation de lipides intrahépatiques pourrait mener à l'altération des effets supprimeurs de l'insuline sur la production de glucose hépatique.

Le rongeur nourri avec une diète HF pendant plusieurs semaines ne développe pas qu'une stéatose hépatique et de l'insulino-résistance, mais aussi de l'obésité (5, 101). Il est ainsi envisageable que cette obésité puisse agir en tant que facteur confondant dans l'induction de l'insulino-résistance hépatique. En effet, il est reconnu que les adipocytes engorgés libèrent des niveaux accrus de cytokines (i.e. TNF- α , IL-6, résistine, etc.) et que ces cytokines pourraient être impliquées dans l'induction de l'insulino-résistance hépatique (49). Néanmoins, plusieurs études dont au moins 3 conduites *in vivo*, ont montré que la stéatose hépatique est associée à l'insulino-résistance hépatique indépendamment de l'adiposité.

La 1^{ère} étude a été réalisée chez l'Homme. Dans cette étude, Seppälä-Lindroos et al. (197) ont étudié des sujets non obèses et non diabétiques présentant des niveaux semblables d'adiposité. Les sujets ont ensuite été séparés en deux groupes selon qu'ils avaient des niveaux faibles ou élevés de lipides hépatiques mesurés par SRMN. Les auteurs observèrent que les sujets avec des niveaux élevés de lipides hépatiques (10% du foie infiltré) étaient atteints d'insulino-résistance hépatique, telle que mesurée à l'aide d'un clamp hyperinsulinémique euglycémique avec infusion de ³H-glucose (197). Les sujets atteints de stéatose semblaient aussi atteints de résistance à l'insuline au niveau adipocytaire telle que montré par l'altération de l'effet inhibiteur de l'insuline sur les AGL circulants lors du clamp (197). Les auteurs conclurent ainsi que la stéatose hépatique était associée à de l'insulino-résistance et ce, de façon indépendante de l'obésité. Ces résultats suggèrent que la stéatose hépatique pourrait être une cause primaire de l'insulino-résistance hépatique et non une conséquence associée de l'obésité. Il est par contre à noter que chez les sujets atteints de stéatose hépatique, la présence d'insulino-résistance périphérique, suggérée par les taux élevés d'AGL circulants lors du clamp et une hyperinsulinémie à jeun, est susceptible d'avoir participé à l'induction de l'insulino-résistance hépatique (114,

172, 174). Il est ainsi impossible, à partir de ces résultats, de départager l'implication des lipides intrahépatiques de celle de l'insulino-résistance périphérique en tant que cause de l'insulino-résistance hépatique observée. De plus, aucun mécanisme pouvant expliquer le lien entre la stéatose et l'insulino-résistance n'était mis de l'avant dans cette étude (197).

La 2^e étude a été réalisée chez des souris A-ZIP/F-1 lipoatrophiques (115). Dans cette étude, Samuel et al. (115) montrèrent que malgré l'absence de dépôts adipeux, ces souris développent de l'insulino-résistance hépatique et musculaire marquée, associée à des niveaux élevés de lipides intracellulaires dans ces tissus. De plus, lorsque des dépôts adipeux étaient transplantés chez ces souris, cela engendrait une redistribution des lipides hors du foie et du muscle, rétablissant ainsi la sensibilité à l'insuline de ces tissus, mesurée lors d'un clamp hyperinsulinémique euglycémique avec infusion de ³H-glucose (Figure 18B et D) (115). Ces auteurs montrèrent de plus que l'accumulation de TAG intrahépatique était associée à une diminution de l'activité de la PI3K lorsqu'elle était stimulée par l'insuline et que cette activité était rétablie lorsque les niveaux de TAG intracellulaires revenaient à la normale (Figure 18C) (115). La diminution de l'activité d'éléments de la cascade de signalisation de l'insuline pourrait donc être à l'origine de l'augmentation de la quantité de F-1,6-Pase hépatique mesurée par immunobuvardage (208) et/ou de l'augmentation de l'activité de la G-6-Pase hépatique (166) observées suite à l'administration d'une diète HF chez le rat. Ceci pourrait, du moins en partie, expliquer l'augmentation de la production de glucose observée lors d'un clamp hyperinsulinémique euglycémique chez ces rats HF.

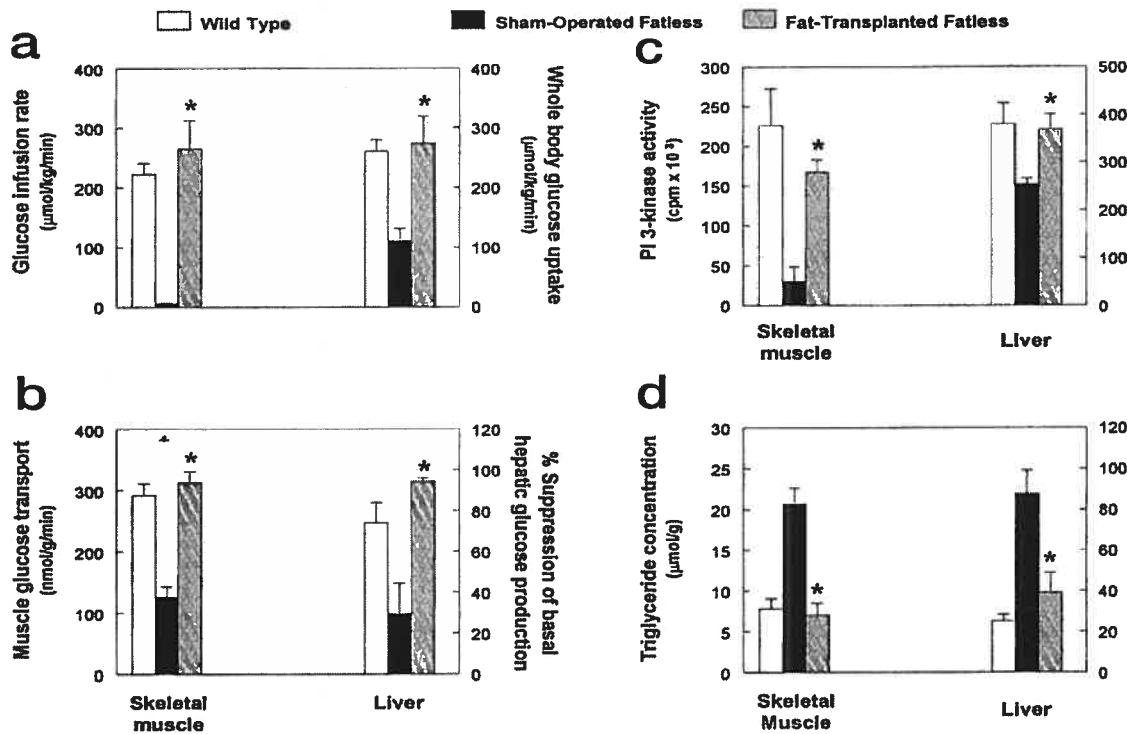


Figure 18. Graphiques tirés de l'étude de Kim et al. (115). Taux d'infusion de glucose et de prise de glucose systémique (A) et transport musculaire du glucose et pourcentage de suppression de la production de glucose hépatique (B) lors d'un clamp hyperinsulinémique euglycémique avec infusion de glucose tritié; activité de la PI3K musculaire et hépatique (C) et niveaux de TAG musculaires et hépatique (D) chez des souris contrôles (histogrammes blancs), lipoatrophiques (histogrammes noirs) et lipoatrophiques transplantées avec du tissu adipeux (histogrammes gris). Voir le texte pour plus d'informations.

À la lumière de ces résultats et de ceux de plusieurs études menées sur le muscle (voir références no (172, 205) pour revue), il apparaît de plus en plus clair que l'accumulation de lipides intracellulaires résulte en l'altération de l'activité d'éléments de la cascade de signalisation de l'insuline et donc, en l'insulino-résistance du tissu en question et ce, sans présence d'obésité. Il est par contre à noter que la présence de stéatose hépatique chez les souris lipoatrophiques est aussi associée à de l'insulino-résistance périphérique et des niveaux élevés d'AGL circulants comparativement aux souris contrôles. Ainsi, tout comme dans l'étude de Seppälä-Lindroos et al. (197), il est impossible de dissocier l'accumulation de lipides intracellulaires de facteurs extra hépatiques tels l'insulino-résistance périphérique et les taux élevés d'acides gras dans l'induction de l'insulino-résistance hépatique.

À ce sujet, l'étude de Samuel et al. (192) du laboratoire du Dr Shulman permit non seulement de dissocier la stéatose hépatique de l'obésité, mais aussi de l'insulino-résistance périphérique. Pour ce faire, ils nourrirent des rats avec une diète HF pendant 3 jours, ce temps étant rapporté par Kraegen et al. (119) comme suffisant pour induire une insulino-résistance hépatique, mais trop court pour observer de l'insulino-résistance périphérique. Tel qu'escompté, en 3 jours de diète HF, les niveaux de TAG et de LCFA-CoA hépatiques triplèrent, ce qui était associé à l'absence totale d'inhibition de la production de glucose hépatique lors d'un clamp hyperinsulinémique euglycémique (192). Aucun effet de la diète HF n'était observable sur les TAG intramusculaires et l'insulino-résistance périphérique (192). De plus, les auteurs validèrent le lien entre les lipides intrahépatiques et la sensibilité à l'insuline du foie en administrant du 2,4-Dinitrophénol (DNP) à un groupe de rats HF, un composé pharmacologique augmentant l'oxydation des lipides. Le DNP eut pour effet de rétablir les niveaux d'acyl-CoA à la normale et de largement améliorer la sensibilité du foie à l'insuline (Figure 19A et B).

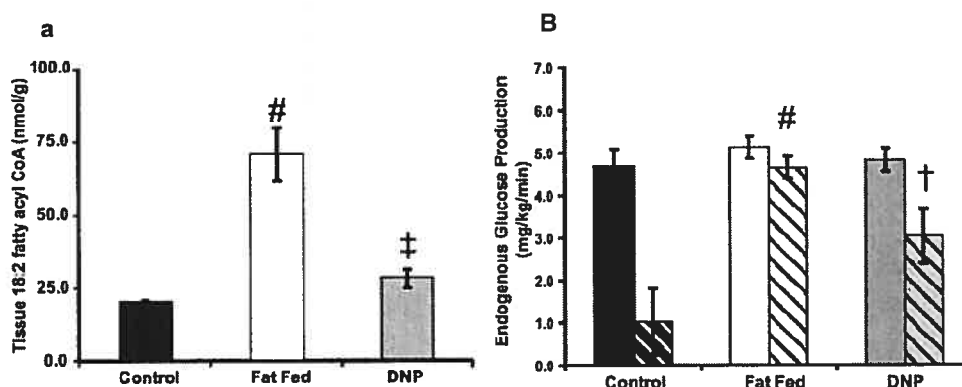


Figure 19. Graphiques tirés de (192). Niveaux de LCFA-CoA 18:2 hépatiques (A) et production hépatique de glucose avant (histogrammes pleins) et durant (histogrammes hachurés) un clamp hyperinsulinémique euglycémique (B) chez des rats nourris avec une diète SD (*Control*), une diète HF (*Fat fed*) et une diète HF avec 16 mg/kg/jour de DNP (DNP), pendant 3 jours. # $P < 0,001$ vs *Control*; † $P < 0,05$ vs *Fat fed*; ‡ $P < 0,01$ vs *Fat fed*.

Ces auteurs étudièrent également plusieurs étapes de la cascade de signalisation de l'insuline au niveau hépatique afin de déterminer à quel(s) échelon(s) elle pourrait être affectée par la diète riche en lipides. Ils observèrent ainsi qu'avec la stéatose hépatique

induite par la diète HF et lorsque stimulé par l'insuline *in vivo*, était associées 1) une diminution de la phosphorylation en tyrosine de IRS1 et IRS2, 2) une diminution de l'activité de la PI3K liée à IRS1 et IRS2, 3) une diminution de l'activité de PKB/Akt, 4) une augmentation de l'activité de GSK3, ce qui résultait finalement en 5) une diminution de l'activité de la glycogène synthase, un enzyme cible de la cascade de signalisation de l'insuline (Figure 20). De plus, l'administration de DNP de façon concomitante à la diète HF avait pour résultat de rétablir à la normale l'activité de tous les éléments mesurés de la cascade de signalisation de l'insuline. Ainsi, ces résultats de Samuel et al. (192) confirment ceux trouvés au sein des souris A-ZIP/F-1 (115), renforçant le concept voulant que les lipides intracellulaires altèrent les fonctions de l'insuline au niveau hépatique.

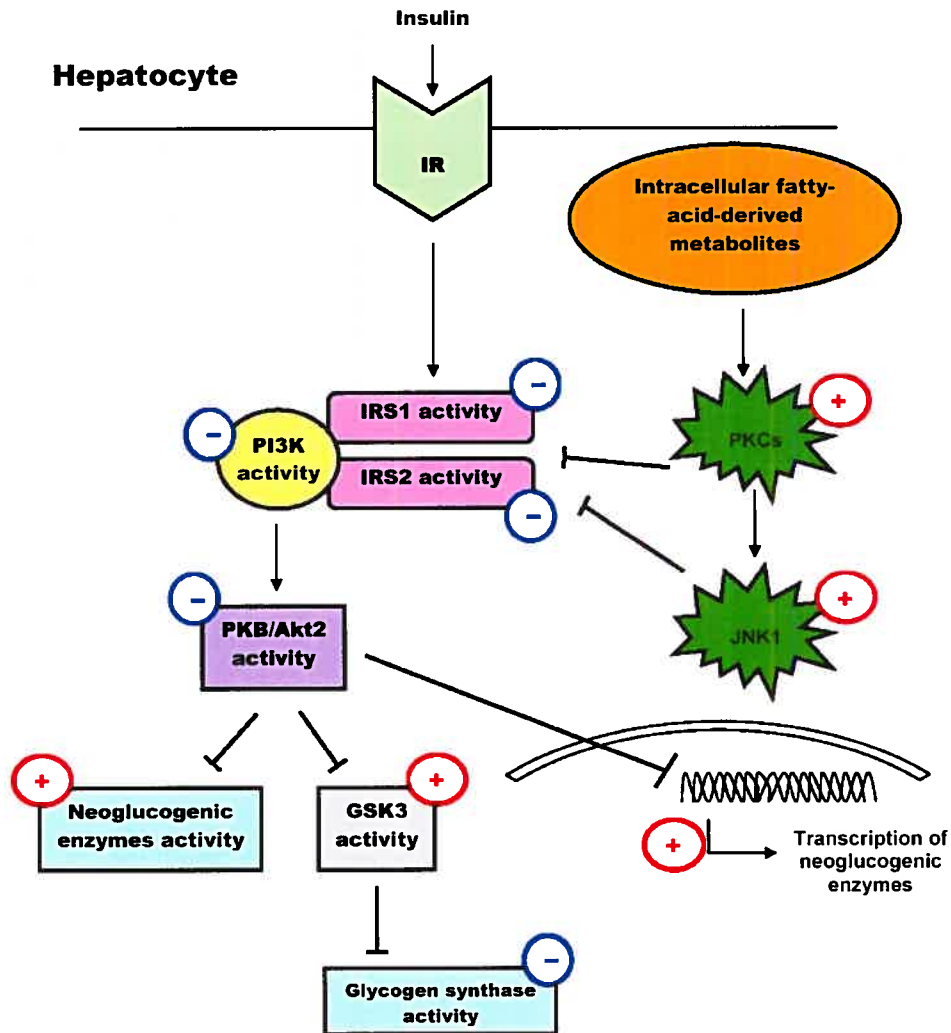


Figure 20. Schéma illustrant les mécanismes putatifs par lesquels les lipides intrahépatiques pourraient mener à l'insulino-résistance hépatique. L'accumulation de métabolites dérivés des acides gras activerait des protéines kinases C (PKC) qui pourraient activer c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1). Ces kinases inhiberaient l'activité des IRS et/ou de la PI3K associée aux IRS résultant en une inhibition de la suite des événements de la cascade de signalisation de l'insuline. Le résultat net de ceci serait une diminution de l'activité de la glycogène synthase, ainsi qu'une augmentation de l'activité et de la transcription des enzymes néoglucogéniques. Voir le texte pour plus d'informations. IR : récepteur à l'insuline; IRS1 : *insulin receptor substrate 1*; IRS2 : *insulin receptor substrate 2*; PI3K : phosphatidylinositol-3-kinase; PKB/Akt2 : protéine kinase B/protéine proto-oncogène Akt2; GSK3 : glycogène synthase kinase 3.

1.3.3. Mécanismes d'altération des fonctions de l'insuline par les lipides : activation de PKCs

Lors d'accumulation de lipides intracellulaires, il y a non seulement accumulation de TAG, mais aussi de plusieurs dérivés du métabolisme des acides gras tels les LCFA-CoA, les DAG et le malonyl-CoA (82, 172, 205). Il apparaît d'ailleurs de plus en plus clair que la présence accrue de TAG ne serait que le témoin, relativement bénin, d'une infiltration lipidique du tissu, alors que ce qui entraîne les effets néfastes de cette infiltration serait plutôt l'accumulation des dérivés des acides gras (172, 205). De ces dérivés, les DAG intracellulaires (162) et peut-être les LCFA-CoA (189) sont des activateurs connus des PKCs. Au niveau musculaire, plusieurs études ont montré que l'activation de certaines protéines kinases C (PKC) serait à l'origine de l'insulino-résistance induite par les lipides via la phosphorylation en sérine (Ser) des IRS1 qu'elles induisent (85, 106, 114, 248). Cette phosphorylation en Ser de IRS1 interférerait avec sa phosphorylation en tyrosine et sa liaison avec la PI3K et conséquemment, altérerait les événements subséquents de la voie de signalisation de l'insuline, menant ainsi à l'insulino-résistance musculaire (85, 106, 114, 248). L'infusion aigue de lipides chez le rat a permis de soupçonner qu'il puisse exister un mécanisme semblable au niveau hépatique, cette infusion ayant conduit à l'activation de la PKC- δ associée à une diminution de la sensibilité à l'insuline du foie (126). Il se pourrait aussi que les effets inhibiteurs des PKCs sur la cascade de l'insuline soient médiés par l'activation de c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) que les PKCs provoquent (192). En effet, il a été rapporté que les PKCs active la JNK1 (38) et la JNK1 a été impliquée en tant que médiatrice de l'insulino-résistance induite par les lipides, possiblement via son effet phosphorylant en Ser³⁰⁷ de IRS1 (102, 129).

Dans leur étude, Samuel et al. (192) ont ainsi voulu vérifier s'il était possible que l'activation de la JNK1 et d'isoformes des PKCs ait pu mener à l'insulino-résistance hépatique observée chez les rats HF. Ils ont donc mesuré l'activité de plusieurs des isoformes (δ , α , β -1, ζ , et ϵ) de la PKC. De ces isoformes, seule la PKC- ϵ était activée chez les rats HF de l'étude de Samuel et al. (192), alors que Lam et al. (126) avaient plutôt trouvé qu'une infusion aigue de lipides provoquait l'activation de la PKC- δ au niveau hépatique. Ces résultats divergents s'expliquent possiblement par la différence entre les

effets d'une infusion aigue de lipides et l'administration d'une diète HF de façon chronique (192). Samuel et al. (192) trouvèrent aussi que les rats nourris avec une diète HF pendant 3 jours avaient une activité hépatique de la JNK1 3 fois plus élevée que les rats SD et que la JNK1 se liait à la fois à IRS1 et IRS2. Par contre, ils ne trouvèrent aucune augmentation de la phosphorylation en Ser³⁰⁷ de l'IRS1 chez les rats HF et suggérèrent que cette conséquence de l'activation de la JNK1 puisse être un événement qui se produise plus tard dans la chronologie de la pathogenèse de l'insulino-résistance hépatique induite par la stéatose hépatique (192). Quoi qu'il en soit, les activités de la PKC- ϵ et de la JNK1 étaient ramenées à la normale par le traitement au DNP des rats HF, suggérant un rôle potentiel de ces kinases dans le développement de l'insulino-résistance hépatique induite par la stéatose (Figure 20).

Ces résultats ont été confirmés par l'étude de Neshen et al. (162) conduite chez des souris dont le gène de l'enzyme glycérophosphate acyltransférase mitochondriale (mtGPAT) a été supprimé (mtGPAT^{-/-}). L'enzyme mtGPAT est responsable de l'acylation du glycérol-3-phosphate menant à la formation d'acide lysophosphatidique (Figure 21). Cette réaction représente l'étape limitante dans la synthèse de TAG *de novo*. Contrairement à leurs contrôles, lorsque nourries avec une diète HF ces souris mtGPAT^{-/-} sont caractérisées par l'absence de stéatose hépatique, une suppression de la production hépatique de glucose par l'insuline tout-à-fait normale et de faibles niveaux de DAG intrahépatiques. Comparativement à leurs contrôles, les souris mtGPAT^{-/-} présentent aussi, au niveau hépatique, une activité supérieure de la PI3K associée à IRS2, une activité supérieure de PKB/Akt2 et une activité moindre de la PKC- ϵ . Il est intéressant de noter que ces souris mtGPAT^{-/-} ont par contre des niveaux intrahépatiques de LCFA-CoA plus élevés que leurs contrôles mais sans altération de la sensibilité hépatique à l'insuline. Ces résultats remettent en question le rôle des LCFA-CoA dans l'insulino-résistance induite par les lipides et mettent plutôt l'accent sur les DAG en tant que métabolites dérivés des acides gras inducteurs de l'insulino-résistance.

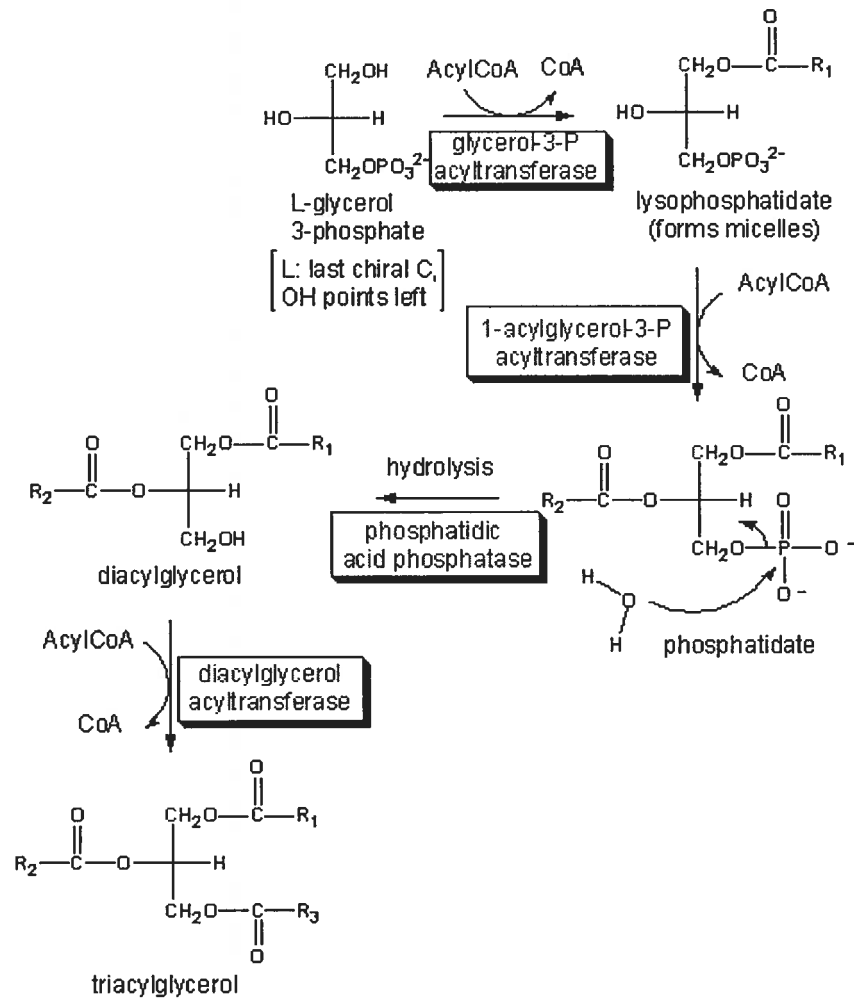


Figure 21. Synthèse de TAG *de novo* à partir de glycérol-3-phosphate et d'acyl-CoA. La première étape consiste en l'acylation du glycérol-3-phosphate afin de former de l'acide lysophosphatidique. Cette réaction est catalysée par l'enzyme mitochondrial glycérophosphate acyltransférase (mtGPAT) et représente l'étape limitante de cette voie anabolique (162). Il y a ensuite une seconde acylation entraînant la formation d'acide phosphatidique à l'aide de l'enzyme 1-acylglycérol-3-phosphate acyltransférase (AGPAT). Il y a ensuite formation de diacylglycérol suite à l'hydrolyse de l'acide phosphatidique à l'aide de la *phosphatidic acid phosphatase* (PAP). Finalement, le triacylglycérol est formé suite à l'acylation du diacylglycérol par l'enzyme diacylglycérol acyltransférase (DGAT).

En conclusion, le modèle d'induction de la stéatose hépatique par une diète riche en lipides chez le rat permet de mettre en évidence l'existence d'un lien étroit entre l'accumulation de lipides intrahépatiques et le développement d'insulino-résistance hépatique. Il apparaît vraisemblable que les métabolites dérivés des acides gras soient responsables d'altération de l'activité d'éléments de la cascade de signalisation de l'insuline. Ceci pourrait être médié par l'activation de PKCs et/ou de JNK1 par les lipides et résulterait en une diminution de l'effet supprimeur qu'exerce l'insuline sur la production de glucose hépatique.

1.4. Exercice et stéatose hépatique non-alcoolique

L'entraînement physique est depuis longtemps recommandé afin de prévenir et de traiter l'obésité et le diabète de type 2 (9, 46, 62). De plus, les effets bénéfiques de l'exercice sur le muscle squelettique sont bien documentés (25, 78, 113, 165, 224). Cette reconnaissance des bienfaits de l'exercice a amené de plus en plus de chercheurs oeuvrant dans le domaine du NAFLD à recommander la pratique d'activité physique dans le traitement et la gestion de ce spectre d'affections hépatiques (16, 163, 213). De façon surprenante, très peu d'études expérimentales ont été consacrées à la détermination des effets de l'exercice sur la stéatose hépatique et l'insulino-résistance hépatique.

Chez les humains, à notre connaissance, aucune étude n'a été consacrée à l'examen des effets de l'entraînement physique sans manipulation de la diète sur la stéatose hépatique. Quelques auteurs se sont par contre intéressés aux effets de l'entraînement combiné à une diète hypocalorique sur la SHNA (217, 231).

Chez des patients obèses présentant une SHNA, 3 mois de diète restrictive ($\sim 1500 \text{ kcal} \cdot \text{jour}^{-1}$ pour des sujets de $\sim 85 \text{ kg}$; 20% protéines, 30% lipides, 50% glucides) et d'entraînement physique (quotidien, progressif jusqu'à 40 min de course $\cdot \text{jour}^{-1}$) a permis de réduire significativement le degré de stéatose hépatique mesurée à l'aide d'une analyse semi-quantitative de coupes histologiques (231). Malheureusement, cette étude ne comportait aucun groupe de sujets ayant seulement suivi le programme d'activité physique ou seulement suivi le programme de diète. Il est donc impossible à partir de cette étude de conclure sur les effets de l'entraînement sur la stéatose hépatique.

Dans leur étude, Tamura et al. (217) mesurèrent les effets d'une diète seule (D) ($\sim 1600 \text{ kcal} \cdot \text{jour}^{-1}$; 15% protéines, 25% lipides, 60% glucides) et de la combinaison de cette même diète et d'un programme d'entraînement (D + E) (1-1,5 h de marche par jour, 5-6 jour par sem, $\sim 170 \text{ kcal} \cdot \text{jour}^{-1}$) sur les lipides intrahépatiques chez des sujets atteints de

diabète de type 2 et de stéatose hépatique (groupe D : 10% d'infiltration; groupe D + E : 7% d'infiltration; mesuré par SRMN). Deux semaines de diète seule ou de diète et d'entraînement résultèrent en une diminution des lipides intrahépatiques de ~25% similaire (Figure 22). Le programme d'entraînement prescrit n'eut donc pas d'effet sur les niveaux de lipides intrahépatiques qui puissent s'ajouter à ceux de la diète seule. Il est difficile d'évaluer les effets de l'entraînement physique puisque cette étude ne comportait pas de groupe de sujets n'ayant suivi que le programme d'entraînement. Il est permis de suggérer qu'un programme d'entraînement se prolongeant sur plus de 2 sem aurait peut-être résulté en une plus grande diminution des lipides intrahépatiques que la diète seule. Il est aussi à noter qu'un nombre supérieur de sujets du groupe D + E, que du groupe D, utilisait de la metformine afin de traiter leur diabète de type 2. La metformine étant reconnue pour diminuer les niveaux de lipides hépatiques, il est possible que l'exercice n'ait pu surpasser les effets déjà présents du médicament additionnés de ceux de la diète.

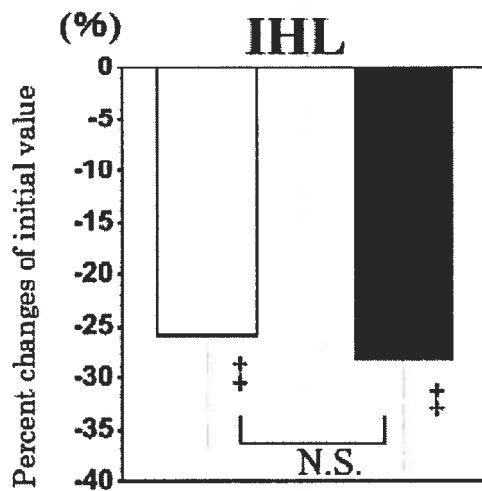


Figure 22. Graphique tiré de (217) illustrant le pourcentage de changement des lipides intrahépatiques (IHL) de patients atteints de stéatose hépatique et de diabète de type 2 après 2 sem de diète hypocalorique (histogramme blanc) et de 2 sem de diète hypocalorique combinée à un programme d'entraînement à la marche (histogramme noir).

Quelques recherches menées chez le rat ont été consacrées à l'étude de l'exercice sur la stéatose hépatique, mais elles datent pour la plupart de plus de 10 ans et rapportent des résultats contradictoires. Les détails expérimentaux et les résultats de ces études sont

présentés de façon synthétisée au Tableau V. En somme, 6 études ont examiné les effets d'un programme d'entraînement opéré de façon concomitante à une diète riche en lipides (63, 160, 187, 212, 219) ou riche en éthanol (229) destinée à l'induction d'une stéatose hépatique. Deux études ont évalué les effets d'un programme d'entraînement et d'une diète débutés à la suite de l'induction d'une stéatose hépatique induite par une diète HF (220, 221).

Tableau V. Tableau synthèse des études publiées sur les effets de l'entraînement sur la stéatose hépatique non-alcoolique.

Référence	Souche	Traitements	Résultats concernant les lipides hépatiques	Conclusion
Narayan et al., 1975 (160)	Rats Holtzman mâles (340 g) n = 10/groupe	<ul style="list-style-type: none"> • Diète HF (65% lipides, kcal) ou SD (9% lipides, kcal) pendant 6 sem • Entraînement : concomitant, tapis roulant progressif sur 6 sem, 3 dernières sem : 80-85 min, 23 m/min, 8,5% pente, 5 jour/sem 	SD-Sed: TAG: 9,27 ± 4,6 mg/g; Lipides: 41,8 ± 4,1 mg/g HF-Sed: TAG: 17,6 ± 5,5 mg/g; Lipides: 76,1 ± 7,7 mg/g SD-Tr: TAG: 16,8 ± 4,3 mg/g; Lipides: 48,1 ± 15 mg/g HF-Tr : TAG: 8,66 ± 2,7 mg/g; Lipides: 46,4 ± 5,5 mg/g	6 sem d'entraînement concomitant à une HF prévinrent l'induction de la stéatose hépatique
Estadella et al., 2004 (63)	Rats Wistar mâles (3,5 sem) n = 10/groupe	<ul style="list-style-type: none"> • Diète HF (35% lipides, kcal) ou SD pendant 8 sem • Entraînement : concomitant, nage (32-36 °C) 90 min avec poids de 5% du poids corporel attaché à la queue, 5 jour/sem, 8 sem 	SD-Sed: Lipides: 37,4 ± 1,1 mg/g HF-Sed: Lipides: 53,0 ± 3,1 mg/g SD-Tr: Lipides: 34,8 ± 0,7 mg/g HF-Tr : Lipides: 46,8 ± 1,3 mg/g	8 sem d'entraînement concomitant à une diète HF réduisirent significativement le degré de stéatose hépatique.
Rothfeld et al., 1977 (187)	Rats Sprague-Dawley mâles (3 sem) n = 8/groupe	<ul style="list-style-type: none"> • Diète HF pendant 3 sem • Entraînement : concomitant, cages avec roue libre 	HF : TAG : 337,7 ± 23,3 mg% HF-Tr : TAG : 301,6 ± 38,1 mg%	3 sem d'entraînement concomitant à une diète HF réduisirent la stéatose hépatique
Trudell et al., 1995 (229)	Rats Sprague-Dawley n = 6/groupe	<ul style="list-style-type: none"> • Diète SD seule ou avec 5% éthanol (Eth), pendant 7 sem • Entraînement concomitant : tapis roulant, progressif sur 7 sem, 4 dernières sem : 27 m/min, 60 min/jour, 5 jour/sem 	Analyse histologique semi quantitative : SD-Sed : grade 0 de stéatose SD-Eth : grade 2,5 de stéatose SD-Tr : grade 0 de stéatose Eth-Tr : grade 0,5 de stéatose	7 sem d'entraînement concomitant à une diète riche en éthanol prévinrent l'induction de la stéatose hépatique alcoolique.

Strackowski et al., 2001 (212)	Rats Wistar mâles (5 sem) $n = 12$ /groupe	<ul style="list-style-type: none"> ● Diète HF (59% lipides, kcal) ou SD pendant 3 sem ● Entraînement : concomitant commencé 1 sem avant la diète, tapis roulant progressif sur 4 sem, 2 dernières sem : 180 min, 20 m/min, 10% pente, 6 jour/sem 	<p>SD-Sed: TAG: ~3 mg/g HF-Sed: TAG: ~8,8 mg/g SD-Tr: TAG: ~6 mg/g HF-Tr: TAG: ~8 mg/g</p>	4 sem d'entraînement concomitant à une diète HF ne prévint pas l'induction de la stéatose hépatique
Terao et al., 1987 (219)	Rats Wistar mâles (280-310 g) $n = 6$ /groupe	<ul style="list-style-type: none"> ● Sem 0 à 5 : diète SD + 10% sucrose ● Sem 5 à 10 : 15 g diète SD + 8 g de jaune d'œufs par jour; avec ou sans entraînement (tapis roulant, 5 jour/sem, 10% pente progressif : 2 dernières sem 20 m/min, 60 min/jour) 	<p>Sed : TAG : ~42 mg/g Tr : TAG : ~35 mg/g</p>	5 sem d'entraînement ne permis pas de réduire de façon substantielle l'induction d'une stéatose hépatique à l'aide d'une diète HF.
Terao et al., 1988 (221)	Rats Wistar mâles (180-200 g) $n = 4-6$ /groupe	<ul style="list-style-type: none"> ● Sem 0 à 6 : diète HF (15% lard, 2% cholestérol, 83% de diète SD; kg) ● sem 6 à 12 : diète SD avec ou sans entraînement (tapis roulant, 10% pente, 5 jour/sem) <ul style="list-style-type: none"> ▪ marche (M) (10 m/min, 60 min) ▪ course faible (CF) (20 m/min, 30 min) ▪ course moyenne (CM) (30 m/min, 20 min) ▪ course rapide (CR) (40 m/min, 15 min) 	<p>Valeur basale après 6 sem de HF: TAG : ~70 mg/g Résultats à 12 sem : SD-Sed : TAG : ~35 mg/g SD-M : TAG : ~15 mg/g SD-CF : TAG : ~16 mg/g SD-CM : TAG : ~23 mg/g SD-CR : TAG : ~20 mg/g</p>	5 sem de diète SD seule ou accompagnée de l'un des 4 programmes d'entraînement réduisirent significativement la stéatose. Le programme M et CF réduisirent la stéatose de façon plus importante que la diète seule.
Terao et al., 1989 (220)	Rats Wistar mâles (180-200 g) $n = 4-8$ /groupe	<ul style="list-style-type: none"> ● Sem 0 à 6 : diète HF (15% lard, 2% cholestérol, 83% de diète SD; kg) ● sem 6 à 12 : diète SD avec ou sans entraînement (nage à 20°C ou 30°C, 30 min/jour, 5 jour/sem, 6 sem.) 	<p>Valeur basale après 6 sem de HF: TAG : ~60 mg/g Résultats à 12 sem : SD-Sed : TAG : ~30 mg/g SD-Tr-20°C : TAG: ~10 mg/g SD-Tr-30°C : TAG: ~20 mg/g</p>	6 sem de diète SD diminua la stéatose, d'autant plus lorsqu'un programme de nage était concomitant. Le programme de nage à 20°C élimina complètement la stéatose.

Dans leur étude, Narayan et al. (160) trouvèrent que 6 sem d'entraînement sur tapis roulant prévint complètement l'induction d'une stéatose hépatique par une diète HF (65% lipides, kcal) (Tableau V). En accord avec ces résultats, Rothfeld et al. (187) observèrent que 3 sem d'entraînement volontaire réduisit significativement l'accumulation de lipides hépatiques induite par une diète HF. Malheureusement cette étude ne comportait pas de rats contrôles ayant été nourris avec une diète SD, ceci rendant les effets de l'entraînement volontaire plus difficiles à apprécier. Estadella et al. (63) observèrent que 8 sem d'entraînement concomitant à une diète HF (35% lipides, kcal) réduisit significativement l'induction de la stéatose hépatique par la diète HF. Il semble par ailleurs que 7 sem d'entraînement menées de façon simultanée à une diète riche en éthanol aient presque complètement prévenu la stéatose alcoolique observée chez les rats sédentaires (229). Bien que les mécanismes qui provoquent la stéatose alcoolique soient différents de ceux qui induisent la SHNA, les résultats de cette étude permettent de supposer que l'entraînement physique pourrait prévenir l'accumulation de lipides hépatiques lors de stéatoses non-alcooliques.

Dans leur étude, Straczkowski et al. (212) n'observèrent aucun effet de l'entraînement lorsqu'il était entrepris de façon concomitante à une diète HF de 3 sem sur l'accumulation de TAG hépatiques. La raison qui pourrait expliquer ces résultats divergents reste obscure. Il est par contre à noter que Straczkowski et al. (212) observèrent des niveaux de TAG hépatiques très bas (8,8 mg/g) comparativement à ce qui est habituellement rapporté chez des rats nourris HF (Tableaux I et V). Il se pourrait que de si basses valeurs n'aient pu permettre d'apprécier les effets potentiels de l'entraînement. Finalement, Terao et al. (219) n'observèrent aucune différence significative entre les niveaux de stéatose hépatique de rats nourris pendant 5 sem à l'aide d'une diète HF et de rats qui étaient entraînés de façon simultanée à cette diète. Il est par contre à noter que dans cette étude (219) les rats étaient nourris avec une diète SD à laquelle était ajouté 10% de sucrose pendant 5 sem avant de débiter leur programme d'entraînement concomitant à la diète HF. Il a été rapporté que les diètes riches en sucrose induisent une stéatose hépatique (11, 157). Il se pourrait ainsi que les rats l'étude de Terao et al. (219) aient présenté une stéatose avant même de commencer leur programme d'entraînement. Il est possible que l'entraînement ne soit efficace que pour contrer l'induction de la stéatose et non pour résorber une stéatose déjà installée d'autant

plus lorsqu'un nouveau stimulus d'induction de la stéatose (i.e. diète HF) est initié en même temps que le programme d'entraînement.

D'autre part, Terao et al. (220, 221) ont aussi étudié les effets de l'entraînement débuté de façon subséquente à l'induction d'une SHNA de manière à évaluer si l'entraînement peut résorber la stéatose lorsqu'elle est déjà présente. Les programmes d'entraînement évalués étaient par contre combinés à un changement de diète (de HF à SD) ceci rendant, une fois de plus, les effets de l'entraînement plus difficile à évaluer. Dans ces deux études (220, 221), une SHNA était tout d'abord induite à l'aide de 6 sem de diète HF. À la suite de ces 6 sem, les rats étaient nourris à l'aide d'une diète SD en restant sédentaires, ou en suivant différents programmes d'entraînement à la nage (220) ou sur tapis roulant (221) et ce, pendant 6 autres sem (Tableau V).

En bref, 6 sem de diète SD à la suite de 6 sem de diète HF eurent pour résultat de diminuer le contenu en TAG hépatiques de moitié (de ~70 mg/g à ~35 mg/g) alors que, quelqu'il soit, l'entraînement combiné à la diète SD eut pour effet de réduire la stéatose de manière encore plus prononcée que la diète SD seule (Tableau V). Il semble que des 2 programmes d'entraînement à la nage, celui s'étant déroulé dans de l'eau dont la température était réglée à 20°C ait été plus efficace que celui dans de l'eau à 30°C, résorbant la quantité de TAG hépatiques à ~10mg/g et éliminant tout signe qualitatif de stéatose (220). Face à ces résultats, les auteurs suggérèrent qu'une certaine quantité de lipides hépatiques étaient utilisée afin de maintenir la température corporelle.

Des 4 programmes d'entraînement sur tapis roulant étudiés, le programme de marche (10 m/min, 60 min/jour) et celui de course lente (20 m/min, 30 min/jour) furent plus efficaces pour résorber la SHNA que ceux de course à vitesse moyenne (30 m/min, 20 min/jour) et rapide (40 m/min, 15 min/jour) (221). Il semble ainsi que l'utilisation de lipides hépatiques, et donc la résorption de la stéatose, soit plus importante lors d'exercices à basse intensité. Ces résultats entrent ainsi en contradiction avec ceux de l'étude de Tamura et al. (217) (Figure 21), dans laquelle l'ajout d'entraînement à la marche à une diète hypocalorique ne réduisit pas plus la stéatose que la diète seule. Ce programme

d'entraînement de l'étude de Tamura et al. (217) était par contre très court (2 sem). De plus, il est difficile de comparer des études ayant été conduites chez l'humain à des études conduites chez le rat, surtout lorsque les designs expérimentaux sont si différents l'un de l'autre.

En résumé, il semble y avoir une tendance générale indiquant que l'entraînement physique pourrait avoir des effets d'une part préventifs et d'autre part curatifs sur la stéatose hépatique non-alcoolique. Par contre, un plus grand nombre d'études examinant les effets de l'entraînement seul et avec des designs expérimentaux mieux contrôlés est requis avant de tirer une conclusion ferme à ce sujet.

Par ailleurs, plusieurs effets extra et intrahépatiques liés à la pratique de l'exercice mènent à penser que la pratique d'activité physique puisse prévenir et/ou traiter la stéatose hépatique non-alcoolique. Au niveau extra hépatique, l'entraînement physique est connu pour diminuer l'adiposité (54, 103, 179, 204), améliorer la sensibilité périphérique à l'insuline (99, 113), réduire les niveaux d'AGL circulants (159) ainsi que pour améliorer l'effet supresseur qu'exerce l'insuline sur les concentrations plasmatiques d'AGL (100, 127). Ces facteurs étant tous susceptibles de participer au développement de la stéatose hépatique (voir section 1.2), leur amélioration par l'entraînement physique risque d'exercer un effet positif sur la SHNA.

Il n'existe dans la littérature aucune étude ayant été conduite dans le but de comprendre les mécanismes intrahépatiques via lesquels la pratique d'exercice puisse être bénéfique à la SHNA. Il existe par contre des évidences expérimentales indiquant que l'exercice aigu pourrait avoir des effets stimulants sur l'oxydation des lipides hépatiques et des effets inhibiteurs sur la synthèse des lipides hépatiques et ce, via l'activation de la voie de l'AMPK (33, 171). L'activation de cette voie par l'exercice aigu pourrait ainsi être un des mécanismes par lesquels l'entraînement physique qui est la répétition de plusieurs sessions d'exercice pourrait prévenir et/ou traiter la stéatose hépatique non-alcoolique.

1.4.1. L'activation de la voie de l'AMPK hépatique par l'exercice aigu : un mécanisme potentiel de traitement de la stéatose hépatique et de l'insulino-résistance hépatique

L'*adenosin monophosphate-activated protein kinase* (AMPK) est une protéine kinase qui joue un rôle crucial dans la régulation métabolique intracellulaire et systémique (31, 32). En réaction à une baisse des niveaux d'énergie cellulaire, le rôle de l'AMPK est de stimuler les voies métaboliques qui entraînent la formation d'ATP et d'inhiber les voies métaboliques requérant une consommation d'ATP. L'AMPK est un hétérotrimère formé d'une sous-unité catalytique α et de 2 sous-unités régulatrices β et γ (90). L'AMPK est activée de façon allostérique par l'augmentation du ratio AMP : ATP et de façon covalente par une ou plusieurs kinases qui phosphorylent l'AMPK sur le résidu Thr¹⁷² de sa sous-unité catalytique α (32, 89). Ces kinases situées en aval de l'AMPK ne sont pas encore très bien identifiées et ont donc été désignées AMPK-kinases (AMPKK); elles semblent aussi être activées par l'augmentation du ratio AMP : ATP, (32, 89). Il existe de plus en plus d'évidences expérimentales suggérant que le suppresseur de tumeur LKB1 puisse être une de ces kinases (Figure 23) (94, 243). L'activité de l'AMPK se mesure suite à l'immunoprécipitation de la protéine à partir du tissu étudié et la mesure de la capacité de l'AMPK à phosphoryler un peptide synthétique *in vitro* (233, 241). Il existe aussi des anticorps commercialisés reconnaissant la forme phosphorylée en Thr¹⁷², et donc la forme active, de l'AMPK. Il a été rapporté que l'état phosphorylé en Thr¹⁷² de l'AMPK mesuré par immunobuvardage est représentatif de son activité enzymatique mesurée dans toutes les conditions testées (31).

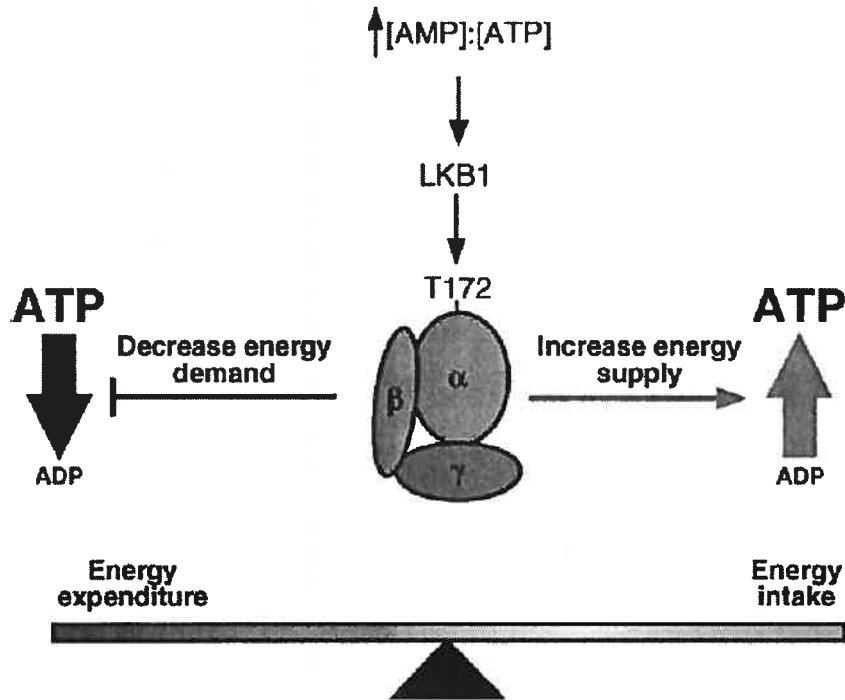


Figure 23. Structure et fonctions de l'AMPK. Voir le texte pour plus d'information. Tiré de Carling (32)

Rôle clé de l'AMPK dans la régulation du métabolisme des lipides au niveau hépatique

Au niveau hépatique, de plus en plus d'études mettent en évidence le rôle important que joue l'AMPK dans la régulation du métabolisme des lipides en activant leur oxydation et en inhibant leur synthèse (32, 33, 91, 171, 188, 253). L'inhibition de la synthèse des lipides par l'AMPK se produit de plusieurs façons : 1) par l'inactivation de l'ACC via la phosphorylation de son résidu Ser⁷⁹ (207), 2) par l'activation de l'enzyme malonyl-CoA décarboxylase (MCD) qui catalyse la décarboxylation du malonyl-CoA en acétyl-CoA (171), 3) par la diminution de l'activité de l'enzyme mtGPAT (158, 162, 171) 4) par l'inhibition de l'expression des gènes lipogéniques ACC et FAS (242) et ce, possiblement via 5) l'inhibition que l'AMPK exerce sur l'expression et l'activité de SREBP-1c (253). L'AMPK stimule l'oxydation des lipides via 6) la diminution des niveaux de malonyl-CoA, relevant ainsi la CPT-1 de son inhibition (171, 188, 234) et possiblement, via 7) la stimulation directe qu'elle exercerait sur la CPT-1 (234). Un schéma synthèse de la régulation de l'AMPK sur le métabolisme des lipides au niveau hépatique est représenté à la figure 24.

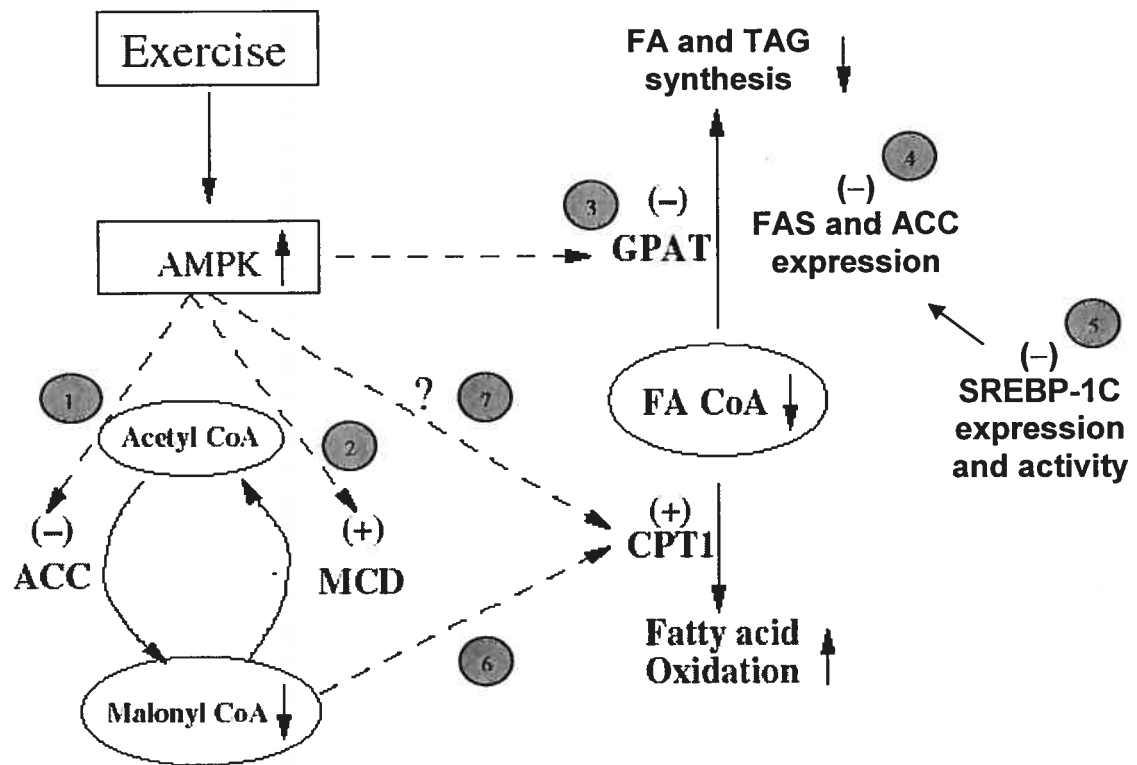


Figure 24. Effets de l'activation de l'AMPK par l'exercice aigu sur le métabolisme des lipides au niveau hépatique. L'augmentation de l'activité de l'AMPK entraîne une diminution des voies de synthèse des lipides et une augmentation de l'oxydation des lipides. Voir le texte pour plus d'informations. Modifié de Ruderman et al. (188).

L'exercice aigu active l'AMPK

Il est maintenant bien connu que l'exercice aigu a pour effet d'activer la voie de signalisation de l'AMPK au niveau du muscle squelettique et que ceci résulte en une augmentation de la prise de glucose par le muscle (i.e. augmentation de la sensibilité à l'insuline pendant et suite à l'exercice) et une augmentation de l'oxydation des lipides (78, 90, 188, 224).

L'effet de l'exercice aigu sur l'activation de l'AMPK dans des tissus autres que le muscle squelettique a été très peu étudié. Park et al. (171) ont observé une activation de l'AMPK hépatique 30 min après une période d'exercice aigu de 30 min sur tapis roulant (21 m/min,

10% de pente) chez des rats normaux nourris avec une diète SD. Cette activation de l'AMPK était associée à une diminution des niveaux hépatiques de malonyl-CoA, une diminution de l'activité de l'ACC et de la mtGPAT et une augmentation de l'activité de la MCD (171). Carlson et al. (33) ont aussi rapporté une augmentation de l'activité de l'AMPK hépatique et une diminution de l'activité de l'ACC chez des rats SD après 10 min de course sur tapis roulant à 32 m/min mais aucune modification significative dans l'activité de ces enzymes lorsque l'exercice était de plus longue durée et de plus faible intensité (120 min, 16 m/min, 15% de pente). La raison qui explique ces résultats divergents reste à être déterminée mais il est possible qu'un exercice à une vitesse de 16 m/min ne soit pas assez intense pour augmenter de façon significative l'activité de l'AMPK.

L'activation de l'AMPK par des composés pharmacologiques améliore la stéatose hépatique et l'insulino-résistance hépatique

Puisque l'AMPK stimule l'oxydation des lipides et inhibe leur synthèse et que l'accumulation de lipides intrahépatiques provoque l'insulino-résistance du tissu, l'activation de l'AMPK hépatique par l'exercice pourrait être un mécanisme potentiel par lequel l'exercice aigu et/ou l'entraînement réduirait la stéatose hépatique et, conséquemment, l'insulino-résistance hépatique induite par les lipides. À l'appui de cette hypothèse, rappelons l'étude d'Iglesias et al. (105) qui montra qu'une seule injection d'AICAR (un agent pharmacologique reconnu pour activer l'AMPK) rétablit la sensibilité hépatique à l'insuline et diminua la stéatose hépatique chez des rats nourris durant 3 semaines avec une diète HF (60%, kcal). Ces résultats permirent d'ailleurs aux auteurs de suggérer que l'activation ponctuelle de l'AMPK à l'aide de l'injection d'AICAR permit d'améliorer la sensibilité hépatique à l'insuline vraisemblablement via l'effet activateur que l'AMPK exerce sur l'oxydation des lipides. Toutefois, il est à noter que l'AICAR n'est pas un activateur spécifique de l'AMPK. Il se pourrait donc que les effets obtenus après injection d'AICAR aient été engendrés par une autre voie métabolique que celle de l'AMPK hépatique. Par ailleurs, il est maintenant accepté que les effets thérapeutiques de la metformine sur la stéatose hépatique et l'insulino-résistance hépatique sont dus à l'activation qu'elle exerce sur l'AMPK (252, 253). D'autre part, il a été suggéré que le

développement du diabète de type 2 et de niveaux élevés de malonyl-CoA hépatiques chez des rats ZDF seraient en partie attribuables à une activité moindre de l'AMPK chez ce modèle génétique de diabète de type 2 (249).

À la lumière de ces résultats, il est permis de postuler qu'une activité moindre de l'AMPK de façon chronique puisse participer au développement de la stéatose et de l'insulino-résistance hépatiques. Ce pourrait d'ailleurs être un des mécanismes participant à l'induction de la stéatose hépatique par les diètes riches en lipides. Aucune étude ne fait toutefois état de données concernant l'activité de l'AMPK hépatique lors de diètes HF.

D'autre part, l'activation de l'AMPK hépatique par l'exercice aigu semble réduire les niveaux de malonyl-CoA hépatiques et activer l'oxydation des lipides hépatiques chez des rats normaux (171). Il est donc légitime de penser que les effets préventifs et/ou curatifs de la répétition de sessions d'exercice (i.e. l'entraînement) sur la stéatose hépatique puissent être engendrés par l'activation de la voie de l'AMPK hépatique. Aucune étude expérimentale n'a été consacrée au rôle que l'AMPK hépatique peut potentiellement jouer en tant que médiatrice des effets de l'exercice et de l'entraînement dans des cas de stéatose hépatique.

Par ailleurs, étant donné les effets néfastes de l'accumulation de lipides intrahépatiques sur l'insulino-résistance hépatique et puisque l'exercice aigu semble réduire les niveaux de lipides intrahépatiques grâce à l'activation de la voie de l'AMPK hépatique (171), il se pourrait que l'exercice aigu puisse améliorer la sensibilité du foie à l'insuline. À notre connaissance, les effets de l'exercice aigu sur l'insulino-résistance hépatique n'ont été examinés que dans une seule étude. Oakes et al. (165) ont mesuré la production de glucose lors d'un clamp hyperinsulinémique euglycémique chez des rats chez qui de l'insulino-résistance avait été induite par 3 sem de diète HF (60%, kcal). Dans cette étude, 2 h de nage n'eurent aucun effet bénéfique sur l'insulino-résistance hépatique mesurée lors du clamp et les lipides intrahépatiques ne furent pas mesurés lors de cette étude. Il est à noter que l'expérience était conduite 24 h après la fin de la période d'exercice et que les rats continuaient d'être nourris avec une diète riche en lipides entre temps. Il est donc possible

que cette période de latence entre l'exercice et l'expérience ait permis aux effets bénéfiques de l'exercice de s'estomper, hypothétiquement dû au retour à la normale des lipides intrahépatiques durant ces 24 h. Il serait donc intéressant de mesurer la sensibilité hépatique à l'insuline immédiatement après une période d'exercice chez des rats HF et d'examiner s'il peut y avoir une association entre la sensibilité hépatique à l'insuline et l'activité de l'AMPK. Aucune donnée n'a été rapportée à ce sujet jusqu'à maintenant.

1.5. Hypothèses et objectifs des études de la thèse

La première étude réalisée dans le cadre de cette thèse s'est déroulée au début de l'année 2001. Suite à une recension de la littérature disponible à ce moment, il apparaissait de plus en plus clair que la stéatose hépatique d'origine non-alcoolique représentait un problème médical d'envergure. De plus, la notion d'association entre l'accumulation de lipides intracellulaires et la sensibilité à l'insuline commençait à se préciser. Par ailleurs, les études dans lesquelles les effets de l'entraînement physique sur la stéatose hépatique non-alcoolique avaient été évalués faisaient état de résultats contradictoires et les designs expérimentaux utilisés lors de ces études n'étaient pas toujours bien contrôlés. De plus, le type (micro- versus macrovésicules) de vésicules lipidiques infiltrées au sein du parenchyme hépatique n'avait encore été caractérisé de manière quantitative dans aucune étude.

Grâce à l'utilisation du modèle de rat nourris avec une diète HF (42%, kcal; 8 sem) afin d'induire une stéatose hépatique non-alcoolique, ce premier projet de recherche visait à évaluer si un programme d'entraînement (progressif sur 8 sem, tapis roulant, 26 m/min, 10% de pente, 5 jours/sem) concomitant à cette diète HF peut prévenir la stéatose hépatique normalement induite par ce type de diète. Le deuxième but de ce projet était de caractériser le type de stéatose hépatique induite par la diète HF en terme de micro- ou de macrovésicules et d'observer quels étaient les effets de l'entraînement (s'il y a lieu) sur les différents types de vésicules de lipides intrahépatiques. Pour ce faire, une analyse histologique quantitative fut faite à l'aide d'un logiciel de capture et d'analyse d'images couplé à un microscope. Ceci nous permis de calculer le nombre de vésicules de lipides et de les catégoriser selon leur surface, ainsi que de calculer la surface du parenchyme hépatique occupée par ces vésicules.

La conclusion principale de ce projet fut qu'un programme d'entraînement concomitant à une diète riche en lipides permet de prévenir complètement la stéatose hépatique normalement induite par cette diète. Nous nous sommes donc interrogés à savoir si le même programme d'entraînement mais débutant cette fois lorsque la stéatose hépatique

était déjà présente, permettrait de faire se résorber cette stéatose sans qu'il y ait changement de diète. Pour ce faire, les rats étaient nourris pendant 8 sem avec une diète HF de manière à ce qu'ils développent une stéatose hépatique. Ils débutèrent ensuite le programme d'entraînement (progressif sur 8 sem, tapis roulant, 26 m/min, 10% de pente, 5 jours/sem) tout en étant maintenus sur la diète HF (pour un totale de 16 sem sur la diète HF). À notre connaissance, cette étude était la première, et est encore la seule, consacrée à l'étude des effets de l'entraînement seul, sans changement de diète, sur la stéatose hépatique déjà présente.

De façon surprenante, nous avons observé que les rats sédentaires nourris durant 16 sem avec une diète HF, avaient des niveaux de TAG hépatiques semblables à ceux de rats nourris pendant 16 sem avec une diète SD (~15 mg/g vs ~12 mg/g; respectivement). Dans la 1^e étude, 8 sem de diète HF avaient significativement augmenté les niveaux de TAG hépatiques comparativement à 8 sem de diète SD (~17 mg/g vs ~9 mg/g; respectivement).

Ces résultats nous firent donc développer l'hypothèse de la 3^e étude voulant que lors de l'ingestion chronique d'une diète HF, contrairement au tissu adipeux, l'accumulation de lipides au niveau hépatique ne se produise pas de façon linéaire. Selon notre hypothèse, le foie accumulerait une grande quantité de lipides dans les premières sem de diète HF et ces niveaux de lipides hépatiques pourraient éventuellement se résorber avec le prolongement de la diète HF. À ce moment, les résultats de Kraegen et al. (119) suggéraient déjà que l'accumulation de lipides au niveau hépatique puisse se faire de façon plus rapide qu'au niveau adipocytaire et musculaire mais aucune information sur la cinétique du développement de la stéatose hépatique induite par une diète riche en lipides n'était disponible dans la littérature. Ainsi, afin de vérifier notre hypothèse, des rats furent nourris avec une diète HF pendant 1, 2, 4, 6, 8, 12 et 16 sem et comparés à des rats nourris avec une diète SD pendant 2, 6, 12, et 16. L'accumulation de lipides intrahépatiques fut comparée à celle du tissu adipeux et du profil sanguin. Les résultats de cette étude confirmèrent notre hypothèse et montrèrent que, contrairement à ce qui était vu dans le tissu adipeux et le profil lipidique sanguin, les lipides intrahépatiques ne s'accumulaient pas de façon linéaire dans le temps. L'accumulation de lipides intrahépatiques était importante

(~27 mg/g vs ~13 mg/g; rats HF vs rats SD, respectivement) dans les 2 premières sem de diète HF et que la SHNA se résorbait ensuite d'elle-même pendant les sem suivantes, pour se stabiliser à des niveaux plus bas après 16 sem de diète HF (~20 mg/g vs ~13 mg/g; rats HF vs rats SD, respectivement).

Au cours de la quatrième étude conduite dans le cadre de cette thèse nous avons voulu, cette fois, explorer la conséquence de la stéatose hépatique qu'est l'insulino-résistance hépatique et tester les effets de l'exercice aigu sur celle-ci. Tel que discuté au cours de la section 1.4.1, quelques données disponibles dans la littérature indiquaient que l'exercice aigu puisse activer l'AMPK hépatique et qu'en retour l'activation de l'AMPK puisse améliorer la sensibilité à l'insuline. En effet, l'activation de l'AMPK par des agents pharmacologiques avait été associée à une diminution de l'insulino-résistance hépatique à quelques reprises. Pourtant, aucune étude n'avait encore concilié ces données et étudié les effets de l'exercice aigu sur l'insulino-résistance hépatique et sur l'AMPK hépatique à la fois. De plus, il n'existait aucune donnée disponible dans la littérature sur l'état d'activation de l'AMPK lors de diètes HF. La 4^e étude présentée a donc été réalisée dans le but d'évaluer si l'exercice aigu est en mesure d'améliorer l'insulino-résistance hépatique induite par une diète riche en lipides (45%, kcal; 3 sem) et de voir si ceci est associé à l'activation de la voie de l'AMPK hépatique par l'exercice. Pour ce faire, des rats nourris avec une diète HF subirent un clamp hyperinsulinémique euglycémique avec infusion de ³H glucose 15 min après l'arrêt d'une session de 30 min sur tapis roulant (20 m/min, 0% de pente) et furent comparés à des rats nourris avec une diète SD ou HF restés au repos avant le clamp. Les niveaux hépatiques de phospho-AMPK, la forme activée de cette kinase, furent mesurés par immunobuvardage. Les résultats de cette étude révélèrent que les rats nourris avec une diète HF souffraient d'insulino-résistance hépatique associée à des niveaux de phospho-AMPK 30% plus faibles que les rats nourris avec une diète SD. Une session d'exercice aigu sur tapis roulant chez les rats HF améliora la sensibilité hépatique à l'insuline et rétablit les niveaux de phospho-AMPK à la normale.

2. Chapitre 2- études expérimentales

2.1. Étude 1-

Titre

Concurrent exercise prevents high-fat diet-induced macrovesicular hepatic steatosis.


Auteurs

Marie-Soleil Gauthier, Karine Couturier, Jean-Gilles Latour et Jean-Marc Lavoie.

Journal

Publié dans le *Journal of Applied Physiology* en 2003;

(J Appl Physiol 94: 2127–2134, 2003)

Concurrent Exercise prevents high-fat diet induced macrovesicular hepatic steatosis**Marie-Soleil Gauthier, Karine Couturier, Jean-Gilles Latour, and Jean-Marc Lavoie****Département de kinésiologie and département de pathologie et biologie cellulaire,
Université de Montréal, Montréal, Canada****Running title: Hepatic steatosis and exercise training****Mailing proofs: Dr. Jean-Marc Lavoie****Département de kinésiologie****Université de Montréal****C.P. 6128, Succ. centre-ville****Montréal (Québec) Canada H3C 3J7****Tel: (514) 343-7044****Fax: (514) 343-2181**


SUMMARY

The purpose of the present study was to assess the effect of an exercise training programme conducted concurrently with a high-fat diet regimen on the induction of hepatic steatosis. A novel tool was used to histologically quantify the accumulation of fat within hepatocytes, in terms of number and size of lipid vacuoles and, hence, to determine the type of steatosis (macrovesicular ($> 1 \mu\text{m}^2$ of surface area) and/or microvesicular ($< 1 \mu\text{m}^2$ of surface area)). Two groups of rats were either fed a standard (SD) or a high-fat (HF; 40% kcal) diet for eight weeks and were additionally assigned either to a sedentary (SED) or a treadmill-trained (TR) group. Training (5 days/wk) was initiated at the same time of the high-fat diet and was progressively increased reaching 60 min at 26 m/min, 10% grade, for the last 4 weeks. Liver lipid infiltration was histologically quantified using an image analysis computing system (Northern Eclipse, Empix Imaging Inc.). At the end of the 8-wk period, HF-SED rats exhibited $\sim 72\%$ higher liver triacylglycerol concentration than SD-SED rats ($X \pm \text{SE}$: 17.15 ± 1.5 vs 9.98 ± 1.0 mg/g; $P < 0.01$). Histological analysis revealed that although fat was mainly stored as microvesicles, the high-fat diet-induced hepatic steatosis occurred via the accumulation of macrovesicles. Concurrent exercise training completely prevented the high-fat diet-induced hepatic steatosis. The surface area of liver parenchyma infiltrated by lipid vacuoles was similar in HF-TR than in SD-SED rats (26.4 ± 1.8 vs $29.3 \pm 5.9 \times 10^3 \mu\text{m}^2 / 200,000 \mu\text{m}^2$ of liver parenchyma; respectively; $P > 0.05$). The resorption of hepatic steatosis with training was mainly macrovesicular. The different states of liver lipid infiltration following the high-fat diet in SED and TR rats were associated with similar changes in plasma non-esterified fatty acids and glycerol, as well as with similar changes in fat pads weights but not with plasma triacylglycerol levels. It is concluded that following a high-fat diet regimen of eight weeks in rats, hepatic steatosis occurs primarily via the accumulation of lipid as macrovesicles. Exercise training pursued at the same time completely prevents the high-fat diet-induced macrovesicular hepatic steatosis.

Key words: liver; fatty liver; lipid infiltration; lipid vacuoles; insulin resistance; adiposity

INTRODUCTION

Fatty liver, or steatosis, refers to a histopathological condition characterised by an excess accumulation of lipids, primarily triacylglycerols, within hepatocytes (30). Although simple steatosis is not strictly a form of hepatitis, it is included as part of the broad spectrum of non-alcoholic fatty liver diseases (7). The clinical significance of fatty liver is generally thought to be a benign process. A subset of patients, however, go on to develop steatohepatitis, which then progresses to fibrosis, cirrhosis, and liver failure (10, 170, 232). Fatty liver can be classified as macrovesicular or microvesicular steatosis, depending on the size of the lipid vacuoles. Besides chronic ingestion of alcohol, macrovesicular fatty liver is also seen in other conditions including type 2 diabetes, obesity, and the metabolic syndrome (146, 232).

Increasing interest in the causes and the consequences of liver lipid infiltration has been recently spurred by the finding that an association exists between the accumulation of triacylglycerol in tissues other than adipocytes and the development of a state of insulin resistance (191). Studies in fatless mice have demonstrated that fat accumulation in skeletal muscle and liver is associated with insulin resistance and insulin signalling defects (115, 186). Studies in humans have also indicated that hepatic fat content is closely associated with causes of insulin resistance such as obesity (146) and with defects in insulin suppression of glucose production independent of obesity (25). These data provide significant support to the emerging concept that fat accumulation in insulin-sensitive tissues is deleterious for insulin action. Consequently, reduction of hepatic fat accumulation might be considered as a new therapeutic target in the overall problem of insulin resistance.

Exercise training accompanied by a low-fat diet have long been prescribed as part of the treatment in the management of obesity and type 2 diabetes. In spite of this, there is no firm conclusion as to whether or not exercise training can prevent the induction of hepatic steatosis. Two studies conducted in the 1970's have indicated that exercise training can prevent the accumulation of fat in the liver of rats receiving a high-fat diet (160, 187). In more recent studies, conducted with use of a similar model of high-fat-induced obesity in

rats, an absence of effects of exercise on liver lipid accumulation was reported (212, 219). The reasons for this discrepancy are not clear, although differences in the diet-induced fatty liver, in the exercise training programme, and in the techniques used to assess liver lipid infiltration may all be candidate. The purpose of the present study was first to re-examine the effects of an exercise training programme pursued at the same time of a high-fat diet induced-obesity (40% in kcal) on the accumulation of lipids in the liver and the associated metabolic disturbances in plasma lipid profile, visceral and subcutaneous fat accumulation, and the development of insulin resistance. In addition, with the use of a novel image analysis computing system software program that enables precise morphological quantification of liver lipid infiltration, the present study was intended to precisely quantify the high-fat diet-induced macrovesicular and/or microvesicular hepatic steatosis in rats and the extent to which exercise training affects this classification.

METHODS

Animal care. Female Sprague-Dawley strain rats ($n=37$, Charles River, St-Constant, PQ, Canada), weighing 180-200g (6 weeks of age) upon their arrival were housed by pairs 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 and exercise protocol. A few days after their arrival, all animals were randomly assigned to a standard or a high-fat diet for 8 wks. Half of the animals in each dietary condition were concurrently exercise trained for the whole 8-wk period, while the other half remained sedentary. Hence, the four experimental groups consisted of standard fed rats in the sedentary (SD-SED, $n=9$) or the trained state (SD-TR, $n=9$), or high-fat fed rats in the sedentary (HF-SED, $n=9$) or the trained state (HF-TR, $n=10$). The HF diet consisted of 42% lipid, 36% carbohydrate, and 22% protein (kcal) and was provided in small pellets from ICN Pharmaceuticals (NY, USA). The standard diet (12.5% lipid, 63.2% carbohydrate, and 24.3 % protein; kcal) consisted of usual pellet rat chow (Agribrands Purina Canada, Woodstock, Ontario). Both diets are described in detail in Table 1.

Exercise training consisted of continuous running on a motor-driven rodent treadmill (Quinton Instruments, Seattle, WA) 5 times a wk for 8 wks. Rats were progressively run from 15 min/day at 15 m/min, 0% slope, up to 60 min/day at 26 m/min, 10% slope for the last 4 wks.

All rats were weighed 2 times per wk and their food intake in g was monitored 3 times per wk.

Intravenous glucose tolerance test. Six weeks after the beginning of the dietary and exercise protocols, all animals were submitted to an intravenous glucose tolerance test (ivGTT) while in an overnight-fasted state (~18 h). All exercise trained animals were

restrained from exercise 48 h before the test. The experiments were run between 09:00 AM and 13:00 PM. The ivGTT was conducted according to a modified technique of Bongbele et al. (20). On the morning of the test, animals were anaesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg, ip) and shaved on the right side of their neck. A venous catheter (PE50) was inserted in the right jugular vein and kept patent for the entire duration of the test with a sterile saline heparin solution (5 U/ml). A period of 15 min was allowed between the completion of the surgery and the beginning of the test to standardize the effects of the surgical stress. Blood samples were drawn at time -5 and 0 min to measure glucagon in the fasting state in addition to plasma glucose and insulin. The ivGTT consisted of an injection of a glucose bolus (0.5 g/kg of 50% dextrose solution) administered over a period of 10 s at time 0 min. The catheter was rinsed 4-6 times with the animal's blood in order to avoid any residual glucose in the catheter. Blood samples (0.5 ml) were collected in ethylene diamine tetraacetic acid rinsed syringe (EDTA, 15%) at 2.5, 5, 15, 25, 35, and 60 min following the glucose injection and the plasma was used for subsequent glucose and insulin analyses. Red blood cells from each sampling were resuspended in a Krebs-Heinseleit solution resembling plasma composition and re-injected into the animal. At the end of the ivGTT, the jugular catheter was removed and the vein closed as well as the opening on the neck of the animal. Penicillin (penicillin G procain, 40,000 U/kg, im) was injected in the right leg of the rat to prevent risks of infection. Animals were returned to their cages and housed individually for the remaining of the experimental period (2 wks). Exercise trained rats were allowed a day of recovery before the resumption of their training programme.

Blood and tissue sampling. Two weeks after the ivGTT, all animals were sacrificed between 09:00 AM and 12:00 PM. All exercise trained animals were restrained from training 48 h before the sacrifice. 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) and simultaneously drawn from the abdominal vena cava (~4 ml) and the hepatic portal vein (~1.5 ml) into syringes pre-treated with EDTA (15%). Blood was centrifuged (3000 RPM for 8 min, 4 °C) and the plasma kept for further analyses. Several organs, muscles and fat deposits were excised and weighed in the following order: liver,

mesenteric fat, right and left limb muscles (plantaris, soleus, medial and lateral gastrocnemius), urogenital fat, retroperitoneal fat, and subcutaneous fat. All tissue samples were frozen in liquid nitrogen immediately after being weighed. The liver median lobe was freeze-clamped and used for glycogen and triacylglycerol determinations. For histological analysis of liver lipid infiltration, two cross-sections of the large lobe were cut, embedded in histological compound (OCT) and pre-frozen in 2-methylbutane brought to liquid nitrogen temperature. Mesenteric fat pad consisted of adipose tissue surrounding the gastrointestinal tract from the gastro-oesophageal sphincter to the end of the rectum with special care taken in distinguishing and removing pancreatic cells. Urogenital fat pad included adipose tissue surrounding the kidneys, ureters, and bladder as well as ovaries, oviducts and uterus. Retroperitoneal fat pad was taken as that distinct deposit behind each kidney along the lumbar muscles. For subcutaneous deposit measurement, a rectangular piece of skin was taken on the right side of each animal, from the median line of the abdomen to the spine and the right hip to the first rib as described by Krotkiewski and Bjorntorp (125). All plasma and tissue samples were stored at -78°C until analyses except for the liver cross-sections which were stored at -25°C until histochemical treatment and analysis.

Analytical Procedures. Plasma glucose concentration was determined with the use of a glucose analyser (Yellow Springs Instruments 2300, Yellow Springs, OH). Insulin and glucagon concentrations were measured with commercially available radioimmunoassay kits (Medicorp, Montréal, P.Q. and ICN Pharmaceuticals, New York, NY). Plasma NEFA levels were measured with a commercially available kit from Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany) and glycerol, TAG, and beta-hydroxybutyrate were measured with kits from Sigma Diagnostics (St-Louis, MO).

Liver TAG 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 TAG, Frayn and Maycock (75) have shown that omitting removal of phospholipids leads to only a $\pm 2\%$ error in the determination of tissue TAG. Liver glycogen content was determined by use of the phenol-sulfuric acid reaction (139). For histological analysis, OCT-embedded liver sections

were cut in a cryostat at 5 μm and mounted on microscope slides at $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$. The slides were then fixed with formaldehyde (10%) and stained with oil red O. Lipid infiltration was assessed with light microscopy using an image analysis computing system (Northern Eclipse, Empix Imaging Inc.). This system enabled a morphological quantification of liver lipid infiltration in terms of lipid vacuole size and number as well as the overall surface area of liver parenchyma occupied by lipid vacuoles. Lipid vacuoles with a surface area less than $1\ \mu\text{m}^2$ were considered as microvesicles while lipid vacuoles with a surface area greater than $1\ \mu\text{m}^2$ were considered as macrovesicles. To account for discrepancies in sinusoids size between animals, the number and the surface area of the lipid vacuoles are expressed for a standardised surface of liver parenchyma of $200\ 000\ \mu\text{m}^2$.

Statistical Analysis. Values are expressed as means \pm S.E. Statistical analyses were performed by a two-way ANOVA for non-repeated-measures design with diet and exercise training as main effects. Fisher's post-hoc test was used in the event of a significant ($P < 0.05$) F ratio. The area under the curve for plasma glucose and insulin levels during the ivGTT was computed using a trapezoidal model.

RESULTS

The high-fat diet resulted in a significant ($P < 0.01$) increase in body weight in HF-SED compared to SD-SED rats (Table 2). Exercise training in rats on the high-fat diet resulted in a smaller body weight gain ($P < 0.06$) compared to HF-SED rats, so that after training, body weight in HF-TR rats was similar to body weight of SD-TR rats. The high-fat diet in the sedentary state was associated with a significantly ($P < 0.05$) higher mean daily energy intake compared to the standard diet (Table 2). Exercise training increased ($P < 0.01$) energy intake only in animals fed the standard diet. A lower ($P < 0.01$) total relative muscle weight was measured after the high-fat diet in the sedentary state, while it was only increased ($P < 0.01$) after exercise training in the high-fat group (Table 2).

There were no significant ($P > 0.05$) effects of either the high-fat diet or exercise training on plasma glucose response during the ivGTT (Fig.1). However, the glucose stimulated insulin response (GSIR) was significantly ($P < 0.05$) higher in high-fat fed rats than rats fed the standard diet in both the sedentary and the trained state. There was no significant ($P < 0.05$) effect of training on GSIR, although a tendency for a decrease (7.5%) can be observed in the high-fat rats (Fig.2).

The high-fat diet in the sedentary rats resulted in a significant ($P < 0.01$) increase in plasma NEFA and glycerol concentrations whereas plasma TAG and β -hydroxybutyrate concentrations were not affected by the dietary manipulation (Table 3). Exercise training significantly ($P < 0.05$) reduced plasma NEFA and glycerol concentrations in both dietary conditions, although the values remained higher in rats fed the HF than the standard diet. There was also a tendency ($P < 0.07$) for plasma TAG to be decreased by training in both dietary groups, while β -hydroxybutyrate values were not changed following training (Table 3). Plasma glucose and insulin levels measured in peripheral blood were not affected either by the high-fat diet or exercise training (Table 3). On the other hand, insulin measured in the portal blood and glucagon measured in the fasting state were all significantly ($P < 0.05$) increased following the high-fat diet. Although a substantial reduction in fasting glucagon level of approximately 30% can be observed following training in the HF rats, there were

no statistically significant effects of training on the hormones measured in the present study (Table 3). As expected, the high-fat diet in the sedentary rats resulted in a significant ($P < 0.05$) increase (133 to 228%) in the relative weight of all visceral and subcutaneous fat pads (Fig.3A). Exercise training resulted in a significant ($P < 0.05$) decrease in mesenteric and subcutaneous fat deposits, and in the sum of the three visceral and the four measured (including subcutaneous) fat pads in both rats on the standard diet and even more in rats on the high-fat diet (Fig. 3B). On the whole, it appears that the high-fat diet altered most of the variables related to lipid metabolism and that physical training was of significant value in counteracting these deleterious effects.

There were no significant ($P > 0.05$) effects of either high-fat diet or exercise training on relative liver weight (Fig.4A). Liver glycogen content was significantly ($P < 0.01$) lower following the high-fat diet in both sedentary and exercise trained rats (Fig.4B). Training resulted in an increase ($P < 0.05$) in liver glycogen content in both dietary groups (Fig. 4B). The high-fat diet in the sedentary group resulted in a significant ($P < 0.01$) increase in liver TAG concentrations (Fig. 4C). Exercise training in rats on the high-fat diet prevented the increase in liver TAG ($P < 0.01$) so that after training, liver TAG concentrations were similar in HF-TR and SD-SED groups (Fig. 4C). The histological assessment of liver lipid infiltration revealed that the total surface area occupied by lipid vacuoles was largely increased ($\sim 48\%$) following the high-fat diet in the sedentary state, although the statistical significance level of this comparison was at $P < 0.07$ (Fig 5A). As for the liver TAG levels, the surface area occupied by the lipid vacuoles was significantly ($P < 0.01$) reduced by exercise training (Fig. 5A). No statistical differences were found between groups in the total number of lipid vacuoles in the liver (Fig. 5B). There was no statistical difference between all groups in the number of liver lipid vacuoles of surface area less than $1 \mu\text{m}^2$ (Fig.6). HF-SED rats had, however, a significantly ($P < 0.05$) higher number of lipid vacuoles with surface area between 1 and $10 \mu\text{m}^2$ than SD-SED rats. Exercise training significantly ($P < 0.05$) lowered the number of liver lipid vacuoles in all sizes between 1 and $10 \mu\text{m}^2$ (Fig. 6).

DISCUSSION

The present high-fat diet regimen in rats resulted in a 72% higher fat accumulation in the liver compared to standard-fed animals (Fig. 4C). Histological analyses confirmed these results, the surface area of liver parenchyma occupied by the lipid vacuoles being ~ 48% greater in high-fat than in standard-fed animals (Fig.5A). These results concords with those of previous studies in which hepatic steatosis in rodents was induced by high-fat diets (88, 160, 212). Hepatic steatosis can also be induced by other types of diets such as high-cholesterol (219), ethanol containing (229), choline-methionine deficient (141), and high-sucrose diets (11). In the present study we used a 40% high-fat diet in rats (as compared to a ~12% fat in standard chow, in kcal) over a relatively long period of time (8 wks) for this species, in an attempt to reproduce a common high-fat diet in humans (~60% kcal as fat in a high-fat diet vs 30% in a recommended standard diet). Our results, using biochemical and histological measurements, clearly show that hepatic steatosis can be induced by such a fat-rich diet without any toxin ingestion or alimentary deficiency.

The major finding of the present study is that when an exercise training programme is pursued at the same time as the high-fat diet, the induction of hepatic steatosis is completely suppressed. At the end of the eight-week experimental period, HF-TR animals had similar liver fat content than SD-SED animals. This was observed using biochemical as well as histological analyses (Fig. 4C and 5A). There is some evidence that ethanol-induced fatty liver can be attenuated by repeated running exercise in rats (229). The evidence that exercise training reduces liver lipid accumulation induced by fat-rich diets is, however, controversial. In previous studies, an effect (160) and the absence of an effect (219) of exercise training on hepatic steatosis have been reported. Comparison between these two studies reveals that in the latter study (219), exercise training was started after fatty liver had been induced. It is therefore possible that to be most effective, exercise must be concurrent with the induction of fatty liver. In a recent study, however, Straczkowski et al. (212) failed to show an effect of concurrent exercise training on high-fat diet induced hepatic steatosis in rats. In that study, rats were sustained on a 59% fat diet (as kcal) resulting in a ~ 190% increase in liver triacylglycerols and a ~ 65% decrease in liver

glycogen over a period of three weeks. Exercise training, over a 4 wk period, consisted of running 6 times/wk from 1 to 3 h at 20 m/min, 10% slope. In the present study, liver triacylglycerols were increased by ~ 72% while liver glycogen content was decreased by ~ 20%. It is thus possible that in Strackowski et al.'s study (212), the metabolic perturbations induced by the high-fat diet might have been too intense to be compensated by the exercise training programme. Although the modalities of application of the exercise regimen seem to play a role, the present results clearly indicate that a 40 % high-fat diet-induced hepatic steatosis can be totally prevented by a concurrent exercise training programme.

Hepatic steatosis can be distinguished as macro- or microvesicular according to the size of the lipid vacuoles (greater or less than $1 \mu\text{m}^2$ of surface area, respectively). Macrovesicular steatosis has been reported to be more common (199) while microvesicular steatosis is usually described in association with more severe clinical cases (73, 93). It has been recently suggested, however, that microvesicular steatosis is more prevalent than was originally believed and that it can be present without liver dysfunction (73) or hepatotoxicity (196). Thus, it seems that the clinical implications of microvesicular vs macrovesicular steatosis require better characterization. In a first step towards this goal, we, for the first time, used of a novel image analysis computing system to quantitatively assess, the number and the size of lipid vacuoles accumulated within liver parenchyma. The results obtained using this tool indicate that, although the number of microvesicles in the liver is far greater than the number of macrovesicles, high-fat diet-induced hepatic steatosis occurs mainly via an increased number of macrovesicles (Fig.6). The present study also provides the first evidence that prevention of high-fat diet induced hepatic steatosis by exercise training occurs mainly by preventing the accumulation of triacylglycerols as macrovesicles without any apparent changes in the pool of microvesicles. It is not possible, however, to determine from the present data if lipid macrovesicles are newly synthesised as large vesicles or if they result from the aggregation of small lipid vesicles into larger vesicles (29), accompanied by an increased synthesis of microvesicles. Nevertheless, the increased number of macrovesicles without any reduction in quantity of microvesicles should have led to an increase in the total number of vesicles following the high-fat diet. Although a

tendency towards an increase in the total number of vesicles following the high-fat diet and a decrease in the total number of vesicles following exercise training can be observed among high-fat fed rats, the differences did not reach statistical significance (Fig.5B). This could be due to the remarkably greater number of microvesicles compared to macrovesicles and the fact that the number of microvesicles were not affected by the present dietary and exercise manipulations (Fig.6).

The precise mechanism by which macrovesicular hepatic steatosis can be prevented through exercise training remains speculative. Mechanisms involved in the pathogenesis of high-fat diet-induced hepatic steatosis are themselves nebulous. The accumulation of lipids within the liver must be the result of an imbalance between 1) lipid uptake by the liver, 2) lipid oxidation inside the liver, and 3) VLDL-triacylglycerol secretion. In the present experiment, high-fat diet resulted in more than a two-fold increase in plasma NEFA. The increased delivery of fatty acids to the liver should result in a higher uptake by the liver since NEFA uptake is mostly done in a concentration-dependent manner (29). Although we did not directly measure liver lipid oxidation, plasma β -hydroxybutyrate levels, which can be used as an index of the activation of this metabolic pathway, was not altered by either the high-fat diet or exercise training. An increase in lipid uptake by the liver should have resulted in an increased output through incorporation of triacylglycerol into VLDL. The increased VLDL secretion by the liver should have led to an increased plasma level of triacylglycerol (95). In our study, plasma triacylglycerol levels was not, however, increased by the high-fat diet. During increased fat availability, the synthesis and secretion of VLDL has already been reported to be insufficient to assure the normal lipid cycling between adipocytes and hepatocytes (140, 245). Altogether, the changes of blood lipid profiles following the high-fat diet suggest that fat accumulation inside the liver was the result of an increased uptake of fatty acids by the organ, leading to an increased TAG synthesis rather than an increased oxidation. Furthermore, it appears that the increased liver TAG synthesis could not be compensated by an increase in VLDL secretion, resulting in fat accumulation within hepatocytes.

Consistent with the above-discussed mechanisms involved in the development of high-fat diet-induced hepatic steatosis, there are three possibilities through which exercise training could have prevented liver fat accumulation: 1) a diminished delivery of lipids to the liver, 2) an increased hepatic oxidation, and/or 3) an increased incorporation of TAG into VLDL. Concurrent training in rats receiving the present high-fat diet resulted in a large decrease in circulating plasma NEFA, no change in plasma β -hydroxybutyrate levels, and a tendency ($P < 0.07$) for lower plasma triacylglycerol levels. Altogether, these results suggest that the preventing effect of exercise training on hepatic fat accumulation is a consequence of a diminished delivery of NEFA to the liver rather than an increased hepatic oxidation or an increased VLDL synthesis.

The reduced NEFA and glycerol plasma concentrations in exercise trained animals are most likely related to the decreased level of adiposity in these rats, most likely due to an increased fat utilization. The interpretation that the decrease in liver lipid accumulation with exercise training is due to a decrease in circulating lipids rather than an increased output from the liver would be consistent with the above-mentioned suggestion that training is more efficient in decreasing hepatic fat accumulation if it is conducted at the same time than fatty liver is induced than if it is conducted after fatty liver has been induced. Another interesting observation is that similarly to the liver, fat accumulation in the mesenteric fat pad, which is drained into the hepatic portal vein, was completely prevented by exercise training. In contrast, high-fat diet induced enlargement of other visceral fat pads (urogenital and retroperitoneal), which are drained into the vena cava, was not completely abolished by exercise training. It has been suggested in a recent review (132) that intracellular triacylglycerol storage depot within the liver could act as an internal buffer to temporarily protect the hepatocytes against the potential toxicity of NEFAs when their uptake is greater than their oxidation rate and VLDL secretion. Similarly, it can be postulated that, along with the mesenteric fat pad, the liver could act as a systemic buffer to temporarily lower circulating NEFAs.

A decrease in liver lipid accumulation may have clinical significance. An increase in liver triacylglycerol content has been associated with impaired insulin signalling pathway within

hepatocytes of fatless mice, resulting in decreased insulin suppression of hepatic glucose production (115). Normal insulin action on hepatic glucose production, was re-established when liver triacylglycerols were reduced by redistribution of fat into transplanted adipocytes (115). In our experiment, hepatic insulin sensitivity was not determined. However, the results of the ivGTT revealed that high-fat fed rats developed mild systemic insulin resistance, which was only somewhat improved by training (Fig. 2). High-fat fed rats also depicted higher portal insulin and fasting glucagon levels than their standard-fed counterpart animals, which was not fully counteracted by training. The rather small effect of training on these insulin sensitivity related variables contrasts, however, with the large effect of training observed on hepatic lipid accumulation. Hepatic steatosis also constitutes the first hit in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver which can progress to steatohepatitis, steatonecrosis, fibrosis, cirrhosis and even liver failure (10, 170). Exercise training can, therefore, constitute a tool contributing to the protection of the liver against clinical complications of fatty liver.

In summary, the results of the present study indicate that a high-fat diet administered over a period of eight weeks in rats induced a state of hepatic steatosis, which was primarily attributable to an accumulation of lipids into macrovesicles ($> 1 \mu\text{m}^2$ of surface area). Exercise training conducted concurrently with the high-fat diet, completely prevented the accumulation of lipids into the liver. The exercise-induced decrease in hepatic fat accumulation was mainly attributed to a reduction in the number of macrovesicles.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and Fonds pour la Formation des Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR, Gouvernement of Québec). The authors acknowledge Dr. Claudette Léger-Gauthier for assistance in histological analysis of hepatic lipid infiltration.

REFERENCES

LEGENDS

Fig 1. Plasma glucose response during the ivGTT test (A; means) and total area under glucose concentration curve (AUC; B; means \pm SE) in standard-fed rats (SD) in the sedentary (SED) and exercise trained (TR) state, and in high-fat fed rats (HF) in the SED and TR state. $n = 9-10$ rats/group.

Fig 2. Plasma insulin response during the ivGTT test (A; means) and total area under insulin concentration curve (AUC; B; means \pm SE) in standard-fed rats (SD) in the sedentary (SED) and exercise trained (TR) state, and in high-fat fed rats (HF) in the SED and TR state. $n = 9-10$ rats/group. * Significantly different from standard-fed animals, $P < 0.05$.

Fig 3. Mesenteric (MES), subcutaneous (SC), retroperitoneal (RP), and urogenital (UG) fat weight (WT) relative to 100 g body weight (BW) and the sum of the relative weights of the three visceral fat pads (MES, RP, and UG) and the four fat pads (including SC) in standard-fed rats (SD) in the sedentary (SED) and exercise trained (TR) state and in high-fat fed rats (HF) in the SED and TR state. Values are means \pm SE, $n = 9-10$ rats/group. * Significantly different from corresponding standard-fed group, $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. & Significantly different from corresponding sedentary group $P < 0.05$, && $P < 0.01$.

Fig 4. Liver weight (A) relative to 100 g body weight (BW), liver glycogen (B), and liver triacylglycerol (C) concentrations in standard-fed rats (SD) in the sedentary (SED) and exercise trained (TR) state and in high-fat fed rats (HF) in the SED and TR state. Values are means \pm SE, $n = 7-10$ rats/group. ** Significantly different from corresponding standard-fed group, $P < 0.01$. & Significantly different from corresponding sedentary group, $P < 0.05$, && $P < 0.01$.

Fig 5. Total surface area occupied by the lipid vacuoles (A) and total number of lipid vacuoles (B), both expressed for a standardized surface area ($2 \times 10^5 \mu\text{m}^2$) of liver parenchyma in standard-fed rats (SD) in the sedentary (SED) and exercise trained (TR) rats and in high-fat fed rats (HF) in the SED and TR state. Values were obtained from histochemical quantification using an image analysis computing system (Northern Eclipse, Empix Imaging Inc.). Values are means \pm SE, $n = 4-8$ rats/group. * Significantly different from corresponding standard-fed group ($P < 0.07$). && Significantly different from corresponding sedentary group, $P < 0.01$.

Fig 6. Number of lipid vacuoles per unit of surface area expressed for a standardized surface area ($2 \times 10^5 \mu\text{m}^2$) of liver parenchyma in standard-fed (SD) rats in the sedentary (SED) and exercise trained (TR) state and in high-fat fed rats (HF) in the SED and TR state. Values were obtained via histochemical quantification using an image analysis computing system (Northern Eclipse, Empix Imaging Inc.). Values are means \pm SE, $n = 4-8$ rats/group.

* Significantly different between HF-SED and SD-SED groups, $P < 0.05$; & Significantly different between HF-TR and HF-SED groups, $P < 0.05$. Statistical significance was for all vacuole sizes between 1 and $10 \mu\text{m}^2$ (shown within brackets).

Table 1. *Composition of the high-fat and standard diets*

High-Fat Diet		kg	Standard Diet		kg
Casein	Purified	High	20	Crude Protein	18.1
Nitrogen					
Corn Starch			39	Crude Fat	4.5
Corn Oil			3.4	Crude Fibre	3.4
Lard			14.6	Ash	6.7
AIN 76 Mineral Mix			5	Nitrogen Free Extract	57.3
Alpha cell Non-Nutritive			16	Humidity	10
Bulk					
VDFM (Sheet Dextrose)			2		
Total			100		100

Table 2. *Initial and final body weight, energy intake, and total relative muscle weight in standard- and high-fat fed rats kept sedentary or exercise trained for 8 wks*

		SD-SED (n=9)	SD-TR (n=9)	HF-SED (n=9)	HF-TR (n=10)
Initial	Body Weight (g)	183 ± 2.1	186 ± 1.0	187 ± 1.9	184 ± 1.1
Final	Body Weight (g)	284 ± 9.0	306 ± 4.3	330 ± 12.7*	306 ± 7.0
Total	Relative Muscle Weight (g/100g BW)	0.732 ± 0.01	0.705 ± 0.01	0.646 ± 0.02 **	0.721 ± 0.02 &&
Energy	Intake (kcal/day)	70.9 ± 1.4	75.8 ± 1.2 ^{&}	77.0 ± 2.3 *	75.1 ± 1.5
Fat intake	(g/day)	0.98	1.04	3.6	3.5
Carbohydrates	intake (g/day)	9.96	10.65	6.16	6.0
Protein intake	(g/day)	4.3	4.59	3.76	4.13

Values are means ± SE.

SD: standard diet; HF: high-fat diet; SED: sedentary state; TR: trained state.

Total relative muscle weight represents the sum of soleus, plantaris, and gastrocnemius muscles relative weight of the right leg.

Energy intake represents the daily mean over the 8-week protocol. * Significantly different from SD counterpart ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$). [&] Significantly different from sedentary counterpart ($P < 0.05$), ^{&&} ($P < 0.01$).

Table 3. Plasma metabolites and hormones concentrations in standard- and high-fat fed rats kept sedentary or exercise trained for 8 weeks

	SD-SED (n=9)	SD-TR (n=9)	HF-SED (n=9)	HF-TR (n=10)
NEFA (mM)	0.09 ± 0.01	0.05 ± 0.01 ^{&}	0.21 ± 0.04 ^{***}	0.13 ± 0.02 ^{***&}
Glycerol (mM)	0.12 ± 0.01	0.08 ± 0.01 ^{&&}	0.18 ± 0.03 ^{**}	0.11 ± 0.01 ^{**&&}
TAG (mM)	0.75 ± 0.10	0.60 ± 0.06	0.92 ± 0.22	0.59 ± 0.07
β-OH (mM)	0.10 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.01
Glucose (mM)	7.66 ± 0.21	8.06 ± 0.21	7.76 ± 0.23	7.63 ± 0.22
Peripheral. Insulin (pM)	148.7 ± 10.5	170.9 ± 15.7	168.7 ± 16.5	163.1 ± 10.7
Portal Insulin (pM)	225.6 ± 17.2	219.3 ± 30.1	265.8 ± 23.5 [*]	277.0 ± 26.8 [*]
Fasting Glucagon (pg/L)	191.7 ± 9.9	207.3 ± 30.3	345.6 ± 70.6 [*]	247.7 ± 18.2 [*]

Values are means ± SE.

SD: standard diet; HF: high-fat diet; SED: sedentary state; TR: trained state

NEFA: non-esterified fatty acids; TAG, triacylglycerol; β-OH, beta-hydroxybutyrate.

Note: All variables were measured in a postprandial state (> 2h) except for fasting glucagon.

* Significantly different from standard-fed counterpart animals ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$), *** ($P < 0.001$)[&] Significantly different from sedentary counterpart animals ($P < 0.05$),^{&&} ($P < 0.01$).

Fig.1

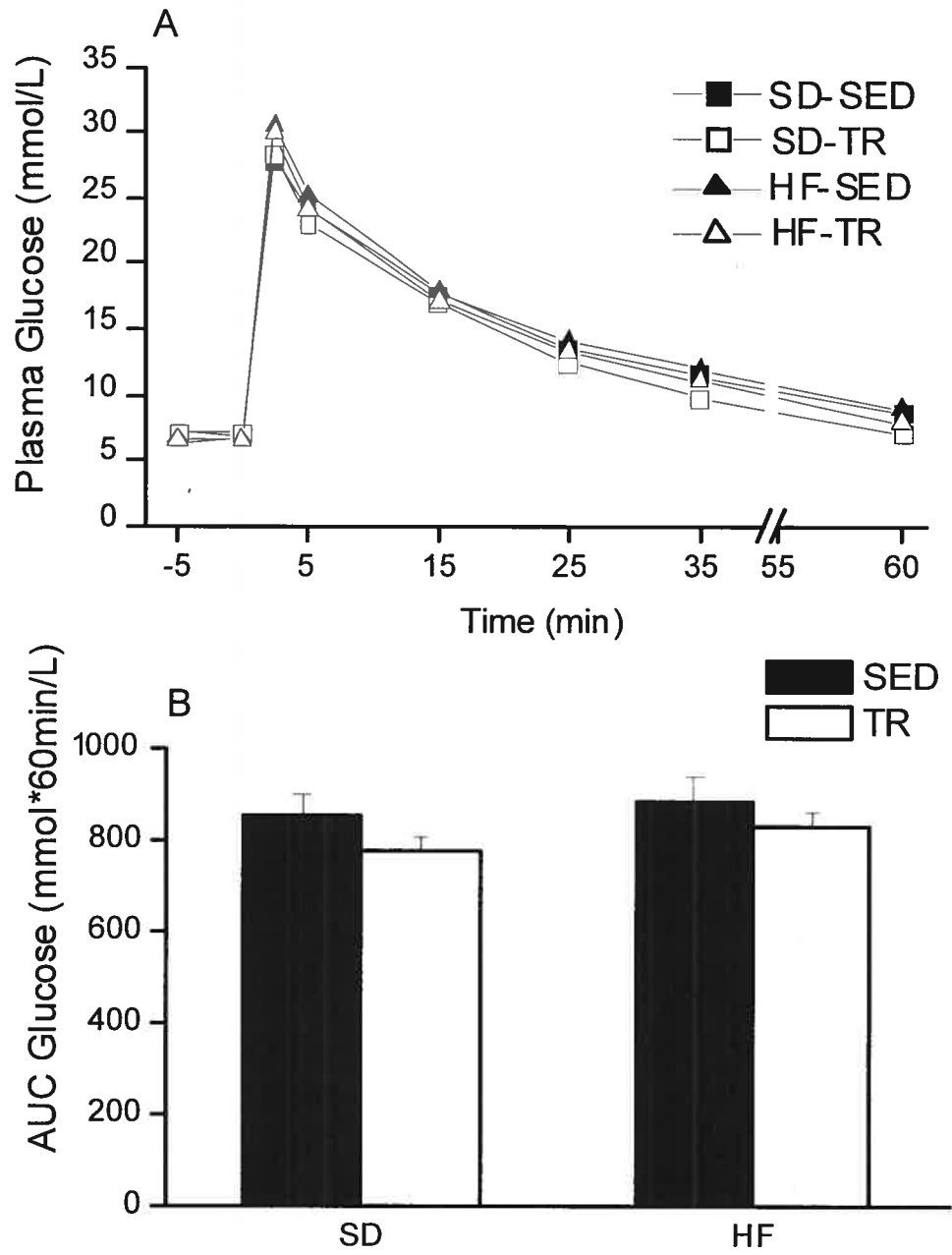


Fig.2

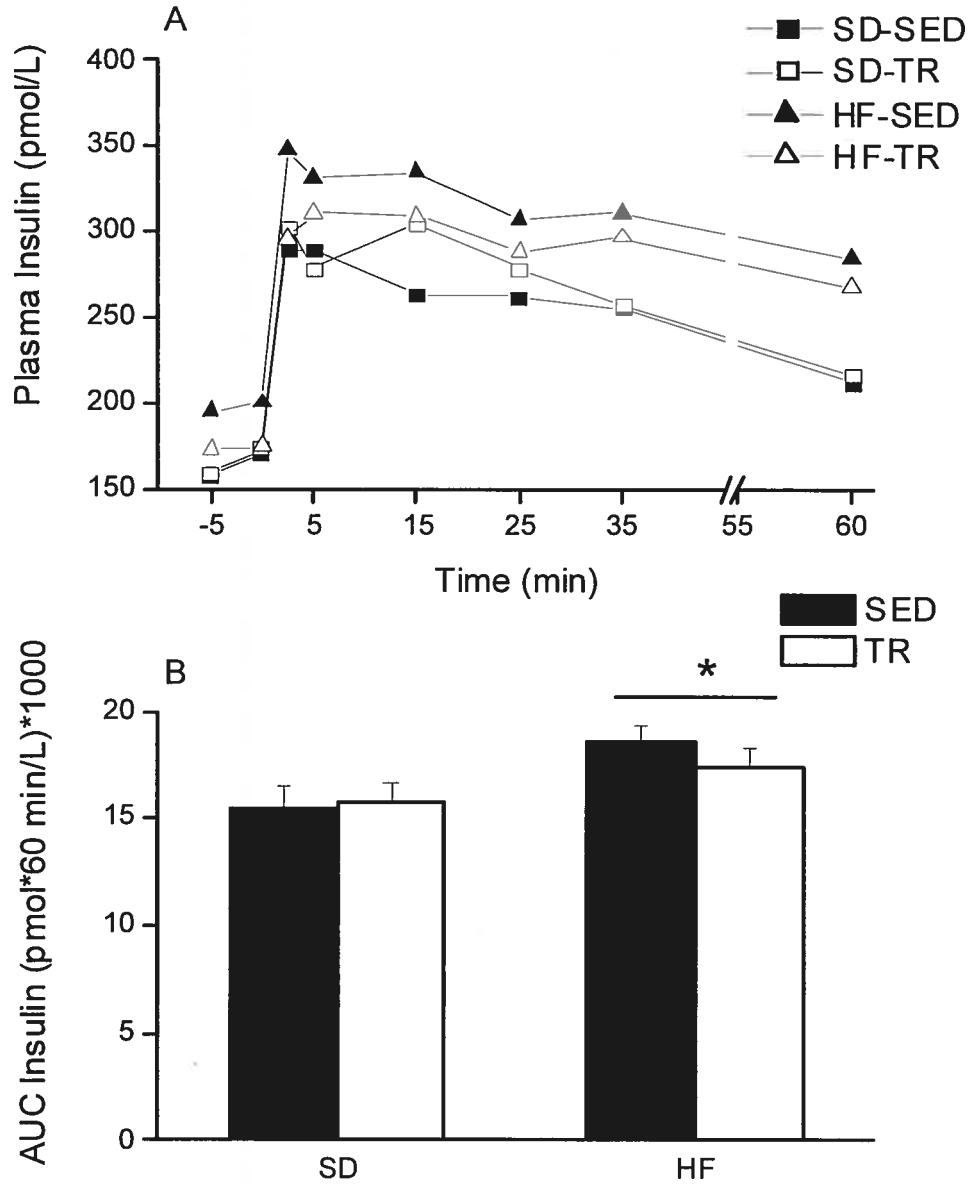


Fig.3

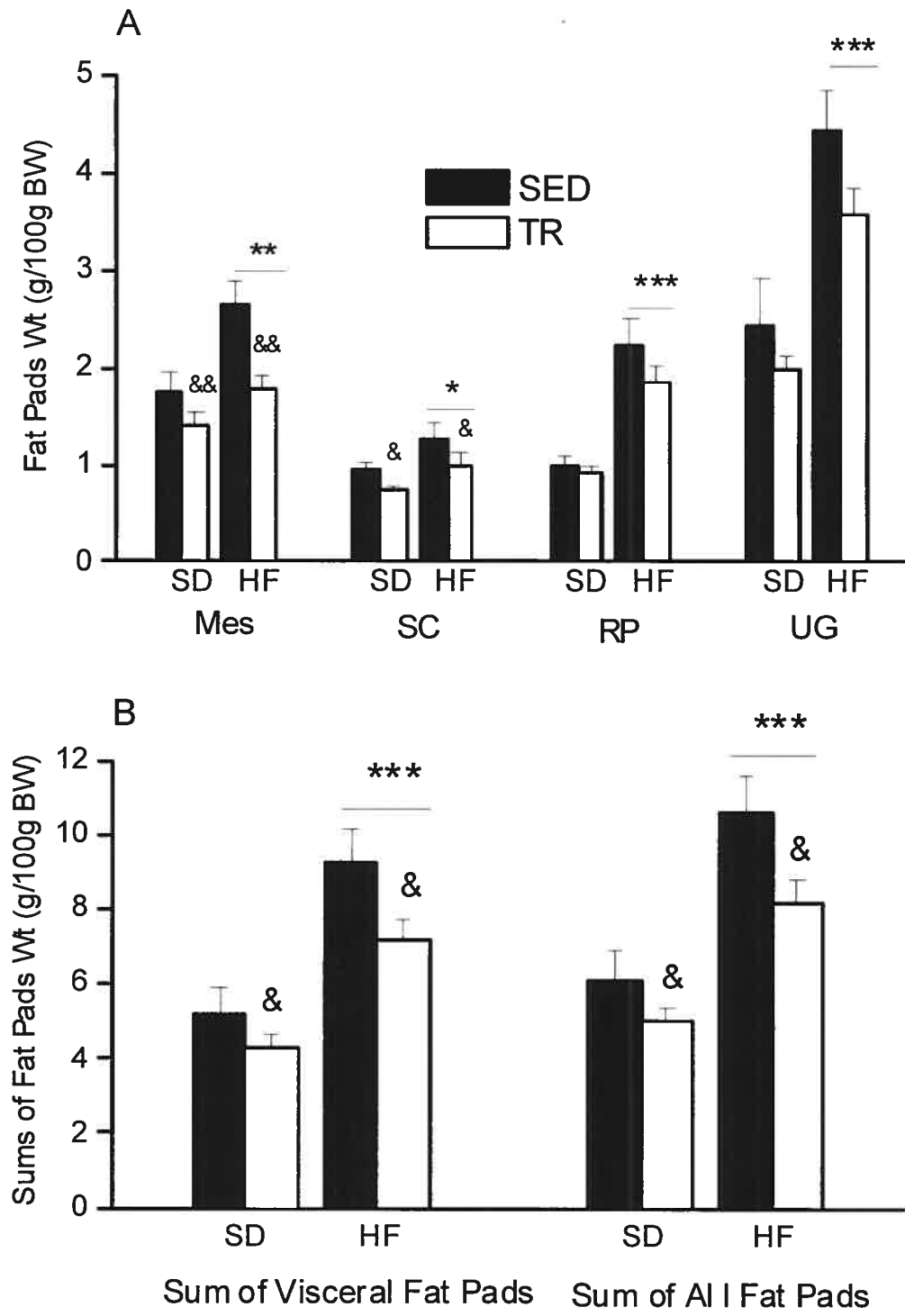


Fig.4

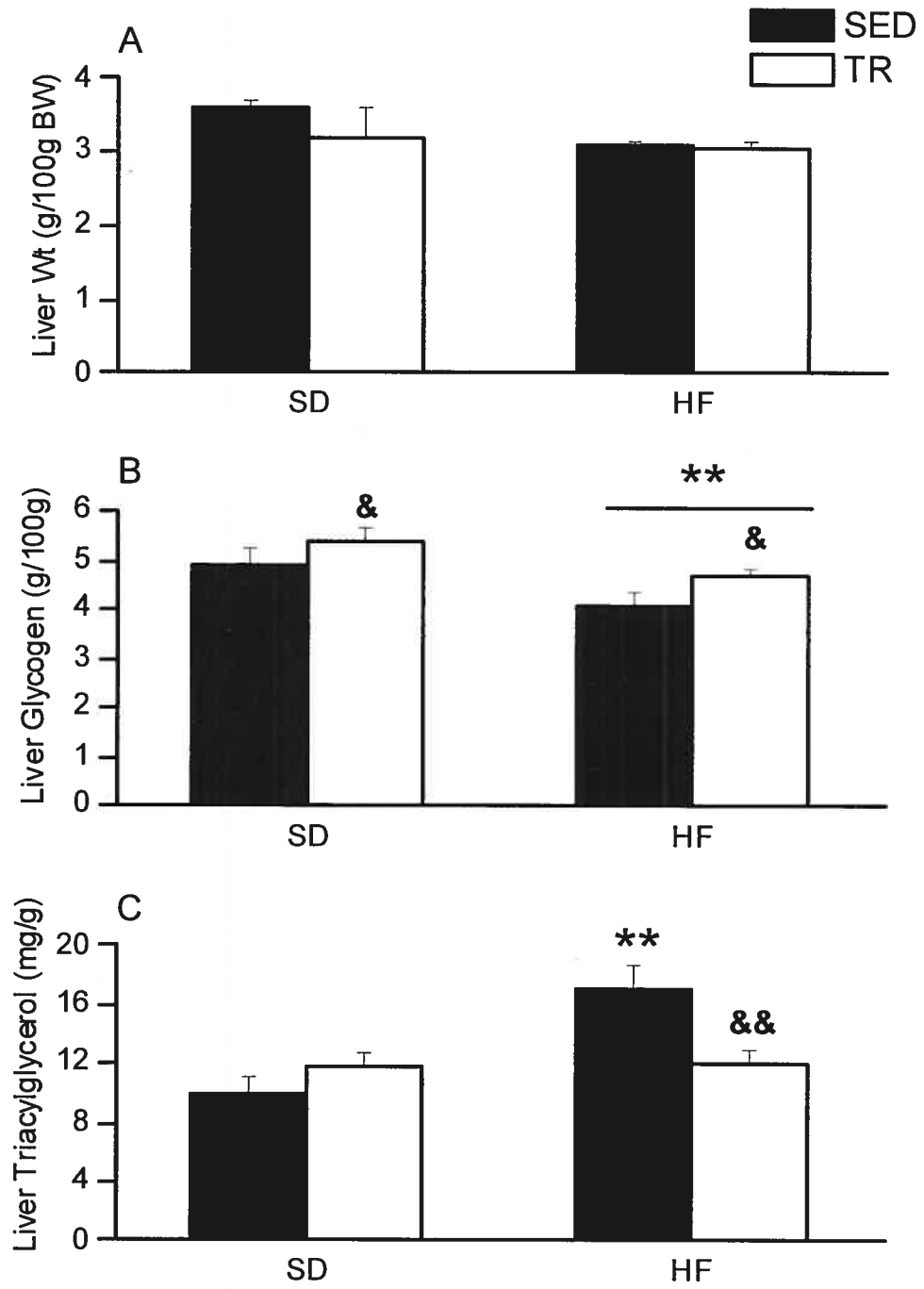


Fig.5

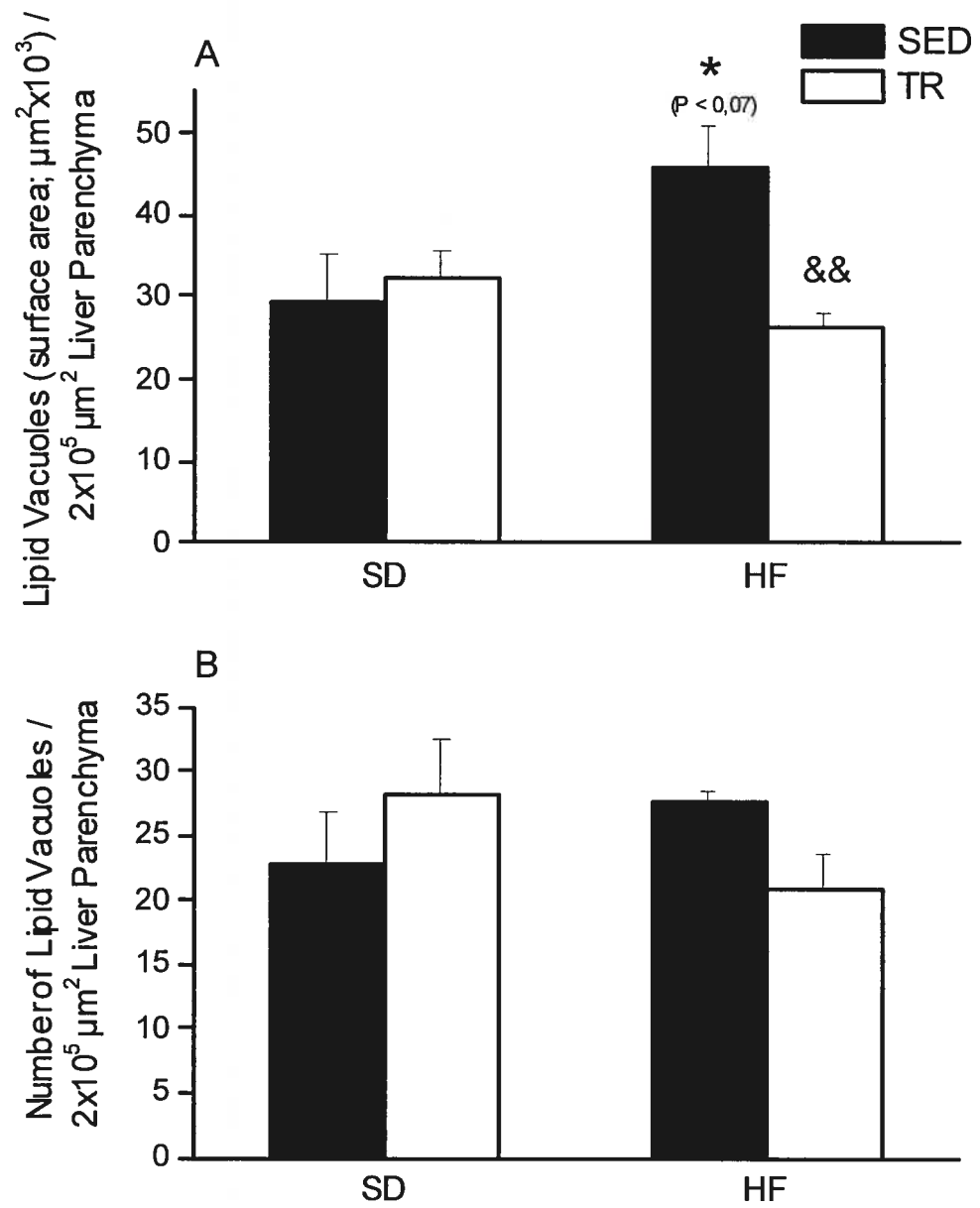
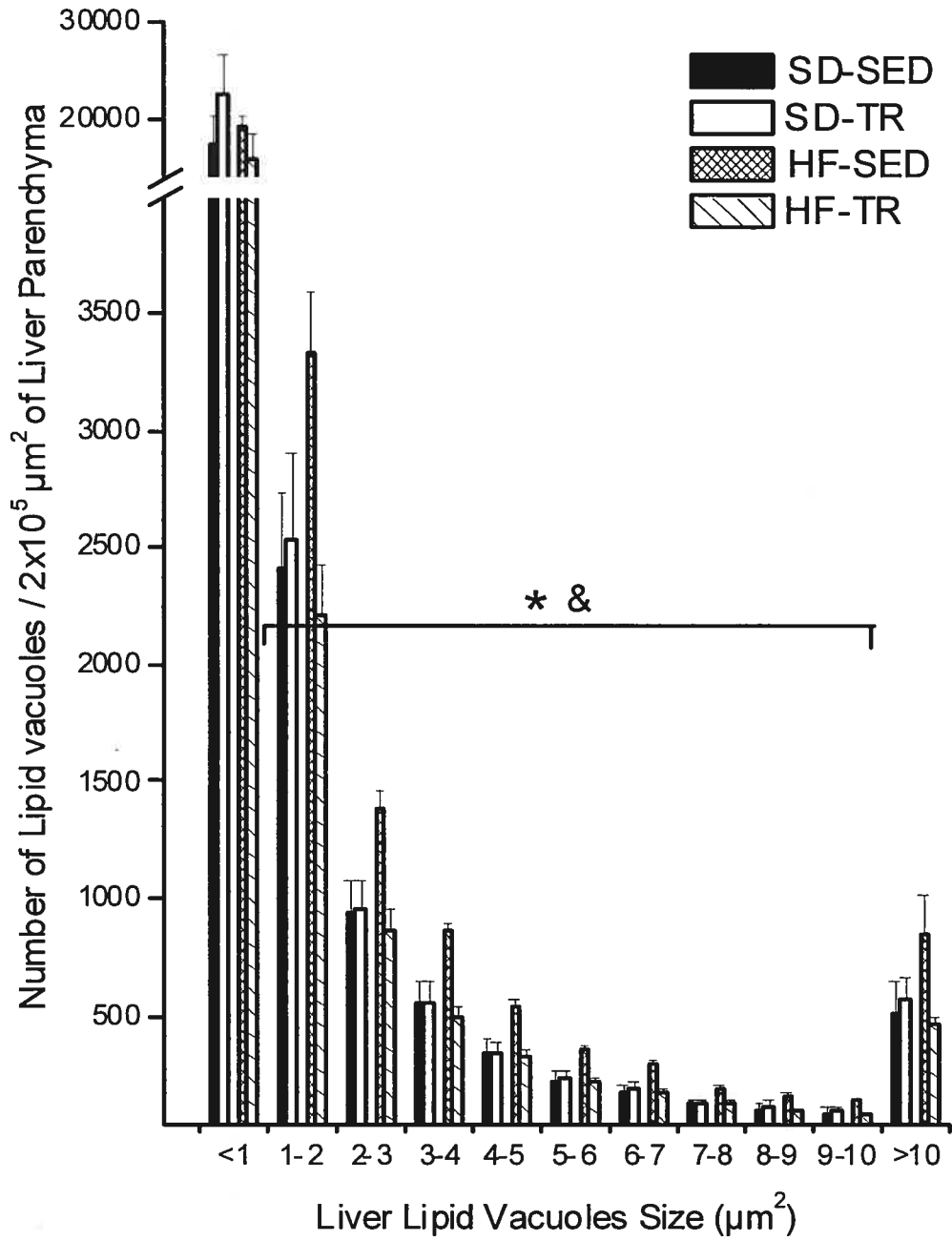


Fig.6



2.2. Étude 2-

Titre

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.

Auteurs

Marie-Soleil Gauthier, Karine Couturier, Alexandre Charbonneau et Jean-Marc Lavoie.

Journal

Publié dans le *International Journal of Obesity* en 2004;
(*International Journal of Obesity* (2004) 28, 1064–1071)

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

Marie-Soleil Gauthier, Karine Couturier, Alexandre Charbonneau, and Jean-Marc Lavoie

Département de kinésiologie, Université de Montréal, Montréal, Canada

Running title: Exercise in the course of a high-fat diet regimen

Mailing proofs: Dr. Jean-Marc Lavoie

Département de kinésiologie

Université de Montréal

C.P. 6128, Succ. centre-ville

Montréal (Québec) Canada H3C 3J7

Tel: (514) 343-7044

Fax: (514) 343-2181



OBJECTIVE: We recently reported that an 8-week high-fat diet-induced hepatic steatosis was completely prevented if an exercise training programme was introduced and pursued concurrently with the diet. The purpose of the present study was to determine the extent to which introducing exercise training at mid-point in the course of a 16-week high-fat diet regimen contributes to the reversal of liver lipid infiltration and the reduction of blood lipid profile deterioration and body fat accumulation.

DESIGN AND SUBJECTS: Two groups of rats were fed a high-fat diet (42% kcal) for 16 weeks, one remaining sedentary during this entire period (HF-Sed) and the other being exercise trained for the last 8 weeks (HF-Tr). A third group was fed a standard diet and remained sedentary for all 16 weeks (SD-Sed). Training (5 days/week for 8 weeks) began 8 weeks after introducing the high-fat diet and consisted of treadmill running that was progressively increased to reach 60 min at 26 m/min, 10% grade, for the last 4 weeks.

MEASUREMENTS: Various parameters including liver lipid infiltration, fat depots and blood lipids.

RESULTS: Unexpectedly, liver lipid infiltration was not significantly higher in HF-Sed than in SD-Sed rats (means \pm SE: 14.9 ± 1.7 vs 12.3 ± 0.4 mg/g; $P > 0.05$). High-fat compared to age-matched standard fed rats also showed an absence of difference ($P > 0.05$) in the weight of total visceral fat pads (13 %), plasma non-esterified fatty acids (NEFA), and leptin concentrations, but depicted significantly ($P < 0.01$) higher values for subcutaneous fat pad weight and plasma triacylglycerol. Exercise training largely decreased visceral and subcutaneous fat accumulation by 30% and 26% respectively ($P < 0.01$) as well as NEFA, triacylglycerol, and leptin concentrations ($P < 0.01$).

CONCLUSION: Liver lipid infiltration does not seem to progress linearly over 16 weeks of high-fat feeding in light of what has previously been observed after 8 weeks of high-fat feeding. Introducing a training programme in the course of a 16-week high-fat diet protocol reduced adiposity, plasma NEFA, and leptin concentrations below the levels observed in standard fed rats. These data indicate that, exercise training, whether conducted concurrently or introduced during the course of a high-fat diet, is an asset to reduce the deleterious effects of a high-fat diet.

Keywords: high-fat diet, exercise training, adiposity, lipid profiles, hepatic steatosis

INTRODUCTION

It is well established that the ingestion of a high-fat diet induces deleterious metabolic effects including fat accretion in adipocytes, hyperlipidemia, and insulin resistance in both rodents and human beings (1-3). Recent data also indicate that such high-fat diets result in liver lipid infiltration, which is now recognised as an integral part of the metabolic syndrome. More specifically, hepatic steatosis, which is characterised by an excessive accumulation of triacylglycerol within hepatocytes, has been associated with the development of insulin resistance and insulin signalling defects (4-8). As a consequence, information relative to the development and the reversal of hepatic steatosis has a clinical importance that might have been overlooked in past studies. Specific concerns such as how physical training interacts with the development and reversal of hepatic steatosis become important to counteract deleterious metabolic effects resulting from high-fat diet-induced obesity.

Exercise training and a low-fat diet have long been prescribed as part of the treatment in the management of obesity and type 2 diabetes. Previous studies have shown that when imposed at the same time of a switch to a high-fat diet, exercise training attenuates excessive fat gain, blood lipid profile deterioration, and the development of an insulin resistant state that would otherwise occur with sedentarity and high-fat feeding (9-11). Precise information on the role of exercise training as a preventive and/or a reversal agent of liver lipid infiltration is, however, relatively limited. Our group has recently reported data showing that exercise training pursued at the same time as an eight-week high-fat diet completely prevented the high-fat diet-induced macrovesicular hepatic steatosis (12). These data confirmed what has been reported in earlier studies using different approaches (13, 14). However, there are other studies reporting an absence of effects of exercise training on hepatic steatosis (15, 16). One of the reasons put forward to explain this discrepancy was that exercise training began after fatty liver had been induced. It was suggested that to be most effective, exercise must be concurrent with the induction of fatty liver (12). It is not known if exercise training introduced during the course of a high-fat diet may be beneficial to counteract some of the effects of the high-fat diet while maintaining the high-fat diet

regimen. Such information may be important to incite people to undertake a programme of physical exercise, even if they do not intend to change their dietary habits. Moreover, it is not known how hepatic steatosis progresses if the high-fat feeding in rats is pursued beyond a short term period (> 8 weeks). The present study was designed to determine the extent to which exercise training, introduced in the course of a relatively long term high-fat diet regimen (16 weeks), may contribute to the reversal of hepatic steatosis and its associated blood lipid profile deterioration and adipose tissue fat accumulation. To do this, exercise training was imposed during the last 8 weeks of a 16-week high-fat diet regimen in rats.

Methods

Animal Care. Female Sprague-Dawley rats ($n=27$, Charles River, St-Constant, PQ, Canada), 6 weeks old, weighing 180-200g were housed by pairs and had free 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 temperature (20-23°C). All experiments were conducted in accordance with the regulations of the Canadian Council on Animal Care.

Diet and Exercise Protocol. A few days after their arrival, all animals were randomly assigned to either a high-fat or a standard diet protocol for 16 wks. The HF diet consisted of 42% lipid (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% lipid, 63.2% carbohydrate, and 24.3 % protein; kcal) consisted of usual pellet rat chow (Agribands Purina Canada, Woodstock, Ontario). Details of the diets have been reported elsewhere (12). Animals submitted to the high-fat diet were divided into two groups. One group of rats remained sedentary for the whole 16-wk period (HF-Sed, $n=9$), while the second group of rats remained sedentary for the first 8 wks and were exercise trained for the remaining 8-wk period (HF-Tr, $n=9$). The third group consisted of rats fed a standard diet while remaining sedentary for the whole 16-wk period (SD-Sed, $n=9$). Exercise training consisted of continuous running on a motor-driven rodent treadmill (Quinton Instruments, Seattle, WA) 5 times a wk for 8 wks. Rats ran progressively from 15 min/day at 15 m/min, 0% slope, up to 60 min/day at 26 m/min, 10% slope for the last 4 wks. All rats were weighed 2 times per wk and food intake was monitored 3 times per wk.

Blood and tissue sampling. At the end of the dietary and exercise protocol, all animals were sacrificed between 09:00 AM and 12:00 PM. All trained animals were restrained from training 48 h before the sacrifice. 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 drawn rapidly (< 45 s) and simultaneously from the abdominal vena cava (~ 4 ml) and the hepatic portal vein (~ 1.5 ml) into syringes pre-treated with EDTA (15%). Blood was

centrifuged (3000 RPM for 8 min, 4 °C) and the plasma kept for further analysis. Several organs, muscles and fat deposits were excised and weighed in the following order: liver, mesenteric fat, triceps surae muscles (plantaris, soleus, medial and lateral gastrocnemius), urogenital fat, retroperitoneal fat, and subcutaneous fat. All tissue samples were frozen in liquid nitrogen immediately after being weighed. The liver median lobe was freeze-clamped and used for triacylglycerol determinations. Mesenteric fat pad included the adipose tissue surrounding the gastro-intestinal tract from the gastro-oesophageal sphincter to the end of the rectum. Special care was taken in distinguishing and excluding pancreatic cells. Urogenital fat pad included adipose tissue surrounding the kidneys, ureters, and bladder as well as ovaries, oviducts, and uterus. Retroperitoneal fat pad was taken as that distinct deposit behind each kidney along the lumbar muscles. For subcutaneous deposit measurement, a rectangular piece of skin was taken on the right side of each animal, from the median line of the abdomen to the spine and the right hip to the first rib as described by Krotkiewski and Bjorntorp (17). All plasma and tissue samples were stored at -78°C until analyses.

Analytical Procedures. Plasma glucose concentration was determined with the use of a glucose analyser (Yellow Springs Instruments 2300, Yellow Springs, OH). Insulin concentration was measured with a commercially available radioimmunoassay kit (Medicorp, Montréal, P.Q. and ICN Pharmaceuticals, New York, NY). Leptin concentration was measured with a commercially available radioimmunoassay kit (Linco Research Inc., St-Charles, MO, USA). Plasma nonesterified fatty acids (NEFA) levels were measured with a commercially available kit from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). Triacylglycerol (TAG), and beta-hydroxybutyrate were measured with kits from Sigma Diagnostics (St-Louis, MO).

Liver TAG 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 TAG, Frayn and Maycock (18) have shown that omitting removal of phospholipids leads to only a $\pm 2\%$ error in the determination of tissue TAG.

Statistical Analysis. Values are expressed as means \pm SE. Statistical analyses were performed by a one-way ANOVA for nonrepeated-measures. Fisher's post-hoc test was used in the event of a significant ($P < 0.05$) F ratio.

Results

There was no difference ($P > 0.05$) in final body weight or mean daily energy intake among the three groups (Table 1). Exercise training in HF-fed rats resulted in a significantly ($P < 0.05$) higher sum of relative weights of the triceps surae muscles compared to the other two sedentary groups (Table 1). There was no significant difference ($P > 0.05$) in liver triacylglycerol concentration among the three groups, despite a 22% higher level observed in HF-Sed compared to SD-Sed rats (Fig. 1A). Plasma NEFA concentration was not significantly ($P > 0.05$) affected by the HF diet (Fig. 1B). Exercise training, however, resulted in significantly ($P < 0.01$) lower levels of NEFA compared to SD-Sed. The high-fat diet resulted in ~2 fold increase ($P < 0.05$) in plasma triacylglycerol concentration (Fig. 1C). Exercise training in HF-fed rats resulted in significantly ($P < 0.01$) lower levels in plasma concentrations of triacylglycerol, compared to HF-Sed rats. No difference ($P > 0.05$) was found in β -hydroxybutyrate concentration among the 3 groups (Fig. 1D).

The HF diet in rats in the Sed state resulted in a larger ($P < 0.001$) deposit of subcutaneous and retroperitoneal fat than rats fed the SD diet (Fig.2A). However, mesenteric and urogenital fat pad weight was not significantly different ($P > 0.05$) between HF-Sed and SD-Sed rats. The combined weight of the visceral fat pads was 13% higher in the HF-Sed rats compared to SD-Sed rats but this difference did not reach statistical significance ($P > 0.05$; Fig.2B). When the 4 fat pads were compiled together, a 17% higher fat relative weight was found between HF-Sed and SD-Sed groups ($P < 0.07$). Exercise training while on the high-fat diet resulted in a lower level ($P < 0.05$) of fat accumulation in every fat pad (Fig. 2A).

Plasma glucose concentration was not significantly ($P > 0.05$) different among the 3 groups (Fig. 3A). Insulin concentration was lower in the two HF-fed groups compared to the SD-fed group ($P < 0.001$) (Fig. 3B). Portal insulin was not significantly ($P > 0.05$) different between the 3 groups (Fig. 3C). Exercise training did not have any effect on peripheral and portal insulin concentrations ($P > 0.05$). Leptin concentration was not significantly different between HF-Sed and SD-Sed groups ($P > 0.05$) despite a 19% higher value in HF-Sed rats

(Fig. 3D). Exercise training, however, resulted in a significant ($P < 0.001$) lower plasma leptin concentration level compared to the two sedentary groups. The same differences between groups were reproduced when the leptin response was expressed per g of fat measured as the sum of the four fat pads (Fig. 3E). Leptin concentration for all groups was highly correlated with total fat pads weight ($R^2 = 0.81$; $P < 0.001$).

DISCUSSION

In a recent study we reported that exercise training pursued at the same time as a high-fat diet regimen of 8 weeks in rats completely prevented the development of hepatic steatosis (12). The present experiment, in continuity with this first study, was designed to evaluate the effects of the same 8-week training programme but conducted during the last 8 weeks of a 16-week high-fat diet regimen. Comparisons of the main results of these two studies are presented in Table 2. Surprisingly, the first observation made from these comparisons is that, compared to respective SD fed rats, liver lipid infiltration was more than 3 times higher after eight weeks of high-fat diet than after 16 weeks of the same high-fat diet. A possible explanation for this observation is that liver lipid infiltration occurs rapidly when rats undertake a high-fat diet regimen and decreases to a certain extent as part of the adaptations to the high-fat diet. It is possible that, the role of the liver during a relatively short period (8 weeks) of high-fat feeding is to take up lipids from the circulation, and thereafter progressively release them back into circulation as the animal adapts to the high-fat feeding. This would be consistent with the suggestion that the liver acts as a systemic lipid buffer during periods of high lipid influx (12, 19). This, however, does not mean that liver lipid infiltration may not increase again if the high-fat diet is pursued for a longer period of time. High-fat feeding for 10 months in male Wistar rats resulted in a large increase in liver triacylglycerol concentrations (20).

One of the interests of the present study was to test the effects of an eight-week training programme during the course of a 16-week high-fat diet regimen on liver lipid infiltration. Since the development of liver lipid infiltration, independent of age, was much smaller after 16 weeks than after 8 weeks, the answer to this question is not readily obtained. At first glance, it seems that exercise training in the present study did not have any effect on hepatic steatosis. This would be consistent with results from other studies showing an absence of effect of exercise training on hepatic lipid content when it was conducted after hepatic steatosis had been induced (15, 21). One reason for this might be that once liver lipid infiltration is induced, a process that occurs relatively rapidly, the liver will by itself release lipids back into circulation, reducing the potential beneficial contribution of

exercise training. Notwithstanding this interpretation, it can be observed in Table 2 that liver lipid infiltration was somewhat attenuated in HF-Tr rats, compared to SD fed rats, when training was initiated during the course of the HF diet (16-wk protocol).

One reason to assume that rats in the present study adapted to the 16-week high-fat regimen is the surprisingly low increase in weight of visceral fat pads (Fig.2B). Although fat pad weight was significantly increased in retroperitoneal and subcutaneous areas, there was no significant increase in mesenteric and urogenital fat pad weights. The difference in increase in total visceral fat pad weight, taking age into account, between HF and SD fed rats, was much lower after 16 weeks than what has been observed after 8 weeks of the same high-fat diet (Table 2). This strongly suggests that rats adapted to the high-fat diet, most likely by oxidizing more lipids (22). On the other hand, the weight of the subcutaneous fat deposit increased more after 16 weeks than after the 8-week high-fat diet (55% vs 33%; Table 2). Although reasons for this are not clear, it does suggest that the different deposits of fat do not follow a similar response to obesity. Even though the increase in visceral fat pad weight was lower in the present 16-week regimen than in the previous 8-week high-fat diet (Table 2), the introduction of exercise training in the course of the present 16-week high-fat diet had a marked effect on reducing the weight of all fat deposits such that overall fat accumulation was even ~30% smaller than in standard diet fed counterparts (sedentary counterparts) (Fig.2B). This, at the least, indicates that exercise training has a profound reducing effect on body fat accumulation whether exercise is carried out at the same time or introduced during the course of a high-fat diet regimen. It also indicates that liver lipid infiltration and/or reversal follows a pattern somewhat different from body fat accumulation and/or reduction. Tiikkainen et al. (23) recently reported data in obese women suggesting that liver fat content does not simply reflect the size of endogenous fat stores. On the other hand, the large reduction in body fat accumulation with exercise training during the course of the present high-fat feeding (diet) gives some support to the interpretation that exercise training might also have hindered the development of hepatic steatosis.

An interesting observation of the present study is that the 16-week high-fat feeding (diet), as compared to SD feeding, resulted in a large increase in plasma triacylglycerol concentrations and an absence of change in plasma NEFA levels (Fig. 1B,C). This response is the opposite to what has been found after 8 weeks of the same high-fat diet as the plasma NEFA were elevated and not the triacylglycerols (Table 2). Similar findings were found by Barnard *et al.* (24) who reported an early increase in plasma glycerol and a large increase in plasma TAG after 2 and 6 months, respectively, of high-fat feeding. As previously suggested (12), the increase in plasma NEFA after the 8-week high-fat diet protocol probably resulted in a higher uptake of lipid by the liver since NEFA uptake is mostly done in a concentration-dependent manner (25). The large increase in plasma NEFA concentrations in this shorter-term condition is possibly due to an increased rate of lipolysis and may explain the large increase in liver lipid infiltration. A different response is, however, seen after 16 weeks of the same high-fat diet. With time (16 wks), exposure of the liver to lipids may have resulted in an increase in VLDL secretion causing in turn a large increase in plasma TAG level (26). This might explain why, as compared to rats on the SD diet, liver lipid infiltration was much smaller after 16 weeks than after 8 weeks of the same high-fat diet. The lower levels of change in plasma NEFA after 16 weeks compared to after 8 weeks of the same high-fat diet might be explained by adaptations to the high-fat diet such as a greater capacity to oxidize fat and possibly a better capacity to sequester the lipids inside the adipocytes. On the other hand, plasma β -hydroxybutyrate levels, which may be taken as an index of liver lipid oxidation, were not changed by the present diet conditions. Altogether, the increase in plasma TAG, most likely reflecting an increase in liver VLDL secretion, and the absence of a significant change in plasma NEFA may both be put forth to explain the finding that liver lipid infiltration is less accentuated after 16 weeks than after 8 weeks of the same high-fat diet. Exercise training in the present 16-week high-fat fed rats reduced circulating TAG as well as plasma NEFA. The decreased plasma TAG in exercising high-fat fed rats may reflect a decreased need for VLDL-TAG secretion due to the diminished delivery of NEFA to the liver. It could also reflect an increased utilisation of circulating VLDL-TAG as energy substrate during exercise on a high-fat diet (27).

On the whole, the plasma NEFA and TAG data indicate that a high-fat diet regimen of 16 weeks leads to perturbations in lipid metabolism that are less accentuated than after only 8 weeks of high-fat feeding. Nevertheless, exercise training was instrumental in reducing the detrimental effects of high-fat feeding on lipid metabolism whether it is conducted at the same time or introduced during the course of a high-fat diet. In contrast to lipid metabolism, our data do not show any alterations in glucose metabolism either by high-fat feeding or the training status. Although peripheral insulin was found to be lower in the high-fat fed groups, plasma glucose and portal insulin levels were similar in all three groups. These data do not provide any indication of the development of an insulin resistant state in the present 16 week high-fat fed rats. It is possible that insulin resistance might be more present after eight weeks of high-fat feeding, as in our previous study (12), than after 16 weeks when rats depicted a higher level of adaptation to high-fat feeding.

Body weight measured at mid-point (8 weeks) in rats of the present study which evolved into an absence of difference in final body weight between the groups also support the interpretation of an adaptation to prolonged high-fat feeding. Exercise training introduced in the middle of a 16-week high-fat diet protocol did not affect body weight nor daily food intake but had a noticeable effect on body composition, largely reducing body fat content and increasing muscle weight, assuming that the latter reflects increased muscle protein mass (Table 1). Exercise training also largely diminished plasma leptin concentration. Interestingly, reduced adiposity could not account for all of the lowering effect of training on plasma leptin since when expressed per g of fat, exercise-trained animals still had lower leptin values than the two other groups. Similar effects of training have been reported in humans (28) and male rats (21). It has been proposed by Reseland *et al.* (28) that regular exercise could allow a resetting of the leptin concentration so that a lower concentration can be maintained at a certain body fat content.

In summary, our results from rats submitted to a 16-week high-fat diet have led to a number of new information in the light of what has been previously reported (12) following 8 weeks of the same high-fat diet: 1) liver lipid infiltration that was largely increased after 8 weeks of high-fat diet was not different between the 16-week high-fat fed rats and the age-

matched rats fed the standard diet; 2) visceral, but not subcutaneous, fat accumulation was comparatively less after 16 weeks than after 8 weeks of high-fat feeding; 3) contrary to the observations made after 8 weeks, 16 weeks of high-fat feeding was associated with an increase in plasma triacylglycerol and no change in NEFA; and 4) exercise training whether conducted concurrently to an 8-week high-fat diet or introduced during the course of a 16-week high-fat diet largely reduced fat accumulation and attenuated the deterioration of blood lipid profile. It is suggested that the liver acts as a lipid buffer in the early phase of a high-fat diet and progressively releases lipids into the circulation as the animal adapts to the high-fat diet. On the other hand, exercise training, whether conducted concurrently or introduced during the course of a high-fat diet, is an asset to reduce the deleterious effects of a high-fat diet. More research will be needed to better characterize the time-course of the response of the triad liver-adipocyte-plasma to high-fat diet-induced obesity.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and Fonds pour la Formation des Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR, Government of Québec).

REFERENCES

1. **Kraegen EW, Clark PW, Jenkins AB, Daley EA, Chisholm DJ and Storlien LH.** Development of muscle insulin resistance after liver insulin resistance in high-fat-fed rats. *Diabetes*. 1991;40: 1397-403.
2. **Ghibaudi L, Cook J, Farley C, van Heek M and Hwa JJ.** Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of sprague-dawley rats. *Obes Res*. 2002;10: 956-63.
3. **Satia-Abouta J, Patterson RE, Schiller RN and Kristal AR.** Energy from fat is associated with obesity in U.S. men: results from the Prostate Cancer Prevention Trial. *Prev Med*. 2002;34: 493-501.
4. **Seppala-Lindroos A, et al.** Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87: 3023-8.
5. **Kim JK, Gavrilova O, Chen Y, Reitman ML and Shulman GI.** Mechanism of insulin resistance in A-ZIP/F-1 fatless mice. *J Biol Chem*. 2000;275: 8456-60.
6. **Reue K, Xu P, Wang XP and Slavin BG.** Adipose tissue deficiency, glucose intolerance, and increased atherosclerosis result from mutation in the mouse fatty liver dystrophy (fld) gene. *J Lipid Res*. 2000;41: 1067-76.
7. **Marceau P, et al.** Liver pathology and the metabolic syndrome X in severe obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84: 1513-7.
8. **Saltiel AR and Kahn CR.** Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001;414: 799-806.
9. **Bell RR, Spencer MJ and Sherriff JL.** Voluntary exercise and monounsaturated canola oil reduce fat gain in mice fed diets high in fat. *J Nutr*. 1997;127: 2006-10.
10. **Kraegen EW, Storlien LH, Jenkins AB and James DE.** Chronic exercise compensates for insulin resistance induced by a high-fat diet in rats. *Am J Physiol*. 1989;256: E242-9.
11. **Kitakoshi K, Oshida Y, Nakai N, Han YQ and Sato Y.** Effects of troglitazone and voluntary running on insulin resistance induced high fat diet in the rat. *Horm Metab Res*. 2001;33: 365-9.

12. **Gauthier MS, Couturier K, Latour JG and Lavoie JM.** Concurrent exercise prevents high-fat-diet-induced macrovesicular hepatic steatosis. *J Appl Physiol.* 2003;94: 2127-34.
13. **Narayan KA, McMullen JJ, Butler DP, Wakefield T and Calhoun WK.** Effect of exercise on tissue lipids and serum lipoproteins of rats fed two levels of fat. *J Nutr.* 1975;105: 581-7.
14. **Rothfeld B, Levine A, Varady A, Loken S and Karmen A.** The effect of exercise on lipid deposition in the rat. *Biochem Med.* 1977;18: 206-9.
15. **Terao T, Fujise T and Nakano S.** Effects of long-term exercise and high-cholesterol diet on lipid-lipoprotein metabolism in rats. *Tokai J Exp Clin Med.* 1987;12: 243-51.
16. **Straczkowski M, Kowalska I, Dzienis-Straczkowska S, Kinalski M, Gorski J and Kinalska I.** The effect of exercise training on glucose tolerance and skeletal muscle triacylglycerol content in rats fed with a high-fat diet. *Diabetes Metab.* 2001;27: 19-23.
17. **Krotkiewski M and Bjorntorp P.** The effect of progesterone and of insulin administration on regional adipose tissue cellularity in the rat. *Acta Physiol Scand.* 1976;96: 122-7.
18. **Frayn KN and Maycock PF.** Skeletal muscle triacylglycerol in the rat: methods for sampling and measurement, and studies of biological variability. *J Lipid Res.* 1980;21: 139-44.
19. **Frayn KN.** Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. *Diabetologia.* 2002;45: 1201-10.
20. **Chalkley SM, Hettiarachchi M, Chisholm DJ and Kraegen EW.** Long-term high-fat feeding leads to severe insulin resistance but not diabetes in Wistar rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002;282: E1231-8.
21. **Pellizzon M, Buison A, Ordiz F, Jr., Santa Ana L and Jen KL.** Effects of dietary fatty acids and exercise on body-weight regulation and metabolism in rats. *Obes Res.* 2002;10: 947-55.
22. **Schrauwen P and Westerterp KR.** The role of high-fat diets and physical activity in the regulation of body weight. *Br J Nutr.* 2000;84: 417-27.

23. **Tiikkainen M, et al.** Effects of identical weight loss on body composition and features of insulin resistance in obese women with high and low liver fat content. *Diabetes*. 2003;52: 701-7.
24. **Barnard RJ, Roberts CK, Varon SM and Berger JJ.** Diet-induced insulin resistance precedes other aspects of the metabolic syndrome. *J Appl Physiol*. 1998;84: 1311-5.
25. **Burt AD, MacSween RNM, Peters TJ and Simpson KJ.** Non-alcoholic fatty liver: causes and complications. In: *Oxford textbook of clinical hepatology*, edited by McIntyre N. New York: Oxford University Press, 1991, p. 865-71.
26. **Hecht Y and Chevrel B.** *Les stéatoses hépatiques*. Paris: Baillière, J.-B., 1975.
27. **Helge JW, Watt PW, Richter EA, Rennie MJ and Kiens B.** Fat utilization during exercise: adaptation to a fat-rich diet increases utilization of plasma fatty acids and very low density lipoprotein-triacylglycerol in humans. *J Physiol*. 2001;537: 1009-20.
28. **Reseland JE, et al.** Effect of long-term changes in diet and exercise on plasma leptin concentrations. *Am J Clin Nutr*. 2001;73: 240-5.

LEGENDS

Fig 1. Liver Triacylglycerol (A), plasma non-esterified fatty acids (NEFA) (B), triacylglycerol (C), and beta-hydroxybutyrate (D) concentrations in standard- (SD) and high-fat (HF) fed rats in the sedentary state (Sed) and in HF trained (Tr) rats. Values are means \pm SE, $n = 9$ rats/group. ^a Significantly different from SD-fed rats $P < 0.05$, ^{aa} $P < 0.01$. ^{bb} Significantly different from HF-Sed rats $P < 0.01$.

Fig 2. Mesenteric (MES), subcutaneous (SC), retroperitoneal (RP), and urogenital (UG) fat weight (WT) relative to 100 g body weight (BW) and the sum of the relative weights of the three visceral fat pads (MES, RP, and UG) and the four fat pads (including SC) in standard- (SD) and high fat (HF) fed rats in the sedentary state (Sed) and in HF trained (Tr) rats. Values are means \pm SE, $n = 9$ rats/group. ^a Significantly different from SD-fed rats $P < 0.05$, ^{aa} $P < 0.01$, ^{aaa} $P < 0.001$. ^b Significantly different from HF-Sed rats $P < 0.05$, ^{bb} $P < 0.01$, ^{bbb} $P < 0.001$.

Fig 3. Plasma glucose (A), peripheral insulin (B), portal insulin (C) and leptin concentrations expressed in absolute (D), and relative to the sum of the fat pad weights (E) in standard- (SD) and in high-fat (HF) fed rats in the sedentary state (Sed) and in HF trained (Tr) rats. Values are means \pm SE, $n = 9$ rats/group. ^a Significantly different from SD-fed rats $P < 0.05$, ^{aa} $P < 0.01$, ^{aaa} $P < 0.001$. ^b Significantly different from HF-Sed rats $P < 0.05$, ^{bb} $P < 0.01$, ^{bbb} $P < 0.001$.

Table 1. Final body weight, daily energy intake and the sum of right calf muscle relative weights in rats fed a high-fat diet and remaining sedentary for 16 weeks (HF-Sed), fed a high-fat diet for 16 weeks and exercise trained for the last 8 weeks of their diet protocol (HF-Tr), and rats fed a standard diet while remaining sedentary for the duration of 16 weeks (SD-Sed).

	SD-Sed (<i>n</i> = 9)	HF-Sed (<i>n</i> = 9)	HF-Tr (<i>n</i> = 9)
Mid-Point (8 wks) Body Weight (g)	315.1 ± 5.9	330.2 ± 9.8	304.1 ± 5.7
Final Body Weight (g)	365.8 ± 10.4	364.7 ± 13.2	334.4 ± 7.2
Mid-Point (8 wks) Daily Energy Intake (kcal/day)	70.2 ± 2.0	74.3 ± 1.8	70.4 ± 0.9
Daily Energy Intake After 16 wks (kcal/day)	68.2 ± 1.9	70.8 ± 1.6	68.7 ± 0.7
Right Triceps Surae Weight (g/100g BW)	0.623 ± 0.02	0.586 ± 0.02	0.688 ± 0.01 ^{a, bb}

^a Significantly different from standard-fed counterpart animals ($P < 0.05$). ^{bb} Significantly different from sedentary counterpart animals ($P < 0.01$).

Table 2. Relative changes in lipid variables computed from data in the present study and in a previous study (12) conducted under the same experimental conditions but for a shorter duration.

	<u>Previous study (12)</u>		<u>Present study</u>	
	HF8-Sed vs SD8-Sed	HF8- Tr vs SD8-Sed	HF16-Sed vs SD16-Sed	HF16-Tr vs SD16-Sed
Liver TAG (mg/g)	↑↑ 72%**	↑ 20%	↑ 22%	↑ 2%
Visceral Fat (g/ 100g BW)	↑↑ 80%***	↑ 41%*	↑ 13%	↓ 21%*
Subcutaneous Fat (g/100g BW)	↑ 33%*	↑ 5%	↑↑ 55%**	↑ 15%
Plasma NEFA (mmol/L)	↑↑↑ 124%***	↑ 44%	↓ 23%*	↓↓ 52%**
Plasma TAG (mmol/L)	↑ 18%	↓ 21%	↑↑↑ 91%*	↓ 18%

HF8: high-fat diet during 8 weeks; HF16: high-fat diet during 16 weeks; SD8: standard diet during 8 weeks; SD16: standard diet during 16 weeks; Sed: sedentary during their whole respective protocol; HF8-Tr: high-fat diet and exercise training during 8 weeks; HF16-Tr: high-fat diet during 16 weeks with exercise training during the last 8 weeks. * Significant difference between the two groups mentioned at the top of the table ($P < 0.05$); ** ($P < 0.01$); *** ($P < 0.001$). NEFA: non-esterified fatty acids; TAG, triacylglycerol; Visceral fat: sum of the mesenteric, urogenital and retroperitoneal fat.

Figure 1.

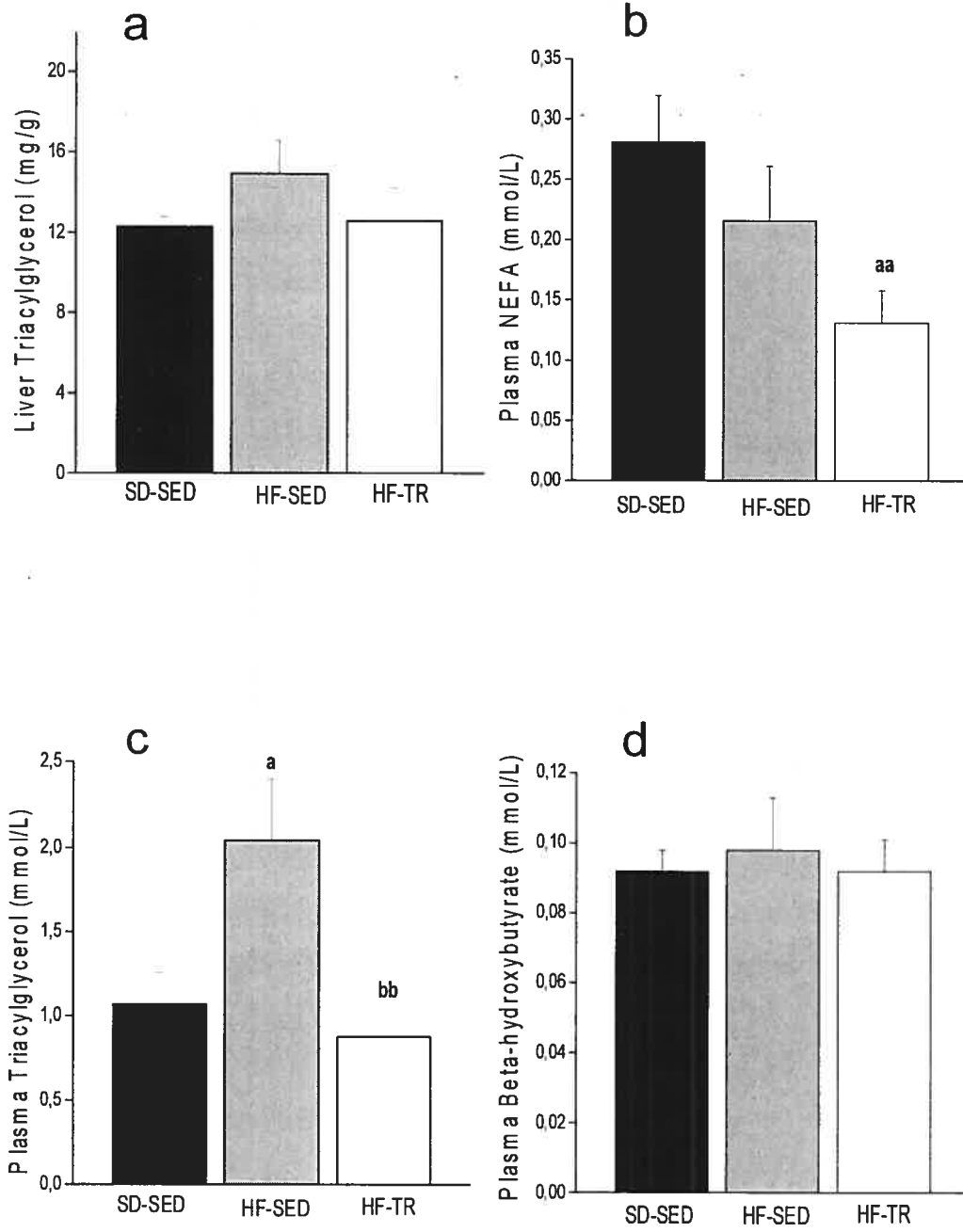


Figure 2.

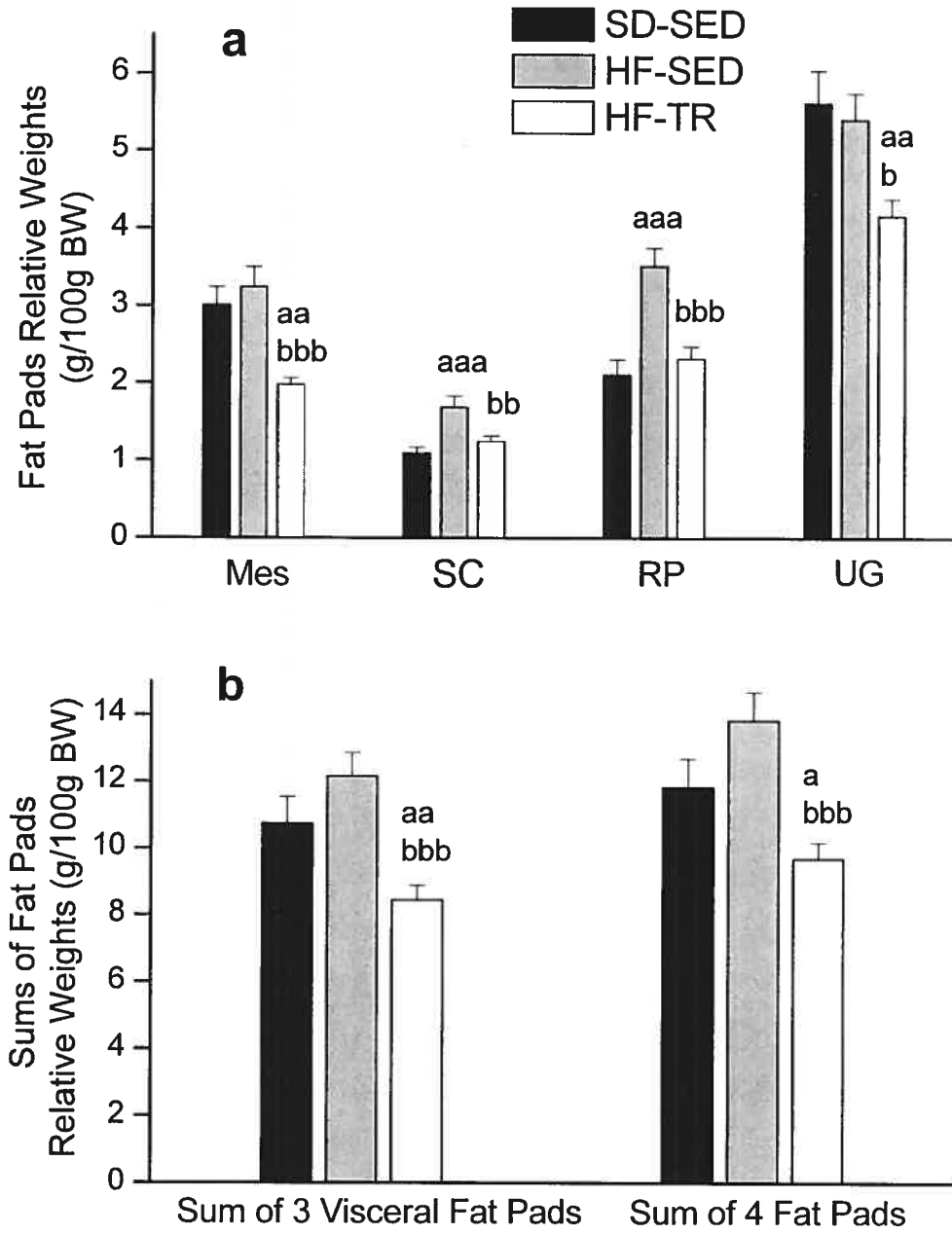
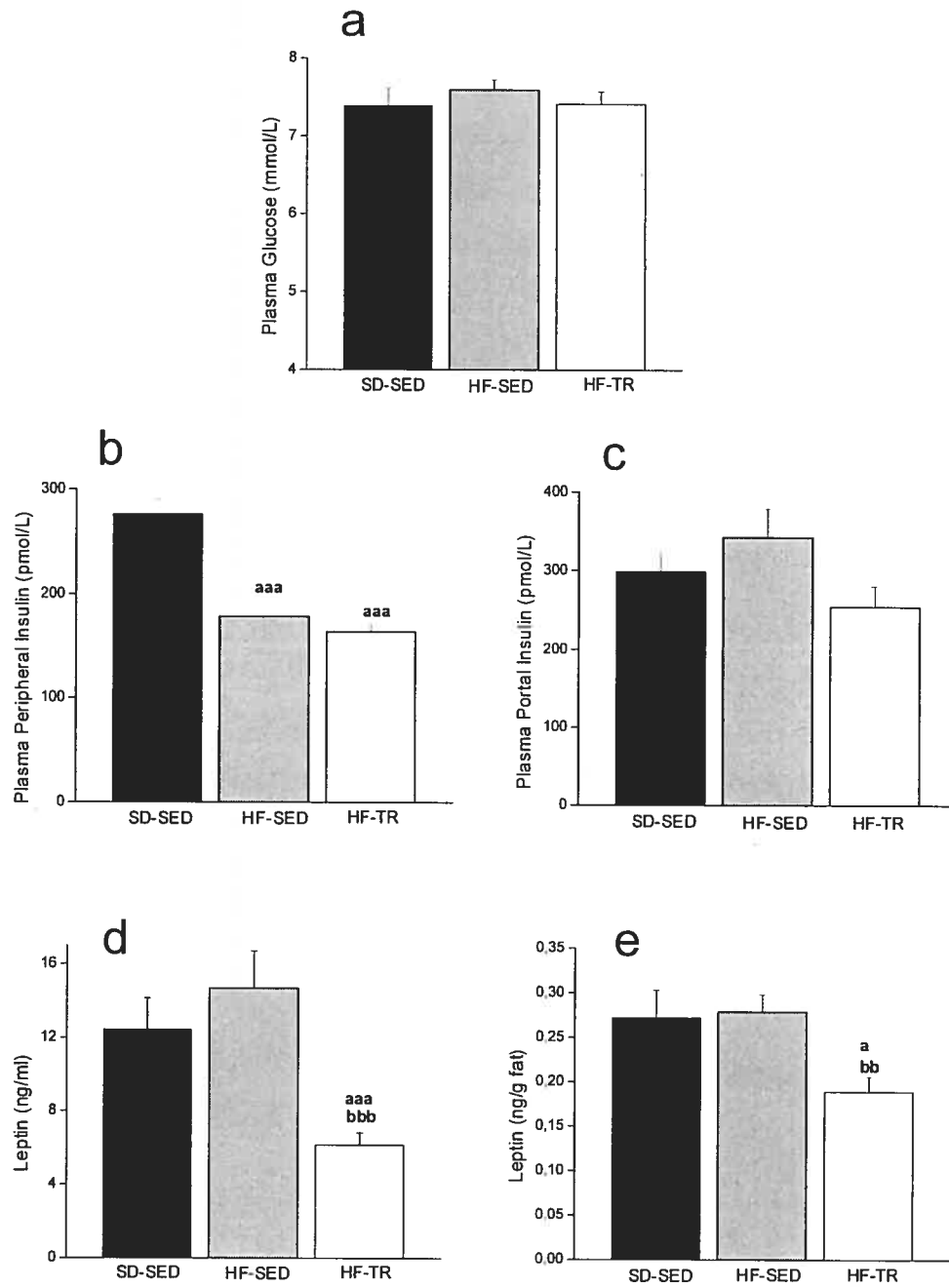


Figure 3.



2.3. Étude 3-

Titre

Time Course of the Development of Non-Alcoholic Hepatic Steatosis in Response to High-Fat Diet-Induced Obesity in Rats.

Auteurs

Marie-Soleil Gauthier, Roland Favier et Jean-Marc Lavoie.

Journal

Accepté pour publication dans le *British Journal of Nutrition*, Septembre 2005.

Time Course of the Development of Non-Alcoholic Hepatic Steatosis in Response to High-Fat Diet-Induced Obesity in Rats

Marie-Soleil Gauthier¹, Roland Favier², and Jean-Marc Lavoie¹

¹Département de kinésiologie, Université de Montréal, Montréal, Canada and ²Équipe Mixte INSERM 221, Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée, Université Joseph Fourier, Grenoble, France

Running title: Kinetic of development of hepatic steatosis

Mailing proofs: Dr. Jean-Marc Lavoie

Département de kinésiologie


Université de Montréal

C.P. 6128, Succ. centre-ville

Montréal (Québec) Canada H3C 3J7

Tel: (514) 343-7044

Fax: (514) 343-2181



Abstract

The aim of the study was to characterize the time course of the development of high-fat diet-induced hepatic steatosis and its relation to body fat accretion and changes in plasma lipid profile. Female Sprague-Dawley rats were high-fat fed (HF; 42%, kJ) for 1, 2, 4, 6, 12, and 16 weeks and compared to standard fed rats (SD). Data obtained from HF rats were further analyzed by classifying the animals into obesity-prone and obesity-resistant. In HF rats, liver lipid content increased rapidly by ~200% during the first 2 weeks, decreased almost to baseline levels between week 2 and 6, and re-increased by 17% between week 6 and 16 ($p < 0.05$). Body weight, body fat accretion, plasma leptin, NEFA, and glycerol concentrations were higher in HF than in SD rats ($p < 0.05$). These higher values were established in 2 weeks and the differences between the groups did not further enlarge from week 2 to 16. Obesity-prone rats depicted higher body weight and body fat accretion than obesity-resistant and SD rats. Surprisingly however, liver lipid content was the same in obesity-prone as in obesity-resistant rats as they were both higher than in SD rats (weeks 2 and 16; $p < 0.05$). Our data support the hypothesis that the liver acts as a systemic buffer, largely increasing its lipid content in the early stage of high-fat feeding. Our results also suggest that the development of non-alcoholic fatty liver is more linked to dietary fats than to body weight gain.

Keywords: fatty liver, intraabdominal fat, plasma lipid profile, NAFLD, obesity resistant

Introduction

It is well established that the ingestion of a high-fat diet promotes obesity and the development of the metabolic syndrome in both rodents and human beings (Hill *et al.*, 1992; Ghibaudi *et al.*, 2002; Satia-Abouta *et al.*, 2002; Axen *et al.*, 2003). Besides increased fat accretion in adipocytes and hyperlipidemia, recent data also indicate that such high-fat diets result in non-alcoholic hepatic steatosis, which is characterized by an excessive accumulation of triacylglycerol within hepatocytes. Non-alcoholic hepatic steatosis is now recognized as an integral part of the metabolic syndrome and has been associated with the development of insulin resistance and insulin signaling defects (Marceau *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2000; Reue *et al.*, 2000; Saltiel & Kahn, 2001; Seppala-Lindroos *et al.*, 2002; Samuel *et al.*, 2004). Furthermore, an accumulating body of evidence suggests that non-alcoholic hepatic steatosis may progress to advanced liver disease in a proportion of patients (Day, 2002).

Recent works conducted in our laboratory, using the high-fat diet regimen approach, have led us to postulate that, opposite to what is generally assumed, lipids do not accumulate in a linear fashion in the liver (Gauthier *et al.*, 2003; Gauthier *et al.*, 2004). In these works (Gauthier *et al.*, 2003; Gauthier *et al.*, 2004), we hypothesized that hepatic steatosis develops rapidly when rats undertake a high-fat diet regimen but does not increase linearly over time and might even decrease if high-fat feeding is pursued for a longer period of time. This observation would be consistent with the suggestion that the liver acts as a systemic lipid buffer during periods of high lipid influx (Frayn, 2002; Gauthier *et al.*, 2003) and may be the first organ to store excessive amounts of fatty acids (Westerbacka *et al.*, 2005). One way to better circumscribe the role of the liver as a “fat trapper” in response to high-fat feeding, is to establish the time course of the development of hepatic steatosis. Surprisingly, very little information on the time course of the development of high-fat diet-induced obesity and hepatic steatosis is available. Such information may be useful not only to better characterize liver lipid infiltration but to better understand how a lipid load is managed by the body over time. Since hepatic steatosis often develops in conjunction with lipid accumulation in adipocytes and changes in blood lipid profile, these parameters must

be considered to better understand how hepatic steatosis develops. Thus, the main goal of the present study was to gain some information on the development of hepatic steatosis by characterizing the time sequence (1 to 16 weeks) of high-fat diet-induced liver lipid infiltration in rats.

Sprague-Dawley rats show large inter-individual differences in susceptibility to weight gain when submitted to high-fat feeding (Lauterio *et al.*, 1994; Levin *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1998; Ghibaudi *et al.*, 2002). HF obesity-resistant rats seem to be protected against weight gain and adipocytes fat accretion (Pagliassotti *et al.*, 1993; Lauterio *et al.*, 1994; Pagliassotti *et al.*, 1994; Pagliassotti *et al.*, 1995; Levin *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1998; Commerford *et al.*, 2000; Ghibaudi *et al.*, 2002) but not consistently from high-fat diet-induced increase in plasma NEFA (Commerford *et al.*, 2000; Ghibaudi *et al.*, 2002; Ji *et al.*, 2005). Liver lipid infiltration is highly related to the amount of circulating NEFA (Sniderman *et al.*, 1998). It is, however, unknown if obesity-resistant rats are protected against high-fat diet-induced hepatic steatosis. Thus, to further characterize liver lipid infiltration in response to high-fat feeding, we proceeded to a second analysis of the results where high-fat fed rats that had the highest and the lowest weight gain were designated obesity-prone (HF-OP) and obesity-resistant (HF-OR), respectively, and compared to control standard fed rats.

Methods

Animal care

Female Sprague-Dawley strain rats ($n=119$, 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

Three days after their arrival, animals were randomly assigned either to a standard (SD) or a high-fat (HF) diet. The HF diet consisted of 42% lipid, 36% carbohydrate, and 22% protein (kJ) and was provided in small pellets from ICN Pharmaceuticals (NY, USA). The lipids included in the high-fat diet consisted of 80% lard (41% saturated fat, 44% monounsaturated fat, and 9% polyunsaturated fat; g of fatty acids /100g of lard), and 20% corn oil (13% saturated fat, 25% monounsaturated and 58% polyunsaturated fat; g of fatty acids /100g of corn oil). The standard diet (12.5% lipid, 63.2% carbohydrate, and 24.3 % protein; kJ) consisted of usual pellet rat chow (Agribrands Purina Canada, Woodstock, Ontario). Details of the diets have been presented elsewhere (Gauthier *et al.*, 2003). Twelve rats were immediately sacrificed after their 3-day acclimatization period to provide baseline values for the dependant variables. Rats on the high-fat diet were sacrificed after 1, 2, 4, 6, 8, 12, and 16 weeks ($n = 9-10$ /group), while control rats on the SD diet were sacrificed only after 2, 6, 12, and 16 weeks ($n = 9-10$ /group). Body weight and food intake were monitored daily in all rats. For the second part of the study, HF-fed rats were classified according to their weight gain during their respective period of high-fat feeding (2, 6, 12, and 16 weeks). The 5 rats showing the highest weight gain and the five showing the lowest weight gain were further classified as obesity-prone (HF-OP) and obesity-resistant (HF-OR).

Blood and tissue sampling

At the end of their respective dietary manipulation, all animals were sacrificed between 09:00 AM and 12:00 PM. Food was removed from the animals' cage 2-3 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) and simultaneously drawn from the abdominal vena cava (~4 ml) and the hepatic portal vein (~1.5 ml) into syringes pre-treated with EDTA (15%). Blood was centrifuged (3000 RPM for 8 min, 4 °C) and the plasma kept for further analyses. Liver, muscles, and fat deposits were excised and weighed in the following order: liver, mesenteric fat, urogenital fat, retroperitoneal fat, and subcutaneous fat. All tissue samples were frozen in liquid nitrogen immediately after being weighed. The liver median lobe was freeze-clamped and used for glycogen and triacylglycerol determinations. 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. Urogenital fat pad included adipose tissue surrounding the kidneys, ureters, and bladder as well as ovaries, oviducts, and uterus. Retroperitoneal fat pad was taken as that distinct deposit behind each kidney along the lumbar muscles. For subcutaneous deposit measurement, a rectangular piece of skin was taken on the right side of each animal, from the median line of the abdomen to the spine and the right hip to the first rib as described by Krotkiewski and Bjorntorp (Krotkiewski & Bjorntorp, 1976). All plasma and tissue samples were stored at -78 °C until analyses.

Analytical procedures

Plasma glucose concentration was determined with the use of a glucose analyser (Yellow Springs Instruments 2300, Yellow Springs, OH). Insulin concentrations were measured with commercially available radioimmunoassay kits (Medicorp, Montréal, P.Q. and ICN Pharmaceuticals, New York, NY). Leptin concentrations were measured with commercially available radioimmunoassay kits (Linco Research Inc., St-Charles, MO, USA). Plasma non-esterified fatty acid (NEFA) levels were measured with a commercially available kit from Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany) and glycerol, triacylglycerol

(TAG), and beta-hydroxybutyrate were measured with kits from Sigma Diagnostics (St-Louis, MO).

Liver TAG content 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 TAG, Frayn and Maycock (Frayn & Maycock, 1980) have shown that omitting removal of phospholipids leads to only a $\pm 2\%$ error in the determination of tissue TAG. Liver glycogen content was determined by use of the phenol-sulfuric acid reaction (Lo *et al.*, 1970).

Statistical analyses

Values are expressed as means \pm S.E. Statistical analyses were performed using a two-way ANOVA for non-repeated measures design with diet and time as main effects at common time points 2, 6, 12 and 16 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 time points 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, and 16 weeks in high-fat fed rats and time points 0, 2, 6, 12, and 16 weeks for SD fed rats. This second statistical analysis was performed to better characterize the effect of time in each diet including comparison with time 0. In the second part of the study, HF-OP, HF-OR, and SD rats were compared using a two-way ANOVA for non-repeated measures design with phenotype and time as main effects at time points 2, 6, 12, and 16 weeks. Fisher's post-hoc test was used in the event of a significant ($p < 0.05$) F ratio.

Results

Mean daily energy intake was significantly higher ($p < 0.05$) in rats that were fed the high-fat diet only for the first two weeks compared to standard fed counterparts (Fig. 1A). Figure 1B illustrates the mean daily energy intake from week 1 to 16 only in rats that were fed either the high-fat or the standard diet for 16 weeks. This figure shows that on a high-fat diet, rats ingest more energy during the first few weeks and then lower their daily energy intake to levels similar to standard-fed rats. Rats on the high-fat diet depicted overall (from week 2 to 16) higher ($p < 0.05$) body weight compared to standard fed rats (Fig. 1C). Liver TAG content was higher ($p < 0.05$) in high-fat than in standard fed rats at weeks 2 (~200%) and 16 (~50%) (Fig. 1D). In high-fat fed rats, liver TAG content increased by ~2 folds during the first two weeks of the diet ($p < 0.05$), to decrease during weeks 2 to 6 ($p < 0.05$) to a level that was not significantly ($p > 0.05$) different from baseline values anymore. Liver lipid infiltration re-increased when high-fat feeding was pursued over 6 weeks, HF fed rats showing liver TAG values significantly ($p < 0.05$) higher than resting levels at week 8 and 16. There was no effect of time on liver triacylglycerol concentration in standard-fed rats ($p > 0.05$). Liver glycogen content was significantly ($p < 0.05$) lower in HF than in SD fed rats (Fig. 1E). There was no significant ($p > 0.05$) effect of time on liver glycogen levels.

Fat depots

The relative weights of the mesenteric, retroperitoneal, and urogenital fat depots as well as plasma leptin concentrations were significantly ($p < 0.05$) higher in HF than in SD fed rats throughout weeks 2 to 16 (Fig. 2). There was no statistical interaction in any of these responses indicating that high-fat feeding induced a rapid increase in these variables during the first 2 weeks and that the difference between high-fat and standard fed rats was not accentuated or diminished throughout the remaining weeks. The intraabdominal fat depots and plasma leptin concentrations were significantly ($p < 0.05$) higher with time in both dietary conditions. The response of the subcutaneous fat pad was, however, somewhat different than the intraabdominal fat depots (Fig. 2D). Although overall higher ($p < 0.05$) values were found in HF compared to SD rats, the accumulation of subcutaneous lipids was

rapidly increased in high-fat fed rats (first two weeks) to decrease during weeks 2 to 4 and increase again until the end of the experiment.

Plasma variables

As for fat pads weight, plasma NEFA and glycerol concentrations were higher ($p < 0.05$) in HF than in SD fed rats throughout weeks 2 to 16, the difference between the two dietary groups being established during the 2 first weeks on the diets and remaining constant during the remainder of the study (Fig. 3 A, B). Plasma NEFA and glycerol levels increased ($p < 0.05$) rapidly with time (1st wk) in HF fed animals while they were significantly ($p < 0.05$) increased only after 12 wks when rats were fed the SD diet. No significant differences ($p > 0.05$) were found in plasma TAG between HF and SD rats ($p > 0.05$), the values increasing ($p < 0.05$) similarly on and after the 6th wk in both dietary conditions (Fig. 3C). No significant ($p > 0.05$) differences were found in plasma β -hydroxybutyrate between the two dietary groups (Fig. 3D). Plasma β -hydroxybutyrate concentrations were found to be lower with time on and after the 12th week in SD fed rats only.

High-fat feeding was associated with small but significantly ($p < 0.05$) higher plasma glucose values (Fig. 4A) along with higher ($p < 0.05$) overall plasma insulin values in portal but not in peripheral blood (Fig 4B, C).

Comparisons of HF-OP and HF-OR rats with control SD rats

To further characterize liver lipid infiltration in response to high-fat feeding, we proceeded to a second analysis of the results where high-fat fed rats that had the highest and the lowest weight gain were designated obesity-prone (HF-OP) and obesity-resistant (HF-OR), respectively, and compared to control standard fed rats. As expected, rats prone to high-fat diet-induced obesity (HF-OP) gained more weight than rats resistant to high-fat diet-induced obesity (HF-OR) and SD-fed rats ($p < 0.05$; Fig 5A). Weight gain in HF-OR rats was similar ($p > 0.05$) to rats fed the standard diet with the exception of week 2 where they gained slightly more weight than the SD rats ($p < 0.05$). Mean daily energy intake was significantly higher ($p < 0.05$) in HF-OP rats than HF-OR and SD rats except at week 12

(Fig 5B). No difference in energy intake was found between HF-OR and SD rats with the exception of week 16 where HF-OR rats had lower energy intake than SD rats ($p < 0.05$). Intraabdominal and subcutaneous fat pad weights were heavier in HF-OP rats than in the two other groups at each time point ($p < 0.05$; Fig 5C, D). HF-OR rats also showed heavier intraabdominal fat pad weights than control standard-fed rats ($p < 0.05$). Unexpectedly, no difference was found in liver TAG content between HF-OP and HF-OR ($p > 0.05$), these two groups depicting higher liver TAG content than SD rats at week 2 and 16 ($p < 0.05$; Fig 5E). Similarly to liver TAG, there were no significant differences ($p > 0.05$) in plasma NEFA levels between HF-OP and HF-OR rats, both of these groups showing higher plasma NEFA levels than SD rats ($p < 0.05$; Fig 5F).

Discussion

Although the significance of hepatic steatosis in relation to obesity and the metabolic syndrome has gained interest in recent years, there is a paucity of information on the development of this metabolic phenomenon. One of the advantages of using an animal instead of a human model to study obesity is that it is ethically easier to use a nutritional stimulus to examine how obesity develops instead of using obese versus non-obese comparisons. This approach was used in the present study to examine how high-fat diet-induced hepatic steatosis develops over time and in relation to other metabolic deteriorations. The present time course data show that in response to an increased ingestion of fat, the liver becomes rapidly (1-2 weeks) and highly (~2 folds) infiltrated with lipids, to decrease its lipid content in subsequent weeks (weeks 4-6), and becomes slowly re-infiltrated if the high-fat diet is pursued for a longer period of time (6-16 weeks). These observations suggest that high-fat feeding-induced hepatic steatosis is, at first, a transitory phenomena that probably helps avoiding the excessive accumulation of circulating lipids upon a sudden increase in fat ingestion. Previous studies have shown that hepatic steatosis can occur as early as after three days of high-fat feeding (Kraegen *et al.*, 1991; Samuel *et al.*, 2004). To our knowledge, the present data show for the first time that the time course of high-fat feeding-induced liver lipid infiltration occurs as a rapid and large increase in liver fat content during the first few weeks which can subsequently decrease, even if the high-fat diet is maintained, and slowly re-increase over time. However, the present data do not preclude that high-fat feeding-induced hepatic steatosis can not become a more stable phenomena, as suggested by the 16th week values, if the diet or the obesity stimulus is pursued for a longer period of time. High-fat feeding for 10 months in male Wistar rats resulted in a large increase in liver triacylglycerol concentrations (Chalkley *et al.*, 2002). It is also revealing to observe that in rats fed a standard diet, liver lipid content did not increase over time. This is in contrast to what is seen in the plasma and the adipocytes of these standard fed rats where lipids accumulate over time even if the lipid content of the diet remains unchanged. This suggests that liver lipid infiltration is more closely related to the diet than to aging. The present findings on the development of hepatic steatosis are, however, limited to the high-fat diet model since the mechanisms leading to hepatic

steatosis might be different with other types of diet (i.e. high sucrose) or in genetic models of obesity (i.e. *ob/ob* mice and Zucker *fa/fa* rats).

As expected, obesity-prone rats showed higher intraabdominal and subcutaneous fat than standard-fed rats while obesity-resistant rats seemed largely protected against these high-fat diet-induced deleterious effects. Surprisingly however, at time when significant hepatic steatosis was present in high-fat fed rats (weeks 2 and 16), obesity-resistant rats depicted the same degree of liver lipid infiltration than obesity-prone rats (Fig.5E). In addition, high-fat obesity-resistant rats showed NEFA concentrations similar to obesity-prone rats (Fig. 5F). These results suggest that high-fat obesity-resistant rats might not be protected against high-fat feeding-induced liver lipid infiltration. This is in agreement with the recent work of Westerbacka et al. (2005) who found a close relationship between the amount of dietary fat and liver lipid content in human independent of body fat. These results are also in line with the suggestion that hepatic steatosis is independent of body weight gain and more closely related to circulating NEFA levels (Seppala-Lindroos *et al.*, 2002). Overall, data from the present study indicate that, opposite to adipocytes fat accretion, high-fat diet-induced hepatic steatosis does not develop linearly over time. Moreover, the HF-OP and HF-OR comparison reveals that high-fat feeding-induced hepatic steatosis is independent of the ability of the animal to resist body fat gain.

In agreement with the suggestion of Westerbacka et al. (2005), our data on high-fat diet-induced liver lipid infiltration appear to indicate that the liver may be the first organ to store excessive amounts of fatty acids. Acting as a lipid buffer, the liver would have a detoxifying role in converting cytotoxic NEFA into TAG, a biologically inert molecule (Gibbons *et al.*, 2004). Changes in liver lipid content can be caused by modification of lipid uptake which can then be directed towards lipid oxidation, lipid synthesis and storage, and/or changes in VLDL-TAG secretion by the organ. In the present study, it seems likely that the rapid and large accumulation of liver TAG observed during the first two weeks of high-fat feeding is mostly the result of an increase in NEFA uptake. Indeed, high-fat feeding resulted in a three-fold increase in plasma NEFA levels after 2 weeks. The increased delivery of fatty acids to the liver should result in a higher uptake by the liver,

because NEFA uptake is mostly done in a concentration-dependent manner (Burt *et al.*, 1991). It is also important to mention that the higher energy intake (Fig. 1A, B) observed during the first weeks of high-fat feeding may have contributed to the rapid increase in plasma NEFA and liver fat content of high-fat fed rats. Furthermore, data from the present time course study reveal that during the first two weeks of high-fat feeding, liver lipid partitioning seems directed more towards lipid synthesis and storage rather than lipid oxidation or VLDL-TAG secretion. On the other hand, the decrease and re-increase in liver lipid content between weeks 2 and 16 could be partly attributable to changes in VLDL-TAG secretion. Supporting this interpretation is the observation that, on the whole, the time course of plasma TAG, which can partly reflect VLDL-TAG secretion, is opposite to the time course of liver TAG accumulation. It is becoming clear that liver TAG which serves as precursors for secreted VLDL-TAG particles do not come from newly synthesized TAG made from circulating NEFA but from a second pool of TAG located in the endoplasmic reticulum (Gibbons *et al.*, 2004). This second pool of TAG, utilized for the assembly of VLDL-TAG particles, comes from the hydrolysis and subsequent re-esterification of cytosolic TAG, and thus requires a more complex enzymatic apparatus. It is tempting to postulate that upon an increased ingestion of fat, lipids are first preferentially partitioned towards the cytosolic pool, increasing liver TAG content, and that more time is required for the up-regulation of VLDL-TAG assembly and secretion.

The time course of energy intake could also be part of the explanation for the decrease in liver fat content seen between week 2 and 6 of high-fat feeding. After the first week, daily energy intake of high-fat fed rats slowly decreased and stabilized to the levels of standard fed rats. However, rats that were high-fat fed for 16 weeks show significant hepatic steatosis while their mean daily energy intake calculated on the whole period of feeding was the same as observed in standard fed rats (Fig 1A). Moreover, obesity-resistant rats showed equivalent liver lipid content as obesity-prone rats in spite of lower energy intake (Fig. 5B, E). It thus appears that energy intake can influence liver fat content but is not the sole contributor since isocaloric high-fat feeding can still induce hepatic steatosis as seen in HF rats at 16 weeks.

An interesting observation of the present study is that the higher gain in intraabdominal fat pads weight (Fig. 2), whether sampled from the mesenteric, retroperitoneal, or urogenital area, in HF compared to SD fed rats was established as early as two weeks after the diet was initiated. The difference in intraabdominal fat between the 2 dietary groups then remained constant during the subsequent 14 weeks of the experiment, high-fat fed rats gaining no more fat than standard-fed rats after the 2 first weeks. The same pattern of response is also observed for plasma leptin concentration, which is well known to be highly correlated with the gain in adiposity (Bahceci *et al.*, 1999). These observations suggest that the gain in adiposity is rapidly established when rats are submitted to high-fat feeding and, secondly, that animals seem to adapt to high-fat feeding so as to control the gain in adiposity. High-fat fed rats had a higher daily energy intake during the first few weeks of feeding which declined to the level of standard fed rats during the first 4 weeks (Fig. 1A, B). This initial hyperphagia could thus partly explain the time course of adipocyte fat accretion observed in the present study. Along with the rapid gain in adiposity, higher levels of portal insulin were established early (2 wk) in high-fat compared to SD fed rats. Such an observation was not seen in peripheral blood. This may be taken as an indication that insulin secretion is rapidly increased by a HF diet and that consequently the liver is rapidly exposed to higher levels of insulin. These higher portal insulin levels in HF fed rats might have a role to play in the rapid development of hepatic steatosis.

In summary, results of the present study show that hepatic steatosis is a phenomenon that takes place rapidly when rats are submitted to high-fat feeding but that does not develop linearly over time. Moreover, obesity-resistant rats do not seem to be protected against high-fat feeding-induced hepatic steatosis, suggesting a close relationship between dietary fat and liver lipid content, independent of body weight and fat accretion. From a clinical point of view, our results emphasize the importance of reducing dietary fat ingestion, even in the absence of a gain in body weight, to avoid the development of a state of hepatic steatosis.

Acknowledgements

This work was supported by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). Marie-Soleil Gauthier is supported by a Canada Graduate Scholarship from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

Legends

Fig 1. Mean daily energy intake in rats killed at different times and calculated for the whole period of feeding (A), mean daily energy intake from week 1 to 16 only in rats that were killed after 16 weeks and calculated weekly (B), final body weight (C), liver triacylglycerol and glycogen concentrations (D, E) in rats fed a standard (SD) or a high-fat (HF) diet. Values are means \pm SE, $n = 9-10$ rats/group. + Significantly different from SD fed rats, $p < 0.05$. * Significantly different from week 0 (significantly different from week 1 in Fig 1A and B only), $p < 0.05$. & Significantly different from week 6, $p < 0.05$.

Fig 2. Mesenteric (A), retroperitoneal (B), urogenital (C), and subcutaneous (D) fat weight relative to 100 g body weight (BW), and plasma leptin concentration (E) in rats fed a standard (SD) or a high-fat (HF) diet. Values are means \pm SE, $n = 9-10$ rats/group. + Significantly different from SD fed rats, $p < 0.05$. * Significantly different from week 0, $p < 0.05$. & Significantly different from week 6, $p < 0.05$.

Fig 3. Plasma non-esterified fatty acids (NEFA) (A) plasma glycerol (B), triacylglycerol (C) and beta-hydroxybutyrate concentrations (D) in rats fed a standard (SD) or a high-fat (HF) diet. Values are means \pm SE, $n = 9-10$ rats/group. + Significantly different from SD fed rats, $p < 0.05$. * Significantly different from week 0, $p < 0.05$. & Significantly different from week 6, $p < 0.05$.

Fig 4. Plasma glucose (A) and plasma insulin concentrations measured in peripheral (B) and portal (C) blood in rats fed a standard (SD) or a high-fat (HF) diet. Values are means \pm SE, $n = 9-10$ rats/group. + Significantly different from SD fed rats, $p < 0.05$. * Significantly different from week 0, $p < 0.05$. & Significantly different from week 6, $p < 0.05$.

Fig 5. Body weight (A), mean daily energy intake (B), the sum of the relative weights of the three intraabdominal fat pads (mesenteric, urogenital, and retroperitoneal) (C) and the subcutaneous fat pad weight relative to 100 g BW (D), liver triacylglycerol concentration (E), and plasma non-esterified fatty acids (NEFA) (F) between rats prone (HF-OP) or resistant (HF-OR) to high-fat diet-induced obesity and control rats on the SD diet. Values are means \pm SE, $n = 5$ rats/group in HF-OP and HF-OR rats and $n = 9$ rats/group in SD rats. § Significantly different from HF-OR rats, $p < 0.05$. + Significantly different from SD fed rats, $p < 0.05$.

References

Axen KV, Dikeakos A & Sclafani A (2003) High Dietary Fat Promotes Syndrome X in Nonobese Rats. *J. Nutr.* **133**, 2244-2249.

Bahceci M, Tuzcu A, Akkus M, Yaldiz M & Ozbay A (1999) The effect of high-fat diet on the development of obesity and serum leptin level in rats. *Eat Weight Disord* **4**, 128-132.

Burt AD, MacSween RNM, Peters TJ & Simpson KJ (1991) Non-alcoholic fatty liver: causes and complications. In *Oxford textbook of clinical hepatology*, pp. 865-871 [N McIntyre, editor]. New York: Oxford University Press.

Chalkley SM, Hettiarachchi M, Chisholm DJ & Kraegen EW (2002) Long-term high-fat feeding leads to severe insulin resistance but not diabetes in Wistar rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**, E1231-1238.

Commerford SR, Pagliassotti MJ, Melby CL, Wei Y, Gayles EC & Hill JO (2000) Fat oxidation, lipolysis, and free fatty acid cycling in obesity-prone and obesity-resistant rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **279**, E875-885.

Day CP (2002) Pathogenesis of steatohepatitis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* **16**, 663-678.

Frayn KN (2002) Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. *Diabetologia* **45**, 1201-1210.

Frayn KN & Maycock PF (1980) Skeletal muscle triacylglycerol in the rat: methods for sampling and measurement, and studies of biological variability. *J Lipid Res* **21**, 139-144.

Gauthier MS, Couturier K, Charbonneau A & Lavoie JM (2004) 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* **28**, 1064-1071.

Gauthier MS, Couturier K, Latour JG & Lavoie JM (2003) Concurrent exercise prevents high-fat-diet-induced macrovesicular hepatic steatosis. *J Appl Physiol* **94**, 2127-2134.

Ghibaoudi L, Cook J, Farley C, van Heek M & Hwa JJ (2002) Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of sprague-dawley rats. *Obes Res* **10**, 956-963.

Gibbons GF, Wiggins D, Brown AM & Hebbachi AM (2004) Synthesis and function of hepatic very-low-density lipoprotein. *Biochem Soc Trans* **32**, 59-64.

Hill JO, Lin D, Yakubu F & Peters JC (1992) Development of dietary obesity in rats: influence of amount and composition of dietary fat. *Int J Obes Relat Metab Disord* **16**, 321-333.

Ji H, Outterbridge LV & Friedman MI (2005) Phenotype-based treatment of dietary obesity: differential effects of fenofibrate in obesity-prone and obesity-resistant rats. *Metabolism - Clinical and Experimental* **54**, 421-429.

Kim JK, Gavrilova O, Chen Y, Reitman ML & Shulman GI (2000) Mechanism of insulin resistance in A-ZIP/F-1 fatless mice. *J Biol Chem* **275**, 8456-8460.

Kraegen EW, Clark PW, Jenkins AB, Daley EA, Chisholm DJ & Storlien LH (1991) Development of muscle insulin resistance after liver insulin resistance in high-fat-fed rats. *Diabetes* **40**, 1397-1403.

Krotkiewski M & Bjorntorp P (1976) The effect of progesterone and of insulin administration on regional adipose tissue cellularity in the rat. *Acta Physiol Scand* **96**, 122-127.

Lauterio TJ, Bond JP & Ulman EA (1994) Development and characterization of a purified diet to identify obesity-susceptible and resistant rat populations. *J Nutr* **124**, 2172-2178.

Levin BE, Dunn-Meynell AA, Balkan B & Keesey RE (1997) Selective breeding for diet-induced obesity and resistance in Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol* **273**, R725-730.

Lo S, Russell JC & Taylor AW (1970) Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol* **28**, 234-236.

Marceau P, Biron S, Hould FS, Marceau S, Simard S, Thung SN & Kral JG (1999) Liver pathology and the metabolic syndrome X in severe obesity. *J Clin Endocrinol Metab* **84**, 1513-1517.

Pagliassotti MJ, Knobel SM, Shahrokhi KA, Manzo AM & Hill JO (1994) Time course of adaptation to a high-fat diet in obesity-resistant and obesity-prone rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **267**, R659-664.

Pagliassotti MJ, Pan D, Prach P, Koppenhafer T, Storlien L & Hill JO (1995) Tissue oxidative capacity, fuel stores and skeletal muscle fatty acid composition in obesity-prone and obesity-resistant rats. *Obes Res* **3**, 459-464.

Pagliassotti MJ, Shahrokhi KA & Hill JO (1993) Skeletal muscle glucose metabolism in obesity-prone and obesity-resistant rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **264**, R1224-1228.

Reue K, Xu P, Wang XP & Slavin BG (2000) Adipose tissue deficiency, glucose intolerance, and increased atherosclerosis result from mutation in the mouse fatty liver dystrophy (fld) gene. *J Lipid Res* **41**, 1067-1076.

Saltiel AR & Kahn CR (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **414**, 799-806.

Samuel VT, Liu Z-X, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, Romanelli AJ & Shulman GI (2004) Mechanism of Hepatic Insulin Resistance in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *J Biol Chem* **279**, 32345-32353.

Satia-Abouta J, Patterson RE, Schiller RN & Kristal AR (2002) Energy from fat is associated with obesity in U.S. men: results from the Prostate Cancer Prevention Trial. *Prev Med* **34**, 493-501.

Seppala-Lindroos A, Vehkavaara S, Hakkinen AM, Goto T, Westerbacka J, Sovijarvi A, Halavaara J & Yki-Jarvinen H (2002) Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 3023-3028.

Sniderman AD, Cianflone K, Arner P, Summers LKM & Frayn KN (1998) The Adipocyte, Fatty Acid Trapping, and Atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**, 147-151.

Wang J, Alexander JT, Zheng P, Yu HJ, Dourmashkin J & Leibowitz SF (1998) Behavioral and endocrine traits of obesity-prone and obesity-resistant rats on macronutrient diets. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **274**, E1057-1066.

Westerbacka J, Lammi K, Hakkinen AM, Rissanen A, Salminen I, Aro A & Yki-Jarvinen H (2005) Dietary Fat Content Modifies Liver Fat in Overweight Non-Diabetic Subjects. *J Clin Endocrinol Metab*.

Figure 1

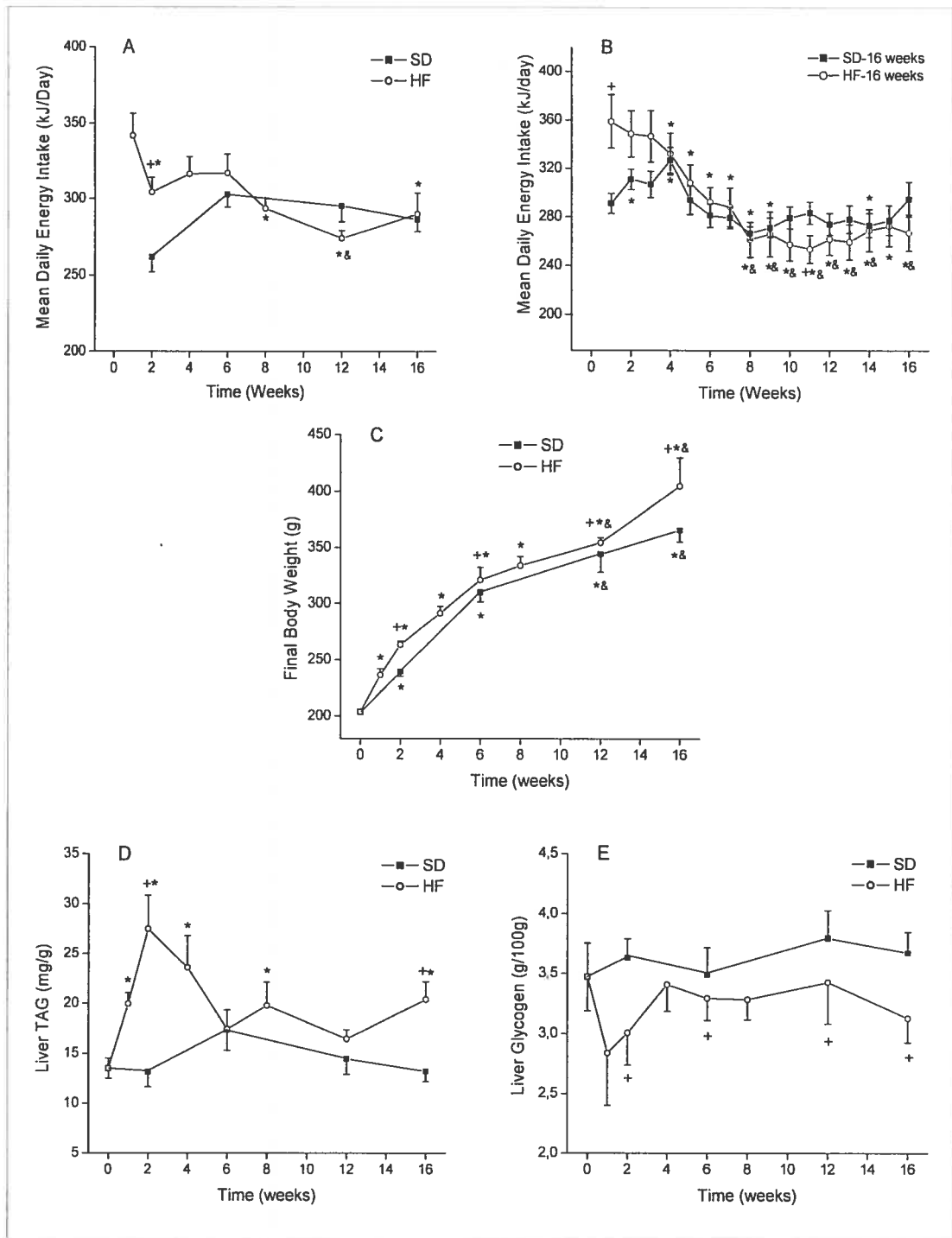


Figure 2

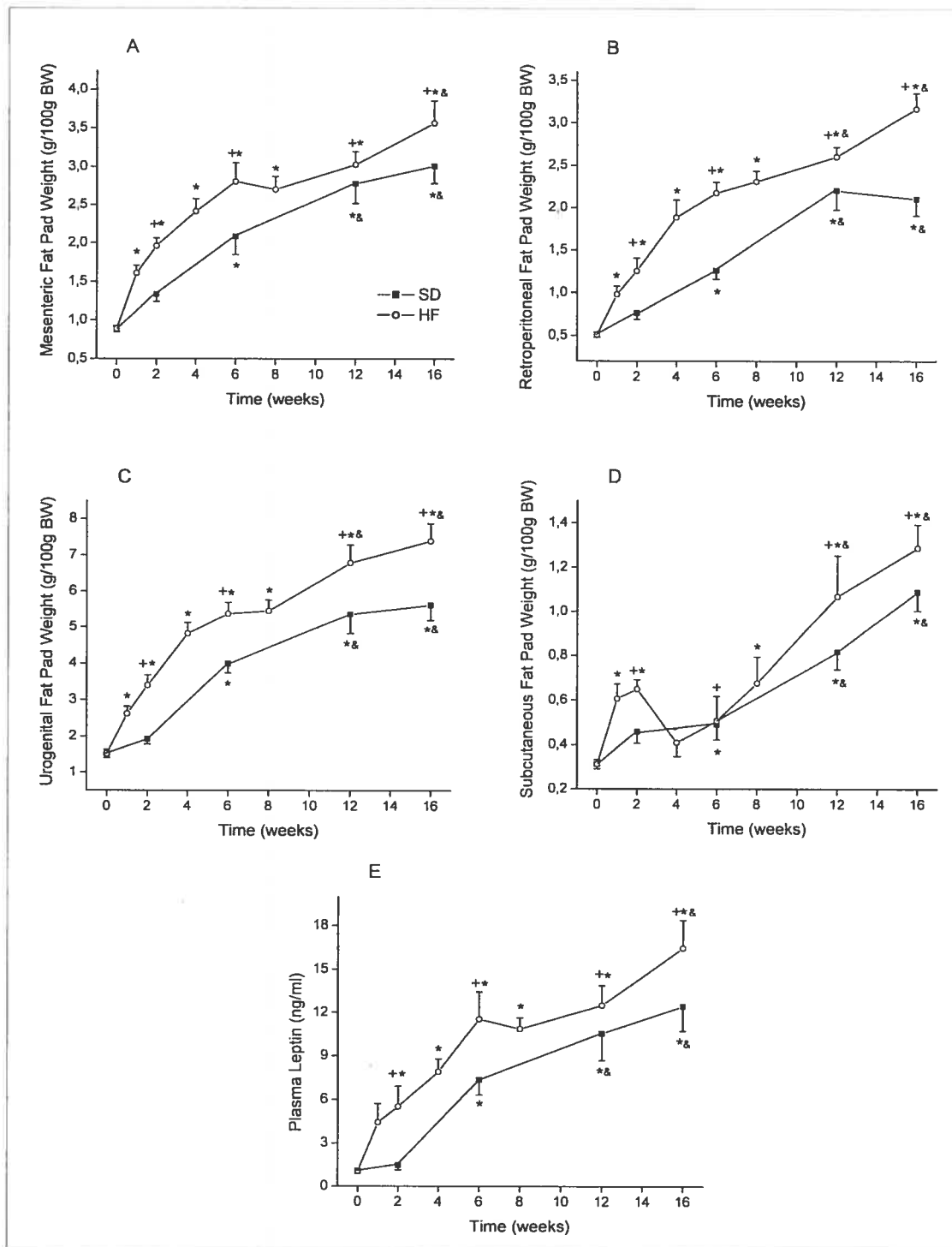


Figure 3

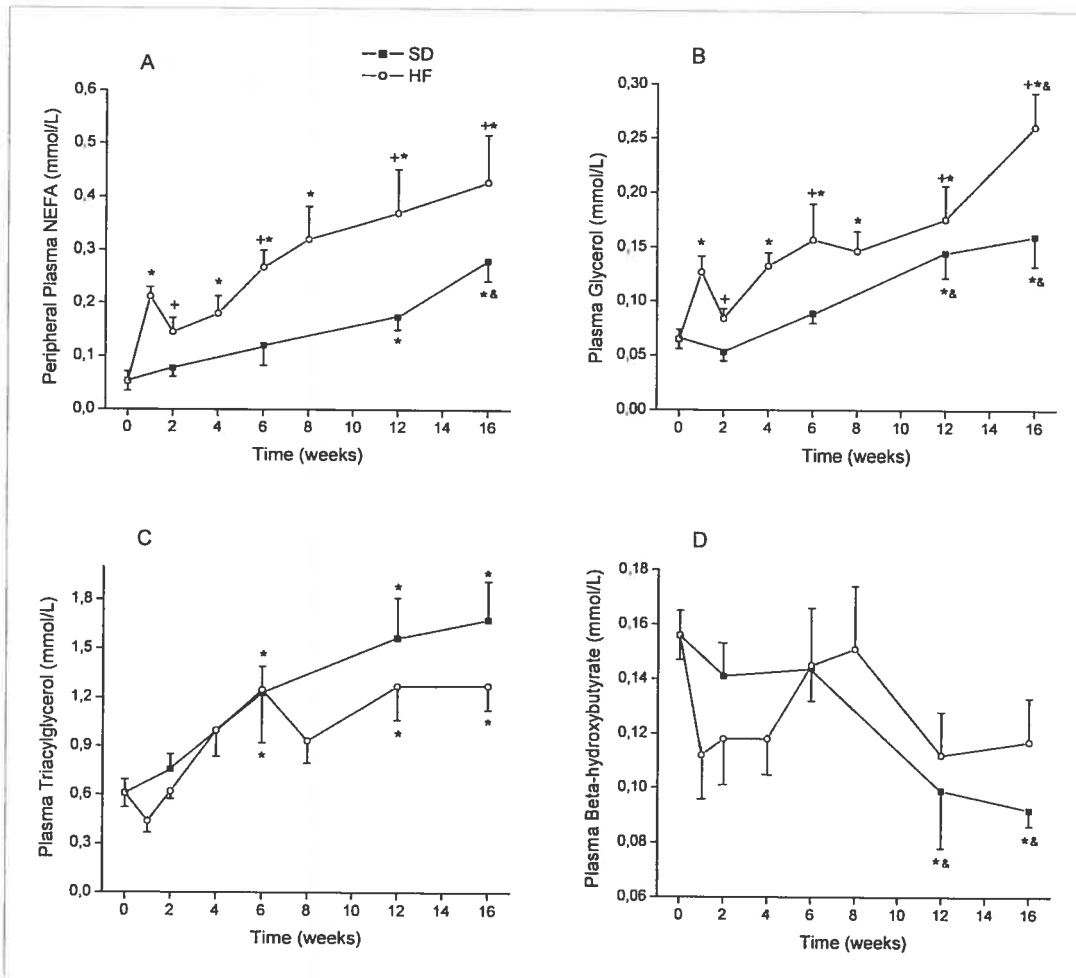


Figure 4

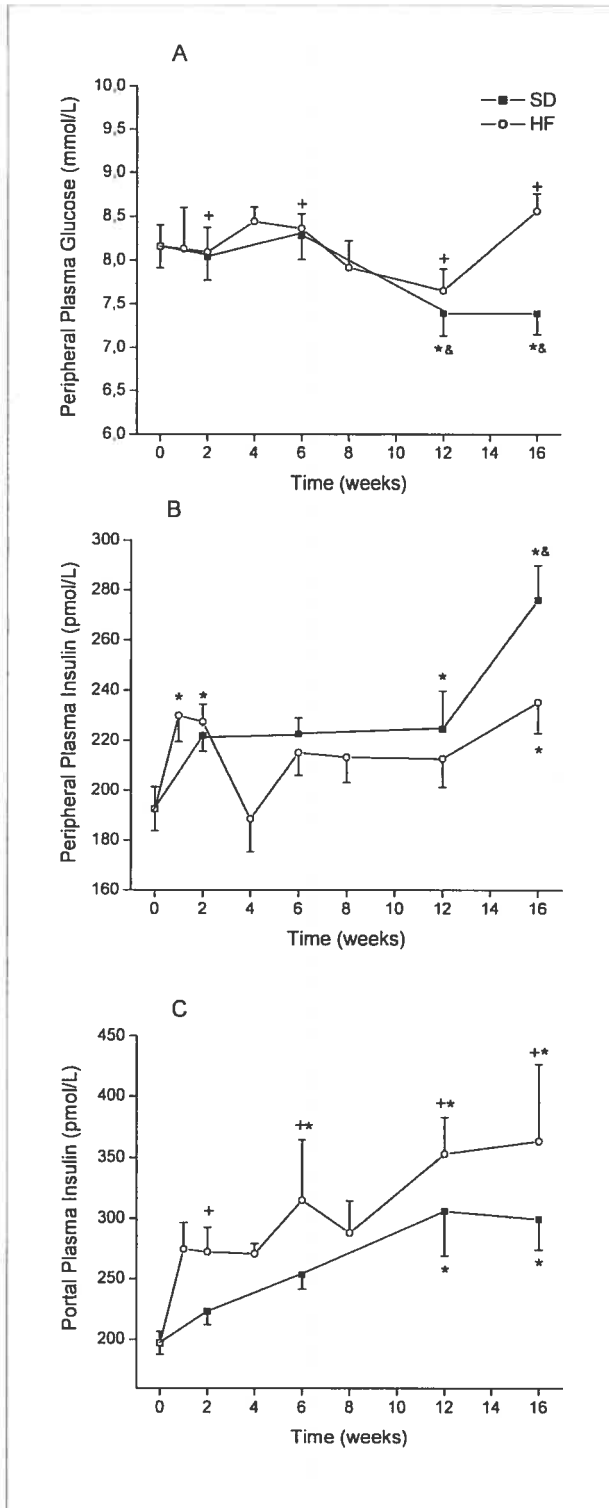
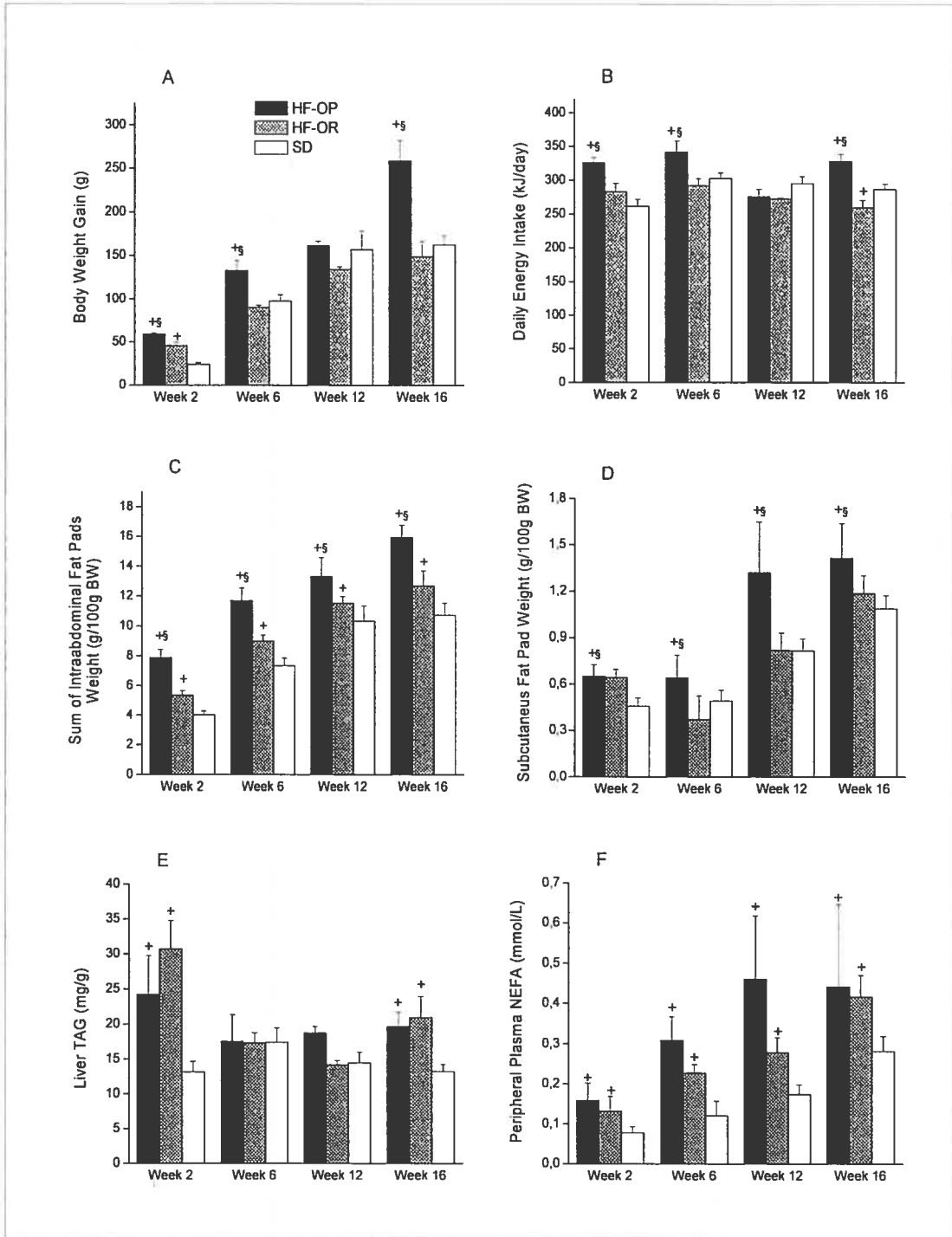


Figure 5



2.4. Étude 4-

Titre

Acute exercise improves high-fat diet-induced hepatic insulin resistance in rats: potential role of AMP-activated protein kinase.

Auteurs

Marie-Soleil Gauthier, Raynald Bergeron, Martin Latour et Jean-Marc Lavoie.

Journal

En préparation pour le *American Journal of Physiology- Endocrinology and Metabolism*.

**Acute exercise improves high-fat diet-induced hepatic insulin resistance in rats:
potential role of AMP-activated protein kinase**

Marie-Soleil Gauthier¹, Raynald Bergeron², Martin G. Latour³, and Jean-Marc Lavoie¹


¹Département de kinésiologie, Université de Montréal, Montréal, Canada

²Dept. of Metabolic Disorders, Merck Research Laboratories, RY80M-132, 126 Lincoln Ave., Rahway, NJ07065 USA

³CR-CHUM-Hôpital Notre-Dame, 2099 Alexandre De sève Y-4625, Montréal, Québec H2L 2W5

Running title: Acute exercise improves hepatic insulin resistance

Mailing proofs: Dr. Jean-Marc Lavoie
Département de kinésiologie
Université de Montréal
C.P. 6128, Succ. centre-ville
Montréal (Québec) Canada H3C 3J7
Tel: (514) 343-7044
Fax: (514) 343-2181



ABSTRACT

The purpose of the present study was to determine whether an acute bout of treadmill running could improve high-fat diet-induced hepatic insulin resistance in rats and if this could be associated with liver AMPK activation. Male Wistar rats fed a standard (SD) or a high-fat (HF) diet for 3 weeks were submitted to a hyperinsulinemic euglycemic clamp with tracer (D-[3-³H]-glucose) infusion for the determination of endogenous glucose production (EGP). On the day of the experiment, high-fat fed rats were randomly assigned to a group that remained at rest (HF-Rest) or a group that was subjected to 30 min of treadmill running (HF-Ex). Suppression of EGP during the clamp was lower in HF-Rest compared to SD-Rest rats ($P < 0.05$) indicating a state of hepatic insulin resistance with high-fat feeding. However, suppression of EGP during the clamp was not different between HF-Ex compared to SD-Rest rats ($P > 0.05$) indicating an improvement in hepatic insulin sensitivity after acute exercise. Liver phospho-AMPK Thr172 levels were 30% lower in HF-Rest compared to SD-Rest rats ($P < 0.05$). Liver phospho-AMPK Thr172 levels were completely restored to normal levels in HF-Ex rats ($P > 0.05$). Liver triacylglycerol content was ~2 fold higher in HF-Rest compared to SD-Rest rats ($P < 0.05$). No effect of acute exercise was observed on liver TAG ($P > 0.05$). In conclusion, an acute bout of exercise can improve high-fat diet-induced liver insulin resistance. Activation of liver AMPK could be in part responsible for the enhanced action of insulin with acute exercise.

Keywords: hepatic steatosis, endogenous glucose production, hyperinsulinemic euglycemic clamp, liver, NAFLD

INTRODUCTION

Non-alcoholic hepatic steatosis which is characterized by an accumulation of triacylglycerol within hepatocytes, is now recognized as the hepatic component of the metabolic syndrome (21). This affection has been associated with the development of insulin resistance and insulin signaling defects in the liver in both humans and rodents (13, 20, 25, 26). Chronic high-fat feeding in rats is a widely used model to induce hepatic steatosis as well as hepatic insulin resistance (4, 17, 28). In the liver, insulin resistance is characterized by an impaired ability of insulin to suppress hepatic glucose production. The exact mechanism by which the accumulation of triacylglycerol leads to insulin resistance has yet to be resolved, but could involve the activation of isoforms of PKCs by fatty-acid derived metabolites, leading to impairment in insulin signaling (18, 25). High-fat diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance are indeed associated with the buildup of intracellular fatty-acid derived metabolites such as malonyl-CoA, long-chain fatty acyl CoA (LCFA-CoA), and diacylglycerol (DAG) (11, 22, 25).

Exercise has long been prescribed as a therapeutic tool for the prevention and the treatment of type 2 diabetes, and an acute period of exercise has been shown to improve muscle insulin sensitivity (7, 12, 22, 27). However, there is a paucity of information on the effects of acute exercise on liver insulin resistance. A study conducted by Oakes et al. (22) failed to show an improvement in high-fat diet-induced hepatic insulin resistance in rats subjected to an acute bout of exercise. However, in that study, hepatic insulin resistance was assessed 24 h after the termination of the exercise period. On the other hand, 30 min of treadmill running in normally fed rats has been shown to increase the activity of liver AMP-activated protein kinase (AMPK) measured 30 min after the completion of the exercise bout (23). This resulted in decreased liver content of malonyl-CoA attributed to inhibition of acetyl-CoA carboxylase (ACC) and activation of malonyl-CoA decarboxylase (MCD) by AMPK (23). Pharmacological activation of AMPK has been shown to improve liver insulin sensitivity. A single injection of the AMPK activator AICAR in chronically high-fat fed rats reduced the levels of liver triacylglycerol and malonyl-CoA and enhanced hepatic insulin sensitivity on the day following the injection (11). Moreover, the lipid-lowering and

insulin sensitizing effect of metformin in the liver have been attributed to the activation of AMPK (30, 31). AMPK activation is thus an interesting mechanism by which acute exercise could sensitize the liver to the action of insulin.

This study was designed to determine whether an acute bout of exercise could improve high-fat diet-induced hepatic insulin resistance and if this was associated with activation of AMPK. To do so, endogenous glucose production (EGP) was measured during a hyperinsulinemic euglycemic clamp with tracer infusion started 15 min after an acute bout of treadmill running in awakened and chronically high-fat fed rats.

METHODS

Animal Care

Male Wistar rats ($n=39$, Charles River, St-Constant, PQ, Canada), weighing 250-300g were housed individually and had free 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 temperature (20-23°C). All experiments were conducted in accordance with the regulations of the Canadian Council on Animal Care.

Preparation of animals

A few days after their arrival, all rats were randomly assigned to either a high-fat or a standard diet regimen for 3 weeks. The HF diet consisted of 45% lipid, 36% carbohydrate, and 22% protein (kcal) and was provided in pellets from Harlan Teklad (TD 03350, IN, USA). Lipids included in the high-fat diet consisted of lard (41% saturated fat, 44% monounsaturated fat, and 9% polyunsaturated fat). The standard diet (12.5% lipid, 63.2% carbohydrate, and 24.3% protein; kcal) consisted of usual pellet rat chow (Agribrands Purina Canada, Woodstock, Ontario). Both diets are presented in details in Table 1. During the second week of their respective diet, all rats were run for five days, 10 min/day, 10-15 m/min, 0% slope, on a motor-driven rodent treadmill (Quinton Instruments, Seattle, WA) to accustom them to the treadmill. During the third week of their respective diet regimen, all rats stayed at rest and were subjected to the surgical procedure for the implantation of catheters. Food intake and body weight of all rats were monitored 5 times per wk.

Surgical procedures

Four to eight days before the day of the experiment, all rats were anesthetized (ketamine/xylazine, 100/20 mg/kg, ip) and implanted with catheters (PE-50) in the right jugular vein and in the left carotid artery. The jugular catheter was used for infusion of tracer (D-[3-³H]-glucose), insulin and unlabeled glucose, and the left carotid artery was used for blood sampling. The catheters were tunneled subcutaneously, exteriorized at the back of the neck, filled with a heparinized saline solution (500 IU/ml) containing 30% glycerol to keep them patent, and closed until the day of the experiment. Animals were

given a minimum of a 4-day postoperative recovery and only rats that regained weight after the surgery were used for the study. Rats in the HF diet group were kept on the HF diet after the surgery, until the day of the experiment.

Groups and acute exercise protocol

On the day of the experiment, food was removed from the cages 5-7h prior to the start of the experiment and high-fat fed rats were randomly divided into two groups. The first group of rats remained at rest (HF-Rest) while rats from the second group were subjected to an acute period of running on the treadmill (20-24 m/min for 30 minutes, 0% slope) (HF-Ex). The third group consisted of rats fed a standard diet that remained at rest on the day of the experiment (SD-Rest). Before the resting or exercising period, the carotid and jugular catheters were connected to lines containing a sterile heparinized saline solution (50 IU/ml) and were verified for permeability.

Basal values

Rats with a non-patent carotid artery catheter on the day of the study were used for the measurement of basal values (HF-Rest basal: $n = 7$; HF-Ex basal: $n = 6$; SD-Rest basal: $n = 7$). They were anesthetized (sodium pentobarbital, 50 mg/kg, ip), and blood and various tissue samples were collected as described in the *blood and tissue sampling* section. Rats in the HF-Ex group were anesthetized 15 min after the completion of the exercise bout.

Hyperinsulinemic euglycemic clamp

The clamp studies were performed on conscious, unrestrained, chronically catheterized HF-Rest ($n = 7$), HF-Ex ($n = 6$) and SD-Rest ($n = 6$) rats. Rats in the HF-Ex group were evaluated 15 minutes after the completion of the exercise bout. The jugular catheter was connected to a 3-way swivel connected to 3 precision infusion pumps (Harvard apparatus) for the infusions of tracer, insulin, and unlabeled glucose. All clamps were started between 12:00 AM and 2:00 PM to prevent from diurnal metabolic variations between animals. At time -70 min, a primed (3.3 μ Ci) / continuous (0.093 μ Ci/min) infusion of D-[3-³H]-Glucose (PerkinElmer, Boston, MA) was administered until time 0 min. Blood samples were drawn at time -20 min, -10 min (220 μ l) and 0 min (850 μ l) for the measurements of plasma

glucose, and tracer specific activity for the calculation of preclamp EGP. Samples at time 0 min were also used for the measurement of preclamp insulin concentrations. After blood sampling at time 0 min, a primed (71mU/kg) / continuous (4.2mU/kg/min) infusion of insulin (from porcine pancreas: Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) was started simultaneously with an infusion of unlabeled glucose (20% Dextrose, Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ) at variable rates, for 120 min and the tracer infusion was doubled at the same time (0.186 μ Ci/min) to keep the tracer specific activity as constant as possible throughout the duration of the clamp. Small blood samples (55 μ l) were drawn at 2.5-5 min intervals and immediately analyzed for glucose concentrations (Glucose analyzer, Yellow Springs Instruments 2300, Yellow Springs, OH). The infusion of glucose was then adjusted to keep blood glucose constant at 5 mmol/L. Larger blood samples (220 μ l) were drawn at 90, 100, 110 and 120 min for the measurement of tracer specific activity. A larger blood sample (850 μ l) was drawn at 60 and 120 min for the measurement of plasma insulin levels. When larger blood samples (0, 60 and 120 min) were drawn, blood was collected in ethylene diamine tetraacetic acid rinsed syringe (EDTA, 15%) and, after centrifugation, the remaining red blood cells were resuspended in sterile saline and re-injected into the animals. Immediately after the last blood sample was taken at the end of the clamp study (120 min), rats were anaesthetized (sodium pentobarbital, 50 mg/kg, ip) and blood and various tissue samples were collected as described in the *blood and tissue sampling* section.

Calculations

The glucose disappearance rate (R_d) and endogenous glucose production rate (EGP) were calculated according to the method described by Kraegen et al. (16):

$$R_d = R_{a^*} / SA_g \quad \text{and} \quad EGP = R_d - GIR,$$

where R_{a^*} is the tracer infusion rate (nCi/min), SA_g is the steady-state value of glucose specific activity (nCi/mg) (mean of measurements from times -20, -10 and 0 min for preclamp values; mean of measurements from time 90, 100, 110 and 120 min for clamp values), and GIR is the unlabeled glucose infusion rate (0 in the preclamp state) assessed over a 30-min period from 90 to 120 min after the start of the insulin infusion.

Blood and tissue samplings

Under general anesthesia, the abdominal cavity was rapidly opened following the median line of the abdomen. Blood was drawn rapidly (< 45 s) from the abdominal vena cava (~4 ml) into syringes pre-rinsed with EDTA (15%). Blood was centrifuged (3000 RPM for 8 min, 4 °C) and the plasma kept frozen at -78 °C for further analysis. The liver was then rapidly excised and its median lobe was freeze-clamped and used for the determination of triacylglycerol (TAG) and glycogen content as well as Western-blot analyses. Epididymal and retroperitoneal fat pads and the right lower limb triceps surae muscles (plantaris, soleus, medial and lateral gastrocnemius) were carefully excised, weighed, and stored at -78 °C until analyses.

Analytical Procedures

For the assay of D-[3-³H]-Glucose radioactivity, 70 µl of plasma was deproteinized with 35 µl of 1N perchloric acid and centrifuged as described previously (15). Duplicate aliquots (30 µl) of the supernatant were evaporated overnight under a stream of air to remove tritiated water. The dry residue was redissolved in 200 µl of water and counted in 3 ml scintillation liquid (Sigma-Fluor, Sigma Chemicals, St-Louis, MO) using a liquid scintillation beta counter. Correction for counting efficiency was always carried out by means of dilutions of the infusate with plasma run in parallel with plasma samples (15). Plasma glucose concentrations were determined with the use of a glucose analyser (Yellow Springs Instruments 2300, Yellow Springs, OH). Plasma insulin concentrations were measured with a commercially available radioimmunoassay kit (Medicorp, Montréal, P.Q. and ICN Pharmaceuticals, New York, NY). Plasma TAG were measured with a kit from Sigma Diagnostics (St-Louis, MO).

Liver TAG 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 TAG, Frayn and Maycock (6) have shown that omitting removal of phospholipids leads to only a ±2% error

in the determination of tissue TAG. Liver glycogen content was determined by use of the phenol-sulfuric acid reaction (19).

Sample preparation for Western-blots

Freeze-clamped liver were powdered under liquid nitrogen and homogenized in a lysis buffer solution (150mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 50mM NaF, 1% v/v Triton, 0.5% v/v Igepal CA-360, 1mM Na₃VO₄, 1µg/ml Leupeptin, 10µg/ml Aprotinin, 500mM PMSF, pH 7.4). Homogenates were vortexed thoroughly every 5 min for 60 min at 4°C and centrifuged at 3000 g for 15 min to get rid of cellular debris. Total protein content of the supernatant was measured using the BCA protein assay (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada), adjusted to 1µg/µl by diluting in SDS sample buffer (120mM Tris-HCL, 4% w/v SDS, 10% v/v mercaptoethanol, 20% v/v glycerol, pH 6.8) and immersed in near-boiling water for 10min.

Western-Blots

Samples (100µg of protein) were electrophoresed in a 10% SDS-PAGE gel. Upon completion of the electrophoresis, proteins were transferred onto a polyvinylidene fluoride membrane (PVDF) (Millipore, Billerica, MA) that had been pre-wetted in 100% methanol and equilibrated in transfer buffer (25mM Tris-base pH 8.3, 192mM glycine, 10% v/v methanol). Transfer was run for 1.5 h at a constant 0.8A. The uniformity of transfer between samples was checked with Ponceau S before the membrane was incubated in blocking buffer (TBS, 0.1% Tween-20, 5% w/v nonfat dry milk) for 1.5 h at room temperature. The membrane was washed in buffer (TBS, 0.1% v/v Tween-20) 3 times for 5 min at room temperature and then incubated overnight at 4°C with phospho-AMPK Thr172 antibody (Cell Signaling Technology, Beverly, MA; 1:2000). The membrane was then rinsed in washing buffer 3 times for 5 min and incubated in HRP-conjugated anti-rabbit IgG antibody (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA; 1:100 000) for 1 h at room temperature and then washed again 3 times for 5 min. Membrane was exposed to ECL Advance Western blotting detection kit (Amersham Biosciences, England) for 5 min and then exposed to X-ray film. The membrane was stripped for 30 min at 50°C in stripping buffer (100mM mercaptoethanol, 2% SDS w/v, 62.5mM Tris-HCl, pH 6.7) and then

reprobed for β -actin (Abcam, Cambridge, UK; 1:2000) as a loading control, following the same procedure as described above.

Statistical Analysis

Values are expressed as means \pm SE. Statistical analyses were performed by a one-way or a two-way ANOVA for repeated or non-repeated measures as appropriate. Fisher's post-hoc test was used in the event of a significant ($P < 0.05$) F ratio. The significance of the F ratio for steady-state endogenous glucose production during the clamp was $P = 0.1341$. Given the differences between the means of the groups and the physiological relevancy of such results, Fisher's post-hoc test was used.

Results

Body composition and energy intake in rats used for basal and clamp values

Initial and final body weights of rats were not significantly different ($P > 0.05$) between all groups (Table 2). Daily energy intake in kcal was higher ($P < 0.05$) in HF-Rest and HF-Ex rats compared to standard fed rats. Epididymal as well as retroperitoneal fat pads weights were higher ($P < 0.05$) in HF-Rest and HF-Ex rats compared to standard fed rats. No significant differences ($P > 0.05$) between groups were found in the weights of the right hind limb triceps surae. A single bout of exercise in high-fat fed rats had no significant effect ($P > 0.05$) on body weight, intraabdominal fat pads weight, and muscle weights.

Plasma and liver variables of rats used for basal and clamp values

Plasma TAG levels were similar ($P > 0.05$) between the 3 experimental groups whether measured in the basal or post-clamp state (Table 2). The hyperinsulinemic euglycemic clamp significantly decreased ($P < 0.05$) the levels of plasma TAG in the 3 experimental groups compared to basal values.

Liver triacylglycerol content of high-fat fed rats whether in the basal state or after the hyperinsulinemic euglycemic clamp was increased by ~2 fold ($P < 0.05$) compared to standard fed rats (Fig. 1A). Thirty minutes of treadmill running had no effect ($P > 0.05$) on liver TAG levels of high-fat fed rats. Liver glycogen content was not significantly different ($P > 0.05$) between the 3 experimental groups and was slightly reduced ($P < 0.05$) in the post-clamp state compared to basal values (Fig. 1B).

Hyperinsulinemic euglycemic clamp study

Preclamp values of plasma insulin were significantly higher ($P < 0.05$) in high-fat fed compared to standard fed rats (Table 3). Levels of plasma insulin achieved during the clamp were similar ($P > 0.05$) between the 3 experimental groups. No differences ($P > 0.05$) were found in plasma glucose concentrations between the 3 experimental groups,

whether measured before or during the clamp study. Preclamp EGP was not significantly different ($P > 0.05$) between the 3 experimental groups (Fig. 2C).

No significant differences ($P > 0.05$) were found between the 3 experimental groups in the rate of disappearance of glucose (Rd), indicating that whole-body insulin sensitivity was not altered with high-fat feeding (Fig. 2A). In face of similar Rd between groups, the glucose infusion rate necessary to maintain euglycemia is a function of endogenous glucose production. GIR during the clamp was lower ($P < 0.01$) in rested high-fat fed compared to rested standard fed rats (Fig. 2B). Acute exercise prior to the clamp resulted in increased GIR so that it was not significantly different between HF-Ex and SD-Rest rats ($P > 0.05$). Suppression of EGP during the clamp was higher (ANOVA $P = 0.13$, Fisher's Post-Hoc $P < 0.05$) in standard fed animals compared to rested high-fat fed rats indicating a state of hepatic insulin resistance with high-fat feeding (Fig. 2D). This difference was no more significant ($P > 0.05$) when high-fat fed rats were submitted to acute exercise prior to the clamp, indicating an improvement in hepatic insulin sensitivity following acute exercise.

Phospho-AMPK levels of rats used for basal and clamp values

Levels of phosphorylated AMPK Thr172 in the liver were 30% lower ($P < 0.05$) in rested high-fat fed compared to standard fed rats (Fig. 3A). Thirty min of treadmill running in high-fat fed rats significantly increased ($P < 0.05$) the content of liver Phospho-AMPK Thr172 to levels similar to the levels observed in standard fed rats ($P = 0.73$). Levels of Phospho-AMPK Thr172 were not different ($P > 0.05$) between the basal and the post-clamp state indicating that the increase induced by acute exercise was maintained as long as ~200 min after the cessation of running.

DISCUSSION

Three weeks of high-fat feeding in the present study resulted in hepatic insulin resistance and this was associated with a 30% reduction in the levels of liver phospho-AMPK compared to standard-fed rats (Fig. 2D, 3). Conversely, high-fat fed rats that were run for 30 min prior to the clamp showed improvement in hepatic insulin sensitivity and this was accompanied by a complete restoration of the levels of liver phospho-AMPK. Taken together, our results indicate that a single bout of exercise improves insulin sensitivity in the liver. We also show, for the first time, that high-fat feeding chronically lowers the levels of liver phospho-AMPK and that a single bout of exercise completely restores these levels to normal.

Chronic high-fat feeding in rats has been shown to induce non-alcoholic hepatic steatosis in numerous studies (8, 11, 16, 25). It is now becoming widely accepted that this accumulation of lipids in the liver alters the suppressive effect of insulin on hepatic glucose production (11, 16, 25). In accordance with these previous findings, the high-fat diet regimen used in the present study resulted in marked hepatic steatosis (Fig. 1A). The present HF feeding regimen also significantly raised fasting plasma insulin levels (Table 3). This state of fasting hyperinsulinemia induced by high-fat feeding may have contributed to liver lipid synthesis and storage since insulin is known to stimulate both of these pathways (5, 9, 14). Furthermore, the present state of hepatic steatosis was associated with a reduced capacity of insulin to suppress endogenous glucose production. This is shown by the ~4-fold higher EGP rate during the clamp in HF-Sed compared to SD-Sed rats (Fig. 2D). Higher levels of liver insulin resistance have been reported after 3 weeks of high-fat feeding but with a high-fat diet regimen containing 60% of lipids (11, 16). Overall, high-fat fed rats in the present study were characterized by hepatic insulin resistance associated with hepatic steatosis. Liver glycogen content was not different between the 3 experimental groups and thus could not account for the differences found in EGP during the clamp. The slightly lower levels of hepatic glycogen found after the clamp compared to the basal values are difficult to interpret considering the known stimulatory effect of insulin on glycogen synthesis. These lower levels might due to the cross-sectional design of the study.

The major finding of the present study is that a single bout of exercise in chronically high-fat fed rats improved hepatic insulin sensitivity. This is shown by the ~2-fold lower EGP rate during the clamp in HF-Ex rats compared to HF-Sed rats (Fig. 2D). To our knowledge, only one research group has studied the effects of acute exercise on liver insulin resistance (22). In their study, Oakes et al. (22) failed to show an improvement of high-fat diet-induced hepatic insulin resistance in rats subjected to an acute bout of exercise. However, in that study, hepatic insulin resistance was assessed 24 h after the termination of the exercise period while we measured hepatic insulin sensitivity 15 min after the completion of the exercise bout. It is likely that 24 h is too long a duration to keep the beneficial effects of a single bout of exercise on liver insulin sensitivity.

In the present study, we also provide the first evidence that liver phospho-AMPK is chronically reduced with high-fat feeding and that acute exercise in high-fat fed rats results in the complete restoration of liver phospho-AMPK content to the levels observed in standard-fed rats (Fig. 3). AMPK is a protein kinase that plays a pivotal role in regulating energy balance within the cell and at the whole-body level by switching-off energy consuming pathways and switching-on alternative pathways for ATP regeneration (1, 2, 10). It has been reported that the activity of AMPK is mirrored by the phosphorylation status of Thr172 under all conditions tested (1). Increasing evidence suggest that AMPK is a key player in liver lipid metabolism by inhibiting lipid synthesis and activating its oxidation (3, 23, 31). Liver AMPK activation by exercise is reported to lower the levels of malonyl-CoA and favor lipid oxidation (23). The accumulation of fatty-acid derived metabolites has been recently directly linked with alteration of liver insulin sensitivity (25). The proposed mechanism is an intracellular fatty-acid-induced increase in PKC- ϵ and JNK1 activity which may interfere with elements of insulin signaling pathway (25). Hence, the phosphorylation status of liver AMPK may play a role in liver insulin sensitivity by influencing intracellular lipid partitioning. In the present study, we observed a 30% lower level of liver phospho-AMPK in high-fat fed insulin resistant rats (Fig. 3). To our knowledge, this is the first evidence of chronically decreased levels of liver phospho-AMPK with high-fat feeding. This suggests that chronically reduced levels of liver

phospho-AMPK with high-fat feeding could participate in the induction of hepatic steatosis and liver insulin resistance. Accordingly, the lipid abnormalities and development of diabetes in ZDF rats have been found to be closely related to a diminished AMPK activity in this genetic model of type 2 diabetes (29). Conversely, a single injection of the AMPK activator AICAR in chronically high-fat fed rats reduced the levels of liver triacylglycerol and malonyl-CoA and enhanced hepatic insulin sensitivity on the day following the injection (11). Moreover, the lipid-lowering and insulin sensitizing effect of metformin in the liver have been attributed to the activation of AMPK (30, 31). In agreement with these reports, the present study is the first to provide evidence that a physiological condition known to increase the activation of AMPK in the liver, namely an acute period of exercise, results in an improvement in HF diet-induced liver insulin resistance.

It is noteworthy that the acute period of exercise was not sufficient to reduce liver TAG levels in the present study (Fig. 1A). It is possible that in order to reduce hepatic steatosis, the exercise period has to be more intense and/or prolonged or, as shown previously (8), repeated chronically. An accumulating body of evidence suggests that triacylglycerol are rather a marker of intracellular lipid accumulation and that the real guilty party leading to impaired insulin sensitivity would be the buildup of the more metabolically active cytosolic fatty-acid derived metabolites such as malonyl-CoA, LCFA-CoA, and DAG (11, 22, 25). It is possible that an acute bout of exercise was sufficient to cause a decrease in malonyl-CoA, as shown by Park et al. (23), but not to reduce the levels of TAG. Notwithstanding this, acute exercise in the present high-fat fed rats resulted in improved liver insulin sensitivity associated with the complete restoration of liver phospho-AMPK levels. This amelioration of liver insulin sensitivity with acute exercise did not, however, result from lower intracellular TAG levels.

The effect of prior exercise on AMPK activity in tissues other than muscle has received little attention. Activation of liver AMPK has been reported in standard-fed rats run for 30 min at 21 m/min on a 12% grade and evaluated 30 min after cessation of exercise (23). This increase in AMPK activity was accompanied by a decrease in liver content of malonyl-CoA attributable to diminished ACC activity and increased MCD activity (23). Carlson et al. (3)

also found an increase in liver AMPK activity and a decrease in liver ACC activity in standard-fed rats after 10 min of treadmill running at 32 m/min but failed to find changes in these enzymes when the duration of exercise was longer (120 min) and the intensity lower (16 m/min, 15% grade). The reason for these discrepancies remains to be determined (24). We report in the present study that 30 min of treadmill running (~22 m/min, 0% grade) in chronically high-fat fed rats resulted in the activation of liver AMPK, and that this activated state remained until the end of the clamp, i.e. as long as ~200 min after cessation of exercise.

In conclusion, our results indicate that a single bout of exercise improves high-fat diet-induced hepatic insulin resistance in rats and that this is associated with increased activation of liver AMPK for several hours after the cessation of the exercise period. We also provide the first evidence of chronically decreased levels of liver phospho-AMPK with high-fat feeding. However, the ability of this enzyme to be activated by exercise is not altered by the high-fat feeding. These results emphasize the interest in considering exercise as a therapeutic tool for the management of fatty liver and hepatic insulin resistance.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). Marie-Soleil Gauthier is supported by a Canada Graduate Scholarship from NSERC and a scholarship from Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

REFERENCES

1. **Carling D.** The AMP-activated protein kinase cascade - a unifying system for energy control. *Trends in Biochemical Sciences* 29: 18-24, 2004.
2. **Carling D.** AMP-activated protein kinase: balancing the scales. *Biochimie* 87: 87-91, 2005.
3. **Carlson CL and Winder WW.** Liver AMP-activated protein kinase and acetyl-CoA carboxylase during and after exercise. *J Appl Physiol* 86: 669-674, 1999.
4. **den Boer M, Voshol PJ, Kuipers F, Havekes LM, and Romijn JA.** Hepatic steatosis: a mediator of the metabolic syndrome. Lessons from animal models. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 644-649, 2004.
5. **Dentin R, Girard J, and Postic C.** Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver. *Biochimie* 87: 81-86, 2005.
6. **Frayn KN and Maycock PF.** Skeletal muscle triacylglycerol in the rat: methods for sampling and measurement, and studies of biological variability. *J Lipid Res* 21: 139-144, 1980.
7. **Fujii N, Aschenbach WG, Musi N, Hirshman MF, and Goodyear LJ.** Regulation of glucose transport by the AMP-activated protein kinase. *Proc Nutr Soc* 63: 205-210, 2004.
8. **Gauthier MS, Couturier K, Latour JG, and Lavoie JM.** Concurrent exercise prevents high-fat-diet-induced macrovesicular hepatic steatosis. *J Appl Physiol* 94: 2127-2134, 2003.
9. **Gibbons GF, Wiggins D, Brown AM, and Hebbachi AM.** Synthesis and function of hepatic very-low-density lipoprotein. *Biochem Soc Trans* 32: 59-64, 2004.
10. **Hardie DG.** The AMP-activated protein kinase pathway - new players upstream and downstream. *J Cell Sci* 117: 5479-5487, 2004.
11. **Iglesias MA, Ye JM, Frangioudakis G, Saha AK, Tomas E, Ruderman NB, Cooney GJ, and Kraegen EW.** AICAR administration causes an apparent

- enhancement of muscle and liver insulin action in insulin-resistant high-fat-fed rats. *Diabetes* 51: 2886-2894, 2002.
12. **Kim CH, Youn JH, Park JY, Hong SK, Park KS, Park SW, Suh KI, and Lee KU.** Effects of high-fat diet and exercise training on intracellular glucose metabolism in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278: E977-984, 2000.
 13. **Kim JK, Gavrilova O, Chen Y, Reitman ML, and Shulman GI.** Mechanism of insulin resistance in A-ZIP/F-1 fatless mice. *J Biol Chem* 275: 8456-8460, 2000.
 14. **Kim K-H.** Regulation of mammalian acetyl-coenzyme A carboxylase. *Annual Review of Nutrition* 17: 77-99, 1997.
 15. **Kjaer M, Kiens B, Hargreaves M, and Richter EA.** Influence of active muscle mass on glucose homeostasis during exercise in humans. *J Appl Physiol* 71: 552-557, 1991.
 16. **Kraegen EW, Clark PW, Jenkins AB, Daley EA, Chisholm DJ, and Storlien LH.** Development of muscle insulin resistance after liver insulin resistance in high-fat-fed rats. *Diabetes* 40: 1397-1403, 1991.
 17. **Kraegen EW, James DE, Storlien LH, Burleigh KM, and Chisholm DJ.** In vivo insulin resistance in individual peripheral tissues of the high fat fed rat: assessment by euglycaemic clamp plus deoxyglucose administration. *Diabetologia* 29: 192-198, 1986.
 18. **Lam TK, van de Werve G, and Giacca A.** Free fatty acids increase basal hepatic glucose production and induce hepatic insulin resistance at different sites. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284: E281-290, 2003.
 19. **Lo S, Russell JC, and Taylor AW.** Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol* 28: 234-236, 1970.
 20. **Marceau P, Biron S, Hould FS, Marceau S, Simard S, Thung SN, and Kral JG.** Liver pathology and the metabolic syndrome X in severe obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 1513-1517, 1999.
 21. **Marchesini G, Marzocchi R, Agostini F, and Bugianesi E.** Nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol* 16: 421-427, 2005.
 22. **Oakes ND, Bell KS, Furler SM, Camilleri S, Saha AK, Ruderman NB, Chisholm DJ, and Kraegen EW.** Diet-induced muscle insulin resistance in rats is

- ameliorated by acute dietary lipid withdrawal or a single bout of exercise: parallel relationship between insulin stimulation of glucose uptake and suppression of long-chain fatty acyl-CoA. *Diabetes* 46: 2022-2028, 1997.
23. **Park H, Kaushik VK, Constant S, Prentki M, Przybytkowski E, Ruderman NB, and Saha AK.** Coordinate regulation of malonyl-CoA decarboxylase, sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, and acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase in rat tissues in response to exercise. *J Biol Chem* 277: 32571-32577, 2002.
 24. **Ruderman NB, Park H, Kaushik VK, Dean D, Constant S, Prentki M, and Saha AK.** AMPK as a metabolic switch in rat muscle, liver and adipose tissue after exercise. *Acta Physiol Scand* 178: 435-442, 2003.
 25. **Samuel VT, Liu Z-X, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, Romanelli AJ, and Shulman GI.** Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem* 279: 32345-32353, 2004.
 26. **Seppala-Lindroos A, Vehkavaara S, Hakkinen AM, Goto T, Westerbacka J, Sovijarvi A, Halavaara J, and Yki-Jarvinen H.** Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 3023-3028, 2002.
 27. **Tomas E, Zorzano A, and Ruderman NB.** Exercise effects on muscle insulin signaling and action: Exercise and insulin signaling: a historical perspective. *J Appl Physiol* 93: 765-772, 2002.
 28. **Ye JM, Doyle PJ, Iglesias MA, Watson DG, Cooney GJ, and Kraegen EW.** Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-alpha activation lowers muscle lipids and improves insulin sensitivity in high fat-fed rats: comparison with PPAR-gamma activation. *Diabetes* 50: 411-417., 2001.
 29. **Yu X, McCorkle S, Wang M, Lee Y, Li J, Saha AK, Unger RH, and Ruderman NB.** Leptinomimetic effects of the AMP kinase activator AICAR in leptin-resistant rats: prevention of diabetes and ectopic lipid deposition. *Diabetologia* 47: 2012-2021, 2004.

30. **Zang M, Zuccollo A, Hou X, Nagata D, Walsh K, Herscovitz H, Brecher P, Ruderman NB, and Cohen RA.** AMP-activated protein kinase is required for the lipid-lowering effect of metformin in insulin-resistant human HepG2 cells. *J Biol Chem* 279: 47898-47905, 2004.
31. **Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, and Moller DE.** Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 108: 1167-1174, 2001.

Legends

Fig 1. Liver triacylglycerol (A), and liver glycogen (B) content measured in the basal state and after the hyperinsulinemic euglycemic clamp in rats fed a standard (SD) or a high-fat (HF) diet for 3 weeks and kept at rest (Rest) or acutely exercised (Ex) prior to the clamp. Values are means \pm SE, $n = 6-7$ rats/group.* Significantly different from SD-Rest rats, $P < 0.05$. & Significantly different from the basal state, $P < 0.05$.

Fig 2. Steady-state glucose disappearance rate (Rd) (A), steady-state glucose infusion rate (B), endogenous glucose production before (C), and during the clamp at steady-state (D) in rats fed a standard (SD) or a high-fat (HF) diet for 3 weeks and kept at rest (Rest) or acutely exercised (Ex) prior to the clamp. Values are the means of measurements made between min 90 and 120 of the hyperinsulinemic euglycemic clamp, except for preclamp endogenous glucose production values for which the means of measurements were made at -20, -10 and 0 min prior to the clamp. Values are means \pm SE, $n = 6-7$ rats/group. *Significantly different from SD-Rest rats, $P < 0.05$.

Fig 3. Ratio of liver Phospho-AMPK Thr172 to β -actin levels measured in the basal state and after the hyperinsulinemic euglycemic clamp in rats fed a standard (SD) or a high-fat (HF) diet for 3 weeks and kept at rest (Rest) or acutely exercised (Ex) prior to the clamp. Values are means \pm SE, $n = 6-7$ rats/group.* Significantly different from SD-Rest rats, $P < 0.05$. + Significantly different from HF-Rest rats, $P < 0.05$.

Table 1. *Composition of the high-fat (TD 03350) and standard diets.*

High-Fat Diet	g/kg	Standard Diet	g/kg
Casein	230	Crude Protein	181
DL-Methionine	3.4	Crude Fat	45
Sucrose, fine ground	200	Crude Fibre	34
Corn Starch	80	Ash	67
Maltodextrin	140	Nitrogen Free Extract	573
Lard	230	Humidity	100
Cellulose	50		
Mineral Mix, AIN-93G-MX (TD 94046)	46		
Calcium Phosphate, dibasic (CaHPO ₄)	3,3		
Vitamin Mix, AIN-93-VX (TD 94047)	14		
Choline Bitartrate	3.3		

Table 2. *Body composition, energy intake and plasma triacylglycerol levels of rats fed a standard (SD) or a high-fat (HF) diet for 3 weeks and kept at rest or submitted to an acute period of exercise (Ex) prior to the measurements in the basal state and at the end of a hyperinsulinemic euglycemic clamp.*

		SD-Rest		HF-Rest		HF-Ex	
		Basal state	Clamp values	Basal state	Clamp values	Basal state	Clamp values
Initial	Body Weight (g)	298 ± 5	291 ± 3	284 ± 4	287 ± 4	289 ± 3	293 ± 4
Final	Body Weight (g)	377 ± 8	366 ± 10	377 ± 12	385 ± 15	390 ± 11	382 ± 10
	Energy intake (kcal/day)	87 ± 2	84 ± 3	94 ± 1*	103 ± 5*	97 ± 3*	96 ± 3*
	Epididymal Fat Pad Weight (g)	4.8 ± 0.6	4.8 ± 0.3	6.7 ± 0.7*	7.5 ± 0.7*	7.4 ± 1.2*	8.4 ± 0.8*
	Retroperitoneal Fat Pad Weight (g)	2.1 ± 0.3	1.9 ± 0.3	4.1 ± 0.6*	4.3 ± 0.6*	4.4 ± 0.7*	4.8 ± 0.6*
	Right Triceps Surae Weight (g)	2.4 ± 0.1	2.4 ± 0.1	2.5 ± 0.1	2.5 ± 0.1	2.7 ± 0.1	2.5 ± 0.1
	Plasma TAG (mM)	0.57 ± 0.01	0.09 ± 0.01&	0.37 ± 0.03	0.06 ± 0.01&	0.31 ± 0.09	0.06 ± 0.02&

Values are means ± SE.

TAG: triacylglycerol.

* Significantly different from SD-Rest rats ($P < 0.05$), & significantly different from animals killed in the basal state ($P < 0.05$).

Table 3. Plasma parameters before (preclamp) or at steady-state during the hyperinsulinemic euglycemic clamp study performed on rats fed a standard (SD) or a high-fat (HF) diet for 3 weeks and kept at rest or submitted to acute period of exercise (Ex) immediately prior to the clamp study.

	SD-Rest		HF-Rest		HF-Ex	
	Preclamp	Clamp	Preclamp	Clamp	Preclamp	Clamp
Plasma Insulin (pM)	121.3±11	1501±327&	192.1±13*	1366±171&	173.1±13.5*	1265±108&
Plasma Glucose (mM)	7.3 ± 0.2	7.9 ± 0.2	7.7 ± 0.2	7.8 ± 0.2	7.7 ± 0.3	7.8 ± 0.2

Values are means ± SE.

Note: Preclamp plasma insulin levels were measured at time 0 min prior to the clamp. Preclamp plasma glucose concentrations are the mean of measurements made at -20, -10 and 0 min prior to the clamp. Plasma insulin levels during the clamp are the mean of measurements made at 60 and 120 min after the start of the clamp. Plasma glucose concentrations during the clamp are the mean of measurements made during the last 30 min of the clamp study.

* Significantly different from standard-fed animals ($P < 0.05$), & significantly different from preclamp values ($P < 0.05$).

Figure 1.

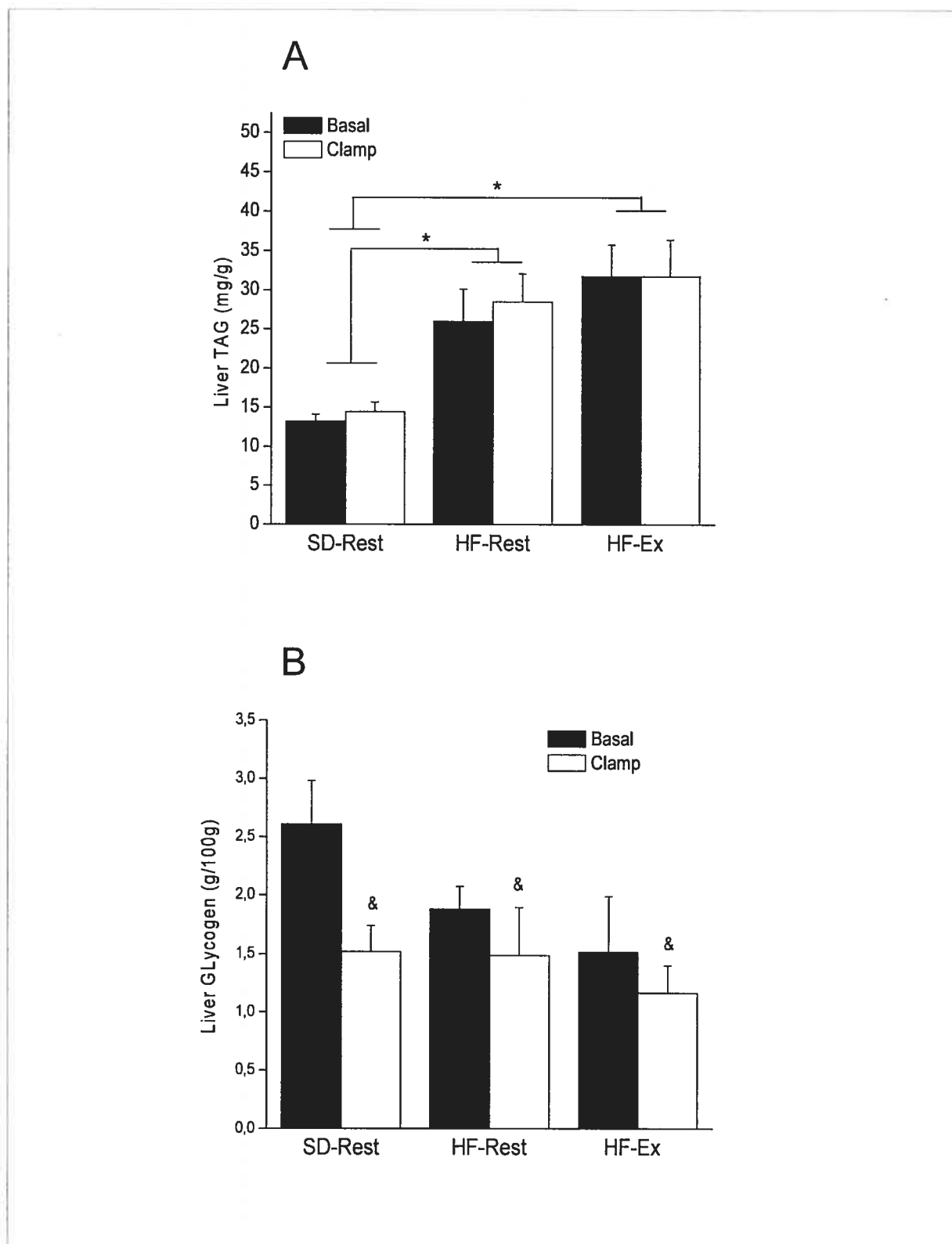


Figure 2.

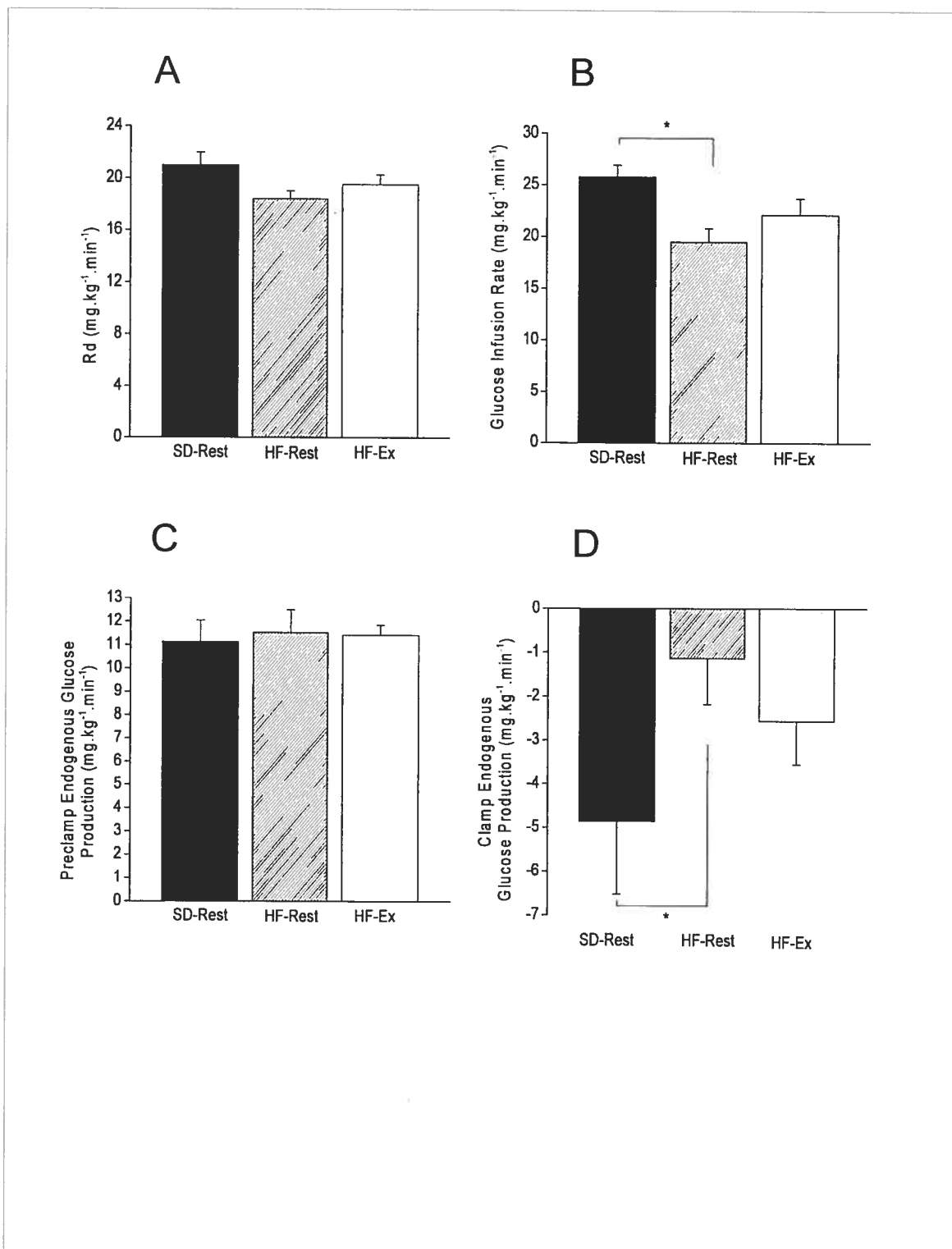
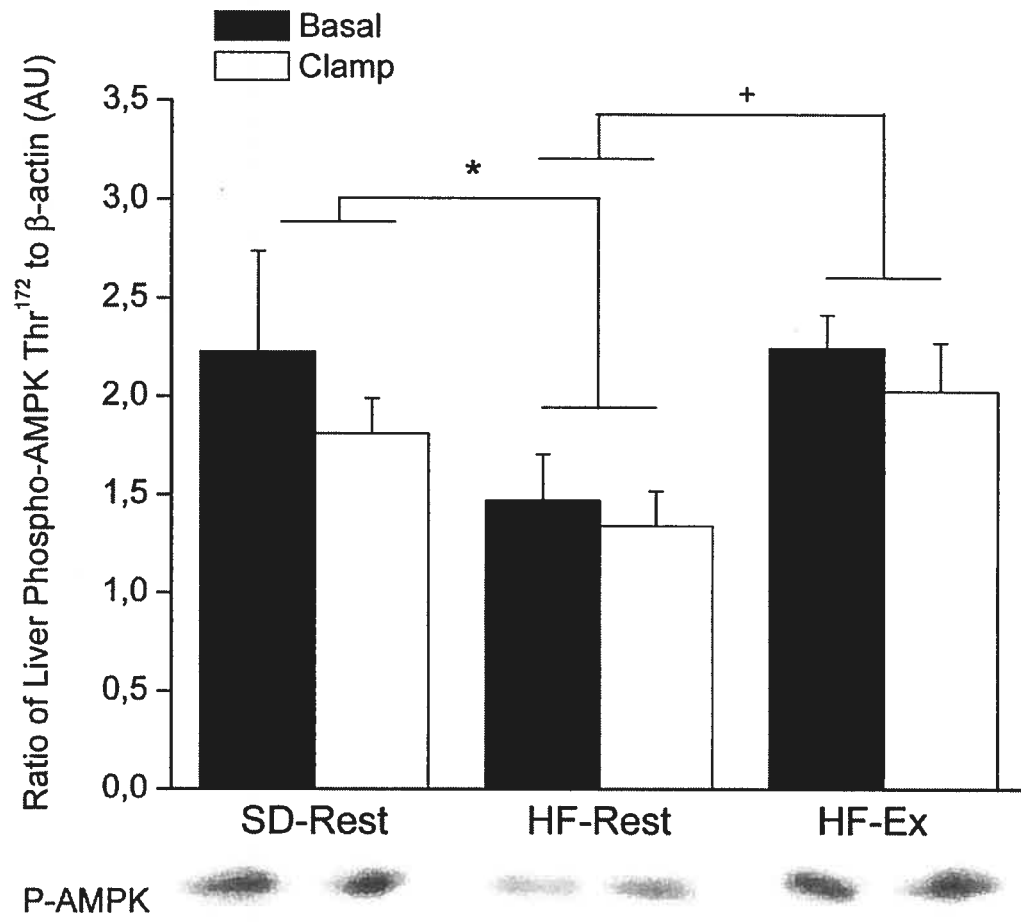


Figure 3.



3. Chapitre 3- Discussion

3.1. Discussion générale

L'objectif général des quatre études conduites dans le cadre de cette thèse était d'élargir les connaissances sur le développement de la stéatose hépatique induite par ce type de diète ainsi que d'explorer le potentiel de l'exercice en tant qu'agent préventif et curatif de la stéatose hépatique et de l'insulino-résistance hépatique qui en découle. Le modèle utilisé afin de réaliser cet objectif fut celui de la stéatose hépatique induite par une diète riche en lipides chez le rat.

Il est de mise de tout d'abord préciser que les conclusions à tirer de l'ensemble des études de cette thèse sont limitées par le modèle expérimental utilisé. En effet, il faut être prudent lorsqu'il vient le temps d'interpréter les résultats observés chez le rat, les conclusions tirées ne peuvent être directement appliquées à l'être humain. Aussi, l'induction de la stéatose hépatique par une diète riche en lipides n'est peut-être pas représentative de tous les cas de stéatoses hépatiques associées à l'obésité et au diabète de type 2. Malgré tout, les informations obtenues à l'aide de ce modèle ne peuvent faire autrement que de permettre de mieux comprendre le phénomène général de cette affection hépatique et de ses conséquences.

Puisque les principaux thèmes de discussion des études ont déjà été abordés dans les articles présentés dans le chapitre précédent, ils ne seront pas réitérés au cours de cette section. Ainsi, cette discussion générale sera plutôt consacrée à des hypothèses et spéculations qui n'ont pas été mentionnées dans les articles ou que l'analyse de l'ensemble du travail de cette thèse peut permettre d'élaborer.

Réflexion sur l'exercice dans un contexte de stéatose hépatique non-alcoolique et d'insulino-résistance hépatique induites par les lipides.

Dans les deux premières études, nous avons étudié les effets de l'entraînement physique sur des facteurs extrahépatiques qui puissent être bénéfiques à la stéatose hépatique associée à l'obésité. Nous avons constaté que 8 sem d'entraînement physique, qu'elles soient débutées de façon concomitante à 8 sem de diète riche en lipides (étude 1) ou conduites durant les 8 dernières semaines d'un régime de 16 sem de diète riche en lipides (étude 2), apportent des améliorations extrahépatiques nettes, telles une diminution des AGL circulants et une réduction de l'adiposité sous-cutanée et intra-abdominale. De façon intéressante, les effets de l'entraînement sur les AGL et l'adiposité furent tout aussi importants lorsque l'entraînement fut débuté en même temps que la diète HF que lorsqu'il fut débuté après 8 semaines de diète HF (Tableau VI).

Tableau VI. Comparaison entre l'effet relatif de 8 sem d'entraînement débutées en même temps qu'une diète HF (étude 1) et l'effet relatif de 8 sem d'entraînement conduites durant les 8 dernières sem d'un régime de 16 sem de diète HF (étude 2) sur les AGL plasmatiques, l'adiposité sous-cutanée et intra-abdominale ainsi que sur les TAG intrahépatiques.

	Étude 1 : HF-Tr vs HF-Sed	Étude 2: HF16-Tr vs HF16-Sed
AGL plasmatiques	↓ 40%*	↓ 40%*
Adiposité sous-cutanée	↓ 24%*	↓ 26%*
Adiposité intra-abdominale	↓ 23%*	↓ 31%*
TAG intrahépatiques	↓ 29%*	↓ 13%

* Significativement différent du groupe sédentaire respectif, $P < 0,05$.

Ces résultats montrent que l'entraînement physique est d'une part un moyen efficace de prévenir la détérioration du profil lipidique sanguin et l'augmentation des dépôts adipeux induits par une diète riche en lipides et, d'autre part, qu'il est un moyen efficace pour traiter ces problèmes lorsqu'ils sont déjà présents. Les mécanismes par lesquels l'entraînement a provoqué ces améliorations n'ont pas été étudiés dans ces deux premières études mais il est bien connu qu'une des adaptations à l'entraînement est l'augmentation de l'utilisation des

lipides en tant que substrats énergétiques (25, 97). Il est donc légitime de spéculer que dans nos études, les rats entraînés ont accumulés moins de lipides adipocytaires et moins d'AGL en circulation parce qu'ils oxydaient plus de lipides.

Puisqu'il est suggéré que l'augmentation des AGL circulants favorise la prise et l'accumulation de lipides hépatiques (tel que discuté à la section 1.2.1.1), la réduction des niveaux d'AGL circulants par l'entraînement devrait théoriquement favoriser la réduction de la stéatose hépatique. En accord avec cette hypothèse, suite à l'entraînement dans l'étude 1, une diminution des AGL circulants de 40% (Tableau VI) fut associée à la prévention complète de la stéatose hépatique normalement induite par 8 sem de diète HF (Figure 4C, étude 1). Par contre, lorsque l'entraînement fut débuté suite à 8 sem de diète HF (étude 2), bien que l'entraînement ait provoqué une diminution tout aussi importante des AGL plasmatiques que dans l'étude 1, cette fois les effets de l'entraînement sur les lipides intrahépatiques furent moindres (Tableau VI). La raison de cette différence reste obscure, mais il semble, suite à ce qui a été observé dans notre étude 3, que les lipides intrahépatiques puissent se résorber d'eux-mêmes au cours du temps et ce, sans manipulations expérimentales (Figure 1D, étude 3). Il est donc vraisemblable que l'absence d'effet de l'entraînement observée dans l'étude 2 soit simplement due au fait qu'après 16 sem de diète HF, les rats HF-Sed ne présentaient pas de stéatose hépatique significative (Figure 1A, étude 2). Cette hypothèse sous-entend que l'entraînement n'aurait d'effet réducteur sur les lipides hépatiques que si le niveau de ceux-ci est plus élevé que la normale. Notre deuxième étude ne comportait pas de groupe de rats nourris avec la diète SD et ayant été entraînés qui puisse nous permettre de vérifier cette hypothèse. Par contre, cette hypothèse est appuyée par les résultats de notre première étude ainsi que ceux d'études publiées par d'autres laboratoires (63, 160, 212) dans lesquelles l'entraînement n'a eu aucun effet sur les lipides hépatiques des rats nourris avec une diète SD et donc qui avaient des niveaux normaux de lipides intrahépatiques.

Suite à l'analyse des 3 premières études, il est important de mentionner que le design expérimental de type transversal que nous avons utilisé est susceptible d'avoir introduit certains biais. L'utilisation de la technique de mesure des lipides intrahépatiques de façon

in vivo par SRMN aurait été une façon de remédier à cette situation. En permettant d'observer la cinétique de développement de la stéatose de façon longitudinale sur 16 semaines à même l'étude 2, cette technique de SRMN aurait non seulement permis de condenser les études 2 et 3 mais aussi de conclure avec plus d'assurance que le manque d'effet du programme d'entraînement de l'étude 2 était probablement dû au fait que la stéatose s'était résorbée d'elle-même chez les rats HF16-Sed.

Quoiqu'il en soit, nous avons clairement montré au cours de nos 2 premières études que l'entraînement physique exerce des effets préventifs et curatifs sur des facteurs extrahépatiques susceptibles de favoriser le développement de la stéatose hépatique non-alcoolique et que ceci concourt à la prévention complète de l'induction d'une stéatose hépatique lorsque le programme d'entraînement est débuté et réalisé de façon simultanée à la diète HF. Suite à ces résultats et étant donné l'accumulation d'évidences scientifiques suggérant que la stéatose hépatique puisse provoquer de l'insulino-résistance hépatique, nous avons voulu dans notre 4^e étude étudier les effets de l'exercice sur des facteurs intrahépatiques qui puissent influencer le degré de stéatose hépatique et conséquemment l'insulino-résistance hépatique induite par les lipides.

Tel que discuté à la section 1.4.1, l'AMPK hépatique est une candidate intéressante susceptible d'influencer les niveaux de lipides intrahépatiques et la sensibilité hépatique à l'insuline. D'une part, il a été montré que cette kinase hépatique peut être activée suite à une session d'exercice aigu et que cette activation résulte en une augmentation de l'oxydation des lipides hépatiques et une diminution de leur synthèse (Figure 24, chapitre 1) (33, 171). D'autre part, les résultats de plusieurs travaux (105, 252, 253) suggèrent que l'activation de l'AMPK par des composés pharmacologiques est associée à une amélioration de l'insulino-résistance hépatique induite par les lipides. Nous avons donc voulu étudier les effets de l'exercice sur l'AMPK hépatique en même temps que sur l'insulino-résistance hépatique et la stéatose hépatique.

Les résultats de notre quatrième étude ont apporté plusieurs informations pertinentes à l'étude et à la compréhension de la stéatose hépatique et de l'insulino-résistance induites par les lipides ainsi qu'à celles des effets de l'exercice sur ces affections hépatiques.

Premièrement, nous avons trouvé des niveaux de phospho-AMPK (la forme active de cet enzyme) plus faibles chez les rats nourris 3 sem avec une diète HF que chez les rats nourris avec une diète SD. Ceci indique que l'ingestion de diètes HF entraîne une diminution de l'activité de l'AMPK hépatique de façon chronique. Il est à noter que dans cette étude, les rats nourris avec la diète riche en lipides avaient une ingestion calorique significativement plus élevée que celles des rats SD. Il est donc difficile de départager les effets des lipides *per se* de ceux de l'augmentation de la quantité d'énergie ingérée sur l'état phosphorylé de l'AMPK. Lorsqu'on considère la fonction de senseur d'énergie cellulaire attribuée à l'AMPK, il est effectivement possible que cette diminution de la phospho-AMPK chez les rats HF soit plutôt due à l'augmentation de l'énergie ingérée qu'à la quantité de lipides disponibles dans leur nourriture. Cette hypothèse reste à vérifier.

À notre connaissance, notre étude est la première à avoir mesuré les niveaux de phospho-AMPK dans des cas de stéatose hépatique et d'insulino-résistance hépatique induites par les lipides. Compte tenu des effets inhibiteurs de l'AMPK hépatique sur la synthèse des lipides hépatiques, la diminution chronique de l'état phosphorylé de l'AMPK hépatique que nous avons observée est susceptible d'avoir participé à l'induction de la stéatose hépatique par la diète HF et, conséquemment, à l'induction de l'insulino-résistance hépatique (Figure 25). À l'appui de cette hypothèse, la stéatose hépatique et le développement du diabète de type 2 chez des rats ZDF ont été associés à une activité moindre de l'AMPK retrouvée chez ces animaux (249).

Nous avons aussi observé qu'une session de 30 min d'exercice sur tapis roulant a entraîné le retour à la normale des niveaux de phospho-AMPK chez les rats HF. De plus, ces niveaux sont restés élevés jusqu'à la fin du clamp, soit plus de 200 min après l'arrêt de l'exercice. Cette augmentation des niveaux de phospho-AMPK suite à l'exercice était associée à l'amélioration de la sensibilité hépatique à l'insuline des rats HF. À partir des

données qui existent sur les effets de l'activation de l'AMPK hépatique ainsi que celles qui sont disponibles sur les mécanismes reliant la présence de stéatose hépatique à l'insulino-résistance hépatique, il est légitime de postuler que l'activation de l'AMPK par l'exercice puisse améliorer la sensibilité à l'insuline induite par les lipides. En poussant un peu plus la réflexion, il est permis d'émettre l'hypothèse que cette amélioration de l'insulino-résistance hépatique par l'exercice puisse être due à la cascade d'évènements illustrées en Figure 25, soient : 1) l'activation de l'AMPK par l'exercice provoque l'augmentation de l'oxydation des lipides et des dérivés des acides gras (LCFA-CoA, malonyl-CoA, DAG) et la diminution de leur synthèse. 2) Cette diminution des niveaux hépatiques des dérivés des acides gras diminue l'effet stimulant qu'ils exercent sur les PKCs. 3) La diminution de l'activation des PKCs diminue l'effet inhibiteur de celles-ci sur les éléments de la cascade de signalisation de l'insuline et finalement, 4) la sensibilité hépatique à l'insuline est améliorée. L'existence d'une telle cascade d'évènements reste maintenant à être vérifiée.

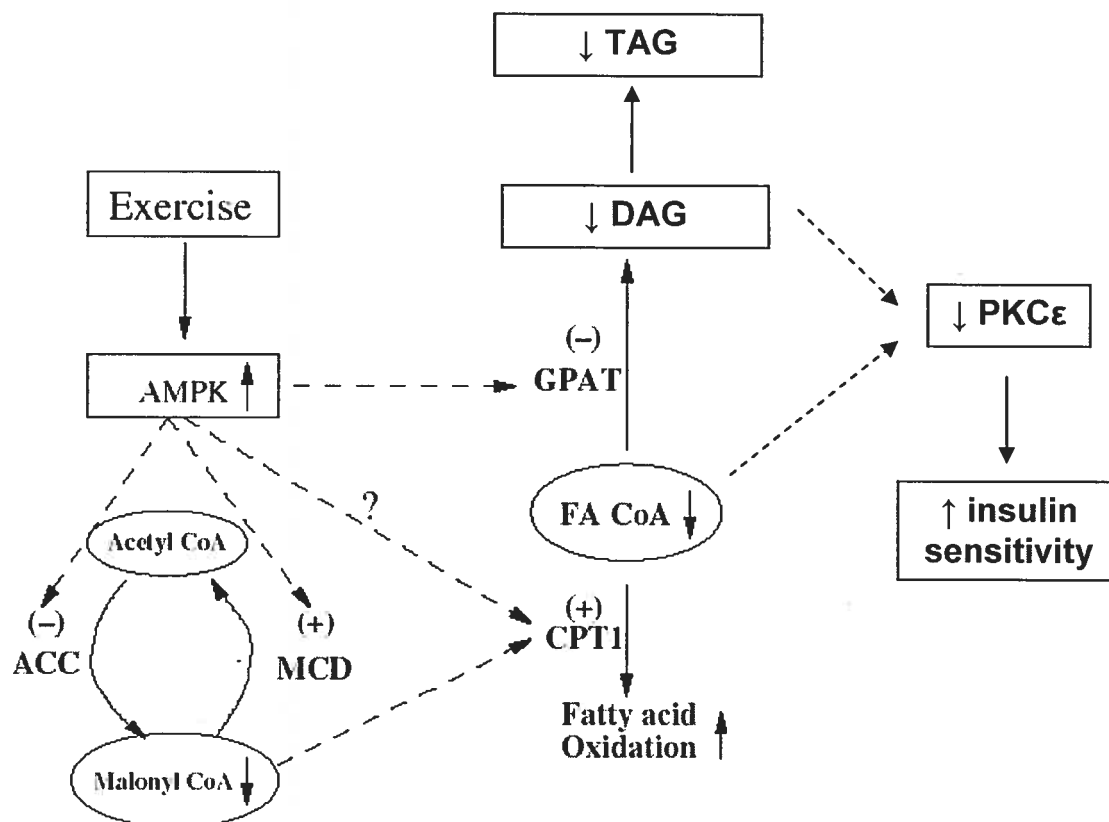


Figure 25. Lien putatif entre l'activation de l'AMPK par l'exercice et l'amélioration de la stéatose hépatique et de l'insulino-résistance induite par les lipides. L'exercice augmente l'activité de l'AMPK hépatique ce qui active l'oxydation des lipides et inhibe leur synthèse. La réduction des niveaux hépatiques des dérivés des acides gras comme les LCFA-CoA, les DAG et le malonyl-CoA est susceptible de diminuer l'activité des PKCs et d'ainsi relever les éléments de la cascade de signalisation de l'insuline de l'effet inhibiteur de ces PKCs. Le résultat net de cette cascade d'événements est une augmentation de la sensibilité hépatique à l'insuline. Modifié de Ruderman et al. (188).

Dans notre étude, l'amélioration de l'insulino-résistance hépatique que nous avons observée suite à l'exercice aigu chez les rats HF n'était pas reliée à une diminution des TAG hépatiques. Il se pourrait que la période d'exercice ait été suffisante pour diminuer les niveaux de malonyl-CoA, comme le suggère les résultats de Park et al. (171), et/ou les niveaux de LCFA-CoA et de DAG mais qu'elle ait été de trop courte durée pour diminuer les niveaux de TAG hépatiques. Il est par ailleurs de plus en plus accepté que ce serait plutôt les dérivés des acides gras qui exerceraient un effet négatif sur l'action de l'insuline

alors que les TAG ne seraient que des témoins de l'accumulation de lipides intracellulaires (81, 82, 120). Quoiqu'il en soit, dans notre étude, malgré aucun changement dans les niveaux de TAG hépatiques, l'exercice aigu chez les rats HF a eu pour effet d'améliorer l'insulino-résistance hépatique et de rétablir les niveaux de phospho-AMPK à la normale. L'activation de l'AMPK par l'exercice pourrait donc être un mécanisme par lequel l'exercice aigu améliore la sensibilité hépatique à l'insuline.

La portée de nos résultats est tout de même limitée par le fait qu'aucune mesure n'a été faite qui puisse relier l'AMPK à la stéatose hépatique et l'insulino-résistance hépatique. Il aurait en effet été intéressant de mesurer l'activité des enzymes clés du métabolisme des lipides régulés par l'AMPK (ACC, MCD, mtGPAT, CPT-I), d'évaluer les niveaux des dérivés des acides gras (malonyl-CoA, DAG, LCFA-CoA) et de mesurer des éléments de la cascade de signalisation de l'insuline (IRS1, IRS2, PI3K, PKB/Akt, GSK3) ainsi que l'activité de PKCs.

Les résultats de cette 4^e étude constituent tout de même les premières évidences montrant que l'exercice a des effets bénéfiques sur l'insulino-résistance hépatique induite par les lipides. Cette étude est de plus la première ayant associé l'activation de l'AMPK hépatique par l'exercice et l'amélioration de l'insulino-résistance hépatique induite par les lipides. Il reste donc beaucoup de travail à faire afin de mieux comprendre les effets de l'exercice sur la stéatose hépatique et l'insulino-résistance hépatique ainsi que de vérifier le lien mécanistique qu'il pourrait y avoir entre l'activation de la voie de l'AMPK hépatique et les effets bénéfiques de l'exercice.

3.2. Conclusion et perspectives

En conclusion, les résultats de nos travaux indiquent que la pratique d'exercice entraîne des effets bénéfiques sur la stéatose hépatique et l'insulino-résistance hépatique induites par l'ingestion d'une diète riche en lipides. Ceci souligne l'intérêt de recommander la pratique d'activité physique afin de prévenir et de traiter ces affections hépatiques.

En effet, nous avons montré que lorsque l'entraînement est débuté et réalisé de façon concomitante à une diète riche en lipides, la stéatose hépatique normalement induite par ce type de diète est complètement prévenue. Les effets du même programme d'entraînement mais débuté alors que la stéatose hépatique est déjà installée ont été difficiles à évaluer avec le design expérimental utilisé. Ce programme d'entraînement a par contre entraîné des améliorations extrahépatiques nettes, comme par exemple une réduction des AGL circulants et de l'adiposité, qui sont sans doute favorables au maintien d'un niveau normal de lipides intrahépatiques.

Nous avons aussi observé que l'exercice aigu améliore l'insulino-résistance hépatique induite par une diète riche en lipides et que cet effet de l'exercice est associé à l'activation de l'AMPK hépatique. De plus, l'ingestion d'une diète riche en lipides de façon chronique semble diminuer l'état phosphorylé de l'AMPK hépatique. Cette diminution chronique de l'état phosphorylé de l'AMPK pourrait participer au développement de la stéatose hépatique et de l'insulino-résistance hépatique qui en découle. Cette hypothèse reste par contre à être vérifiée. Ainsi, suite à ces résultats, la voie de l'AMPK hépatique semble être une candidate de choix vers laquelle diriger de plus amples recherches afin de mieux comprendre les facteurs intrahépatiques qui sont régulés par l'exercice et qui sont ainsi susceptibles de prévenir et/ou de traiter la stéatose hépatique non-alcoolique ainsi que l'insulino-résistance hépatique qui y est associée. Nos travaux étant les premiers à mettre en lien l'activation de l'AMPK hépatique par l'exercice et l'amélioration de l'insulino-résistance hépatique, beaucoup de travail reste encore à être fait afin de vérifier l'existence réelle d'un tel lien mécanistique.

Par ailleurs, ces travaux nous ont révélé que le développement de la stéatose hépatique suite à l'ingestion chronique d'une diète riche en lipides se fait de façon très rapide et très marquée dans les premières semaines de diète. Certains mécanismes d'élimination des lipides hépatiques semblent se mettre en branle par la suite et entraîner la résorption de la stéatose hépatique. Nous avons postulé dans la discussion de notre 3^e article que cette résorption de la stéatose entre les semaines 2 et 6 de diète HF pourrait être provoquée par une activation de la voie hépatique de sécrétion des VLDL face à l'accumulation marquée de lipides hépatiques s'étant déroulée dans les 2 premières semaines de diète HF. L'activation de certains enzymes impliqués dans la formation et la sécrétion de VLDL, comme par exemple DGAT2 et la MTP, pourrait être en cause. Cette hypothèse reste à être vérifiée.

4. Chapitre 4- Bibliographie

1. Nonalcoholic steatohepatitis clinical research network. *Hepatology* 37: 244, 2003.
2. **Abumrad NA, el-Maghrabi MR, Amri EZ, Lopez E, and Grimaldi PA.** Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J Biol Chem* 268: 17665-17668, 1993.
3. **Adams LA, Angulo P, and Lindor KD.** Nonalcoholic fatty liver disease. *CMAJ* 172: 899-905, 2005.
4. **Akbiyik F, Cinar K, Demirpence E, Ozsullu T, Tunca R, Hazirolu R, Yurdaydin C, Uzunalimoglu O, and Bozkaya H.** Ligand-induced expression of peroxisome proliferator-activated receptor and activation of fatty acid oxidation enzymes in fatty liver. *European Journal of Clinical Investigation* 34: 429-435, 2004.
5. **Akiyama T, Tachibana I, Shirohara H, Watanabe N, and Otsuki M.** High-fat hypercaloric diet induces obesity, glucose intolerance and hyperlipidemia in normal adult male Wistar rat. *Diabetes Res Clin Pract* 31: 27-35, 1996.
6. **An J, Muoio DM, Shiota M, Fujimoto Y, Cline GW, Shulman GI, Koves TR, Stevens R, Millington D, and Newgard CB.** Hepatic expression of malonyl-CoA decarboxylase reverses muscle, liver and whole-animal insulin resistance. *Nat Med* 10: 268-274, 2004.
7. **Angulo P.** Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 346: 1221-1231, 2002.
8. **Ascencio C, Torres N, Isoard-Acosta F, Gomez-Perez FJ, Hernandez-Pando R, and Tovar AR.** Soy Protein Affects Serum Insulin and Hepatic SREBP-1 mRNA and Reduces Fatty Liver in Rats. *J Nutr* 134: 522-529, 2004.
9. **Astrup A.** Healthy lifestyles in Europe: prevention of obesity and type II diabetes by diet and physical activity. *Public Health Nutr* 4: 499-515, 2001.
10. **Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CG, and Neuschwander-Tetri BA.** Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology* 107: 1103-1109, 1994.
11. **Bacon BR, Park CH, Fowell EM, and McLaren CE.** Hepatic steatosis in rats fed diets with varying concentrations of sucrose. *Fundam Appl Toxicol* 4: 819-826, 1984.
12. **Bartels ED, Lauritsen M, and Nielsen LB.** Hepatic expression of microsomal triglyceride transfer protein and in vivo secretion of triglyceride-rich lipoproteins are increased in obese diabetic mice. *Diabetes* 51: 1233-1239, 2002.
13. **Barthel A and Schmoll D.** Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285: E685-692, 2003.
14. **Bellentani S, Saccoccio G, Masutti F, Croce LS, Brandi G, Sasso F, Cristanini G, and Tiribelli C.** Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in Northern Italy. *Ann Intern Med* 132: 112-117, 2000.
15. **Benomar Y, Wetzler S, Larue-Achagiotis C, Djiane J, Tome D, and Taouis M.** In vivo leptin infusion impairs insulin and leptin signalling in liver and hypothalamus. *Mol Cell Endocrinol*, 2005.

16. **Bergasa NV, Mehlman J, and Bir K.** Aerobic exercise: a potential therapeutic intervention for patients with liver disease. *Medical Hypotheses* 62: 935-941, 2004.
17. **Bernard S, Touzet S, Personne I, Lapras V, Bondon PJ, Berthezene F, and Moulin P.** Association between microsomal triglyceride transfer protein gene polymorphism and the biological features of liver steatosis in patients with type II diabetes. *Diabetologia* 43: 995-999, 2000.
18. **Biddinger SB, Almind K, Miyazaki M, Kokkotou E, Ntambi JM, and Kahn CR.** Effects of Diet and Genetic Background on Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1c, Stearoyl-CoA Desaturase 1, and the Development of the Metabolic Syndrome. *Diabetes* 54: 1314-1323, 2005.
19. **Bonen A, Dyck DJ, Ibrahim A, and Abumrad NA.** Muscle contractile activity increases fatty acid metabolism and transport and FAT/CD36. *Am J Physiol* 276: E642-649, 1999.
20. **Bongbele J, Gutierrez A, Cardin S, and Lavoie JM.** Effects of exercise training on insulin response to intravenous glucose in pubertal rats. *Int J Sports Med* 13: 225-229, 1992.
21. **Brabant G, Muller G, Horn R, Anderwald C, Roden M, and Nave H.** Hepatic leptin signaling in obesity. *FASEB J* 19: 1048-1050, 2005.
22. **Brady LJ, Brady PS, Romsos DR, and Hoppel CL.** Elevated hepatic mitochondrial and peroxisomal oxidative capacities in fed and starved adult obese (ob/ob) mice. *Biochem J* 231: 439-444, 1985.
23. **Browning JD and Horton JD.** Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 114: 147-152, 2004.
24. **Browning JD and Lidia S. Szczepaniak RD, Pamela Nuremberg, Jay D. Horton, Jonathan C. Cohen, Scott M. Grundy, Helen H. Hobbs,.** Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: Impact of ethnicity. *Hepatology* 40: 1387-1395, 2004.
25. **Bruce CR and Hawley JA.** Improvements in insulin resistance with aerobic exercise training: a lipocentric approach. *Med Sci Sports Exerc* 36: 1196-1201, 2004.
26. **Brunt EM.** Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology. *Semin Liver Dis* 21: 3-16, 2001.
27. **Brunt EM and Tiniakos DG.** Pathological features of NASH. *Front Biosci* 10: 1475-1484, 2005.
28. **Bugianesi E, Gastaldelli A, Vanni E, Gambino R, Cassader M, Baldi S, Ponti V, Pagano G, Ferrannini E, and Rizzetto M.** Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms. *Diabetologia* 48: 634-642, 2005.
29. **Burt AD, MacSween RNM, Peters TJ, and Simpson KJ.** Non-alcoholic fatty liver: causes and complications. In: *Oxford textbook of clinical hepatology*, edited by McIntyre N. New York: Oxford University Press, 1991, p. 865-871.
30. **Burt AD, Mutton A, and Day CP.** Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis. *Semin Diagn Pathol* 15: 246-258, 1998.
31. **Carling D.** The AMP-activated protein kinase cascade - a unifying system for energy control. *Trends in Biochemical Sciences* 29: 18-24, 2004.
32. **Carling D.** AMP-activated protein kinase: balancing the scales. *Biochimie* 87: 87-91, 2005.

33. **Carlson CL and Winder WW.** Liver AMP-activated protein kinase and acetyl-CoA carboxylase during and after exercise. *J Appl Physiol* 86: 669-674, 1999.
34. **Cases S, Stone SJ, Zhou P, Yen E, Tow B, Lardizabal KD, Voelker T, and Farese RV, Jr.** Cloning of DGAT2, a Second Mammalian Diacylglycerol Acyltransferase, and Related Family Members. *J Biol Chem* 276: 38870-38876, 2001.
35. **Chalasani N, Gorski JC, Asghar MS, Asghar A, Foresman B, Hall SD, and Crabb DW.** Hepatic cytochrome P450 2E1 activity in nondiabetic patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 37: 544-550, 2003.
36. **Chalkley SM, Hettiarachchi M, Chisholm DJ, and Kraegen EW.** Five-hour fatty acid elevation increases muscle lipids and impairs glycogen synthesis in the rat. *Metabolism* 47: 1121-1126., 1998.
37. **Charlton M, Sreekumar R, Rasmussen D, Lindor K, and Nair S.** Apolipoprotein synthesis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 35: 898-904, 2002.
38. **Chen N, Ma W, Huang C, and Dong Z.** Translocation of protein kinase Cepsilon and protein kinase Cdelta to membrane is required for ultraviolet B-induced activation of mitogen-activated protein kinases and apoptosis. *J Biol Chem* 274: 15389-15394, 1999.
39. **Chitturi S, Farrell G, Frost L, Kriketos A, Lin R, Fung C, Liddle C, Samarasinghe D, and George J.** Serum leptin in NASH correlates with hepatic steatosis but not fibrosis: a manifestation of lipotoxicity? *Hepatology* 36: 403-409, 2002.
40. **Chitturi S and Farrell GC.** Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 21: 27-41, 2001.
41. **Chitturi S SA, Geoffrey C. Farrell, Jane Holmes-Walker, Jason M. Hui, Caroline Fung, Rooshdiya Karim, Rita Lin, Dev Samarasinghe, Christopher Liddle, Martin Weltman, Jacob George.,** NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology* 35: 373-379, 2002.
42. **Colombo C, Cutson JJ, Yamauchi T, Vinson C, Kadowaki T, Gavrilova O, and Reitman ML.** Transplantation of adipose tissue lacking leptin is unable to reverse the metabolic abnormalities associated with lipoatrophy. *Diabetes* 51: 2727-2733, 2002.
43. **Connor CL.** Fatty infiltration of liver and development of cirrhosis in diabetes and chronic alcoholics. *American Journal of Pathology* 14: 347-357, 1938.
44. **Coort SLM, Coumans WA, Bonen A, van der Vusse GJ, Glatz JFC, and Luiken JJFP.** Divergent effects of rosiglitazone on protein-mediated fatty acid uptake in adipose and in muscle tissues of Zucker rats. *J Lipid Res* 46: 1295-1302, 2005.
45. **Cotrim HP, Parana R, Braga E, and Lyra L.** Nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma: natural history? *Am J Gastroenterol* 95: 3018-3019, 2000.
46. **Creveston T and Quinn L.** Exercise and physical activity in the treatment of type 2 diabetes. *Nurs Clin North Am* 36: 243-271, vi, 2001.
47. **Cruz ML, Shaibi GQ, Weigensberg MJ, Spruijt-Metz D, Ball GDC, and Goran MI.** PEDIATRIC OBESITY AND INSULIN RESISTANCE: Chronic Disease Risk and Implications for Treatment and Prevention Beyond Body Weight Modification. *Annual Review of Nutrition* 25: 435-468, 2005.
48. **Cummings MH, Watts GF, Umpieby AM, Hennessy TR, Naoumova R, Slavin BM, Thompson GR, and Sonksen PH.** Increased hepatic secretion of very-low-density lipoprotein apolipoprotein B-100 in NIDDM. *Diabetologia* 38: 959-967, 1995.
49. **Day CP.** Pathogenesis of steatohepatitis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 16: 663-678, 2002.

50. **Day CP and James OF.** Hepatic steatosis: innocent bystander or guilty party? *Hepatology* 27: 1463-1466, 1998.
51. **Day CP and James OF.** Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 114: 842-845, 1998.
52. **den Boer M, Voshol PJ, Kuipers F, Havekes LM, and Romijn JA.** Hepatic Steatosis: A Mediator of the Metabolic Syndrome. Lessons From Animal Models. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 644-649, 2004.
53. **Dentin R, Girard J, and Postic C.** Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver. *Biochimie* 87: 81-86, 2005.
54. **Despres JP, Pouliot MC, Moorjani S, Nadeau A, Tremblay A, Lupien PJ, Theriault G, and Bouchard C.** Loss of abdominal fat and metabolic response to exercise training in obese women. *Am J Physiol* 261: E159-167, 1991.
55. **Diradourian C, Girard J, and Pegorier JP.** Phosphorylation of PPARs: from molecular characterization to physiological relevance. *Biochimie* 87: 33-38, 2005.
56. **Diraison F, Moulin P, and Beylot M.** Contribution of hepatic de novo lipogenesis and reesterification of plasma non esterified fatty acids to plasma triglyceride synthesis during non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Metab* 29: 478-485, 2003.
57. **Donnelly KL, Margosian MR, Sheth SS, Lusic AJ, and Parks EJ.** Increased Lipogenesis and Fatty Acid Reesterification Contribute to Hepatic Triacylglycerol Stores in Hyperlipidemic Txnip^{-/-} Mice. *J Nutr* 134: 1475-1480, 2004.
58. **Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, and Parks EJ.** Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 115: 1343-1351, 2005.
59. **Elam MB, Wilcox HG, Cagen LM, Deng X, Raghow R, Kumar P, Heimberg M, and Russell JC.** Increased hepatic VLDL secretion, lipogenesis, and SREBP-1 expression in the corpulent JCR:LA-cp rat. *J Lipid Res* 42: 2039-2048, 2001.
60. **el-Hassan AY, Ibrahim EM, al-Mulhim FA, Nabhan AA, and Chammas MY.** Fatty infiltration of the liver: analysis of prevalence, radiological and clinical features and influence on patient management. *Br J Radiol* 65: 774-778, 1992.
61. **Enriquez A, Leclercq I, Farrell GC, and Robertson G.** Altered Expression of Hepatic CYP2E1 and CYP4A in Obese, Diabetic ob/ob Mice, and fa/fa Zucker Rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 255: 300-306, 1999.
62. **Eriksson J, Taimela S, and Koivisto VA.** Exercise and the metabolic syndrome. *Diabetologia* 40: 125-135, 1997.
63. **Estadella D, Oyama LM, Damaso AR, Ribeiro EB, and Oller Do Nascimento CM.** Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition* 20: 218-224, 2004.
64. **Falck-Ytter Y, Younossi ZM, Marchesini G, and McCullough AJ.** Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes. *Semin Liver Dis* 21: 17-26, 2001.
65. **Fan J-G, Zhu J, Li X-J, Chen L, Li L, Dai F, Li F, and Chen S-Y.** Prevalence of and risk factors for fatty liver in a general population of Shanghai, China. *Journal of Hepatology* In Press, Corrected Proof.
66. **Farese RV, Sajan MP, and Standaert ML.** Atypical protein kinase C in insulin action and insulin resistance. *Biochem Soc Trans* 33: 350-353, 2005.

67. **Farrell GC.** Signalling links in the liver: Knitting SOCS with fat and inflammation. *Journal of Hepatology* In Press, Corrected Proof.
68. **Febbraio M, Abumrad NA, Hajjar DP, Sharma K, Cheng W, Pearce SF, and Silverstein RL.** A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *J Biol Chem* 274: 19055-19062, 1999.
69. **Febbraio M, Hajjar DP, and Silverstein RL.** CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest* 108: 785-791, 2001.
70. **Fiorini RN, Kirtz J, Periyasamy B, Evans Z, Haines JK, Cheng G, Polito C, Rodwell D, Shafizadeh SF, Zhou X, Campbell C, Birsner J, Schmidt M, Lewin D, and Chavin KD.** Development of an unbiased method for the estimation of liver steatosis. *Clin Transplant* 18: 700-706, 2004.
71. **Flordellis CS, Ilias I, and Papavassiliou AG.** New therapeutic options for the metabolic syndrome: what's next? *Trends in Endocrinology and Metabolism* In Press, Corrected Proof.
72. **Francone OL, Griffaton G, and Kalopissis AD.** Effect of a high-fat diet on the incorporation of stored triacylglycerol into hepatic VLDL. *Am J Physiol* 263: E615-623, 1992.
73. **Fraser JL, Antonioli DA, Chopra S, and Wang HH.** Prevalence and nonspecificity of microvesicular fatty change in the liver. *Mod Pathol* 8: 65-70, 1995.
74. **Frayn KN.** Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. *Diabetologia* 45: 1201-1210, 2002.
75. **Frayn KN and Maycock PF.** Skeletal muscle triacylglycerol in the rat: methods for sampling and measurement, and studies of biological variability. *J Lipid Res* 21: 139-144, 1980.
76. **Fromenty B and Pessayre D.** Impaired mitochondrial function in microvesicular steatosis. Effects of drugs, ethanol, hormones and cytokines. *J Hepatol* 26 Suppl 2: 43-53, 1997.
77. **Fu J, Oveisi F, Gaetani S, Lin E, and Piomelli D.** Oleoylethanolamide, an endogenous PPAR-[alpha] agonist, lowers body weight and hyperlipidemia in obese rats. *Neuropharmacology* 48: 1147-1153, 2005.
78. **Fujii N, Aschenbach WG, Musi N, Hirshman MF, and Goodyear LJ.** Regulation of glucose transport by the AMP-activated protein kinase. *Proc Nutr Soc* 63: 205-210, 2004.
79. **Gavrilova O, Haluzik M, Matsusue K, Cutson JJ, Johnson L, Dietz KR, Nicol CJ, Vinson C, Gonzalez FJ, and Reitman ML.** Liver peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass. *J Biol Chem* 278: 34268-34276., 2003.
80. **Gibbons GF, Islam K, and Pease RJ.** Mobilisation of triacylglycerol stores. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1483: 37-57, 2000.
81. **Gibbons GF, Wiggins D, Brown AM, and Hebbachi AM.** Synthesis and function of hepatic very-low-density lipoprotein. *Biochem Soc Trans* 32: 59-64, 2004.
82. **Goodpaster BH, He J, Watkins S, and Kelley DE.** Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 5755-5761, 2001.

83. **Grefhorst A, van Dijk TH, Hammer A, van der Sluijs FH, Havinga R, Havekes LM, Romijn JA, Groot PH, Reijngoud D-J, and Kuipers F.** Differential effects of pharmacological liver X receptor activation on hepatic and peripheral insulin sensitivity in lean and ob/ob mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*: 00165.02005, 2005.
84. **Gregoire FM, Zhang Q, Smith SJ, Tong C, Ross D, Lopez H, and West DB.** Diet-induced obesity and hepatic gene expression alterations in C57BL/6J and ICAM-1-deficient mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E703-713, 2002.
85. **Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, Lee D, Goodyear LJ, Kraegen EW, White MF, and Shulman GI.** Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* 48: 1270-1274., 1999.
86. **Guidorizzi de Siqueira AC, Cotrim HP, Rocha R, Carvalho FM, de Freitas LA, Barreto D, Gouveia L, and Landeiro L.** Non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance: importance of risk factors and histological spectrum. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 17: 837-841, 2005.
87. **Gupte P, Amarapurkar D, Agal S, Baijal R, Kulshrestha P, Pramanik S, Patel N, Madan A, Amarapurkar A, and Hafeezunnisa.** Non-alcoholic steatohepatitis in type 2 diabetes mellitus. *J Gastroenterol Hepatol* 19: 854-858, 2004.
88. **Han LK, Takaku T, Li J, Kimura Y, and Okuda H.** Anti-obesity action of oolong tea. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23: 98-105, 1999.
89. **Hardie DG.** The AMP-activated protein kinase pathway - new players upstream and downstream. *J Cell Sci* 117: 5479-5487, 2004.
90. **Hardie DG.** AMP-activated protein kinase: a key system mediating metabolic responses to exercise. *Med Sci Sports Exerc* 36: 28-34, 2004.
91. **Hardie DG.** New roles for the LKB1-->AMPK pathway. *Current Opinion in Cell Biology* 17: 167-173, 2005.
92. **Hashimoto T, Cook WS, Qi C, Yeldandi AV, Reddy JK, and Rao MS.** Defect in Peroxisome Proliferator-activated Receptor alpha -inducible Fatty Acid Oxidation Determines the Severity of Hepatic Steatosis in Response to Fasting. *J Biol Chem* 275: 28918-28928, 2000.
93. **Hautekeete ML, Degott C, and Benhamou JP.** Microvesicular steatosis of the liver. *Acta Clin Belg* 45: 311-326, 1990.
94. **Hawley SA, Boudeau J, Reid JL, Mustard KJ, Udd L, Makela TP, Alessi DR, and Hardie DG.** Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol* 2: 28, 2003.
95. **Hecht Y and Chevrel B.** *Les stéatoses hépatiques*. Paris: Baillière, J.-B., 1975.
96. **Heijboer AC, Donga E, Voshol PJ, Dang Z-C, Havekes LM, Romijn JA, and Corssmit EPM.** Sixteen hours fasting differentially affects hepatic and muscle insulin sensitivity in mice. *J Lipid Res*: M400440-JLR400200, 2004.
97. **Helge JW, Ayre K, Chanchaiyakul S, Hulbert AJ, Kiens B, and Storlien LH.** Endurance in high-fat-fed rats: effects of carbohydrate content and fatty acid profile. *J Appl Physiol* 85: 1342-1348, 1998.
98. **Hermier D, Guy G, Guillaumin S, Davail S, Andre JM, and Hoo-Paris R.** Differential channelling of liver lipids in relation to susceptibility to hepatic steatosis in two species of ducks. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 135: 663-675, 2003.

99. **Hevener AL, Reichart D, and Olefsky J.** Exercise and thiazolidinedione therapy normalize insulin action in the obese Zucker fatty rat. *Diabetes* 49: 2154-2159, 2000.
100. **Hickner RC, Racette SB, Binder EF, Fisher JS, and Kohrt WM.** Effects of 10 days of endurance exercise training on the suppression of whole body and regional lipolysis by insulin. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 1498-1504, 2000.
101. **Hill JO, Lin D, Yakubu F, and Peters JC.** Development of dietary obesity in rats: influence of amount and composition of dietary fat. *Int J Obes Relat Metab Disord* 16: 321-333, 1992.
102. **Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, and Hotamisligil GS.** A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420: 333-336, 2002.
103. **Hongu N and Sachan DS.** Caffeine, carnitine and choline supplementation of rats decreases body fat and serum leptin concentration as does exercise. *J Nutr* 130: 152-157, 2000.
104. **Ibrahimi A, Bonen A, Blinn WD, Hajri T, Li X, Zhong K, Cameron R, and Abumrad NA.** Muscle-specific Overexpression of FAT/CD36 Enhances Fatty Acid Oxidation by Contracting Muscle, Reduces Plasma Triglycerides and Fatty Acids, and Increases Plasma Glucose and Insulin. *J Biol Chem* 274: 26761-26766, 1999.
105. **Iglesias MA, Ye JM, Frangioudakis G, Saha AK, Tomas E, Ruderman NB, Cooney GJ, and Kraegen EW.** AICAR administration causes an apparent enhancement of muscle and liver insulin action in insulin-resistant high-fat-fed rats. *Diabetes* 51: 2886-2894, 2002.
106. **Itani SI, Ruderman NB, Schmieder F, and Boden G.** Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I κ B- α . *Diabetes* 51: 2005-2011., 2002.
107. **Juggi JS and Prathap K.** Lipid accumulation in the rat liver: a histological and biochemical study. *Cytobios* 24: 117-134, 1979.
108. **Kahn R, Buse J, Ferrannini E, and Stern M.** The Metabolic Syndrome: Time for a Critical Appraisal: Joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* 28: 2289-2304, 2005.
109. **Kalopissis AD, Griglio S, Malewiak MI, and Rozen R.** Effect of a high-fat diet on rat very low density lipoprotein secretion. *Biochim Biophys Acta* 620: 111-119, 1980.
110. **Kalopissis AD, Griglio S, Malewiak MI, Rozen R, and Liepvre XL.** Very-low-density-lipoprotein secretion by isolated hepatocytes of fat-fed rats. *Biochem J* 198: 373-377, 1981.
111. **Kelley DE, McKolanis TM, Hegazi RAF, Kuller LH, and Kalhan SC.** Fatty liver in type 2 diabetes mellitus: relation to regional adiposity, fatty acids, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285: E906-916, 2003.
112. **Kersten S.** Effects of fatty acids on gene expression: role of peroxisome proliferator-activated receptor alpha, liver X receptor alpha and sterol regulatory element-binding protein-1c. *Proc Nutr Soc* 61: 371-374, 2002.
113. **Kim CH, Youn JH, Park JY, Hong SK, Park KS, Park SW, Suh KI, and Lee KU.** Effects of high-fat diet and exercise training on intracellular glucose metabolism in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278: E977-984, 2000.
114. **Kim JK, Fillmore JJ, Sunshine MJ, Albrecht B, Higashimori T, Kim D-W, Liu Z-X, Soos TJ, Cline GW, O'Brien WR, Littman DR, and Shulman GI.** PKC- θ

knockout mice are protected from fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 114: 823-827, 2004.

115. **Kim JK, Gavrilova O, Chen Y, Reitman ML, and Shulman GI.** Mechanism of insulin resistance in A-ZIP/F-1 fatless mice. *J Biol Chem* 275: 8456-8460, 2000.

116. **Kim K-H.** REGULATION OF MAMMALIAN ACETYL-COENZYME A CARBOXYLASE. *Annual Review of Nutrition* 17: 77-99, 1997.

117. **Kleiner DE, Brunt EM, and Mark Van Natta CB, Melissa J. Contos, Oscar W. Cummings, Linda D. Ferrell, Yao-Chang Liu, Michael S. Torbenson, Aynur Unalp-Arida, Matthew Yeh, Arthur J. McCullough, Arun J. Sanyal, Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network.** Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 41: 1313-1321, 2005.

118. **Koteish A and Diehl AM.** Animal models of steatosis. *Semin Liver Dis* 21: 89-104, 2001.

119. **Kraegen EW, Clark PW, Jenkins AB, Daley EA, Chisholm DJ, and Storlien LH.** Development of muscle insulin resistance after liver insulin resistance in high-fat-fed rats. *Diabetes* 40: 1397-1403, 1991.

120. **Kraegen EW, Cooney GJ, Ye J, and Thompson AL.** Triglycerides, fatty acids and insulin resistance--hyperinsulinemia. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109: S516-526, 2001.

121. **Kraegen EW, James DE, Bennett SP, and Chisholm DJ.** In vivo insulin sensitivity in the rat determined by euglycemic clamp. *Am J Physiol* 245: E1-7, 1983.

122. **Kraegen EW, James DE, Jenkins AB, and Chisholm DJ.** Dose-response curves for in vivo insulin sensitivity in individual tissues in rats. *Am J Physiol* 248: E353-362, 1985.

123. **Kraegen EW, James DE, Storlien LH, Burleigh KM, and Chisholm DJ.** In vivo insulin resistance in individual peripheral tissues of the high fat fed rat: assessment by euglycaemic clamp plus deoxyglucose administration. *Diabetologia* 29: 192-198, 1986.

124. **Kraegen EW, Storlien LH, Jenkins AB, and James DE.** Chronic exercise compensates for insulin resistance induced by a high-fat diet in rats. *Am J Physiol* 256: E242-249, 1989.

125. **Krotkiewski M and Bjorntorp P.** The effect of progesterone and of insulin administration on regional adipose tissue cellularity in the rat. *Acta Physiol Scand* 96: 122-127, 1976.

126. **Lam TK, Yoshii H, Haber CA, Bogdanovic E, Lam L, Fantus IG, and Giacca A.** Free fatty acid-induced hepatic insulin resistance: a potential role for protein kinase C-delta. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283: E682-691, 2002.

127. **Lavoie JM, Bongbele J, Cardin S, Belisle M, Terrettaz J, and Van de Werve G.** Increased insulin suppression of plasma free fatty acid concentration in exercise-trained rats. *J Appl Physiol* 74: 293-296, 1993.

128. **Lee Y, Wang MY, Kakuma T, Wang ZW, Babcock E, McCorkle K, Higa M, Zhou YT, and Unger RH.** Liporegulation in diet-induced obesity. The antisteatotic role of hyperleptinemia. *J Biol Chem* 276: 5629-5635, 2001.

129. **Lee YH, Giraud J, Davis RJ, and White MF.** c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. *J Biol Chem* 278: 2896-2902, 2003.

130. **Lehner R, Cui Z, and Vance DE.** Subcellular localization, developmental expression and characterization of a liver triacylglycerol hydrolase. *Biochem J* 338 (Pt 3): 761-768, 1999.
131. **Lettéron P, Sutton A, Mansouri A, Fromenty B, and Pessayre D.** Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein: Another mechanism for drug-induced steatosis in mice. *Hepatology* 38: 133-140, 2003.
132. **Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, and Giacca A.** Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev* 23: 201-229, 2002.
133. **Li Z, Yang S, Lin H, Huang J, Watkins PA, Moser AB, Desimone C, Song XY, and Diehl AM.** Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 37: 343-350, 2003.
134. **Liao J, Sportsman R, Harris J, and Stahl A.** Real-time quantification of fatty acid uptake using a novel fluorescence assay. *J Lipid Res* 46: 597-602, 2005.
135. **Lieber CS, Leo MA, Mak KM, Xu Y, Cao Q, Ren C, Ponomarenko A, and DeCarli LM.** Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr* 79: 502-509, 2004.
136. **Lin HZ, Yang SQ, Chuckaree C, Kuhajda F, Ronnet G, and Diehl AM.** Metformin reverses fatty liver disease in obese, leptin-deficient mice. *Nat Med* 6: 998-1003, 2000.
137. **Lin M, Gordon D, and Wetterau J.** Microsomal triglyceride transfer protein (MTP) regulation in HepG2 cells: insulin negatively regulates MTP gene expression. *J Lipid Res* 36: 1073-1081, 1995.
138. **Lin X, Yue P, Chen Z, and Schonfeld G.** Hepatic triglyceride contents are genetically determined in mice: results of a strain survey. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288: G1179-1189, 2005.
139. **Lo S, Russell JC, and Taylor AW.** Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol* 28: 234-236, 1970.
140. **Lombardi B.** Considerations on the pathogenesis of fatty liver. *Lab Invest* 15: 1-20, 1966.
141. **Lombardi B, Pani P, and Schlunk FF.** Choline-deficiency fatty liver: impaired release of hepatic triglycerides. *J Lipid Res* 9: 437-446, 1968.
142. **Longo R, Pollesello P, Ricci C, Masutti F, Kvam BJ, Bercich L, Croce LS, Grigolato P, Paoletti S, de Bernard B, and et al.** Proton MR spectroscopy in quantitative in vivo determination of fat content in human liver steatosis. *J Magn Reson Imaging* 5: 281-285, 1995.
143. **Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, and Oh BJ.** Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 55: 434-438, 1980.
144. **MACDONALD GA and PRINS JB.** Peroxisomal fatty acid metabolism, peroxisomal proliferator-activated receptors and non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 19: 1335-1337, 2004.
145. **Machado M and Cortez-Pinto H.** Non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 17: 823-826, 2005.
146. **Marceau P, Biron S, Hould FS, Marceau S, Simard S, Thung SN, and Kral JG.** Liver pathology and the metabolic syndrome X in severe obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 1513-1517, 1999.

147. **Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM, Bianchi G, Bugianesi E, McCullough AJ, Forlani G, and Melchionda N.** Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med* 107: 450-455, 1999.
148. **Marchesini G, Marzocchi R, Agostini F, and Bugianesi E.** Nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol* 16: 421-427, 2005.
149. **Marrero JA and Robert J. Fontana GLS, Hari S. Conjeevaram, Dawn M. Emick, Anna S. Lok.** NAFLD may be a common underlying liver disease in patients with hepatocellular carcinoma in the United States. *Hepatology* 36: 1349-1354, 2002.
150. **Matsumoto M, Ogawa W, Akimoto K, Inoue H, Miyake K, Furukawa K, Hayashi Y, Iguchi H, Matsuki Y, Hiramatsu R, Shimano H, Yamada N, Ohno S, Kasuga M, and Noda T.** PKC $\{\lambda\}$ in liver mediates insulin-induced SREBP-1c expression and determines both hepatic lipid content and overall insulin sensitivity. *J Clin Invest* 112: 935-944, 2003.
151. **Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, and McCullough AJ.** Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 116: 1413-1419, 1999.
152. **Mayerson AB, Hundal RS, Dufour S, Lebon V, Befroy D, Cline GW, Enocksson S, Inzucchi SE, Shulman GI, and Petersen KF.** The Effects of Rosiglitazone on Insulin Sensitivity, Lipolysis, and Hepatic and Skeletal Muscle Triglyceride Content in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes* 51: 797-802, 2002.
153. **Medina J, Fernandez-Salazar LI, Garcia-Buey L, and Moreno-Otero R.** Approach to the Pathogenesis and Treatment of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Diabetes Care* 27: 2057-2066, 2004.
154. **Memon RA, Tecott LH, Nonogaki K, Beigneux A, Moser AH, Grunfeld C, and Feingold KR.** Up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR-alpha) and PPAR-gamma messenger ribonucleic acid expression in the liver in murine obesity: troglitazone induces expression of PPAR-gamma-responsive adipose tissue-specific genes in the liver of obese diabetic mice. *Endocrinology* 141: 4021-4031, 2000.
155. **Mensenkamp AR, Havekes LM, Romijn JA, and Kuipers F.** Hepatic steatosis and very low density lipoprotein secretion: the involvement of apolipoprotein E. *Journal of Hepatology* 35: 816-822, 2001.
156. **Miele L, Grieco A, Armuzzi A, Candelli M, Forgione A, Gasbarrini A, and Gasbarrini G.** Hepatic mitochondrial beta-oxidation in patients with nonalcoholic steatohepatitis assessed by ^{13}C -octanoate breath test. *Am J Gastroenterol* 98: 2335-2336, 2003.
157. **Mittendorfer B, Jeschke MG, Wolf SE, and Sidossis LS.** Nutritional hepatic steatosis and mortality after burn injury in rats. *Clin Nutr* 17: 293-299, 1998.
158. **Muoio DM, Seefeld K, Witters LA, and Coleman RA.** AMP-activated kinase reciprocally regulates triacylglycerol synthesis and fatty acid oxidation in liver and muscle: evidence that sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase is a novel target. *Biochem J* 338 (Pt 3): 783-791, 1999.
159. **Nara M, Kanda T, Tsukui S, Inukai T, Shimomura Y, Inoue S, and Kobayashi I.** Running exercise increases tumor necrosis factor-alpha secreting from mesenteric fat in insulin-resistant rats. *Life Sci* 65: 237-244, 1999.
160. **Narayan KA, McMullen JJ, Butler DP, Wakefield T, and Calhoun WK.** Effect of exercise on tissue lipids and serum lipoproteins of rats fed two levels of fat. *J Nutr* 105: 581-587, 1975.

161. **Neschen S, Moore I, Regittnig W, Yu CL, Wang Y, Pypaert M, Petersen KF, and Shulman GI.** Contrasting effects of fish oil and safflower oil on hepatic peroxisomal and tissue lipid content. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E395-401., 2002.
162. **Neschen S, Morino K, Hammond LE, Zhang D, Liu ZX, Romanelli AJ, Cline GW, Pongratz RL, Zhang XM, Choi CS, Coleman RA, and Shulman GI.** Prevention of hepatic steatosis and hepatic insulin resistance in mitochondrial acyl-CoA:glycerol-sn-3-phosphate acyltransferase 1 knockout mice. *Cell Metab* 2: 55-65, 2005.
163. **Neuschwander-Tetri BA and Caldwell SH.** Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 37: 1202-1219, 2003.
164. **Nomura H, Kashiwagi S, Hayashi J, Kajiyama W, Tani S, and Goto M.** Prevalence of fatty liver in a general population of Okinawa, Japan. *Jpn J Med* 27: 142-149, 1988.
165. **Oakes ND, Bell KS, Furler SM, Camilleri S, Saha AK, Ruderman NB, Chisholm DJ, and Kraegen EW.** Diet-induced muscle insulin resistance in rats is ameliorated by acute dietary lipid withdrawal or a single bout of exercise: parallel relationship between insulin stimulation of glucose uptake and suppression of long-chain fatty acyl-CoA. *Diabetes* 46: 2022-2028, 1997.
166. **Oakes ND, Cooney GJ, Camilleri S, Chisholm DJ, and Kraegen EW.** Mechanisms of liver and muscle insulin resistance induced by chronic high-fat feeding. *Diabetes* 46: 1768-1774., 1997.
167. **Osborne TF.** Sterol Regulatory Element-binding Proteins (SREBPs): Key Regulators of Nutritional Homeostasis and Insulin Action. *J Biol Chem* 275: 32379-32382, 2000.
168. **OUALI F, DJOUADI F, MERLET-BENICHOUC, RIVEAU B, and BASTIN J.** Regulation of Fatty Acid Transport Protein and Mitochondrial and Peroxisomal {beta}-Oxidation Gene Expression by Fatty Acids in Developing Rats. *Pediatr Res* 48: 691-696, 2000.
169. **Owen MR, Corstorphine CC, and Zammit VA.** Overt and latent activities of diacylglycerol acyltransferase in rat liver microsomes: possible roles in very-low-density lipoprotein triacylglycerol secretion. *Biochem J* 323 (Pt 1): 17-21, 1997.
170. **Paradis V, Perlemuter G, Bonvoust F, Dargere D, Parfait B, Vidaud M, Conti M, Huet S, Ba N, Buffet C, and Bedossa P.** High glucose and hyperinsulinemia stimulate connective tissue growth factor expression: a potential mechanism involved in progression to fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 34: 738-744, 2001.
171. **Park H, Kaushik VK, Constant S, Prentki M, Przybytkowski E, Ruderman NB, and Saha AK.** Coordinate regulation of malonyl-CoA decarboxylase, sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, and acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase in rat tissues in response to exercise. *J Biol Chem* 277: 32571-32577, 2002.
172. **Perseghin G, Petersen K, and Shulman GI.** Cellular mechanism of insulin resistance: potential links with inflammation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27 Suppl 3: S6-11, 2003.
173. **Pessayre D, Berson A, Fromenty B, and Mansouri A.** Mitochondria in steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 21: 57-69, 2001.
174. **Pessayre D and Fromenty B.** NASH: a mitochondrial disease. *Journal of Hepatology* 42: 928-940, 2005.

175. **Pessayre D, Mansouri A, and Fromenty B.** Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. V. Mitochondrial dysfunction in steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282: G193-199, 2002.
176. **Petersen KF, Oral EA, Dufour S, Befroy D, Ariyan C, Yu C, Cline GW, DePaoli AM, Taylor SI, Gorden P, and Shulman GI.** Leptin reverses insulin resistance and hepatic steatosis in patients with severe lipodystrophy. *J Clin Invest* 109: 1345-1350, 2002.
177. **Pilkis SJ and Granner DK.** Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu Rev Physiol* 54: 885-909, 1992.
178. **Pi-Sunyer FX.** Pathophysiology and long-term management of the metabolic syndrome. *Obes Res* 12 Suppl: 174S-180S, 2004.
179. **Podolin DA, Wei Y, and Pagliassotti MJ.** Effects of a high-fat diet and voluntary wheel running on gluconeogenesis and lipolysis in rats. *J Appl Physiol* 86: 1374-1380, 1999.
180. **Powell EE, Cooksley WG, Hanson R, Searle J, Halliday JW, and Powell LW.** The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology* 11: 74-80, 1990.
181. **Raabe M, Veniant MM, Sullivan MA, Zlot CH, Bjorkegren J, Nielsen LB, Wong JS, Hamilton RL, and Young SG.** Analysis of the role of microsomal triglyceride transfer protein in the liver of tissue-specific knockout mice. *J Clin Invest* 103: 1287-1298, 1999.
182. **Ran J, Hirano T, and Adachi M.** Angiotensin II type 1 receptor blocker ameliorates overproduction and accumulation of triglyceride in the liver of Zucker fatty rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287: E227-232, 2004.
183. **Rao MS and Reddy JK.** Peroxisomal beta-oxidation and steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 21: 43-55, 2001.
184. **Ravikumar B, Carey PE, Snaar JEM, Deelchand DK, Cook DB, Neely RDG, English PT, Firbank MJ, Morris PG, and Taylor R.** Real-time assessment of postprandial fat storage in liver and skeletal muscle in health and type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E789-797, 2005.
185. **Redonnet A, Groubet R, No[euml]l-Suberville C, Bonilla Sep, Martinez A, and Higuere P.** Exposure to an obesity-inducing diet early affects the pattern of expression of peroxisome proliferator, retinoic acid, and triiodothyronine nuclear receptors in the rat. *Metabolism* 50: 1161-1167, 2001.
186. **Reue K, Xu P, Wang XP, and Slavin BG.** Adipose tissue deficiency, glucose intolerance, and increased atherosclerosis result from mutation in the mouse fatty liver dystrophy (fld) gene. *J Lipid Res* 41: 1067-1076, 2000.
187. **Rothfeld B, Levine A, Varady A, Loken S, and Karmen A.** The effect of exercise on lipid deposition in the rat. *Biochem Med* 18: 206-209, 1977.
188. **Ruderman NB, Park H, Kaushik VK, Dean D, Constant S, Prentki M, and Saha AK.** AMPK as a metabolic switch in rat muscle, liver and adipose tissue after exercise. *Acta Physiol Scand* 178: 435-442, 2003.
189. **Ruderman NB, Saha AK, Vavvas D, and Witters LA.** Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance. *Am J Physiol* 276: E1-E18, 1999.
190. **Saadeh S, Younossi Z, Remer E, Gramlich(()) T, Ong(()) J, Hurley(()) M, Mullen(*) K, Cooper(()) J, and Sheridan(()) M.** The

- utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 123: 745-750, 2002.
191. **Saltiel AR and Kahn CR.** Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414: 799-806, 2001.
192. **Samuel VT, Liu Z-X, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, Romanelli AJ, and Shulman GI.** Mechanism of Hepatic Insulin Resistance in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *J Biol Chem* 279: 32345-32353, 2004.
193. **Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, Luketic VA, Shiffman ML, and Clore JN.** Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 120: 1183-1192, 2001.
194. **Sasagawa T, Ishii K, Hasuda K, Kubota M, Ota Y, and Okita M.** The effect of dietary polyunsaturated fatty acid on insulin sensitivity and lipid metabolism in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 64: 181-187, 2001.
195. **Schwarz J-M, Linfoot P, Dare D, and Aghajanian K.** Hepatic de novo lipogenesis in normoinsulinemic and hyperinsulinemic subjects consuming high-fat, low-carbohydrate and low-fat, high-carbohydrate isoenergetic diets. *Am J Clin Nutr* 77: 43-50, 2003.
196. **Scott DA, Gholson CF, Netchvolodoff CV, Ray M, Gonzalez E, and Bacon BR.** Incidental microvesicular steatosis due to valproic acid anticonvulsant therapy. *Am J Gastroenterol* 86: 500-502, 1991.
197. **Seppala-Lindroos A, Vehkavaara S, Hakkinen AM, Goto T, Westerbacka J, Sovijarvi A, Halavaara J, and Yki-Jarvinen H.** Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 3023-3028, 2002.
198. **Shelness GS and Sellers JA.** Very-low-density lipoprotein assembly and secretion. *Curr Opin Lipidol* 12: 151-157, 2001.
199. **Sheth SG, Gordon FD, and Chopra S.** Nonalcoholic steatohepatitis. *Ann Intern Med* 126: 137-145, 1997.
200. **Shimomura I, Bashmakov Y, and Horton JD.** Increased Levels of Nuclear SREBP-1c Associated with Fatty Livers in Two Mouse Models of Diabetes Mellitus. *J Biol Chem* 274: 30028-30032, 1999.
201. **Shimomura I, Bashmakov Y, Ikemoto S, Horton JD, Brown MS, and Goldstein JL.** Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 13656-13661, 1999.
202. **Shimomura I, Matsuda M, Hammer RE, Bashmakov Y, Brown MS, and Goldstein JL.** Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Mol Cell* 6: 77-86, 2000.
203. **Shimomura I, Shimano H, Horton JD, Goldstein JL, and Brown MS.** Differential Expression of Exons 1a and 1c in mRNAs for Sterol Regulatory Element Binding Protein-1 in Human and Mouse Organs and Cultured Cells. *J Clin Invest* 99: 838-845, 1997.
204. **Shinoda M, Latour MG, and Lavoie JM.** Effects of physical training on body composition and organ weights in ovariectomized and hyperestrogenic rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26: 335-343, 2002.

205. **Shulman GI.** Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 106: 171-176, 2000.
206. **Siegelman ES and Rosen MA.** Imaging of hepatic steatosis. *Semin Liver Dis* 21: 71-80, 2001.
207. **Sim AT and Hardie DG.** The low activity of acetyl-CoA carboxylase in basal and glucagon-stimulated hepatocytes is due to phosphorylation by the AMP-activated protein kinase and not cyclic AMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett* 233: 294-298, 1988.
208. **Song S, Andrikopoulos S, Filippis C, Thorburn AW, Khan D, and Proietto J.** Mechanism of fat-induced hepatic gluconeogenesis: effect of metformin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281: E275-282., 2001.
209. **Sparks JD and Sparks CE.** Insulin modulation of hepatic synthesis and secretion of apolipoprotein B by rat hepatocytes. *J Biol Chem* 265: 8854-8862, 1990.
210. **Sparks JD and Sparks CE.** Obese Zucker (fa/fa) rats are resistant to insulin's inhibitory effect on hepatic apo B secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 205: 417-422, 1994.
211. **Spiegel AM and Alving BM.** Executive summary of the Strategic Plan for National Institutes of Health Obesity Research *Am J Clin Nutr* 82: 211S-214, 2005.
212. **Straczkowski M, Kowalska I, Dzienis-Straczkowska S, Kinalski M, Gorski J, and Kinalska I.** The effect of exercise training on glucose tolerance and skeletal muscle triacylglycerol content in rats fed with a high-fat diet. *Diabetes Metab* 27: 19-23, 2001.
213. **Suzuki A, Lindor K, Saver JS, Lymp J, Mendes F, Muto A, Okada T, and Angulo P.** Effect of changes on body weight and lifestyle in nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*, 2005.
214. **Szczepaniak LS, Babcock EE, Schick F, Dobbins RL, Garg A, Burns DK, McGarry JD, and Stein DT.** Measurement of intracellular triglyceride stores by H spectroscopy: validation in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 276: E977-989, 1999.
215. **Szczepaniak LS, Nurenberg P, Leonard D, Browning JD, Reingold JS, Grundy S, Hobbs HH, and Dobbins RL.** Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence of hepatic steatosis in the general population. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E462-468, 2005.
216. **Tamura S and Shimomura I.** Contribution of adipose tissue and de novo lipogenesis to nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 115: 1139-1142, 2005.
217. **Tamura Y, Tanaka Y, Sato F, Choi JB, Watada H, Niwa M, Kinoshita J, Ooka A, Kumashiro N, Igarashi Y, Kyogoku S, Maehara T, Kawasumi M, Hirose T, and Kawamori R.** Effects of Diet and Exercise on Muscle and Liver Intracellular Lipid Contents and Insulin Sensitivity in Type 2 Diabetic Patients. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 3191-3196, 2005.
218. **Teli MR, James OF, Burt AD, Bennett MK, and Day CP.** The natural history of nonalcoholic fatty liver: a follow-up study. *Hepatology* 22: 1714-1719, 1995.
219. **Terao T, Fujise T, and Nakano S.** Effects of long-term exercise and high-cholesterol diet on lipid-lipoprotein metabolism in rats. *Tokai J Exp Clin Med* 12: 243-251, 1987.
220. **Terao T, Fujise T, Uchiyama S, Yamashita Y, and Nakano S.** Effects of swimming exercise at two different water temperature on hepatic lipid and lipoprotein levels in experimental fatty liver rats. *Tokai J Exp Clin Med* 14: 139-145, 1989.

221. **Terao T, Fujise T, Yamashita Y, and Nakano S.** Dependence of lipid-lipoprotein metabolism on exercise intensity in experimental fatty liver rats. *Tokai J Exp Clin Med* 13: 99-107, 1988.
222. **Timlin MT and Parks EJ.** Temporal pattern of de novo lipogenesis in the postprandial state in healthy men. *Am J Clin Nutr* 81: 35-42, 2005.
223. **Tobe K, Suzuki R, Aoyama M, Yamauchi T, Kamon J, Kubota N, Terauchi Y, Matsui J, Akanuma Y, Kimura S, Tanaka J, Abe M, Ohsumi J, Nagai R, and Kadowaki T.** Increased Expression of the Sterol Regulatory Element-binding Protein-1 Gene in Insulin Receptor Substrate-2^{-/-} Mouse Liver. *J Biol Chem* 276: 38337-38340, 2001.
224. **Tomas E, Zorzano A, and Ruderman NB.** Exercise Effects on Muscle Insulin Signaling and Action: Exercise and insulin signaling: a historical perspective. *J Appl Physiol* 93: 765-772, 2002.
225. **Tominaga K, Kurata JH, Chen YK, Fujimoto E, Miyagawa S, Abe I, and Kusano Y.** Prevalence of fatty liver in Japanese children and relationship to obesity. An epidemiological ultrasonographic survey. *Dig Dis Sci* 40: 2002-2009, 1995.
226. **Tovar AR, Torre-Villalvazo I, Ochoa M, Elias AL, Ortiz V, Aguilar-Salinas CA, and Torres N.** Soy protein reduces hepatic lipotoxicity in hyperinsulinemic obese Zucker fa/fa rats. *J Lipid Res*: M500067-JLR500200, 2005.
227. **Triscari J, Greenwood MR, and Sullivan AC.** Oxidation and ketogenesis in hepatocytes of lean and obese Zucker rats. *Metabolism* 31: 223-228, 1982.
228. **Triscari J, Nauss-Karol C, Levin BE, and Sullivan AC.** Changes in lipid metabolism in diet-induced obesity. *Metabolism* 34: 580-587, 1985.
229. **Trudell JR, Lin WQ, Chrystof DA, Kirshenbaum G, and Ardies CM.** Induction of HSP72 in rat liver by chronic ethanol consumption combined with exercise: association with the prevention of ethanol-induced fatty liver by exercise. *Alcohol Clin Exp Res* 19: 753-758, 1995.
230. **Ueki K, Kondo T, Tseng Y-H, and Kahn CR.** Central role of suppressors of cytokine signaling proteins in hepatic steatosis, insulin resistance, and the metabolic syndrome in the mouse. *PNAS* 101: 10422-10427, 2004.
231. **Ueno T, Sugawara H, Sujaku K, Hashimoto O, Tsuji R, Tamaki S, Torimura T, Inuzuka S, Sata M, and Tanikawa K.** Therapeutic effects of restricted diet and exercise in obese patients with fatty liver. *J Hepatol* 27: 103-107, 1997.
232. **Van Steenberg W and Lanckmans S.** Liver disturbances in obesity and diabetes mellitus. *Int J Obes Relat Metab Disord* 19: S27-36, 1995.
233. **Vavvas D, Apazidis A, Saha AK, Gamble J, Patel A, Kemp BE, Witters LA, and Ruderman NB.** Contraction-induced Changes in Acetyl-CoA Carboxylase and 5'-AMP-activated Kinase in Skeletal Muscle. *J Biol Chem* 272: 13255-13261, 1997.
234. **Velasco G, Geelen MJH, and Guzman M.** Control of Hepatic Fatty Acid Oxidation by 5'-AMP-Activated Protein Kinase Involves a Malonyl-CoA-Dependent and a Malonyl-CoA-Independent Mechanism. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 337: 169-175, 1997.
235. **Vuppalanchi R, Marri S, Kolwankar D, Considine RV, and Chalasani N.** Is adiponectin involved in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis? A preliminary human study. *J Clin Gastroenterol* 39: 237-242, 2005.
236. **Wang Y, Tran K, and Yao Z.** The Activity of Microsomal Triglyceride Transfer Protein Is Essential for Accumulation of Triglyceride within Microsomes in McA-RH7777

Cells. A UNIFIED MODEL FOR THE ASSEMBLY OF VERY LOW DENSITY LIPOPROTEINS. *J Biol Chem* 274: 27793-27800, 1999.

237. **Waterman IJ and Zammit VA.** Differential Effects of Fenofibrate or Simvastatin Treatment of Rats on Hepatic Microsomal Overt and Latent Diacylglycerol Acyltransferase Activities. *Diabetes* 51: 1708-1713, 2002.

238. **Weng Y, DiRusso CC, Reilly AA, Black PN, and Ding X.** Hepatic gene expression changes in mouse models with liver-specific deletion or global suppression of the NADPH-cytochrome P450 reductase gene: Mechanistic implications for the regulation of microsomal cytochrome P450 and the fatty liver phenotype. *J Biol Chem*: M504447200, 2005.

239. **Westerbacka J, Lammi K, Hakkinen A-M, Rissanen A, Salminen I, Aro A, and Yki-Jarvinen H.** Dietary Fat Content Modifies Liver Fat in Overweight Nondiabetic Subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 2804-2809, 2005.

240. **Westwater JO and Fainer D.** Liver impairment in the obese. *Gastroenterology* 34: 686-693, 1958.

241. **Witters LA and Kemp BE.** Insulin activation of acetyl-CoA carboxylase accompanied by inhibition of the 5'-AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 267: 2864-2867, 1992.

242. **Woods A, Azzout-Marniche D, Foretz M, Stein SC, Lemarchand P, Ferre P, Foufelle F, and Carling D.** Characterization of the Role of AMP-Activated Protein Kinase in the Regulation of Glucose-Activated Gene Expression Using Constitutively Active and Dominant Negative Forms of the Kinase. *Mol Cell Biol* 20: 6704-6711, 2000.

243. **Woods A, Johnstone SR, Dickerson K, Leiper FC, Fryer LG, Neumann D, Schlattner U, Wallimann T, Carlson M, and Carling D.** LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr Biol* 13: 2004-2008, 2003.

244. **Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KSL, and Cooper GJS.** The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest* 112: 91-100, 2003.

245. **Yao ZM and Vance DE.** The active synthesis of phosphatidylcholine is required for very low density lipoprotein secretion from rat hepatocytes. *J Biol Chem* 263: 2998-3004, 1988.

246. **Ye JM, Iglesias MA, Watson DG, Ellis B, Wood L, Jensen PB, Sorensen RV, Larsen PJ, Cooney GJ, Wassermann K, and Kraegen EW.** PPARalpha /gamma ragaglitazar eliminates fatty liver and enhances insulin action in fat-fed rats in the absence of hepatomegaly. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284: E531-540, 2003.

247. **Yoon D, Lee SH, Park HS, Lee JH, Park JS, Cho KH, and Kim SM.** Hypoadiponectinemia and insulin resistance are associated with nonalcoholic fatty liver disease. *J Korean Med Sci* 20: 421-426, 2005.

248. **Yu C, Chen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H, Wang Y, Bergeron R, Kim JK, Cushman SW, Cooney GJ, Atcheson B, White MF, Kraegen EW, and Shulman GI.** Mechanism by Which Fatty Acids Inhibit Insulin Activation of Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1)-associated Phosphatidylinositol 3-Kinase Activity in Muscle. *J Biol Chem* 277: 50230-50236, 2002.

249. **Yu X, McCorkle S, Wang M, Lee Y, Li J, Saha AK, Unger RH, and Ruderman NB.** Leptinomimetic effects of the AMP kinase activator AICAR in leptin-resistant rats: prevention of diabetes and ectopic lipid deposition. *Diabetologia* 47: 2012-2021, 2004.

250. **Yu XX SFM, Sanjay K. Pandey, Sheri L. Booten, Dingjiu Bao, Xiu-Zhen Song, Susan Kelly, Songyuan Chen, Robert McKay, Brett P. Monia, Sanjay Bhanot,** Antisense oligonucleotide reduction of DGAT2 expression improves hepatic steatosis and hyperlipidemia in obese mice. *Hepatology* 42: 362-371, 2005.
251. **Yu YH and Ginsberg HN.** Adipocyte signaling and lipid homeostasis: sequelae of insulin-resistant adipose tissue. *Circ Res* 96: 1042-1052, 2005.
252. **Zang M, Zuccollo A, Hou X, Nagata D, Walsh K, Herscovitz H, Brecher P, Ruderman NB, and Cohen RA.** AMP-activated Protein Kinase Is Required for the Lipid-lowering Effect of Metformin in Insulin-resistant Human HepG2 Cells. *J Biol Chem* 279: 47898-47905, 2004.
253. **Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, and Moller DE.** Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 108: 1167-1174, 2001.
254. **Zoltowska M, Ziv E, Delvin E, Lambert M, Seidman E, and Levy E.** Both Insulin Resistance and Diabetes in *Psammomys obesus* Upregulate the Hepatic Machinery Involved in Intracellular VLDL Assembly. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 118-123, 2004.

