

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

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

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

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

Implication du retrait de l'action estrogénique dans le développement de la stéatose hépatique non-alcoolique

par

Amélie Paquette

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

Septembre, 2008

© Amélie Paquette, 2008



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Implication du retrait de l'action estrogénique dans le développement de la stéatose
hépatique non-alcoolique

présentée par :

Amélie Paquette

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Raynald Bergeron, Ph.D.
président-rapporteur

Jean-Marc Lavoie, Ph.D.
directeur de recherche

François Péronnet, Ph.D.
membre du jury

André Tchernof, Ph.D.
examineur externe

Yan Burelle, Ph.D.
représentant du doyen de la FES

Résumé

La stéatose hépatique (SH) est caractérisée par une accumulation anormalement élevée de lipides dans les hépatocytes et elle prédispose à l'insulino-résistance hépatique. Plusieurs évidences indiquent que le retrait de l'action estrogénique favorise l'accumulation hépatique de lipides. Cependant, les mécanismes à la base de ce phénomène ont été peu investigués. Ainsi, les quatre études présentées dans cette thèse ont été conduites dans le but de documenter le développement de la SH associée au déficit estrogénique à l'aide du modèle animal d'ovariectomie (Ovx) chez la rate.

Dans l'étude 1, nous avons montré que l'Ovx entraîne une accumulation progressive des lipides dans le foie pendant 13 semaines, qui est deux fois plus importante que chez les rates contrôles. De plus, la consommation d'une diète riche en lipides (42% de l'énergie) induit une infiltration lipidique encore plus sévère. Dans la continuité de cette première étude, nous avons montré dans l'étude 2 que l'Ovx diminue l'expression de PPAR α (66%; $P < 0,01$) et augmente celle de SREBP-1c (80%; $P < 0,05$) et SCD-1 (41%; $P < 0,05$) au niveau du foie, ce qui suggère une suppression des processus oxydatifs et une stimulation des processus lipogéniques hépatiques par le déficit estrogénique. À cet égard, les résultats de l'étude 3 ont montré que l'Ovx entraîne une réduction de 34% ($P < 0,05$) du taux d'oxydation hépatique des acides gras, qui ne semble pas être due à une résistance hépatique à la leptine. Enfin, les résultats de l'étude 4 ont montré que l'entraînement en endurance affecte la régulation de l'expression du récepteur estrogénique au niveau du foie et du coeur. Nous avons montré que ces effets sont spécifiques au tissu et à l'isoforme du récepteur (ER α ou ER β), et que la direction de la réponse (augmentation ou diminution) diffère chez les rates intactes et Ovx.

En somme, les résultats de nos études indiquent que l'accumulation hépatique de lipides associée au déficit estrogénique résulte d'une altération des mécanismes intra-hépatiques impliqués dans la régulation du métabolisme des lipides. De plus, il semble que certaines

adaptations d'entraînement au niveau du foie et au niveau du coeur pourraient résulter d'une adaptation de la voie estrogénique.

Mots-clés

Foie

Estrogènes

Lipides

Ovariectomie

Rat

Récepteur estrogénique

Entraînement en endurance

Diète riche en lipides

Leptine

Coeur

Abstract

Hepatic steatosis (HS) is characterized by excessive lipid accumulation within the hepatocytes, which predisposes liver to insulin resistance. Several findings indicate that loss of estrogen function favors hepatic lipid accretion, but mechanisms underlying this phenomenon have been poorly described. Therefore, the four studies of the present thesis have been conducted in an attempt to provide information on the development of HS following estrogen removal with the ovariectomized (Ovx) rat model.

We showed in Study 1 that Ovx leads to a progressive lipid accretion in liver over a 13-wk period, that is 100% greater than in liver of intact rats. Moreover, high-fat feeding (42% of total energy) in Ovx rats induced an even more severe hepatic lipid infiltration. In line with the findings of this first study, results from Study 2 showed a reduction in PPAR α (66%; $P < 0.01$) and an increase in SREBP-1c (80%; $P < 0.05$) and SCD-1 (41%; $P < 0.05$) gene expression in liver of Ovx when compared with intact rats, thus suggesting a down-regulation of oxidative systems and stimulation of lipogenic processes in liver following estrogen removal. Results from Study 3 confirmed these findings and showed that estrogen removal by Ovx reduces fatty acid oxidation rate in liver by 34% ($P < 0.05$), that does not appear to be related to hepatic leptin resistance. Finally, we showed in Study 4 that exercise training regulates the expression of estrogen receptor in liver and heart. Furthermore, we showed that these effects are tissue and isoform (ER α ou ER β)-specific, and that the direction of the response (increase or decrease) is different in intact and Ovx rats.

On the whole, our results indicate that estrogen deficiency-induced lipid accumulation in liver results from an alteration of intra-hepatic mechanisms under estrogenic control involved in lipid metabolism regulation. Moreover, it seems that some training adaptations in liver and heart could be mediated following an adaptation of estrogen signaling.

Keywords

Liver

Estrogens

Lipids

Ovariectomy

Rat

Estrogen receptor

Endurance training

High-fat diet

Leptin

Heart

Table des matières

Résumé.....	iii
Mots-clés.....	v
Abstract.....	vi
Keywords.....	vii
Table des matières.....	viii
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures.....	xii
Liste des sigles et des abréviations.....	xvi
Dédicace.....	xviii
Remerciements.....	xix
Introduction générale de la thèse.....	1
1. Chapitre 1 : Revue de la littérature.....	3
1.1 Pathogenèse de la stéatose hépatique.....	3
1.1.1 <i>Les voies d'accumulation des lipides hépatiques.....</i>	<i>3</i>
1.1.1.1 <i>Les acides gras non-estérifiés.....</i>	<i>3</i>
1.1.1.1.1 <i>La lipolyse adipocytaire.....</i>	<i>5</i>
1.1.1.1.1.1 <i>Accumulation hépatique de lipides et lipotoxicité.....</i>	<i>6</i>
1.1.1.1.1.2 <i>Hypothèse de la veine porte.....</i>	<i>8</i>
1.1.1.2 <i>Les médiateurs moléculaires de la lipogenèse.....</i>	<i>10</i>
1.1.1.2.1 <i>SREBP-1c.....</i>	<i>10</i>
1.1.1.2.1.1 <i>LXR.....</i>	<i>11</i>
1.1.1.2.2 <i>ChREBP.....</i>	<i>13</i>
1.1.1.3 <i>Apport énergétique et diètes riches en lipides.....</i>	<i>15</i>
1.1.2 <i>Les voies d'élimination des lipides hépatiques.....</i>	<i>17</i>
1.1.2.1 <i>L'oxydation β des acides gras.....</i>	<i>17</i>
1.1.2.1.1 <i>PPARα.....</i>	<i>19</i>
1.1.2.2 <i>L'assemblage et la sécrétion des VLDL.....</i>	<i>21</i>
1.1.2.3 <i>Les facteurs adipocytaires.....</i>	<i>23</i>

1.1.2.3.1	La leptine.....	25
1.1.2.3.1.1	SCD-1.....	26
1.2	Implication du retrait de la voie estrogénique dans le développement de la stéatose hépatique.....	31
1.2.1	Présentation de la voie estrogénique.....	31
1.2.1.1	Les estrogènes.....	31
1.2.1.2	Les mécanismes de l'action estrogénique.....	31
1.2.2	Estrogènes et stéatose hépatique.....	33
1.2.3	Le retrait de l'action estrogénique : un modèle d'obésité.....	37
1.2.3.1	Composition corporelle et distribution abdominale du tissu adipeux.....	37
1.2.3.1.1	Prise alimentaire.....	40
1.2.3.1.2	Dépense énergétique.....	42
1.2.3.1.2.1	Sensibilité à la leptine.....	43
1.2.4	Influence du retrait de l'action estrogénique sur les voies hépatiques de synthèse et d'oxydation des lipides.....	46
1.2.4.1	Médiateurs moléculaires de la lipogenèse hépatique.....	46
1.2.4.2	Médiateurs moléculaires de l'oxydation β hépatique des acides gras.....	49
1.2.5	Régulation de la voie estrogénique.....	52
1.2.5.1	Régulation hormonale du récepteur estrogénique au niveau du foie.....	52
1.2.5.1.1	Effet de l'entraînement en endurance sur la régulation de l'expression du récepteur estrogénique.....	54
1.3	Objectifs et hypothèses de la thèse.....	57
2.	Chapitre 2 : Études de la thèse.....	59
2.1	Étude 1.....	59
2.2	Étude 2.....	89
2.3	Étude 3.....	123
2.4	Étude 4.....	148
3.	Chapitre 3 : Discussion générale.....	181
	Conclusion.....	189

Bibliographie.....190

Liste des tableaux

Tableau I. Altérations métaboliques associées à la stéatose hépatique dans différentes populations. Tiré de Bugianesi et al. (2005).....	9
Tableau II. Présentation d'études qui ont rapporté une association entre le retrait de l'action estrogénique et le développement de la stéatose hépatique.....	38

Liste des figures

Figure 1. Métabolisme lipidique hépatique. Tiré de Qureshi et al. 2007.....	4
Figure 2. Représentation schématique des mécanismes putatifs qui lient l'accumulation intra-hépatique de lipides et la RI hépatique. Tiré de Lavoie et Gauthier (2006).....	7
Figure 3. Voie de la lipogenèse à partir du glucose dans le foie. Tiré de Ferré et Foufelle (2007).....	12
Figure 4. Représentation schématique des sites de liaison des facteurs de transcription sur le promoteur de la FAS. Tiré de Joseph et al. (2002).....	14
Figure 5. Rôles respectifs de LXR, ChREBP et SREBP-1c dans le contrôle transcriptionnel de la synthèse des TAG dans le foie. Tiré de Denechaud et al. (2008).....	16
Figure 6. Une balance énergétique positive excède la capacité tampon du tissu adipeux et entraîne la lipotoxicité. Tiré de Lewis et al. (2002).....	18
Figure 7. Distribution du malonyl CoA et des acides gras. Tiré de Rutherman et al. (2003).....	20
Figure 8. Interactions entre les systèmes oxydatifs et PPAR α dans le métabolisme énergétique du foie. Tiré de Reddy et Rao (2006).....	22
Figure 9. Schématisation de la formation de la particule riche en TAG précurseur du VLDL. Tiré de Gibbons et al. (2004).....	24

Figure 10. Mécanisme à la base de l'augmentation de la dépense énergétique chez les souris déficientes en SCD-1. Tiré de Cohen et Friedman (2004).....	28
Figure 11. Effet de la RI sur le métabolisme des lipides. Tiré de Duvnjak et al. (2007).....	30
Figure 12. Principales voies de biosynthèse des estrogènes dans l'ovaire humain. Tiré de Ackerman et Carr (2002).....	32
Figure 13. Représentation schématique des différents mécanismes de signalisation de l'estradiol et du récepteur estrogénique. Tiré de Hall et al. (2001).....	34
Figure 14. Représentation schématique de ER α (humain). Tiré de Heldring et al. (2007).....	35
Figure 15. Poids corporel et masse du tissu adipeux gonadal des rats ArKO et des contrôles. Tiré de Jones et al. (2000).....	39
Figure 16. Effet de l'Ovx sur la prise alimentaire et le poids corporel chez des rates. Tiré de Mc Elroy et Wade (1986).....	41
Figure 17. Diminution de l'effet anorexigène de la leptine par l'Ovx. Tiré de Clegg et al. (2006).....	44
Figure 18. Effet d'une injection intracérébroventriculaire de saline ou de leptine (0,5 μ g ou 3 μ g) sur l'activité physique volontaire des rates intactes et Ovx sur une période de 17h. Tiré de Ainslie et al. (2001).....	45

- Figure 19. Influence de l'Ovx et de l'administration de 17β -estradiol sur l'expression des transcrits OB-RL dans l'hypothalamus chez des rates. Tiré de Kimura et al. (2002).....47
- Figure 20. Prévention de l'accumulation intracellulaire de TAG dans le foie par la régulation négative de gènes lipogéniques par les estrogènes. Tiré de d'Eon et al. (2005).....48
- Figure 21. Expression des gènes oxydatifs dans le foie des souris ArKO. Tiré de Nemoto et al. (2000).....50
- Figure 22. Altération de l'activité de l'oxydation β des acides gras chez les souris ArKO. Tiré de Nemoto et al. (2000).....51
- Figure 23. Effet de l'Ovx et des traitements hormonaux (E_2 ; Progestérone; E_2 + progestérone) sur l'abondance A) des transcrits et B) de la protéine de PPAR α dans le gastrocnémien rouge chez la rate. Tiré de Campbell et al. (2003).....53
- Figure 24. (a) Produits du RT-PCR pour ER α et RL19 dans le muscle gastrocnémien. (b) Effet de l'entraînement en endurance sur l'abondance des ARNm de ER α dans le muscle gastrocnémien des rates non-entraînées et des rates entraînées. Tiré de Lemoine et al. (2002b).....55
- Figure 25. (a) Produits du RT-PCR pour ER α et RL19 dans le muscle extensor digitorium longus. (b) Effet de l'entraînement en endurance sur l'abondance des ARNm de ER α dans le muscle extensor digitorium longus. Tiré de Lemoine et al. (2002b).....56

Figure 26. Effet d'une restriction énergétique chez les rates Ovx équivalente à la prise alimentaire des rates intactes sur l'accumulation hépatique de TAG. Données non-publiées.....185

Liste des sigles et abréviations

ACC-1 :	Acetyl-CoA carboxylase-1
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADP :	Adénosine diphosphate
AGNE :	Acides gras non-estérifiés
AGRP :	Agouti related protein
AKB/PKB :	Protein kinase B
AMPK :	Adenosine 5' monophosphate activated protein kinase
apoB100 :	Apolipoprotéine B100
ArKO :	Aromatase knockout
ATP :	Adénosine triphosphate
β-HAD :	β -3-hydroxyacyl CoA
CART :	Cocaine and amphetamine related transcript
CCK :	Cholécystokinine
ChREBP:	Carbohydrate responsive element-binding protein
CPT-1 :	Carnitine palmitoyl transferase-1
E₂ :	Estradiol
ER :	Récepteur estrogénique
ERE :	Élément de réponse aux estrogènes
ERKO :	Estrogen receptor knockout
FAS :	Fatty acid synthase
GK :	Glucokinase
GPAT :	Glycerol-3-phosphate acyltransferase
GSK3 :	Glycogen synthase kinase 3
HSL :	Hormone sensitive lipase
IRS :	Insulin receptor substrate
JNK1 :	c-Jun N-terminal kinase 1
LPL :	Lipoprotein lipase

L-PK :	Liver-type pyruvate kinase
LXR :	Liver X receptor
MTP :	Microsomal triacylglycerol transfer protein
NAFLD :	Nonalcoholic fatty liver disease
NPY :	Neuropeptide Y
Ovx :	Ovariectomy
PDK4 :	Pyruvate dehydrogenase kinase
PI3K :	Phosphoinositide 3-kinase
PKC-ε :	Protein kinase C
POMC :	Pro-opiomelanocortin
PPARα :	Peroxisome proliferator activated receptor alpha
RI :	Résistance à l'insuline
RXR :	Retinoid X receptors
SCD-1 :	Stearoyl-CoA desaturase
SH :	Stéatose hépatique
SREBP-1c :	Sterol regulatory element-binding protein-1c
TAG :	Triacylglycérol
UCP :	Uncoupling protein
VLDL :	Very-low-density lipoprotein

À mes parents

Remerciements

J'aimerais d'abord remercier mon directeur de thèse, Jean-Marc Lavoie, de m'avoir permis de réaliser mes études doctorales. 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 : les collègues du laboratoire, de même que les collègues, professeurs et personnel de soutien du département de kinésiologie. Au secrétariat: merci de votre bonne humeur!! Je remercie aussi l'organisme subventionnaire CRSNG, la Faculté des études supérieures de l'Université de Montréal et le département de kinésiologie pour leur support financier durant mes années de maîtrise et de doctorat.

Plus spécifiquement pour la réalisation des études expérimentales, un énorme merci à Pierre Corriveau, Motoo Shinoda, Marie-Soleil Gauthier, Kristina Csukly, Natalie Chapados, Raynald Bergeron ainsi qu'à tous mes assistants de recherche: Mélanie, Chrystelle, Élyse, Alexandre, Paula, Martin, Marc-Étienne, Maximilien et Jean-Olivier, pour leur patience et leur assiduité. Jean-Olivier: merci, merci, merci. Tu as ensoleillé mes journées. Un merci tout particulier à l'équipe du CHUM Hôtel-Dieu, sans qui l'essentiel des études expérimentales présentées dans cette thèse n'aurait pu être réalisé: Jolanta Gutkowska, Marek Jankowski et Donghao Wang.

Plus personnellement, un merci sincère à Louise Béliveau, Luc Proteau, Yan Burelle et François Péronnet. Pour avoir contribué à alléger des moments difficiles. Merci à Olivier Birot et Émilie Roudier pour votre fraîcheur et les bons moments passés ensemble. Marie-Soleil, je ne sais pas ce que j'aurais fait sans toi! Toute dans toute pis par-dessure! À Geneviève, David, Jonathan, Natalie, Simon, Christian, Anne, Louise, Andréane, Bob et Loulou, merci pour votre support inconditionnel et pour ce que vous êtes.

J'espère que je n'oublie personne.

Introduction générale de la thèse

Le « NAFLD » - nonalcoholic fatty liver disease - représente un large spectre de lésions hépatiques allant de la simple stéatose à la stéatohépatite, la fibrose, la cirrhose et l'hépatocarcinome (Day 2006). Le NAFLD est reconnu comme la principale cause de maladies hépatiques chroniques, avec une prévalence estimée à 20-30% dans la population générale des pays occidentaux. La pathologie du NAFLD ressemble étrangement à celle des maladies du foie gras d'origine alcoolique, mais elle se manifeste en l'absence d'une consommation excessive d'alcool (Duvnjak 2007). Différentes causes favorisent le développement du NAFLD; toutefois, la présente thèse portera sur le NAFLD primaire, qui s'inscrit dans le contexte de l'obésité et du diabète de type 2. Plus spécifiquement, nous nous sommes intéressés à la stéatose hépatique (SH), une manifestation précoce du NAFLD caractérisée par un contenu en lipides supérieur à 5-10% de la masse du foie (Brunt 2007). Bien que la SH soit une condition bénigne et réversible, elle prédispose le foie au développement de lésions plus sévères du NAFLD et à l'insulino-résistance, d'où l'intérêt de mieux comprendre les facteurs qui favorisent l'accumulation de lipides dans les hépatocytes.

Il est maintenant reconnu que le rôle des estrogènes ne se limite pas au système reproducteur féminin et plusieurs études suggèrent leur implication dans la régulation du métabolisme lipidique (Basdevant 1992, Ciocca 1995). À cet égard, le retrait progressif de l'action estrogénique durant la péri-ménopause a été associé à diverses manifestations du syndrome métabolique qui incluent l'accumulation abdominale de tissu adipeux, la détérioration du profil lipidique plasmatique et le développement de la résistance à l'insuline (Carr 2003, Schneider 2006). Une étude conduite auprès de plus de 800 femmes de 40-59 ans a révélé une association entre la ménopause et la SH, avec une prévalence de la SH chez les femmes post-ménopausées jusqu'à deux fois supérieure à celle rapportée chez les femmes pré-ménopausées (Völzke 2007). Différents modèles animaux de déficit estrogénique par l'ovariectomie (Ovx), la délétion génétique du récepteur estrogénique (ERKO) ou de l'enzyme aromatasase (ArKO) ont permis d'apprécier l'importance du retrait de l'action estrogénique pour l'accumulation hépatique de lipides (Deshaies et al. 1997,

Hewitt et al. 2004, Jones et al. 2000, Lemieux et al. 2005, Mukherjea et Biswas 1975, Nemoto et al. 2000, Picard et al. 2000). Toutefois, bien que ces études aient associé le déficit estrogénique à la SH, peu d'entre elles ont directement investigué les mécanismes à la base de l'infiltration hépatique de lipides dans ce contexte hormonal.

Les quatre études présentées dans cette thèse ont été conduites dans le but de caractériser le développement de la SH associée au déficit estrogénique à l'aide du modèle animal d'ovariectomie (Ovx) chez la rate. L'expertise déjà acquise dans notre laboratoire avec ce modèle, son accessibilité et le fait qu'il se rapproche passablement de la transition vers la ménopause chez la femme sont les facteurs qui ont motivé ce choix (Latour et al. 2001, Shinoda et al. 2002). La première étude de la thèse a été conduite dans le but de caractériser la cinétique d'infiltration lipidique du foie et l'impact d'une diète riche en lipides sur cette infiltration chez la rate Ovx. Dans la continuité de cette première étude, nous avons investigué l'effet du retrait de l'action estrogénique sur l'expression de certains gènes impliqués dans la régulation de l'oxydation (PPAR α) et de la synthèse (SREBP-1c et SCD-1) hépatiques des lipides. La troisième étude a été réalisée pour étudier l'influence du déficit estrogénique sur le taux d'oxydation hépatique des acides gras, de même que sur la sensibilité du foie à un stimulus hormonal d'oxydation, la leptine. Enfin, la dernière étude a investigué l'implication de l'entraînement en endurance sur la régulation de l'expression du récepteur estrogénique au niveau du foie et du coeur.

Cette thèse est composée de trois chapitres principaux. Le premier chapitre est consacré à une revue de la littérature qui est organisée en deux sections : une première qui résume les principaux mécanismes impliqués dans le développement de la stéatose hépatique et une deuxième qui met en évidence l'influence du retrait de l'action estrogénique sur ces mécanismes. Le deuxième chapitre de la thèse présente les études expérimentales qui la composent, alors que le troisième chapitre est une discussion générale.

1. Chapitre 1 : Revue de la littérature

1.1. Pathogenèse de la stéatose hépatique

Les processus métaboliques primaires conduisant à la rétention de triacylglycérols (TAG) dans les hépatocytes ne sont pas complètement élucidés. De nombreuses études ont associé la stéatose hépatique (SH) à l'obésité et à la résistance à l'insuline (RI), ce qui est confirmé par le fait que des interventions destinées à réduire la masse adipeuse et à augmenter la sensibilité à l'insuline sont accompagnées d'une résorption de la SH (Duvnjak 2007). Plusieurs données indiquent que la persistance d'un bilan énergétique positif et les désordres de stockage et de mobilisation des lipides sont au centre de la pathogenèse de la RI, conduisant au développement de la SH (Lewis 2002). Toutefois, l'accumulation hépatique de lipides qui résulte de l'obésité favorise elle-même le développement de la RI (Shulman 2000). On assiste donc à un ensemble de perturbations métaboliques où interagissent l'obésité, la RI et la SH qui impliquent le foie, mais aussi le tissu adipeux, les tissus maigres et la circulation systémique. Dans ce contexte, il devient difficile d'identifier l'événement initiateur à l'origine de l'accumulation hépatique de TAG. Par conséquent, la discussion qui suit présentera les conséquences de l'obésité et de la RI sur les mécanismes les plus susceptibles d'altérer les voies hépatiques de prise, d'oxydation, de synthèse et de sécrétion des lipides, sans chercher à déterminer l'ordre dans lequel ils se manifestent (Figure 1).

1.1.1. *Les voies d'accumulation des lipides hépatiques*

1.1.1.1. *Les acides gras non-estérifiés*

Les concentrations plasmatiques d'acides gras non-estérifiés (AGNE) sont le reflet de la balance entre leur libération dans le plasma (diète et lipolyse des TAG contenus dans les lipoprotéines et les adipocytes) et leur prise par les tissus (re-estérification dans les adipocytes et le foie, et oxydation dans les tissus maigres) (Lewis et al. 2002). Normalement, les flux systémiques d'AGNE ne génèrent pas d'accumulation notable de TAG dans les hépatocytes. Toutefois, certaines conditions comme l'obésité et la RI sont accompagnées d'une augmentation des concentrations plasmatiques d'AGNE (Fong et al. 2000). Étant donné que la prise des acides gras n'est pas régulée au niveau du foie,

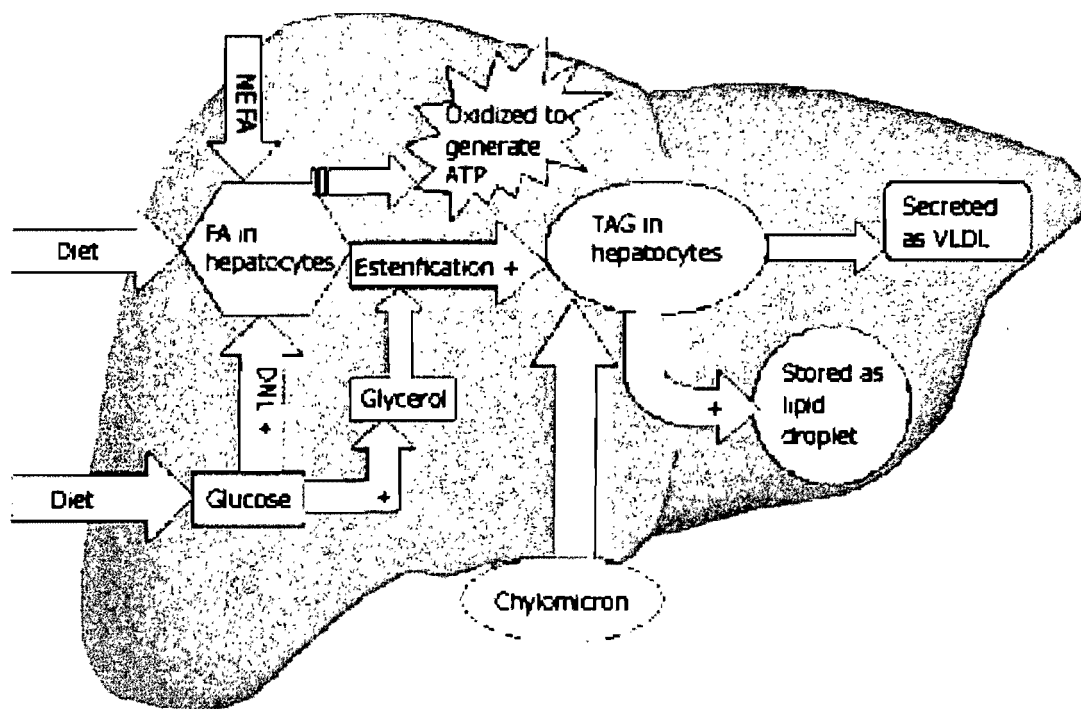


Figure 1. Métabolisme lipidique hépatique. Les étapes identifiées par un + sont stimulées par l'insuline. L'insuline supprime la sécrétion des VLDL et l'oxydation β des acides gras. L'hyperinsulinémie qui accompagne la RI favorise l'accumulation de TAG dans le foie. TAG: triacylglycerols; VLDL: very-low-density lipoprotein; FA: fatty acid; NEFA: nonesterified fatty acids; DNL: *de novo* lipogenesis; ATP: adenosine triphosphate. Tiré de Qureshi et al. (2007).

toute augmentation de leurs concentrations dans le plasma constitue un facteur de risque de la SH (Bugianesi et al. 2005, Kelley et al. 2003, Marchesini et al. 2001). Dans le contexte de l'obésité et de la RI, l'augmentation du taux de lipolyse adipocytaire contribue de façon majeure au pool d'acides gras du plasma.

1.1.1.1.1. *La lipolyse adipocytaire*

Normalement, la lipolyse adipocytaire est inhibée par l'insuline (Duncan et al. 2007). Toutefois, lorsque la RI affecte le tissu adipeux, l'insuline échoue à inhiber l'activité de la HSL (hormone sensitive lipase), la principale enzyme responsable de l'hydrolyse des TAG et des diacylglycérols adipocytaires. Ainsi, la libération adipocytaire d'acides gras dans le plasma demeure élevée même en présence d'une hyperinsulinémie. Ce phénomène, qui est évidemment amplifié par l'obésité, a été associé à la SH. Seppälä-Lindroos et al. (2002) ont soumis 30 sujets non-diabétiques à un clamp insulinémique; ils ont montré une moindre suppression des concentrations d'AGNE du plasma par l'insuline en fonction de la gravité de la SH des sujets (299 ± 33 vs $212\pm 13\mu\text{mol/L}$; $P < 0,02$, contenu hépatique en TAG élevé vs contenu hépatique en TAG faible, respectivement). Marchesini et al. (2001) ont aussi rapporté une efficacité moindre de l'insuline à diminuer les concentrations plasmatiques d'AGNE (-69% vs -84% ; $P < 0,003$), en plus d'observer une élévation des concentrations basales d'AGNE ($0,67\pm 0,27$ vs $0,37\pm 0,12\text{mmol/L}$; $P < 0,001$) chez des sujets atteints de SH en comparaison à des sujets contrôles. D'autres auteurs ont rapporté des résultats similaires (Bugianesi et al. 2005, Kelley et al. 2003, Sanyal et al. 2001).

Cependant, bien que les AGNE issus de la lipolyse adipocytaire contribuent à la synthèse hépatique des TAG, d'autres sources y participent, i.e. les acides gras alimentaires, les lipoprotéines plasmatiques et les acides gras issus de la lipogenèse *de novo*. Donnelly et al. (2005) ont conduit une étude dans le but de quantifier la contribution relative de chaque source d'acide gras à la synthèse hépatique des TAG chez neuf sujets atteints de SH. Pour ce faire, ils ont utilisé la technique des isotopes stables multiples et ont analysé les biopsies hépatiques des sujets par chromatographie gazeuse. Les résultats de l'étude ont confirmé que la majorité ($59,0\%\pm 9,9\%$) des TAG contenus dans le foie des sujets

provenait des acides gras adipocytaires. Toutefois, Miles et al. (2004) ont montré chez des sujets sains que suite à l'action de la LPL (lipoprotéine lipase) sur les chylomicrons, plus du tiers des acides gras normalement destinés au tissu adipeux peuvent se retrouver dans le plasma, ce qui représente une source potentiellement importante d'AGNE pour le foie.

1.1.1.1.1. Accumulation hépatique de lipides et lipotoxicité

Même à faibles concentrations, les acides gras et leurs métabolites (diacylglycérols, acyl CoA, céramides) sont extrêmement toxiques pour les hépatocytes, où ils agissent comme des molécules de signalisation à la manière des hormones protéiques (Shulman 2000). En plus de stimuler la synthèse des lipides, les acides gras et leurs métabolites interfèrent avec la voie de signalisation de l'insuline. Samuel et al. (2004) ont induit une SH conduisant à une augmentation d'environ 3 fois du contenu hépatique en acyl CoA et en TAG chez le rat Sprague-Dawley; ils ont utilisé un protocole d'induction rapide (3 jours) de la SH par une diète riche en lipides (59% de l'énergie) pour éviter l'effet confondant de l'accumulation systémique de lipides. Les auteurs de l'étude ont attribué le développement de la RI hépatique à la diminution de la phosphorylation de la tyrosine des protéines IRS 1 et IRS 2 (insulin receptor substrate) par l'insuline, de même qu'à la diminution subséquente de l'activité de la PI3K (phosphoinositide 3-kinase). Ces altérations de la voie de signalisation de l'insuline ont été attribuées à l'activation de PKC- ϵ ¹ (protein kinase C) et JNK1 (c-Jun N-terminal kinase 1) par les métabolites des acides gras. De plus, l'activation de l'AKT/PKB (protein kinase B) et l'inhibition de la GSK3 (glycogen synthase kinase 3) par l'insuline ont été inhibées, conduisant à une réduction de l'activité de la glycogène synthase et une stimulation de la néoglucogénèse (Figure 2) (Lavoie et Gauthier, 2006). Ces résultats montrent le lien causal entre les lipides intra- hépatiques et la RI hépatique, faisant de la SH un fort prédicteur de la RI du

¹ L'auteure est consciente que l'élision de l'article devant un nom commun ne respecte pas le bon usage de la langue française. Toutefois, cette pratique est répandue dans la littérature scientifique et aura cours dans la présente thèse.

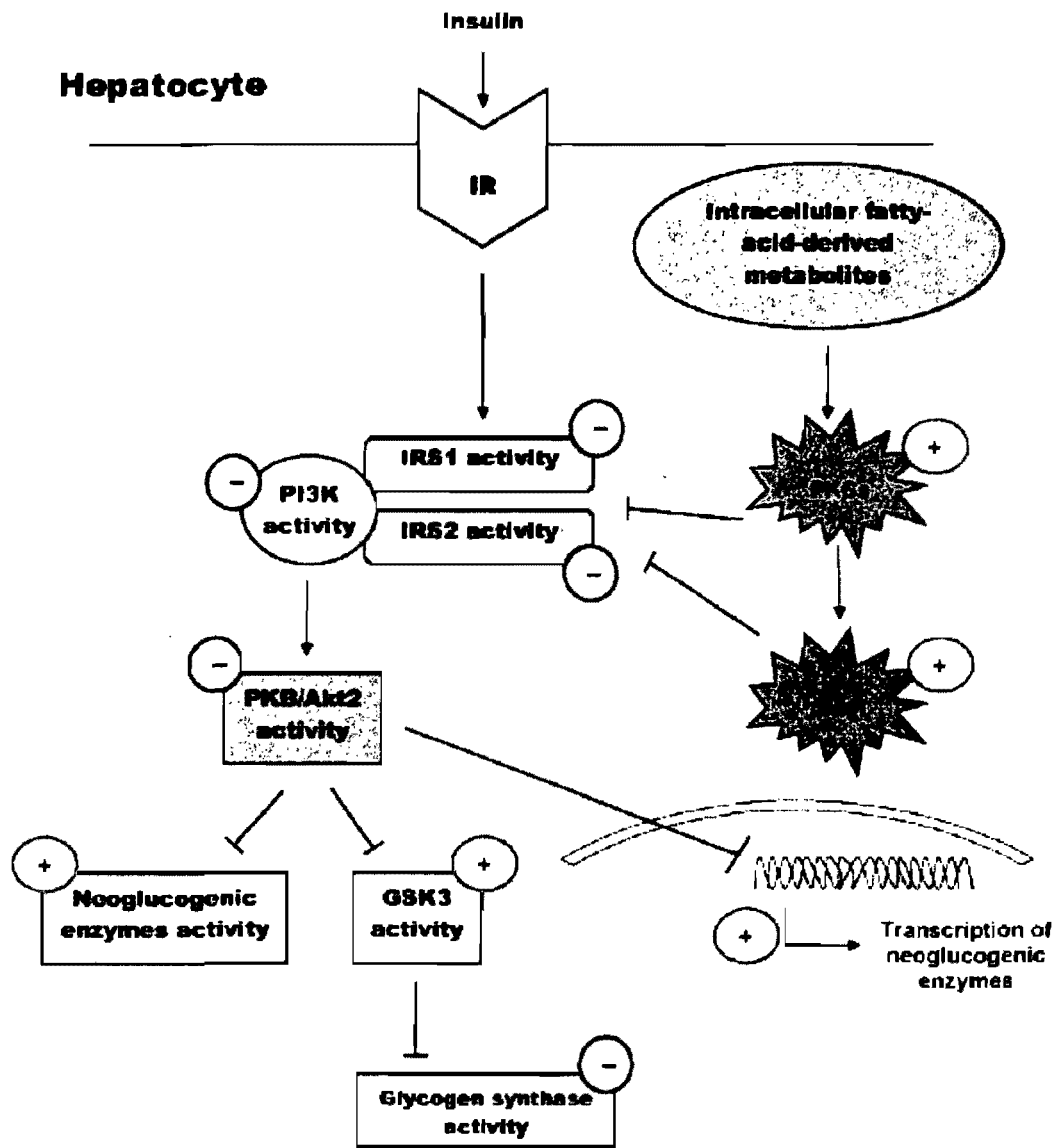


Figure 2. Représentation schématique des mécanismes putatifs qui lient l'accumulation intra-hépatique de lipides et la RI hépatique. L'accumulation des métabolites dérivés des acides gras pourrait augmenter l'activité de certains isoformes PKC, ce qui augmente l'activité de JNK1. Une augmentation de l'activité de PKCs et/ou JNK1 pourrait inhiber la signalisation de l'insuline et en retour, diminuer la stimulation de l'activité de la glycogène synthase par l'insuline et l'inhibition de l'activité et de la transcription des enzymes néoglucogéniques par l'insuline. IR: insulin receptor; JNK1 : c-jun N-terminal kinase; GSK3 : glycogen synthase. Tiré de Lavoie et Gauthier (2006).

foie, comme plusieurs études l'avaient déjà suggéré (Kelley et al. 2003, Marceau et al. 1999, Seppälä-Lindroos et al. 2002).

Une des conséquences de la RI hépatique est la diminution de l'effet suppresseur de l'insuline sur la production hépatique de glucose (Samuel et al. 2004). L'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie qui en résultent favorisent la RI des tissus périphériques, ce qui stimule la lipolyse adipocytaire en plus d'aggraver l'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie qui étaient peut-être déjà en place. Le tableau I tiré de la revue de Bugianesi et al. (2005) rapporte les principales altérations métaboliques de la RI associée à la SH.

Dans ce contexte, l'événement à l'origine de l'accumulation hépatique de TAG pourrait être l'incapacité du tissu adipeux à prendre suffisamment d'expansion pour tamponner les lipides en excès, qui sont alors déviés vers le foie et les autres tissus maigres de l'organisme (Shulman 2000). Cette hypothèse est confirmée par les modèles de lipodystrophie comme celui de la souris transgénique A-ZIP/F-1, où l'absence de tissu adipeux blanc est associée à la SH, à une hypertriglycéridémie et à un état de RI sévère (Moitra et al. 1998). Chez les animaux lipodystrophiques, l'implantation de tissu adipeux blanc corrige ces anomalies métaboliques (Gavrilova et al. 2000). L'efficacité de la capacité de stockage et de séquestration des AGNE du tissu adipeux conférerait donc une protection relative aux tissus maigres contre la lipotoxicité et les déséquilibres métaboliques qu'elle engendre (Shulman 2000).

1.1.1.1.2. Hypothèse de la veine porte

Chez l'adulte, le tissu adipeux blanc est divisé en deux types qui diffèrent dans leur pathophysiologie selon leur localisation, qui sont les tissus adipeux sous-cutané et viscéral (adipocytes omentaux et mésentériques) (Lewis et al. 2002). Le tissu adipeux abdominal, composé des dépôts viscéraux et sous-cutané abdominal, a été associé à la SH dans plusieurs études (Bugianesi et al. 2005, Chitturi et al. 2002, Kelley et al. 2003, Marchesini et al. 2001). De plus, à l'aide des techniques de spectroscopie (^1H MRS) et d'imagerie (IRM) par résonance magnétique nucléaire, Thomas et al. (2005) ont montré qu'une augmentation de l'adiposité viscérale d'aussi peu que 1% conduisait à une

Tableau I. Altérations métaboliques associées à la stéatose hépatique dans différentes populations. Tiré de Bugianesi et al. (2005).

Liver Fat Assessment	Study Design	Study Subjects	Metabolic Alterations	Reference
Liver biopsy	Clamp, $^2\text{H}_2$ glucose	NAFLD/T2DM/CON	↓ Glucose disposal ↓ Suppression of HGO ↓ Suppression of plasma FFAs	Marchesini et al. ²²
Liver biopsy	FSIGTT	NAFLD/CON	↓ Insulin sensitivity = Hepatic Insulin extraction ↑ β -Cell secretion	Pagano et al. ²⁴
Liver biopsy	2-step clamp, $^2\text{H}_2$ glucose, $^2\text{H}_5$ glycerol, calorimetry	FL/NASH/CON	↓ Nonoxidative glucose disposal (NASH < FL < CONT) ↓ Suppression of HGO (NASH < FL) ↓ Suppression of lipolysis (NASH < FL)	Sanyal et al. ²¹
CT scan	Clamp, $^2\text{H}_2$ glucose	T2DM/T2DM + FL	↓ Glucose disposal ↑ Fasting plasma FFA ↓ Suppression of plasma FFAs	Kelley et al. ²⁵
Proton spectroscopy	Clamp, $^2\text{H}_2$ glucose	Healthy	↓ Suppression of HGO ↓ Suppression of plasma FFAs	Seppala-Lindroos et al. ⁴²
CT scan	Clamp	Healthy	↓ Insulin clearance rate	Goto et al. ²⁶
Proton spectroscopy	Clamp	Obese post-GDM	↓ Glucose disposal ↑ Fasting plasma triglycerides	Tilkkainen et al. ²⁷

Abbreviations: NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease; FL, fatty liver; T2DM, type 2 diabetes mellitus; CT, computed tomography; GDM, gestational diabetes; HGO, hepatic glucose output; FFA, free fatty acid; CON, controls; FSIGTT, frequently sampled intravenous glucose tolerance test.

augmentation de 100% des lipides intra-hépatiques. Les adipocytes viscéraux sont considérés comme une source privilégiée d'acides gras pour le foie étant donné leur proximité anatomique avec la veine porte hépatique, leur plus grande sensibilité aux effets lipolytiques des catécholamines et leur résistance à l'action antilipolytique de l'insuline (Montague et O'Rahilly 2000). Cependant, cette théorie de la veine porte selon laquelle l'adiposité viscérale perturbe l'action hépatique de l'insuline en exposant directement le foie à des concentrations élevées d'acides gras demeure controversée (Frayn 2000). Des études ont plutôt montré que les adipocytes du tissu adipeux sous-cutané de la région supérieure du corps étaient les principaux contributeurs (jusqu'à 75%) d'acides gras au pool d'AGNE de la circulation systémique chez des patients obèses et atteints de diabète de type 2 (Basu et al. 2001, Martin et Jensen, 1991).

1.1.1.2. Les médiateurs moléculaires de la lipogenèse

L'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie caractéristiques de la RI systémique participent au développement de la SH en stimulant les processus lipogéniques, i.e. la lipogenèse *de novo* et la synthèse des triacylglycérols (TAG) (Browning et Horton, 2004). L'association entre la RI, l'augmentation des taux de lipogenèse *de novo* et la SH a été rapportée chez les souris *ob/ob*, *db/db* et *aP2-SREBP-1c*, des modèles animaux de diabète de type 2 (Memon et al. 1993, Shimomura et al. 1999). Plus récemment, l'étude de Donnelly et al. (2005) a montré que la contribution de la lipogenèse *de novo* au pool des TAG hépatiques peut aller jusqu'à 26% chez des sujets atteints de SH à l'état de jeûne, alors qu'elle ne dépasse pas 5% chez des sujets sains dans la même condition (Timlin et al. 2005). Plusieurs groupes de recherche se sont penchés sur les mécanismes moléculaires par lesquels l'hyperinsulinémie et l'hyperglycémie stimulent les processus lipogéniques hépatiques. Bien que ces mécanismes ne soient pas complètement élucidés, ils impliquent l'activation des facteurs de transcription SREBP-1c, LXR et ChREBP.

1.1.1.2.1. SREBP-1c

La capacité de l'insuline à stimuler la lipogenèse hépatique repose sur l'activation transcriptionnelle de SREBP-1c - sterol regulatory element-binding protein-1c – une protéine membranaire qui appartient à la famille des facteurs de transcription basic helix-

loop-helix-leucine zipper (Ferré et Foufelle 2007). Après son activation par l'insuline, SREBP-1c induit l'expression d'une dizaine de gènes impliqués dans l'utilisation du glucose et de la biosynthèse des acides gras et des TAG, dont la glucokinase (GK), l'ACC-1 (acetyl-CoA carboxylase-1), la FAS (fatty acid synthase), la SCD-1 (stearoyl-CoA desaturase-1) et la GPAT (glycerol-3-phosphate acyltransferase) (Figure 3).

Les souris *ob/ob* et aP2-SREBP-1c sont sévèrement résistantes à l'action de l'insuline et présentent une SH (Shimomura et al. 1999). Chez ces souris, l'hyperinsulinémie stimule l'expression hépatique de SREBP-1c (2,4 fois et \Leftrightarrow , *ob/ob* et aP2-SREBP-1c, respectivement), ce qui se traduit par une augmentation de l'expression de l'ACC (2,5 et 4,7 fois), de la FAS (9,8 et 4,2 fois) et de la GPAT (4,0 et 3,5 fois) en comparaison aux souris contrôles. De plus, la stimulation des enzymes lipogéniques se reflète par une augmentation des taux de lipogenèse *de novo* hépatique ($43 \pm 2,3$ vs $6,9 \pm 0,5 \mu\text{mol}$ d'acides gras/h/g de foie; $P < 0,05$, *ob/ob* vs contrôles, respectivement) et ($28 \pm 4,5$ vs $11 \pm 2,4 \mu\text{mol}$ d'acides gras/h/g de foie; $P < 0,05$, aP2-SREBP-1c vs contrôles, respectivement). Cette situation est paradoxale car malgré un état de RI important, le foie des souris *ob/ob* et aP2-SREBP-1c demeure sensible à l'action de l'insuline pour induire les processus lipogéniques. La délétion du gène codant pour SREBP-1c chez les souris *ob/ob* (*ob/ob* x *Srebp-1^{-/-}*) réduit le contenu hépatique en TAG d'environ 50%, sans affecter le degré d'obésité et de RI (Yahagi et al. 2002). Ces résultats confirment l'implication de SREBP-1c dans le développement de la SH associée à l'hyperinsulinémie, malgré la présence d'un état de RI.

1.1.1.2.1.1. LXR

L'activation de SREBP-1c par l'insuline est en fait indirecte et implique la stimulation préalable des LXR – liver X receptors (α/β) – des facteurs de transcription membres de la superfamille des récepteurs nucléaires (Chen et al. 2004). D'abord reconnus comme régulateurs clés du métabolisme de la bile et du cholestérol, les LXR sont également requis pour l'induction du programme lipogénique activé par SREBP-1c (Ferré et Foufelle 2007). La stimulation des LXR induit directement l'activation transcriptionnelle de SREBP-1c via un élément de réponse LXR (LXRE), ainsi que l'expression

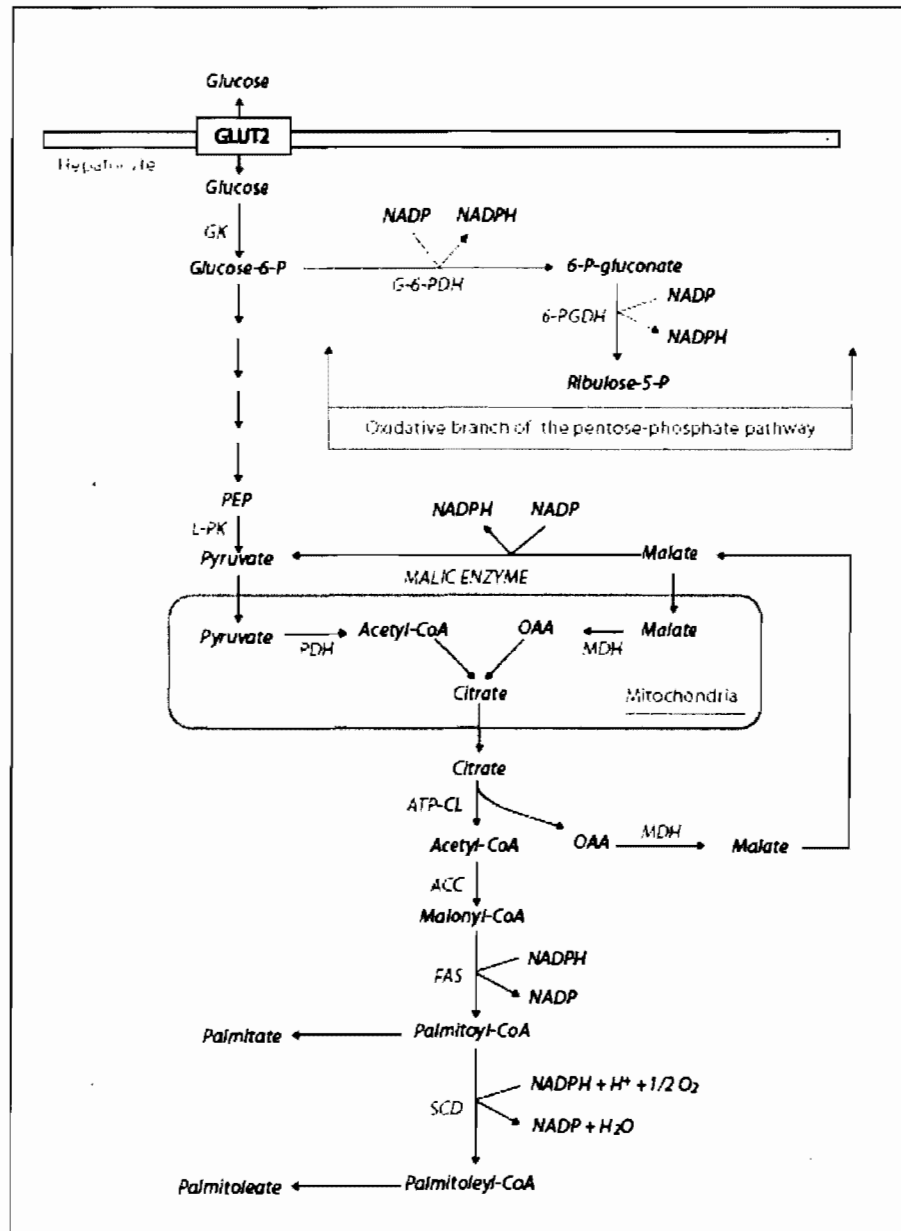


Figure 3. Voie de la lipogenèse à partir du glucose dans le foie. ACC : acetyl-CoA carboxylase; ATP-CL : ATP citrate lyase; FAS : fatty acid synthase; GK : glucokinase; GLUT2 : glucose transporter 2; G-6-PDH : glucose-6-P dehydrogenase; MDH : malate dehydrogenase; OAA : oxaloacetate; PDH : pyruvate dehydrogenase; 6-PG-DH : 6-phosphogluconate dehydrogenase; L-PK : liver-type pyruvate kinase; PEP : phosphoenolpyruvate; SCD : stearoyl-CoA desaturase. Tiré de Ferré et Foufelle (2007).

subséquente des enzymes lipogéniques et la synthèse hépatique des acides gras (Repa et al. 2000, Schultz et al. 2000). Inversement, la délétion des gènes qui encodent les LXR entraîne une diminution majeure de l'expression hépatique de SREBP-1c, des enzymes lipogéniques et du contenu hépatique en TAG (environ six fois) des souris $Lxr\alpha/\beta^{-/-}$ en comparaison aux souris contrôles. De plus, les LXR stimulent directement une enzyme lipogénique essentielle, la FAS, qui exprime un élément de réponse LXRE sur sa région promotrice (Joseph et al. 2002). Cette activation est indépendante de SREBP-1c et suggère que l'activation des deux facteurs de transcription (SREBP-1c et LXR) est requise pour induire l'expression maximale de la FAS (Figure 4). Pour se lier à la séquence promotrice des gènes qu'ils régulent, les LXR doivent obligatoirement former un hétérodimère avec un autre récepteur nucléaire membre des RXR – retinoid X receptors. L'insuline semble produire un ligand pour les LXR, les RXR, ou les deux, permettant l'activation transcriptionnelle du complexe LXR/RXR (Chen et al. 2004).

1.1.1.2.2. *ChREBP*

L'hyperglycémie stimule aussi la lipogenèse hépatique par un mécanisme indépendant de l'insuline qui implique ChREBP – carbohydrate responsive element-binding protein - un autre facteur de transcription membre de la famille basic helix-loop-helix-leucine zipper (Denechaud et al. 2008). L'accumulation cellulaire de glucose initie l'activation transcriptionnelle de ChREBP en favorisant son passage du cytosol vers le noyau et sa liaison aux séquences promotrices des gènes qu'il régule. D'une part, ChREBP induit la L-PK (liver-type pyruvate kinase), une enzyme clé de la glycolyse exclusivement régulée par le glucose, qui catalyse la conversion du phosphoenol pyruvate en pyruvate. Le pyruvate qui entre dans le cycle de Krebs génère du citrate, la principale source d'acétyl-CoA utilisée pour la synthèse des acides gras (Figure 3). D'autre part, ChREBP stimule l'expression de la plupart des enzymes lipogéniques de concert avec SREBP-1c.

Bien qu'il soit attendu que l'expression de ChREBP et SREBP-1c augmente à l'état post-prandial, le contenu hépatique de leurs transcrits est supérieur d'environ 33% ($P < 0,05$) chez les souris *ob/ob* en comparaison aux souris contrôles en réponse à la prise alimentaire (Dentin et al. 2006). De plus, l'expression de ChREBP, de même que celle

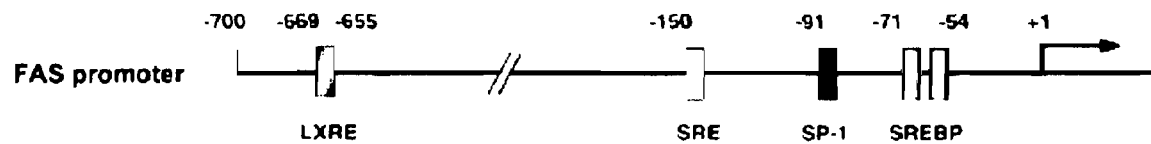


Figure 4. Représentation schématique des sites de liaison des facteurs de transcription sur le promoteur de la FAS. FAS : fatty acid synthase. Tiré de Joseph et al. (2002).

des enzymes qu'il régule (GK, L-PK, ACC, FAS, etc) demeure significativement élevée chez les souris *ob/ob* à l'état de jeûne (24h). Ces résultats suggèrent un mécanisme pouvant expliquer les taux élevés de lipogenèse *de novo* basale rapportés chez les sujets de l'étude de Donnelly et al. (2005). Dans cette étude, la contribution de la lipogenèse *de novo* basale au pool de TAG hépatiques allait jusqu'à 26% chez les sujets atteints de SH, alors qu'elle dépasse rarement 5% chez des sujets sains. Toutefois, la lipogenèse hépatique n'est pas forcément comparable chez le rongeur et chez l'homme (Donnelly et al. 2004).

Inversement, l'inactivation du gène qui encode ChREBP *in vitro* (siChREBP sur hépatocytes en culture) et *in vivo* (souris ChREBP^{-/-}) entraîne une diminution de l'utilisation du glucose et des taux de synthèse des acides gras (jusqu'à 65%), conduisant à une réduction du stockage hépatique des TAG et ce, indépendamment de SREBP-1c (Dentin et al. 2004, Iizuka et al. 2004). Ces résultats ont été confirmés par Dentin et al. (2006), qui ont généré un modèle encore plus ciblé en inactivant spécifiquement l'expression hépatique de ChREBP par l'injection d'un adénovirus (Ad-shChREBP) chez des souris *ob/ob*.

Ainsi, l'expression des SREBP-1c, LXR et ChREBP est nutritionnellement régulée; leur activation concertée coordonne la conversion des glucides en excès en acides gras et est requise pour l'induction optimale du programme lipogénique au niveau du foie. De plus, la stimulation hépatique de ces facteurs de transcription est amplifiée dans les conditions d'hyperglycémie et d'hyperinsulinémie qui caractérisent la RI, ce qui contribue à la pathogenèse de la SH (Figure 5).

1.1.1.3. Apport énergétique et diètes riches en lipides

En accord avec les mécanismes discutés jusqu'à présent, le gain d'adiposité, la sensibilité à l'insuline et le contenu lipidique du foie sont affectés par la prise alimentaire (Hu, 2001). À cet égard, plusieurs études ont investigué le rôle de certains macro-nutriments comme les glucides, ou davantage en lien avec les études de notre laboratoire, les lipides, dans la pathogenèse de la SH (Anurag et Anuradha 2002, Huang et al. 2007, Lê et

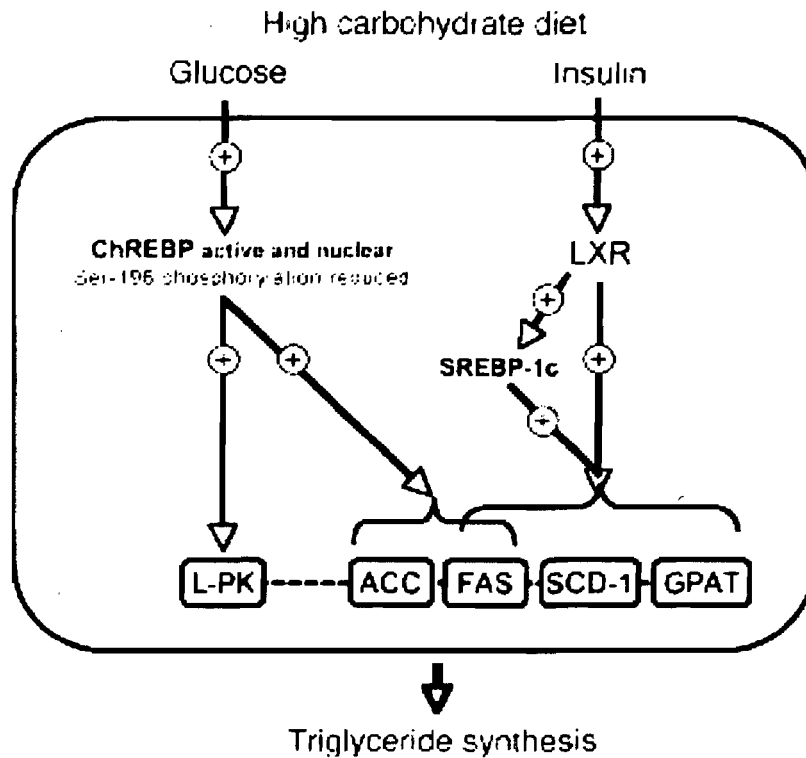


Figure 5. Rôles respectifs de LXR, ChREBP et SREBP-1c dans le contrôle transcriptionnel de la synthèse des TAG dans le foie. L'activation de ChREBP médiée par le glucose est requise pour induire la transcription de la L-PK et de l'ACC. L'expression génétique de la FAS est régulée de façon synergique par ChREBP, LXR et SREBP-1c. La SCD-1 et la GPAT sont sous le contrôle transcriptionnel de SREBP-1c et/ou des LXR. Alors que les LXR jouent un rôle central dans la signalisation de l'insuline via le contrôle transcriptionnel de SREBP-1c, aucune évidence n'indique une implication directe des LXR dans la voie de signalisation du glucose qui implique l'activation de ChREBP. LXR : liver X receptors; ChREBP : carbohydrate responsive element-binding protein; SREBP-1c : sterol regulatory element-binding protein-1c; L-PK : liver-type pyruvate kinase; ACC : acetyl-CoA carboxylase; SCD-1 : stearoyl CoA desaturase-1; GPAT : glycerol-3-phosphate acyltransferase. Tiré de Denechaud et al. (2008).

Bortolotti 2008). Samuel et al. (2004) ont montré la rapidité (3 jours) avec laquelle la consommation d'une diète riche en lipides augmente le contenu hépatique en TAG chez le rat. Dans le but de caractériser la cinétique d'infiltration hépatique à plus long terme avec un modèle similaire, Gauthier et al. (2006) ont soumis des rats à une diète riche en lipides (42% de l'énergie) durant 16 semaines et ont rapporté une augmentation d'environ 200% des TAG hépatiques dans les 2 premières semaines, un retour aux valeurs basales entre les 2^e et 6^e semaines et à nouveau, une accumulation lipidique d'environ 17% entre la 6^e semaine et la fin du protocole expérimental. Ainsi, face à une charge lipidique, le foie semble agir comme un tampon systémique de lipides, qu'il a la capacité d'absorber rapidement et de relâcher dans le plasma avant de s'infiltrer à nouveau.

En somme, le manque de variété dans la composition macro-nutritionnelle de la diète semble être à l'origine des désordres métaboliques (hyperglycémie, hyperinsulinémie, augmentation des AGNE du plasma, etc) qui favorisent l'accumulation hépatique de lipides (Toshimitsu et al. 2007, Vilar et al. 2008). Évidemment, la persistance d'un bilan énergétique positif joue un rôle de premier plan dans le gain d'adiposité et l'accumulation hépatique de lipides; la SH pourrait simplement résulter, au début de son développement, du stockage sous forme lipidique de l'énergie non métabolisée chez ceux qui ont une prise alimentaire excédentaire (Figure 6) (Lewis et al. 2002, Reddy et Rao 2006). La restriction énergétique est d'ailleurs associée à une résorption de la SH induite par un excédent alimentaire (Ueno et al. 1997, Yamamoto et al. 2006).

1.1.2. Les voies d'élimination des lipides hépatiques

1.1.2.1. L'oxydation β des acides gras

Le taux d'oxydation hépatique des acides gras est approximativement proportionnel aux concentrations d'AGNE du plasma et donc à leur disponibilité dans les hépatocytes (Lewis et al. 2002). Ainsi, la SH devrait être associée à une stimulation de l'oxydation hépatique des acides gras et effectivement, Buggianesi et al. (2001) ont rapporté une élévation de plus du double des concentrations plasmatiques de β -hydroxybutyrate avec la SH. Cependant, il appert que l'oxydation des lipides n'est pas stimulée suffisamment pour prévenir leur accumulation dans les hépatocytes ou encore, que l'accumulation

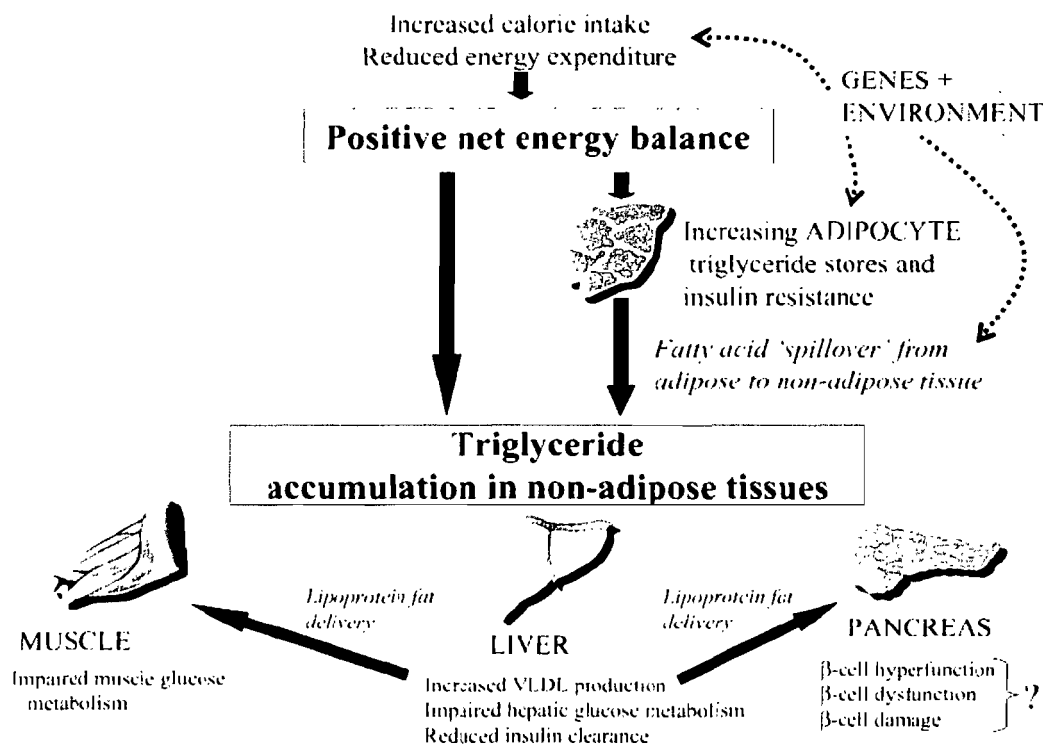


Figure 6. Une balance énergétique positive excède la capacité tampon du tissu adipeux et entraîne la lipotoxicité. La balance énergétique positive résulte d'une augmentation de l'apport énergétique et d'une diminution de la dépense énergétique, ce qui favorise l'accumulation de TAG dans plusieurs tissus et particulièrement le tissu adipeux. L'accumulation de TAG dans le tissu adipeux entraîne une augmentation de la lipolyse par un effet de masse. Ce phénomène, associé au développement de la RI, entraîne un débordement des acides gras vers les tissus non-adipeux qui les stockent sous forme de TAG, ce qui favorise le développement des manifestations typiques des états de RI et du diabète de type 2. Tiré de Lewis et al. (2002).

hépatique d'acides gras surpasse la capacité de l'oxydation β mitochondriale (Angulo 2002, Reddy et Rao 2006).

La stimulation des processus lipogéniques par l'hyperinsulinémie et l'hyperglycémie qui accompagnent la SH fait partie des phénomènes qui contribuent à freiner l'utilisation des acides gras. En effet, l'accumulation de malonyl CoA qui résulte de l'activation de SREBP-1c et ChREBP inhibe de façon allostérique l'activité de la CPT-1 (carnitine palmitoyl transferase-1), l'enzyme qui catalyse l'étape limitante de l'oxydation β des acides gras (Figure 7) (Ruderman et al. 2003).

Dentin et al. (2006) ont montré que l'inactivation spécifique de ChREBP hépatique (Ad-shChREBP) chez des souris *ob/ob* entraînait une réduction du contenu hépatique en malonyl CoA, de même qu'une augmentation des concentrations de β -hydroxybutyrate du plasma (2-3 fois; $P < 0,05$) et des hépatocytes (5 fois; $P < 0,05$). De plus, ces modifications se sont traduites par une résorption de la SH ($42,5 \pm 2,6$ vs $33,1 \pm 3,4$ mg TAG/g foie, $P < 0,05$; *ob/ob* vs shChREBP, respectivement). Au niveau du foie, l'utilisation des acides gras est sous la gouverne de PPAR α , le principal médiateur moléculaire responsable de la régulation des systèmes oxydatifs hépatiques (Rao et Reddy 2004, Reddy et Rao 2006). La discussion qui suit met en évidence la relation entre les altérations de l'activité de PPAR α et la SH.

1.1.2.1.1. PPAR α

PPAR α - peroxysome proliferator-activated receptor alpha - est un récepteur nucléaire qui stimule l'expression des systèmes oxydatifs hépatiques, i.e. les oxydations mitochondriale, peroxysomale et microsomale (Desvergne et al. 2004, Rao et Reddy 2004, Reddy et Rao 2006). Bien que l'oxydation β mitochondriale soit la seule qui soit directement dévolue à la fourniture d'énergie cellulaire, les oxydations β peroxysomale et ω microsomale contribuent également à l'homéostasie hépatique des lipides; elles métabolisent les acides gras potentiellement toxiques, i.e. les prostanoïdes, les métabolites intermédiaires des acides biliaires et les acides gras dicarboxyliques, ainsi que les acides gras à chaînes branchées et à chaînes très longues ($> C_{20}$), qui doivent être

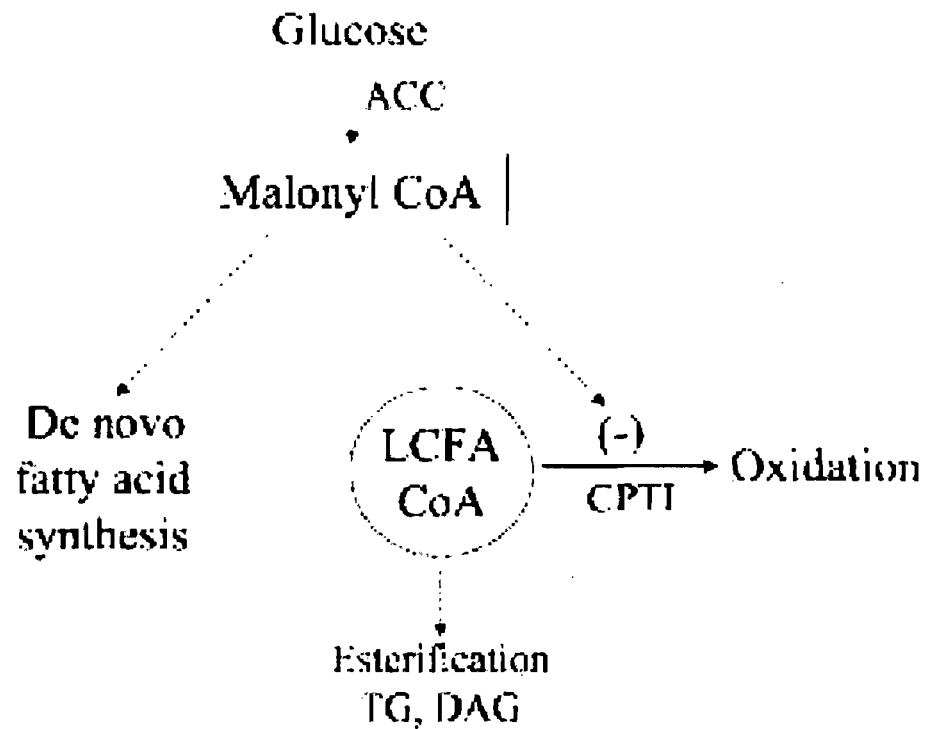


Figure 7. Distribution du malonyl CoA et des acides gras. Le malonyl CoA est un inhibiteur de la CPT-1, l'enzyme qui contrôle le transfert des molécules LCFA du cytosol vers la mitochondrie où elles sont oxydées. L'élévation des concentrations de malonyl CoA inhibe l'activité de la CPT-1 alors que l'estérification des LCFA pour former des diacylglycérols et des TAG est favorisée. CPT-1 : carnitine palmitoyl transférase-1; LCFA : long-chain fatty acyl CoA. Tiré de Rutherford et al. (2003).

raccourcies pour pouvoir entrer dans la mitochondrie. PPAR α est activé par les influx cellulaires d'acides gras qui stimulent ainsi leur propre utilisation, faisant de PPAR α un « senseur de lipides » à la base de l'activation du programme génétique d'utilisation des lipides.

La délétion du gène qui encode PPAR α (souris PPAR $\alpha^{-/-}$) entraîne une réduction de l'expression constitutive des enzymes impliquées dans l'oxydation β mitochondriale, de même qu'une réduction d'environ 50% de l'activité de cette voie métabolique, conduisant au développement progressif d'une SH (Aoyama et al. 1998, Costet et al. 1998). Costet et al. (1998) ont mis en évidence un dimorphisme sexuel dans la régulation du métabolisme des lipides par PPAR α , avec le développement d'une SH beaucoup plus sévère chez les mâles (TAG hépatiques 9,5 fois élevés chez PPAR $\alpha^{-/-}$ vs contrôles; $P < 0,05$) que chez les femelles (TAG hépatiques 2,7 fois plus élevés chez PPAR $\alpha^{-/-}$ vs contrôles; $P < 0,05$). Chez les souris mâles, l'inhibition de PPAR α a également été associée à la stimulation de l'expression hépatique de PPAR γ (d'environ 40%; $P < 0,05$, PPAR $\alpha^{-/-}$ vs contrôles), un membre PPAR responsable de l'adipogenèse normalement faiblement exprimé au niveau du foie. De plus, les souris PPAR $\alpha^{-/-}$ sont incapables de stimuler les systèmes oxydatifs hépatiques face à une charge lipidique, et des situations comme le jeûne prolongé (48-72h) entraînent le développement d'une SH sévère chez ces souris (Hashimoto et al. 2000).

Ainsi, l'activation de PPAR α est critique pour stimuler l'utilisation des acides gras et détermine le degré d'accumulation hépatique de TAG. De plus, un excès d'acides gras intra-hépatiques atténue le rôle de « senseur lipidique » de PPAR α , conduisant à une stimulation insuffisante des systèmes oxydatifs face à l'augmentation de la charge lipidique (Figure 8) (Reddy et Rao 2006).

1.1.2.2. *L'assemblage et la sécrétion des VLDL*

L'accumulation d'acides gras est toxique pour les hépatocytes qui disposent de différents moyens pour les neutraliser (lipogenèse) ou les éliminer (processus oxydatifs) (Neuschwander 2003). Une autre voie importante d'élimination hépatique des acides gras

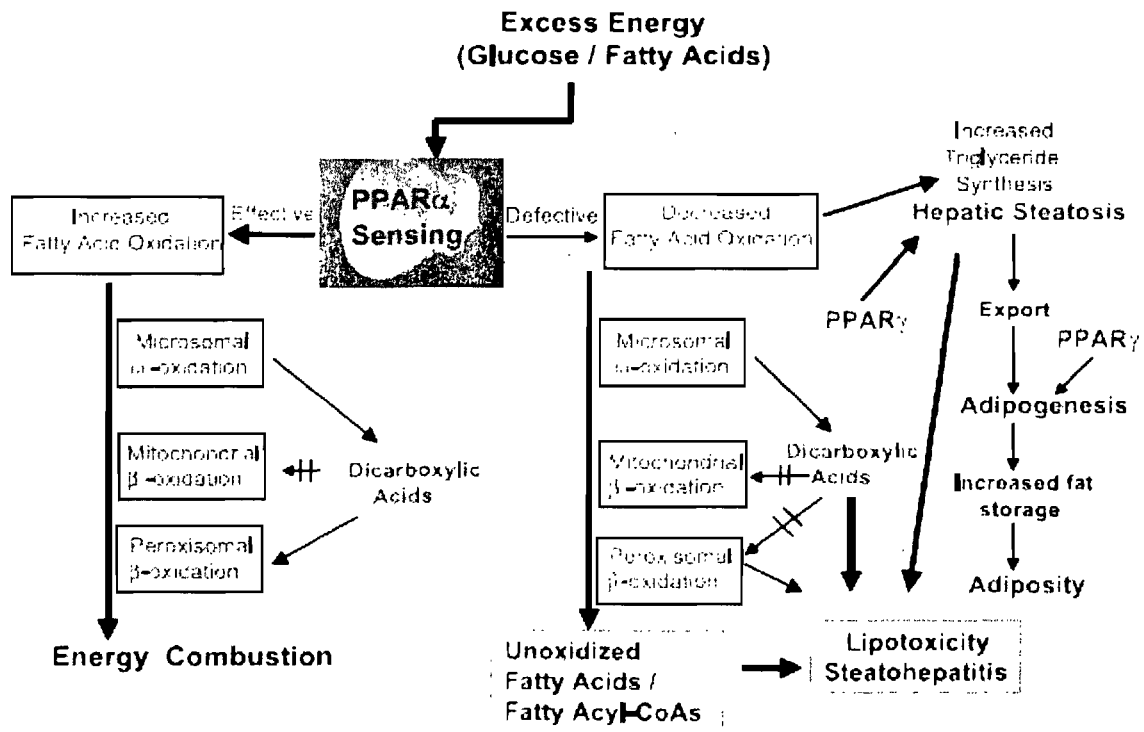


Figure 8. Interactions entre les systèmes oxydatifs et PPAR α dans le métabolisme énergétique du foie. Au niveau du foie, les oxydations mitochondriale, peroxysomale et microsomale sont régulées par PPAR α . L'activation du rôle de senseur de PPAR α dans le foie et l'induction des 3 systèmes oxydatifs augmentent la combustion des réserves d'énergie et diminuent le stockage des lipides. À l'inverse, l'inhibition du rôle de senseur de PPAR α ou la diminution de la capacité d'oxydation des acides gras entraîne une réduction de l'utilisation des réserves et une augmentation de la lipogenèse, ce qui conduit à la stéatose. Des anomalies associées aux différents systèmes oxydatifs hépatiques causées par des perturbations génétiques, toxiques et métaboliques entraînent aussi une diminution du catabolisme des réserves d'énergie, conduisant au stockage de lipides dans les hépatocytes. PPAR α : peroxysome proliferator-activated receptor alpha. Tiré de Reddy et Rao (2006).

est leur sécrétion sous forme de TAG dans les VLDL (very-low-density lipoprotein). L'assemblage des VLDL est un processus complexe constitué de deux phases principales qui se déroulent dans le réticulum endoplasmique (Gibbons et al. 2004). Brièvement, la première phase d'assemblage implique l'addition d'une petite quantité de TAG à une molécule d'apolipoprotéine B100 (apoB100) et donne naissance au précurseur du VLDL. Ensuite, la seconde phase de maturation nécessite la fusion du précurseur à une particule très riche en TAG préalablement formée. L'intervention de différentes enzymes, dont la MTP (microsomal triacylglycerol transfer protein), est requise pour la mobilisation des TAG à partir du pool du réticulum endoplasmique et la maturation du VLDL (Figure 9).

Chez les sujets sains, l'insuline inhibe la sécrétion des VLDL par un mécanisme qui augmente la dégradation de l'apoB100 (Brown et Gibbons 2001, Malmström et al. 1997). Cependant, la RI est associée à une augmentation de la production de VLDL, malgré l'état d'hyperinsulinémie. En réponse à un clamp hyperinsulinémique/hyperglycémique, Malmström et al. (1997) ont rapporté une suppression de $3\pm 8\%$ de la production de VLDL chez des sujets diabétiques, alors que l'infusion d'insuline a induit une suppression de $50\pm 15\%$ de leur production chez les sujets contrôles. L'augmentation de la disponibilité des acides gras, des taux de lipogenèse hépatique et de l'activité de la MTP, de même que la perte de la capacité de l'insuline à dégrader l'apoB100 sont des mécanismes qui permettent d'expliquer ce phénomène et suggère un lien entre la RI, l'augmentation de la sécrétion des VLDL et l'hypertriglycéridémie (Fisher et Ginsberg 2002, Ota et al. 2008). Cependant, la RI et les dyslipidémies coexistent fréquemment avec la SH, ce qui semble paradoxal et suggère que le foie insulino-résistant ne parvient pas à sécréter suffisamment de VLDL pour prévenir le développement de la SH (Kelley et al. 2003, Marceau et al. 1999, Marchesini et al. 1999).

1.1.2.3. Les facteurs adipocytaires

La fonction du tissu adipeux a longtemps été réduite à celle d'un réservoir de TAG (Ahima 2006, Quershi et Abrams 2007). Cependant, le tissu adipeux est maintenant reconnu comme un tissu métaboliquement actif et un organe endocrine à part entière qui

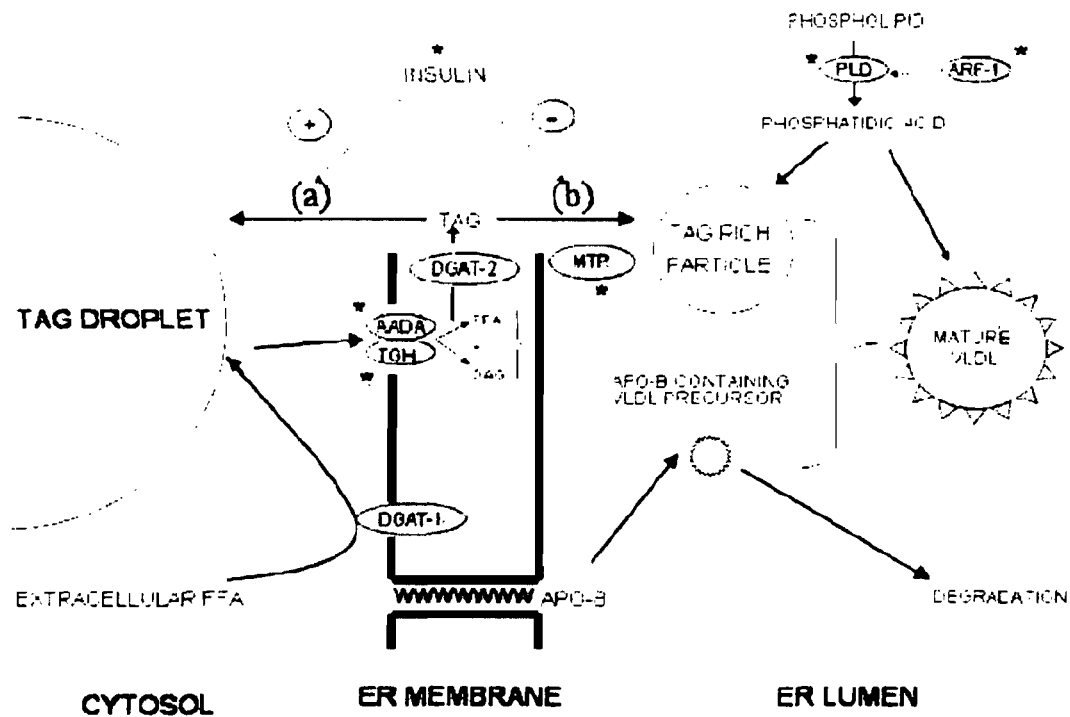


Figure 9. Schématisation de la formation de la particule riche en TAG précurseur du VLDL. Les AGNE du plasma sont pris par les hépatocytes et sont estérifiés par la DGAT-1 pour former des TAG qui sont stockés dans le cytosol. Le TAG précurseur du VLDL est mobilisé par l'action lipolytique de l'AADA et/ou de la TGH. Les produits de la lipolyse sont ré-estérifiés par la DGAT-2. Certains produits des TAG sont dirigés vers une particule riche en TAG précurseur du VLDL (voie b) alors que d'autres sont recyclés dans le cytosol (voie a). La voie (a) est stimulée par l'insuline et la voie (b), par la MTP. Les acides phosphatidiques formés par l'activation de la phospholipase-D médiée par ARF-1 contribuent autant à la formation des TAG impliqués dans la formation de la particule riche en TAG précurseur du VLDL qu'à celle du VLDL mature. VLDL : very-low-density lipoprotein; DGAT : diacylglycerol acyltransferase; AADA : arylacetamide deacetylase; TGH : TAG hydrolase; MTP : microsomal TAG transfer protein; ARF-1 : ADP-ribosylation factor 1. Tiré de Gibbons et al. (2004).

assure différentes fonctions régulatrices tant au niveau du métabolisme que de l'inflammation par l'intermédiaire des facteurs qu'il sécrète. Plus de 100 facteurs adipocytaires ont été identifiés, parmi lesquels on retrouve les acides gras, les adipokines, des cytokines, des stéroïdes, le cholestérol et des prostaglandines, qui agissent de façon autocrine, paracrine et endocrine sur l'ensemble des cellules de l'organisme. L'obésité est caractérisée par une expansion du tissu adipeux, qui est dans un état d'inflammation chronique; cet état altère le stockage des lipides et le métabolisme des facteurs qu'il sécrète (Trayhurn et Wood 2004). Exception faite de l'adiponectine, la sécrétion des facteurs adipocytaires augmente avec l'obésité. Le foie est un tissu particulièrement sensible aux actions des facteurs adipocytaires qui, à l'instar des acides gras, influencent le métabolisme des lipides et interfèrent avec la voie de signalisation de l'insuline. La discussion qui suit sera limitée à la présentation de la leptine, une adipokine pour laquelle la contribution au métabolisme hépatique des lipides est la mieux documentée.

1.1.2.3.1. La leptine

La leptine est la première adipokine à avoir été caractérisée (1994); elle est encodée par le gène *ob* et agit via un récepteur membranaire (OB-R) membre de la famille des récepteurs de cytokines de classe I (Koerner et al. 2005, Zhang Y et al. 1994). La leptine est principalement synthétisée par les adipocytes matures en réponse aux variations du statut nutritionnel et de la masse adipeuse. La suralimentation, le glucose, l'insuline et l'obésité stimulent sa production, alors que le jeûne, la restriction énergétique, l'exercice prolongé et la perte de poids l'inhibent (Ahima 2006, Margetic et al. 2002). Au niveau de l'hypothalamus, la leptine stimule la sécrétion des peptides anorexigènes par les neurones POMC (pro-opiomelanocortin) et CART (cocaine and amphetamine related transcript), alors qu'elle inhibe celle des peptides orexigènes NPY (neuropeptide Y) et AGRP (agouti related protein). Ces circuits interagissent avec d'autres centres du système nerveux central pour coordonner l'appétit et moduler les signaux périphériques qui régulent le métabolisme et la dépense énergétique (Friedman and Halaas 1998). Ainsi, les souris *ob/ob* sont obèses et diabétiques, et existent dans un état de « famine » caractérisé par une hyperphagie sans satiété; l'administration de leptine corrige ce phénotype (Pellemounter 1995, Zhang Y et al. 1994).

Les effets métaboliques de la leptine ne se limitent pas à son action anorexigène; la leptine agit directement au niveau du foie et des tissus périphériques qu'elle sensibilise aux actions de l'insuline, en plus d'y exercer un effet anti-stéatotique (Margetic et al. 2002). Cet effet a d'abord été montré sur des îlots pancréatiques isolés par Shimabukuro et al. (1997). Dans cette étude, la présence de leptine (20 ng/mL) dans le milieu de culture a réduit d'environ 75% le contenu cellulaire en TAG. De même, des perfusions hépatiques de leptine (10 ng/mL) ont conduit à une diminution de 42% des concentrations tissulaires de TAG (Huang et al 2004). Des résultats similaires ont été obtenus suite à des infusions systémiques de leptine chez le rat (Huang et al. 2006). Il existe aussi une littérature qui soutient que l'effet de la leptine sur le foie passe par le système nerveux central, surtout à faibles concentrations plasmatiques (Margetic et al. 2002). Toutefois, l'effet anti-stéatotique de la leptine n'est pas observé chez la plupart des modèles d'obésité (humain, souris *db/db*, rat *fa/fa*), pour lesquels les concentrations élevées de leptine sont directement corrélées à la sévérité de la SH (Huang et al. 2004, Huang et al. 2006, Margetic et al. 2002, Shimabukuro et al. 1997). Ces observations suggèrent un état de résistance hépatique à la leptine qui pourrait favoriser le développement de la SH (Fishman et al. 2007, Huang et al. 2004, Huang et al. 2006, Shimabukuro et al. 1997).

L'effet anti-stéatotique de la leptine repose sur sa capacité à stimuler l'oxydation des acides gras et à inhiber la synthèse des TAG (Huang et al. 2006, Shimabukuro et al. 1997). Bien que l'activation de PPAR α soit requise pour médier les effets anti-stéatotiques de la leptine au niveau du foie, un autre mécanisme a été ciblé (Lee Y et al. 2002). Une analyse du profil transcriptionnel de la leptine a révélé qu'elle réprime spécifiquement le gène de la SCD-1 et que c'est par ce mécanisme que seraient principalement traduits ses effets anti-stéatotiques au niveau du foie (Cohen et al. 2002).

1.1.2.3.1.1. SCD-1

La SCD-1 est une enzyme microsomale qui catalyse l'étape limitante de la biosynthèse des acides gras monoinsaturés essentiels à la synthèse des TAG (Enoch HG 1978). La SCD-1 stimule la conversion des acides palmitique (16:0) et stéarique (18:0) en acides palmitoléique (16:1) et oléique (18:1), respectivement, par l'insertion d'un double lien

entre les 9^e et 10^e carbones des acides gras saturés. La régulation transcriptionnelle de la SCD-1 est principalement stimulée par SREBP-1c, alors que la leptine l'inhibe (Cohen et Friedman 2004). Chez les souris *ob/ob*, la SH est associée à une augmentation de l'expression hépatique des transcrits et de l'activité enzymatique (7 fois; $P < 0,0005$) de la SCD-1 en comparaison aux souris contrôles, et l'administration de leptine normalise ces perturbations au-delà d'une restriction de la prise alimentaire (Cohen et al. 2002). L'inhibition de l'activité de la SCD-1 par la leptine empêche la production des acides gras monoinsaturés, ce qui limite la synthèse des TAG, leur accumulation dans les hépatocytes et leur sécrétion sous forme de VLDL (Miyazaki et al. 2000). De plus, l'accumulation cellulaire d'acides gras saturés inhibe l'activité de l'ACC et donc, la formation de malonyl-CoA, ce qui dirige les acides gras vers l'oxydation plutôt que vers la synthèse des TAG (Figure 10).

L'étude des souris *asebia* (*ab^J/ab^J*) a mis en évidence l'importance de la suppression de l'activité de la SCD-1 dans la médiation des effets anti-stéatotiques de la leptine au niveau du foie (Miyazaki et al. 2000, Ntambi et al. 2002). Les souris *ab^J/ab^J*, qui produisent une SCD-1 non-fonctionnelle, sont caractérisées par un faible contenu hépatique en TAG et une faible production de VLDL qui ne peuvent être expliquées par une action de la leptine; effectivement, ces souris ont également très peu d'adiposité. Ces observations ont conduit à la génération du double mutant *ab^J/ab^J;ob/ob*, qui présente un contenu hépatique en TAG comparable à celui des souris contrôles, malgré l'absence de leptine. Ainsi, le rôle de la leptine serait peut-être davantage celui de permettre le gain d'adiposité en période d'abondance tout en prévenant l'accumulation ectopique de lipides (Unger 2005). Toutefois, l'obésité entraînerait une perte de sensibilité tissulaire à la leptine conduisant à la lipotoxicité du foie et des tissus maigres.

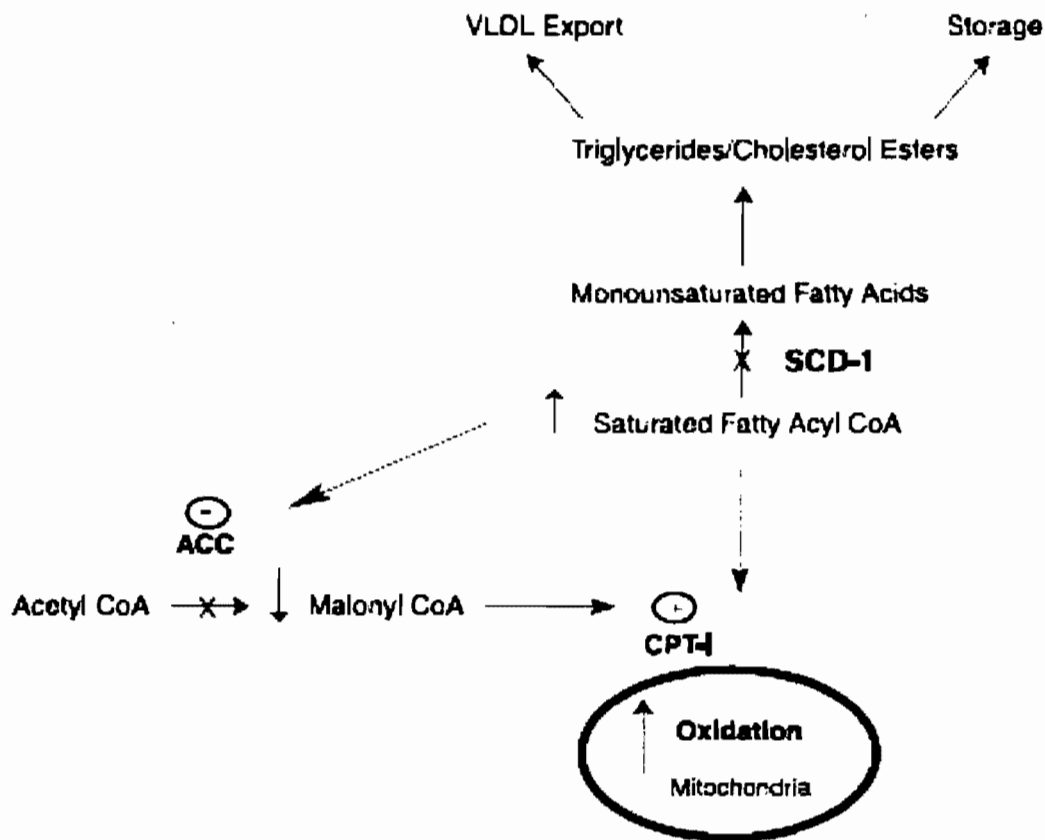


Figure 10. Mécanisme à la base de l'augmentation de la dépense énergétique chez les souris déficientes en SCD-1. En l'absence de la SCD-1, la synthèse des TAG et des VLDL est bloquée conduisant à la diminution du stockage et de la sécrétion hépatiques des lipides. Une déficience en SCD-1 cause une augmentation du pool de fatty acyl saturés, qui inhibent de façon allostérique l'ACC. L'inhibition de l'ACC réduit la formation de malonyl CoA, un métabolite qui inhibe normalement la CPT-1 mitochondriale. Ainsi, la diminution des concentrations de malonyl CoA lève le frein sur l'oxydation des acides gras, ce qui augmente leur utilisation. SCD-1 : stearoyl CoA desaturase-1; VLDL : very-low-density lipoprotein; ACC : acetyl-CoA carboxylase; CPT-1 : carnitine palmitoyl transferase-1. Tiré de Cohen et Friedman (2004).

En résumé, la RI qui affecte prioritairement certains tissus - certains affirment qu'il s'agit du foie (Revue Shulman 2000), d'autres, du tissu adipeux (Revue Lewis 2002) – et l'impact de l'hyperinsulinémie compensatoire sur les tissus qui demeurent sensibles à l'action de l'insuline affectent les voies hépatiques de prise, de synthèse, d'oxydation et de sécrétion des lipides. L'accumulation ectopique de lipides qui résulte de l'expansion de la masse adipeuse compromet également la signalisation de l'insuline, sans oublier l'influence des adipokines comme la leptine sur le métabolisme hépatique des lipides (Figure 11) (Revue Duvnjak 2007).

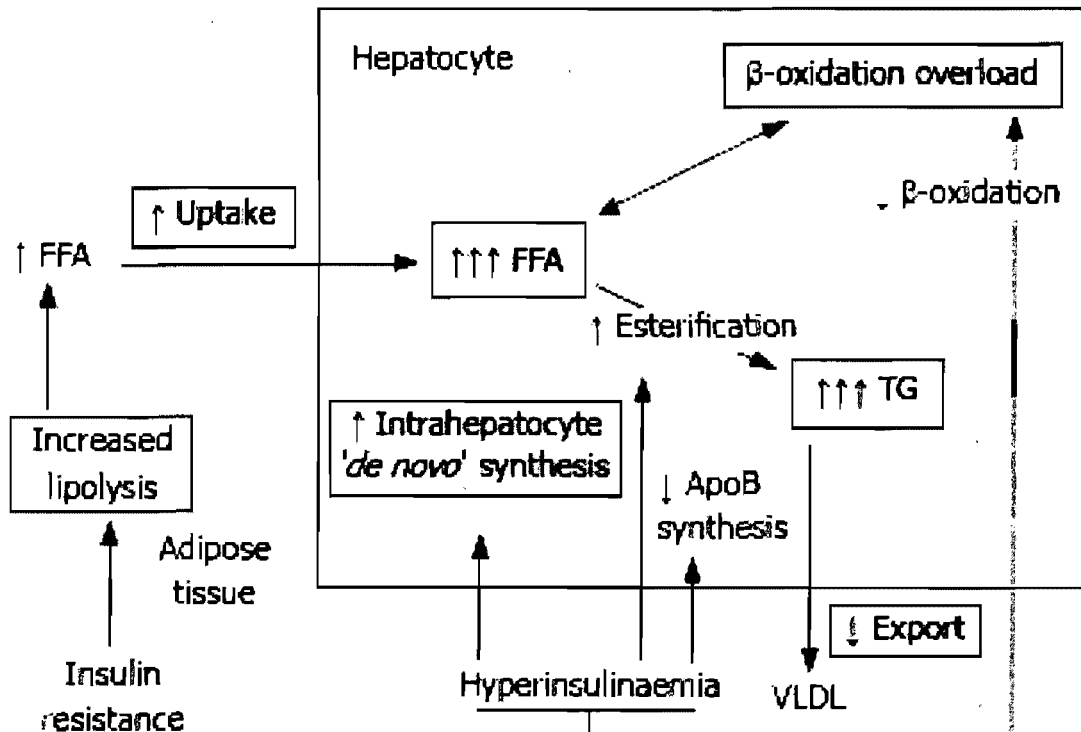


Figure 11. Effet de la RI sur le métabolisme des lipides. La RI et l'hyperinsulinémie qui en résulte conduisent à l'accumulation de lipides dans les hépatocytes par plusieurs mécanismes. Dans le tissu adipeux, la RI augmente la lipolyse des TAG et inhibe l'estérification des acides gras. Il en résulte une augmentation des AGNE qui sont pris par le foie. L'hyperinsulinémie augmente la lipogenèse hépatique et inhibe leur oxydation, ce qui favorise l'accumulation d'acides gras dans les hépatocytes. De plus, l'augmentation de la dégradation de l'apoB diminue la production de VLDL. L'accumulation de lipides dans les hépatocytes favorise la RI hépatique. FFA : free fatty acids; VLDL : very-low-density lipoprotein. Tiré de Duvnjak et al. 2007.

1.2. Implication du retrait de l'action estrogénique dans le développement de la stéatose hépatique

1.2.1. Présentation de la voie estrogénique

1.2.1.1. Les estrogènes

Les estrogènes sont une famille d'hormones stéroïdes C_{18} principalement synthétisées par l'ovaire à partir du cholestérol, par une voie qui implique 2 déshydrogénases (3β -HSD et 17β -HSD) et 3 cytochromes P450 (CYP11A1, CYP17 et CYP19) (Figure 12) (Ackerman et Carr 2002). Les tissus qui expriment l'enzyme aromatasase (CYP19; tissu adipeux, peau, os, cerveau, placenta, muscle, etc) peuvent aussi produire des estrogènes à partir de précurseurs androgéniques C_{19} , comme la testostérone et l'androsténédione (Nelson et al. 2001). Chez la femme post-ménopausée, les surrénales sont la source principale des précurseurs stéroïdiens qui serviront à la synthèse périphérique des estrogènes alors que chez l'homme, c'est le testicule qui en est majoritairement responsable. Le tissu adipeux peut également contribuer de façon significative au pool d'estrogènes du plasma chez le mâle comme chez la femelle (Simpson et al. 2000). D'ailleurs, plusieurs études ont corrélé les concentrations d'estrogènes du plasma à la masse adipeuse chez la rate Ovx, chez la femme et chez l'homme (Fernandez-Real et al. 1999, Mystkowski et Schwartz 2000, Schneider et al. 1979, Zhao H et al. 2005). Le type d'estrogène produit diffère selon le site de synthèse; l'ovaire synthétise principalement le 17β -estradiol (E_2) alors que le tissu adipeux produit de l'estrone. Ainsi, chez la femme pré-ménopausée, E_2 est l'estrogène qui présente l'action biologique la plus importante.

1.2.1.2. Les mécanismes de l'action estrogénique

Le principal mécanisme par lequel l'action estrogénique est transmise aux cellules de l'organisme passe par la liaison d'estradiol (E_2) avec un des deux isoformes connus du récepteur estrogénique - $ER\alpha$ ou $ER\beta$ (Hall et al 2001, Heldring 2007). Les récepteurs estrogéniques (ER) sont membres de la superfamille des récepteurs nucléaires et agissent comme des facteurs de transcription lorsqu'ils sont activés. Normalement, ER est localisé dans le cytosol des cellules; sa liaison avec E_2 permet son homodimérisation et sa translocation nucléaire, où le complexe E_2 -ER se lie à un élément de réponse aux

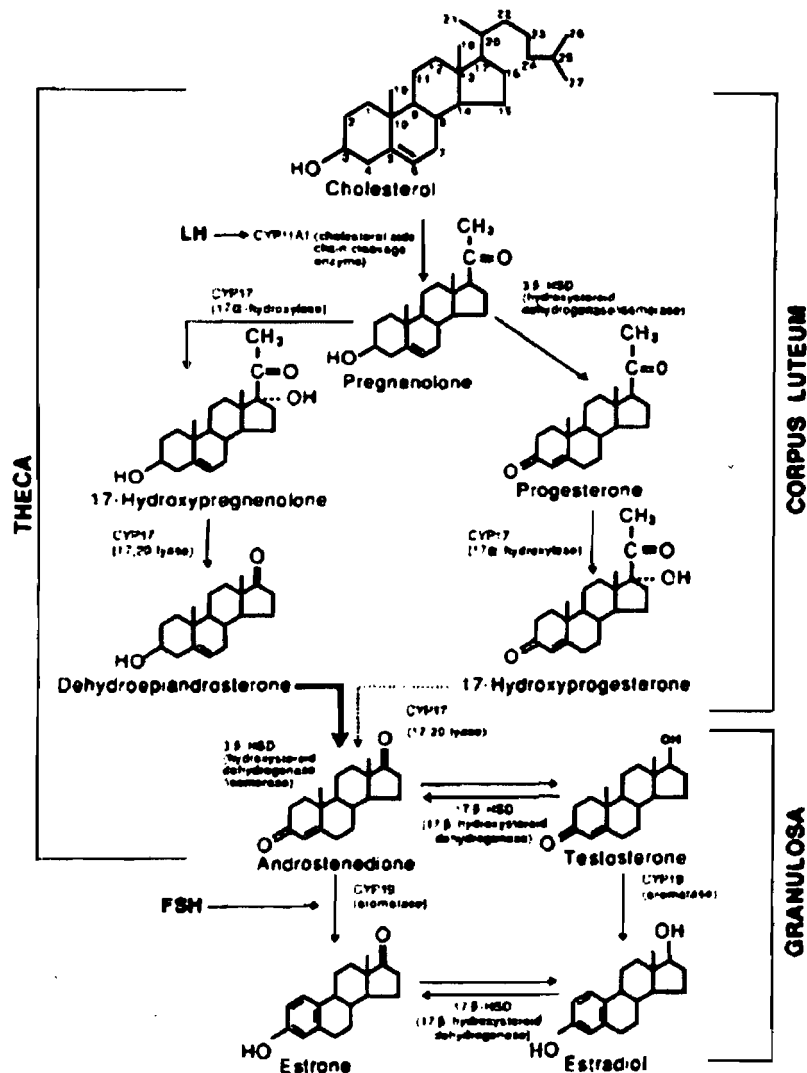


Figure 12. Principales voies de biosynthèse des œstrogènes dans l'ovaire humain. Les principaux compléments enzymatiques des cellules du corps lutéal (corpus luteum), de la thèque et de la granulosa sont présentés dans les accolades. Ces cellules produisent principalement de la progestérone et de la 17-hydroxyprogestérone (corpus lutéal), des androgènes (thèque) et des œstrogènes (granulosa). Les principaux sites d'action de la LH et de la FSH sont montrés par les flèches horizontales. LH : hormone lutéinisante; FSH : hormone folliculo-stimulante. Tiré de Ackerman et Carr (2002).

estrogènes (ERE) de la région promotrice des gènes qu'il régule. Cette liaison peut stimuler ou réprimer la transcription du gène cible (Figure 13; 1).

En plus de la voie d'activation classique, une voie d'activation indépendante de la liaison de E₂ avec ER semble exister; cette voie impliquerait la phosphorylation des fonctions d'activation transcriptionnelle (AF-1 ou AF-2; Figure 14) de ER par des kinases intracellulaires préalablement stimulées par des facteurs de croissance (Figure 13; 2). L'activation transcriptionnelle de ER pourrait également passer par la liaison du complexe E₂-ER à un élément de réponse alternatif (AP-1) plutôt qu'à un ERE de la région promotrice du gène cible. Cette voie d'activation impliquerait donc une liaison indirecte du complexe E₂-ER à l'ADN (Figure 13; 3). Enfin, plusieurs résultats suggèrent l'existence d'une voie estrogénique non-génomique, via la liaison de E₂ à des ER membranaires couplés à des protéines G ou à la voie de signalisation tyrosine kinase (Kelly et Levin 2001). La génération de seconds messagers intracellulaires suite à cette activation permettrait la transmission de réponses cellulaires rapides, comme par exemple l'induction des flux intracellulaires de Ca²⁺ nécessaires à la formation de monoxyde d'azote dans les monocytes (Figure 13; 4).

Il est maintenant reconnu que les effets des estrogènes ne se limitent pas au système reproducteur féminin; presque tous les tissus de l'organisme sont sous influence estrogénique et ce, autant chez le mâle que chez la femelle (Ciocca et al. 1995). Les tissus métaboliquement actifs comme le foie sont particulièrement sensibles aux effets des estrogènes, qui y régulent différentes fonctions dont le métabolisme des lipides.

1.2.2. *Estrogènes et stéatose hépatique*

Les mécanismes impliqués dans la régulation du métabolisme hépatique sont finement régulés par des facteurs génétiques, nutritionnels et hormonaux auxquels participent les estrogènes. Dès 1975, Mukherjea et Biswas ont associé le retrait de l'action estrogénique par l'ovariectomie (Ovx) chez la rate à l'accumulation hépatique de lipides. Cette observation a été confirmée plus récemment par des études du groupe de Richard, qui ont montré une augmentation de plus du double ($P < 0,05$) du contenu hépatique en TAG

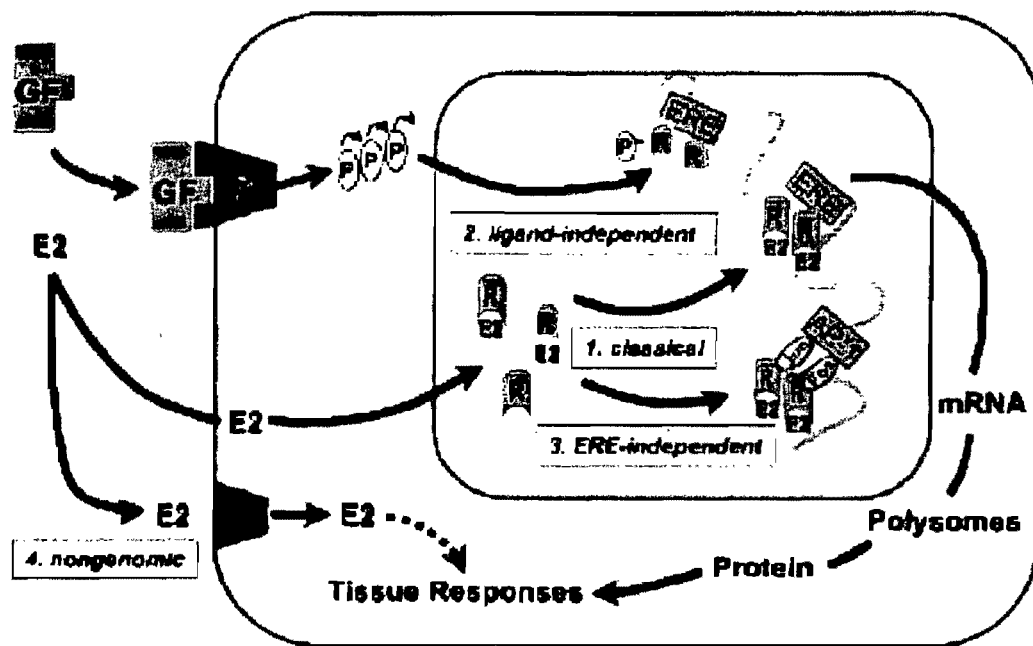


Figure 13. Représentation schématique des différents mécanismes de signalisation de l'estradiol et du récepteur estrogénique. Les effets biologiques de l'estradiol sont médiés par au moins quatre voies. 1) Voie classique impliquant la liaison du complexe E₂-ER à un ERE sur les promoteurs des gènes cibles. 2) Voie d'activation indépendante du ligand, impliquant la phosphorylation de ER et sa liaison à un ERE sur les promoteurs des gènes cibles. 3) Voie d'activation indépendante de la liaison de ER à un ERE, mais qui implique la liaison de ER à une région AP-1. 4) Voie d'activation impliquant la liaison de E₂ à un ER membranaire. E₂ : estradiol; ER : estrogen receptor; ERE : estrogen response element; AP-1 : alternative response element; GF : growth factor; R : receptor. Tiré de Hall et al. (2001).

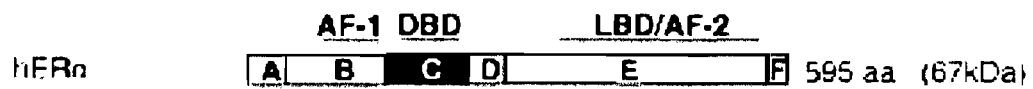


Figure 14. Représentation schématique de ER α (humain). Les domaines du récepteurs incluent le domaine de liaison à l'ADN (DBD), le domaine de liaison à l'hormone (LBD) et les fonctions d'activation transcriptionnelle (AF-1, AF-2). Tiré de Heldring et al. (2007).

chez des rates Ovx (3 semaines) en comparaison à des rates contrôles (Deshaies et al. 1997, Picard et al. 2000). La délétion génétique du gène CYP19 qui encode l'enzyme aromatasase (ArKO) entraîne le développement d'une SH encore plus sévère, se traduisant par un contenu hépatique en TAG chez les souris ArKO jusqu'à 6 fois supérieur ($P < 0,0001$) à celui des souris contrôles (Hewitt et al. 2004, Jones et al. 2000, Nemoto et al. 2000). Lemieux et al. (2005) ont aussi rapporté une augmentation d'environ 3 fois ($P < 0,05$) de l'accumulation hépatique de lipides chez les souris ERKO (délétion génétique du récepteur estrogénique) en comparaison aux souris contrôles, qui s'est avérée statistiquement significative chez le mâle seulement. Les auteurs de l'étude ont attribué cette différence à une plus grande sensibilité des mécanismes de régulation du métabolisme lipidique hépatique des mâles face aux modulations de l'action estrogénique. Ces observations ne sont pas sans rappeler le dimorphisme sexuel de la SH des souris $PPAR\alpha^{-/-}$ rapporté par Costet et al. (1998) (section 1.1.2.1.1).

L'association entre le retrait de l'action estrogénique et la SH a également été rapportée chez l'humain. Une étude conduite auprès de 6648 sujets (3530 hommes et 3118 femmes) de 20 ans et plus a révélé une prévalence de la SH plus élevée chez les hommes que chez les femmes, mais uniquement avant l'arrivée de la ménopause (Park et al. 2006). Ainsi, la prévalence de la SH est jusqu'à deux fois plus élevée chez les femmes post-ménopausées que chez les femmes pré-ménopausées (Clark et al. 2003, Ludwig et al. 1980, Park et al. 2006, Sorrentino et al. 2004, Völzke et al. 2007). De même, la prise d'anti-estrogènes (tamoxifen) utilisés comme traitement préventif du cancer du sein a été associée à une augmentation des risques de développer une stéatohépatite (Bruno 2005). Inversement, des études ont rapporté une correction de la SH par la prise d'un traitement estrogénique. Chez des femmes diabétiques, l'hormonothérapie de remplacement (HRT) composée de faibles doses d'estradiol a corrigé l'élévation plasmatique des aminotransférases, des enzymes libérées par le foie en réponse aux lésions cellulaires pouvant être causées par l'accumulation de lipides (McKenzie et al. 2006). De plus, Maffei et al. (2004) ont montré une résorption de l'insulino-résistance systémique et de la stéatohépatite suite à un traitement estrogénique administré à un homme atteint d'une mutation du gène de

l'aromatase. Le tableau II retrace une quinzaine d'études qui ont rapporté une accumulation hépatique de lipides dans différents contextes de déficits estrogéniques.

Ainsi, il semble que les estrogènes exercent un rôle protecteur contre l'accumulation hépatique de lipides. Bien que la relation entre le retrait de l'action estrogénique et la SH soit établie, peu d'études ont directement investigué les mécanismes qui en sont responsables. La discussion qui suit visera d'abord à montrer la contribution indirecte du retrait de l'action estrogénique au développement de la SH par son influence sur l'obésité. Ensuite, l'implication de l'action estrogénique sur la régulation des voies hépatiques de synthèse et d'oxydation des lipides sera discutée. Ces mécanismes ont été ciblés en lien avec les études qui composent la présente thèse.

1.2.3. Le retrait de l'action estrogénique : un modèle d'obésité

1.2.3.1. Composition corporelle et distribution abdominale du tissu adipeux

Les modèles de déficit estrogénique sont tous caractérisés par un gain de poids corporel qui se manifeste principalement sous forme d'adiposité, bien que des gains protéiques aient également été rapportés (Chen et Heiman 2001, Deshaies et al. 1997, McElroy et Wade 1986, Picard et al. 2000). Ces observations ont été particulièrement bien documentées par les études du groupe de Simpson, qui ont montré que l'accumulation graduelle de tissu adipeux intra-abdominal des souris ArKO correspond rapidement à près du double ($P < 0,05$) de celle des souris contrôles (Figure 15) (Hewitt et al. 2004, Jones et al. 2000, Jones et al. 2001). Des résultats similaires ont été obtenus avec les modèles Ovx et ERKO, de même que chez la femme durant la transition vers la ménopause (Cooke et al. 2001, Gambacciani et al. 1997, Heine et al. 2000, Lemieux et al. 2003, Lemieux et al. 2005, Munoz et al. 2002, Ohlsson et al. 2000, Picard et al. 2000). Chez les souris ArKO et ERKO, la prise d'adiposité a été attribuée autant à l'hypertrophie qu'à l'hyperplasie adipocytaires (Jones et al. 2000, Heine et al. 2000).

Ainsi, en plus de favoriser l'obésité, le retrait de l'action estrogénique conduit à une distribution abdominale de l'adiposité. Différents mécanismes permettent d'expliquer ce

Tableau II. Présentation d'études qui ont rapporté une association entre le retrait de l'action estrogénique et le développement de la stéatose hépatique.

Modèle	Observations	Références
Ovx (Rat) <i>Femelles</i>	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ TAG hépatiques 	Deshaies et al. (1997) Lemieux et al. (2003)
	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ TAG hépatiques • Correction par l'administration d'un traitement estrogénique 	Mukherjea et Biswas (1975) Picard et al. (2000)
ERKO (souris) <i>mâles + femelles</i>	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ TAG hépatiques • Effet plus marqué chez les mâles 	Lemieux et al. (2005)
ArKO (souris) <i>Mâles</i>	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ TAG hépatiques • Correction par l'administration d'un traitement estrogénique 	Jones et al. (2000) Nemoto et al. (2000) Hewitt et al. (2004)
Humain <i>hommes + femmes de plus de 45 ans</i>	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Prévalence NAFLD chez les femmes (biopsie) 	Ludwig et al. (1980) Sorrentino et al. (2004)
Humain <i>hommes + femmes; 17 ans et plus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Prévalence NAFLD chez les hommes (aminotransférases) • ↑ Prévalence NAFLD avec l'âge chez les femmes 	Clark et al. (2003)
Humain <i>hommes + femmes; 20 ans et plus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Prévalence NAFLD chez les hommes (ultrasonographie + aminotransférases) • ↑ Prévalence NAFLD avec la ménopause chez les femmes 	Park et al. (2006)
Humain <i>femmes; 40-59 ans</i>	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Prévalence NAFLD avec la ménopause (ultrasonographie + aminotransférases) 	Völzke et al. (2007)
Humain <i>femmes postménopausées diabétiques</i>	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ contenu hépatique en TAG (aminotransférases) avec thérapie estrogénique (HRT) 	McKenzie et al. (2006)
Humain <i>femmes hystérectomisées</i>	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Prévalence stéatohépatite avec la prise d'un anti-estrogen (tamoxifen) 	Bruno et al. (2005)
Humain <i>homme avec une mutation du gène de l'aromatase</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Stéatohépatite et autres dysfonctions métaboliques • Correction par l'administration d'un traitement estrogénique 	Maffei et al. (2004)

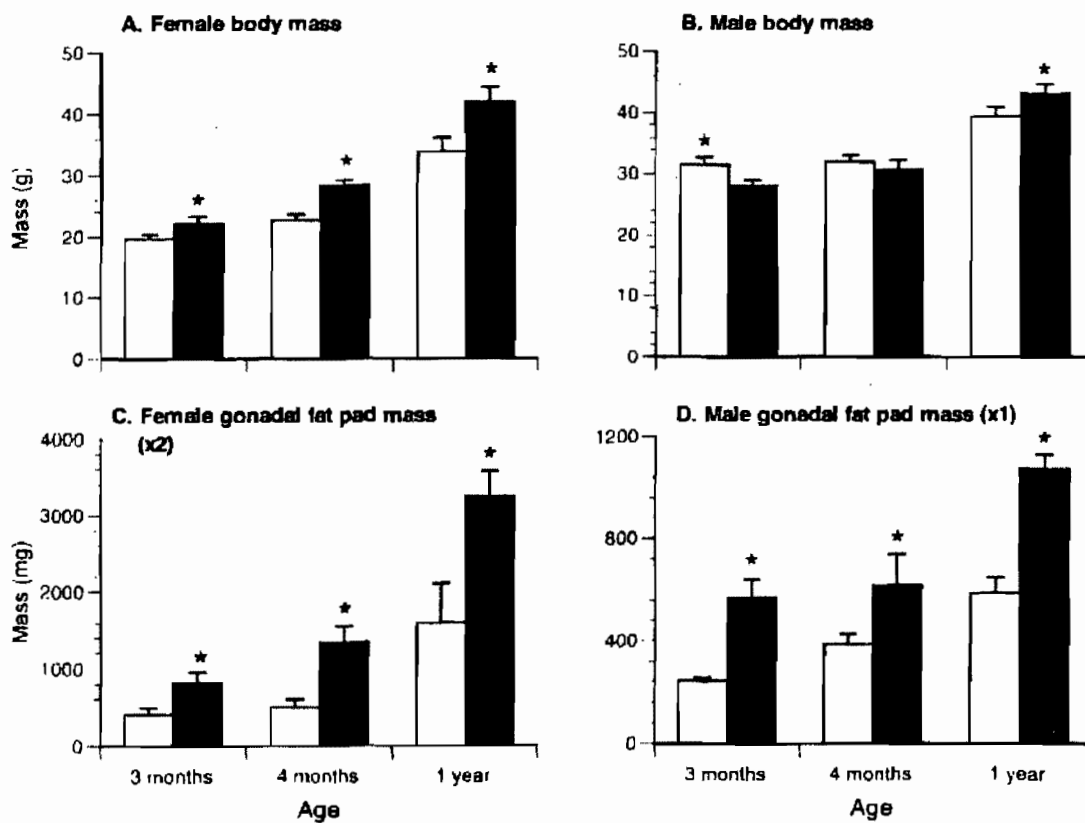


Figure 15. Poids corporel et masse du tissu adipeux gonadal des rats ArKO (colonnes noires) et des contrôles (colonnes vides). A) Poids corporel des femelles. B) Poids corporel des mâles. C) Masse du tissu adipeux gonadal des femelles. D) Masse du tissu adipeux des mâles. $n = 6$ / groupe. * $P < 0,05$. Tiré de Jones et al. (2000).

phénomène, dont l'augmentation de l'expression et de l'activité de la LPL du tissu adipeux gonadal et la diminution de l'expression des récepteurs anti-lipolytiques α 2A-adrénergiques du tissu adipeux sous-cutané (Hamosh et Hamosh 1975, Homma et al 2000, Pedersen et al. 2004, Wade et al. 1985). Récemment, McInnes et al. (2006) ont mis en évidence l'implication de l'augmentation du ratio androgènes : estrogènes dans l'accumulation intra-abdominale de lipides; ils ont montré une inhibition de l'activation de l'AMPK (adenosine 5',monophosphate-activated protein kinase) et une stimulation de la lipogenèse du tissu adipeux viscéral chez des rates Ovx supplémentées en dihydrotestostérone.

Toutefois, au-delà des mécanismes périphériques impliqués dans la distribution de l'adiposité, les estrogènes exercent un contrôle majeur sur la régulation de l'homéostasie énergétique. Un peu à la manière de la leptine, les estrogènes inhibent la prise alimentaire et stimulent la dépense énergétique (Clegg et al. 2006, Gao et Horvath 2008). Ainsi, le retrait de l'action estrogénique contribue au développement de l'obésité par son influence sur les deux principales composantes de la balance énergétique, i.e. la prise alimentaire et la dépense énergétique.

1.2.3.1.1. Prise alimentaire

L'influence de l'action estrogénique sur la prise alimentaire a fait l'objet de plusieurs études des groupes de Wade et Gorski, qui ont attribué le gain de poids corporel des rates Ovx à l'hyperphagie induite par l'absence d'estrogènes (McElroy et Wade 1987, Roy et Wade 1977, Tarttelin et Gorski 1973, Wade et Gray 1978). McElroy et Wade (1987) ont suivi l'évolution de la prise alimentaire de rates Ovx sur une période de 12 semaines. Ils ont rapporté une augmentation de la prise alimentaire à partir de la 2^e semaine post-Ovx, une prise alimentaire maximale autour de la 4^e semaine et un retour à une prise alimentaire comparable à celle des rates contrôles autour de la 6^e semaine post-Ovx (Figure 16). Ce patron de prise alimentaire s'est traduit par un gain de poids corporel rapide suivi d'une période de stabilisation autour de la 5^e semaine post-Ovx; le poids corporel des rates Ovx est demeuré supérieur d'environ 15% à celui des contrôles pour le reste de la période expérimentale.

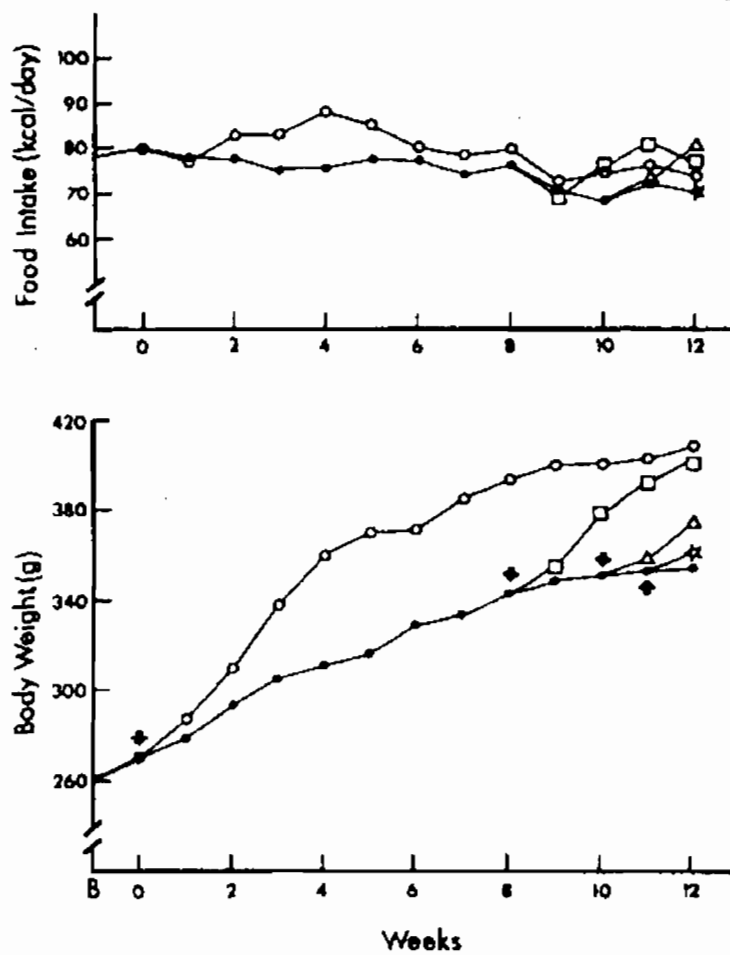


Figure 16. Effet de l'Ovx sur la prise alimentaire et le poids corporel chez des rates. $n = 12$ rats/groupe. Les flèches représentent les interventions chirurgicales. Les symboles ouverts représentent des données post-Ovx. Tiré de McElroy et Wade (1986).

Une étude de Roy et Wade (1977) a montré qu'une supplémentation d'estradiol prévient complètement l'hyperphagie transitoire de même que la prise de poids et d'adiposité induites par l'Ovx. L'action inhibitrice des estrogènes sur la prise alimentaire a également été rapportée durant l'estrus chez le rat et durant la période périovulatoire chez la femme, qui sont des périodes associées à une élévation des concentrations plasmatiques d'estradiol (Geary 2001). L'action anorexigène des estrogènes se ferait en partie par une augmentation de la transmission centrale des signaux périphériques de satiété médiés par la CCK (cholécystokinine) (Eckel et al. 2005). Toutefois, il semble que les estrogènes contribuent aussi à la régulation du métabolisme énergétique par un mécanisme indépendant de leur action anorexigène. Effectivement, chez les rates Ovx, une restriction énergétique ajustée à la prise alimentaire des rates contrôles n'arrive que partiellement à prévenir les gains de poids et d'adiposité induits par le retrait de l'action estrogénique (Roy et Wade 1977). De plus, l'obésité qui accompagne l'Ovx se manifeste même en l'absence d'hyperphagie (Roy et Wade 1977, Tartelin et Gorsky 1973, Wade et Gray 1978).

1.2.3.1.2. Dépense énergétique

Contrairement au modèle Ovx, le phénotype d'obésité des modèles ArKO et ERKO n'est pas associé à l'hyperphagie. Jones et al. (2000) ont rapporté une réduction de moitié ($43,285 \pm 4,205$ vs $93,839 \pm 15,925$ mouvements ambulatoires/jour; $P < 0,01$) de l'activité physique volontaire (cages Perspex équipées de moniteurs à lumière infrarouge) des souris ArKO en comparaison aux contrôles, alors que la prise alimentaire et la dépense énergétique de repos (calorimétrie indirecte respiratoire) se sont avérées comparables entre les deux groupes. Heine et al (2000) ont également rapporté une prise alimentaire similaire entre les souris ERKO et les souris contrôles, mais une réduction de 11% ($P < 0,05$) de la dépense énergétique de repos (calorimétrie indirecte respiratoire) chez les souris ERKO en comparaison aux contrôles. Étant donné l'importance des UCP (uncoupling protein) du tissu adipeux brun dans la régulation de la dépense énergétique de repos chez le rongeur, Pedersen et al. (2001) ont étudié l'influence des estrogènes sur l'expression des UCP chez des rates Ovx nourries *ad libitum* et chez des rates OVX soumises à une restriction énergétique basée sur le gain de poids de rates intactes.

Indépendamment de la prise alimentaire, l'Ovx a été associée à une réduction d'environ 50% ($P < 0,01$) de l'expression des UCP1 du tissu adipeux brun en comparaison aux contrôles. Les auteurs de l'étude ont associé le déficit estrogénique à une réduction de l'expression des UCP du tissu adipeux brun, et le gain de poids de l'Ovx à une diminution de la dépense énergétique de repos. Cependant, une étude antérieure de Richard (1986) n'a rapporté aucune différence dans la dépense énergétique de repos des rates Ovx en comparaison aux contrôles et l'auteur a conclu que le gain de poids de l'Ovx repose principalement sur l'augmentation de la prise alimentaire.

1.2.3.1.2.1. Sensibilité à la leptine

Les estrogènes et la leptine semblent coopérer dans la régulation de l'homéostasie énergétique via des circuits centraux à la fois complémentaires et redondants (Gao et Horvath 2008). En effet, les récepteurs estrogéniques et leptinémiques sont colocalisés dans les neurones hypothalamiques des régions impliquées dans la régulation de la balance énergétique, dont les noyaux arqué et paraventriculaire, de même que l'aire ventromédiale. Dans ces régions, les estrogènes comme la leptine stimulent l'activité des neurones POMC tout en inhibant la libération du NPY. De plus, il semble que la présence des estrogènes facilite l'action centrale de la leptine et le retrait de l'action estrogénique a été associé à une perte de sensibilité pour la leptine. Suite à l'administration intraventriculaire de leptine (0.5 – 3.5 μg), Clegg et al. (2006) ont montré une réduction significative ($P < 0.05$) de la prise alimentaire et du poids corporel chez des rates intactes, alors que les rates Ovx sont demeurées insensibles à ces effets (Figure 17). L'administration d'estradiol aux rates Ovx a rétabli la sensibilité centrale à la leptine de façon comparable à celle des contrôles. De même, Ainslie et al. (2001) ont rapporté une stimulation moindre de l'activité physique volontaire en réponse à des injections intracérébroventriculaires de leptine (0.5 - 3 μg) chez des rates Ovx en comparaison à des rates intactes (Figure 18). Ils ont aussi associé la prise d'adiposité de l'Ovx à une perte de sensibilité à la leptine.

Les estrogènes et la leptine régulent également leur production respective. Chez la rate comme chez la femme, l'élévation cyclique des concentrations plasmatiques d'estrogènes

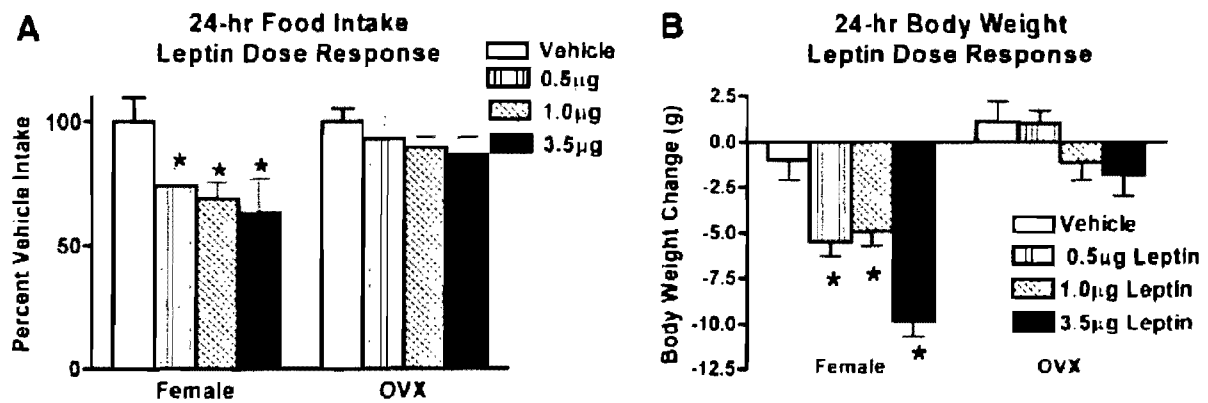


Figure 17. Diminution de l'effet anorexigène de la leptine par l'Ovx. Des femelles intactes ($n = 18$) et Ovx ($n = 20$) ont reçu des injections intraventriculaires de leptine ou de saline. A) Effet des injections sur la prise alimentaire et B) sur le poids corporel. * $P < 0,05$. Tiré de Clegg et al. (2006).

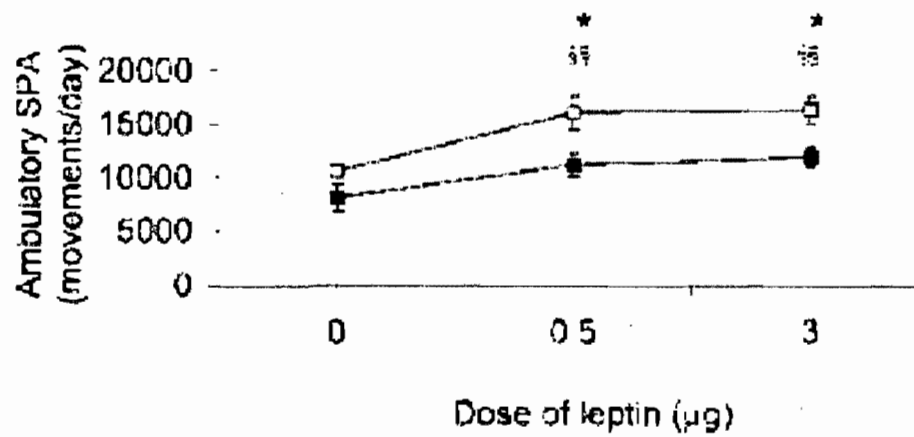


Figure 18. Effet d'une injection intracérébroventriculaire de saline ou de leptine (0,5µg ou 3µg) sur l'activité physique volontaire des rates intactes et Ovx sur une période de 17h. Carrés ouverts : femelles intactes; carrés fermés : femelles Ovx ($n = 8/\text{groupe}$). * $P < 0,05$ Ovx vs intact; $\xi\xi P < 0,005$ injections de leptine vs saline chez les rates intactes. Tiré de Ainslie et al. (2001).

stimule l'expression des transcrits *ob* dans le tissu adipeux, de même que la sécrétion plasmatique de leptine (Mannucci et al. 1998, Tanaka et al. 2001). Inversement, l'Ovx a été associée à une diminution de 23% ($P < 0,05$) de l'expression hypothalamique des transcrits *Ob-RL*, de même qu'à une diminution de 50% ($P < 0,01$) de l'expression adipocytaire des transcrits *ob* (Figure 19) (Kimura et al. 2002). Les concentrations plasmatiques de leptine sont tout de même généralement élevées chez les rates Ovx à cause du gain d'adiposité induit par le retrait de l'action estrogénique (Ainslie et al. 2001, Clegg et al. 2006). Bien que des contradictions existent dans la littérature quant aux interactions entre les estrogènes et la leptine, les observations présentées dans cette section mettent en évidence un autre mécanisme par lequel les estrogènes contribuent à la régulation de l'homéostasie énergétique.

1.2.4. *Influence du retrait de l'action estrogénique sur les voies hépatiques de synthèse et d'oxydation des lipides*

De la même manière que les gains de poids et d'adiposité induits par l'Ovx ne sont que partiellement prévenus par la restriction énergétique, différentes observations indiquent que l'accumulation hépatique de TAG associée au déficit estrogénique ne résulte pas exclusivement d'une diminution de l'action estrogénique centrale (Roy et Wade 1977). Effectivement, le retrait de l'action estrogénique semble conduire à une stimulation des processus lipogéniques et à une inhibition des processus oxydatifs intra-hépatiques.

1.2.4.1. *Médiateurs moléculaires de la lipogenèse hépatique*

D'Eon et al. (2005) ont investigué la contribution de l'action estrogénique à la régulation moléculaire des processus lipogéniques hépatiques chez des souris Ovx comparées à un groupe contrôle de souris Ovx-E₂. Les souris Ovx ont été soumises à une restriction énergétique basée sur la prise alimentaire des souris contrôles pour éviter l'effet confondant de l'hyperphagie de l'Ovx sur l'expression des gènes lipogéniques hépatiques. Les résultats de l'étude ont montré une diminution de 80 % ($P < 0,01$) de l'expression de SREBP-1c et des gènes lipogéniques qu'il régule, i.e. la FAS (60%; $P < 0,05$) et l'ACC-1 (40%; $P < 0,05$) par la supplémentation estrogénique chez les rates Ovx (Figure 20). Il est probable que l'effet répresseur des estrogènes sur l'expression des

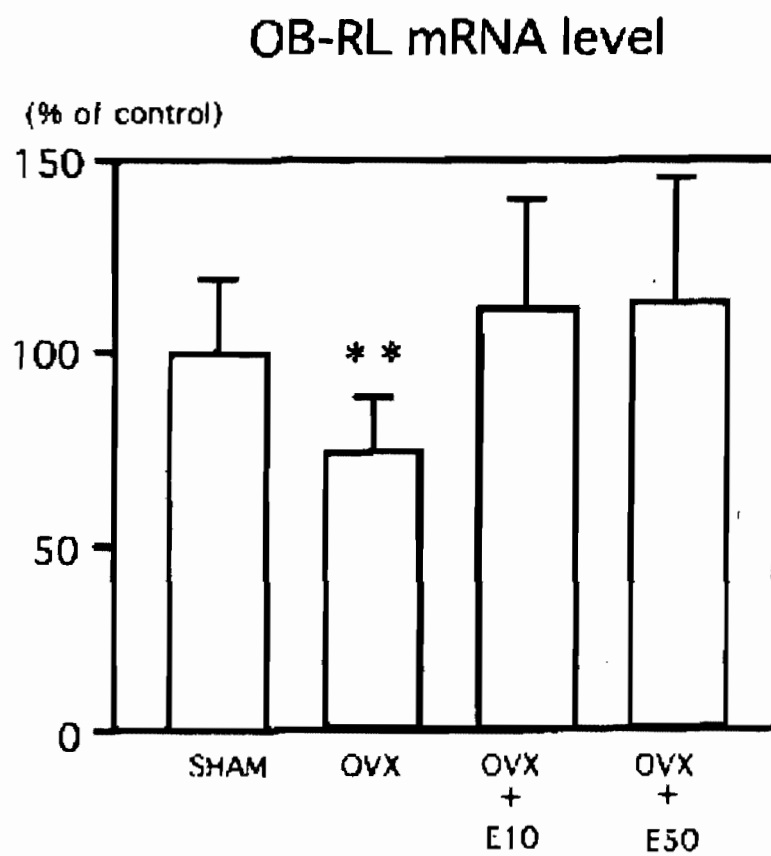


Figure 19. Influence de l'Ovx et de l'administration de 17β -estradiol sur l'expression des transcrits OB-RL dans l'hypothalamus chez des rates. ** $P < 0,05$ Sham vs Ovx. Tiré de Kimura et al. (2002)

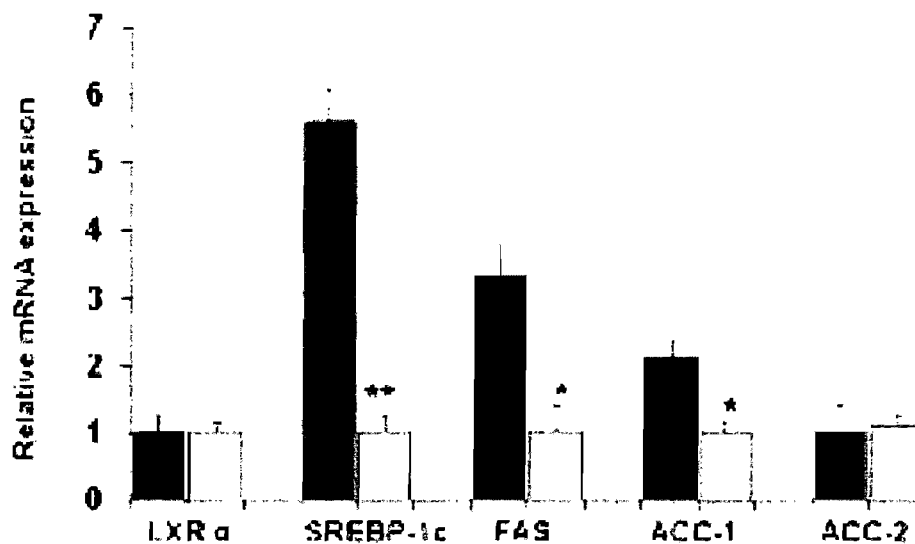


Figure 20. Prévention de l'accumulation intracellulaire de TAG dans le foie par la régulation négative de gènes lipogéniques par les estrogènes (RT-PCR). Les estrogènes diminuent l'expression de SREBP-1c et des gènes lipogéniques qu'il régule. Barres pleines : Ovx; Barres ouvertes : Ovx-E₂ ($n = 5/\text{groupe}$). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$. LXRα : liver X receptor alpha; SREBP-1c : sterol regulatory element-binding protein-1c; FAS : fatty acid synthase; ACC : acetyl-CoA carboxylase. Tiré de d'Eon et al. (2005).

gènes lipogéniques hépatiques passe par un ERE sur le promoteur du gène de SREBP-1c et ne résulte pas uniquement d'un effet indirect de la supplémentation estrogénique sur la diminution des concentrations d'insuline (Bajic et al. 2003). Bien que Lundholm et al. (2004) aient aussi identifié un ERE spécifiquement inhibé par les estrogènes sur le gène LXR dans le tissu adipeux, d'Eon et al. (2005) n'ont pas observé d'effet suppresseur de la supplémentation estrogénique sur l'expression hépatique de LXR. Enfin, Hewitt et al. (2004) ont aussi rapporté une augmentation de l'expression hépatique de la FAS chez les souris ArKO en comparaison aux souris contrôles et une correction de cet effet par une supplémentation estrogénique.

L'effet protecteur des estrogènes sur l'accumulation hépatique des lipides a également été montré suite à la consommation de diètes riches en protéines de soja, qui contiennent des isoflavones ayant certaines propriétés estrogéniques. Aoki et al. (2006) ont rapporté que la consommation d'une diète riche en isolat de protéine de soja (20g/100g) chez le rat conduisait à une diminution de 60% ($P < 0,05$) des transcrits hépatiques de l'ACC-1, de même qu'à une réduction de 70% ($P < 0,001$) du contenu hépatique en TAG. Cet effet semble être indépendant de l'activation de SREBP-1c et impliquerait possiblement l'activation transcriptionnelle d'un autre facteur de transcription nucléaire. Des résultats similaires ont été obtenus par Xiao et al. (2006).

1.2.4.2. *Médiateurs moléculaires de l'oxydation β hépatique des acides gras*

Deux études conduites par le groupe de Shizuta ont investigué le rôle des estrogènes dans la régulation des médiateurs moléculaires hépatiques de l'oxydation des acides gras (Nemoto et al. 2000, Toda et al. 2001). Les auteurs de ces études ont montré, chez les souris ArKO mâles, que la SH est associée à la suppression de l'expression des transcrits et de l'activité des enzymes impliquées dans les oxydations β peroxysomale et mitochondriale des acides gras (Figures 21 et 22). Les auteurs de ces études ont conclu à la nécessité de l'activité estrogénique pour préserver l'expression constitutive des gènes impliqués dans l'oxydation β des acides gras au niveau du foie.

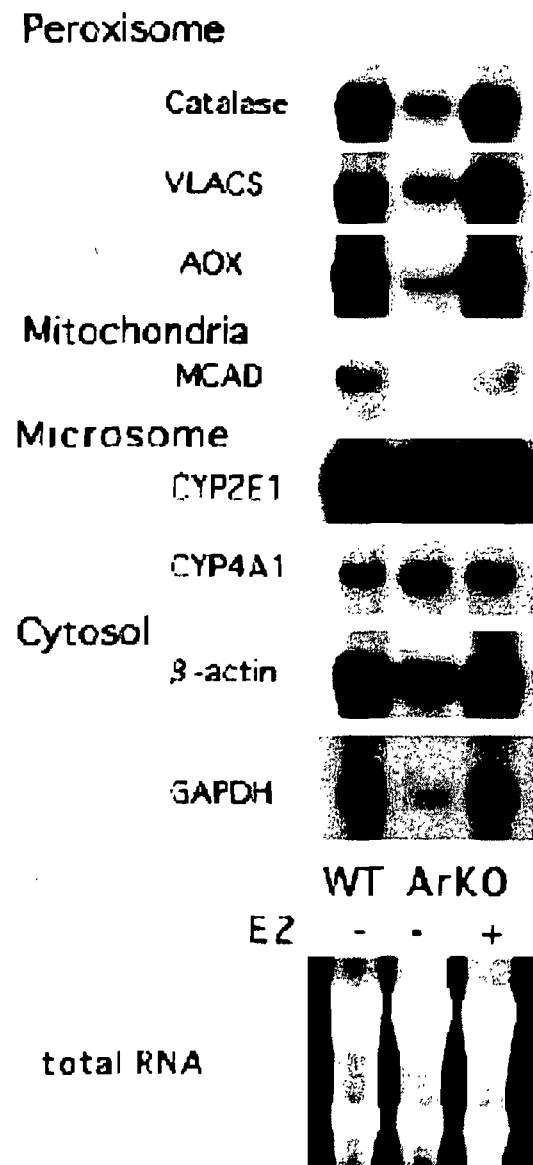


Figure 21. Expression des gènes oxydatifs dans le foie des souris ArKO (Northern Blot). Les ARN cellulaires totaux ont été extraits du foie des souris contrôles (WT) ou ArKO traitées ou non avec E₂. Présentation des enzymes essentielles pour les oxydations β mitochondriale et peroxysomale. Des quantités équivalentes d'ARN totaux ont été utilisées pour ces analyses. Tiré de Nemoto et al. (2000).

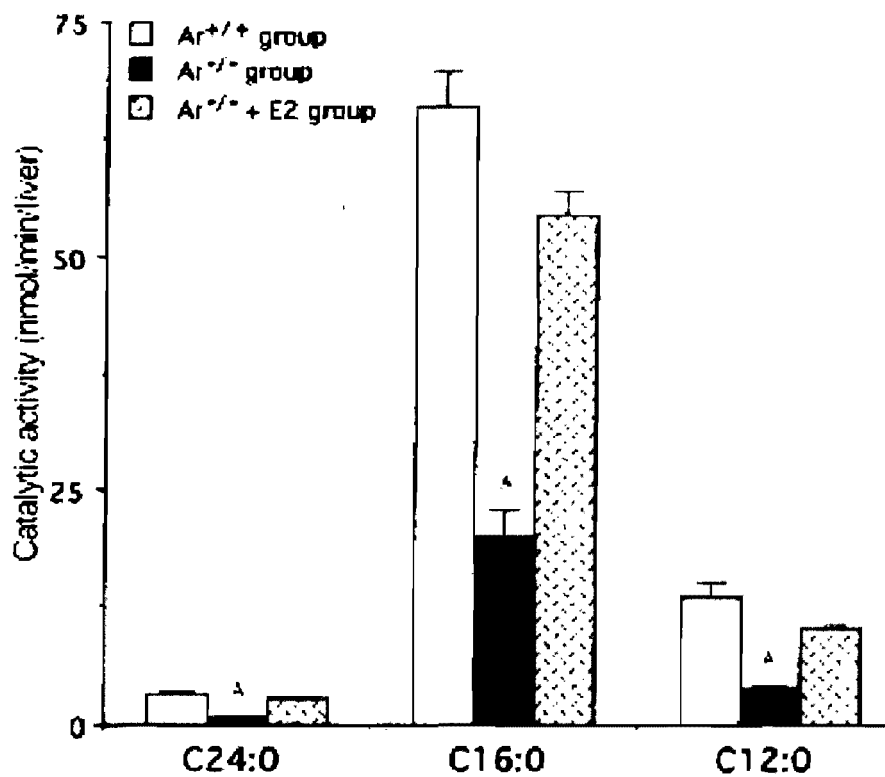


Figure 22. Altération de l'activité de l'oxydation β des acides gras chez les souris ArKO. L'acide tétracosanoïque (C24:0) a été utilisé comme substrat pour évaluer la capacité de l'oxydation β peroxysomale, alors que les acides palmitique (C16:0) et laurique (C12:0) ont été utilisés comme substrats pour évaluer la capacité de l'oxydation β mitochondriale. $n = 6/\text{groupe}$; ^A $P < 0,001$ Contrôles vs ArKO. Tiré de Nemoto et al. (2000).

La littérature scientifique n'est pas particulièrement abondante d'information sur la régulation des systèmes oxydatifs hépatiques par les estrogènes. Cependant, les résultats d'études qui ont examiné l'effet de l'action estrogénique sur les systèmes oxydatifs du muscle squelettique confirment l'effet stimulateur des estrogènes sur l'utilisation tissulaire des lipides. Campbell et al. (2001, 2003) ont montré une diminution d'environ 60% ($P < 0,05$) des transcrits et de la protéine de PPAR α au niveau du muscle gastrocnémien, qui s'est reflétée par une diminution de l'expression et de l'activité des gènes d'enzymes oxydatives sous le contrôle de PPAR α , i.e. CPT-I, β -HAD (β -3-hydroxyacyl CoA) et PDK4 (pyruvate dehydrogenase kinase) chez des rates Ovx en comparaison à des rates contrôles. Dans cette étude, une supplémentation estrogénique a stimulé l'expression de PPAR α et des enzymes oxydatives qu'il régule (Figure 23). De plus, l'effet stimulateur de la génistéine – un isoflavone – sur l'expression de PPAR α a été montré sur des hépatocytes en culture (HepG2) et sur des hépatocytes isolés en provenance de rats obèses (Zucker) (Kim et al. 2004, Mezei et al. 2003).

L'effet stimulateur des estrogènes sur l'oxydation des lipides a également été rapporté chez des femmes post-ménopausées, pour lesquelles l'hormonothérapie estrogénique a été associée à une augmentation de la consommation d'oxygène et de l'utilisation des acides gras dans le myocarde (tomographie par émission de positrons) en comparaison aux femmes non supplémentées en estrogènes (Herrero et al. 2005).

1.2.5. Régulation de la voie estrogénique

1.2.5.1. Régulation hormonale du récepteur estrogénique au niveau du foie

Différentes fonctions hépatiques sont sous la gouverne d'un mécanisme estrogénique dépendant de ER α , le seul isoforme du récepteur estrogénique exprimé au niveau du foie (Kuipper et al. 1997). La synthèse de l'angiotensinogène, de plusieurs facteurs de coagulation, du récepteur LDL (low density lipoprotein), de même que l'expression de certains facteurs de transcription et d'enzymes du métabolisme hépatique des lipides répondent à l'action estrogénique (D'Eon et al. 2005, Farsetti et al. 1995, Jones et al.

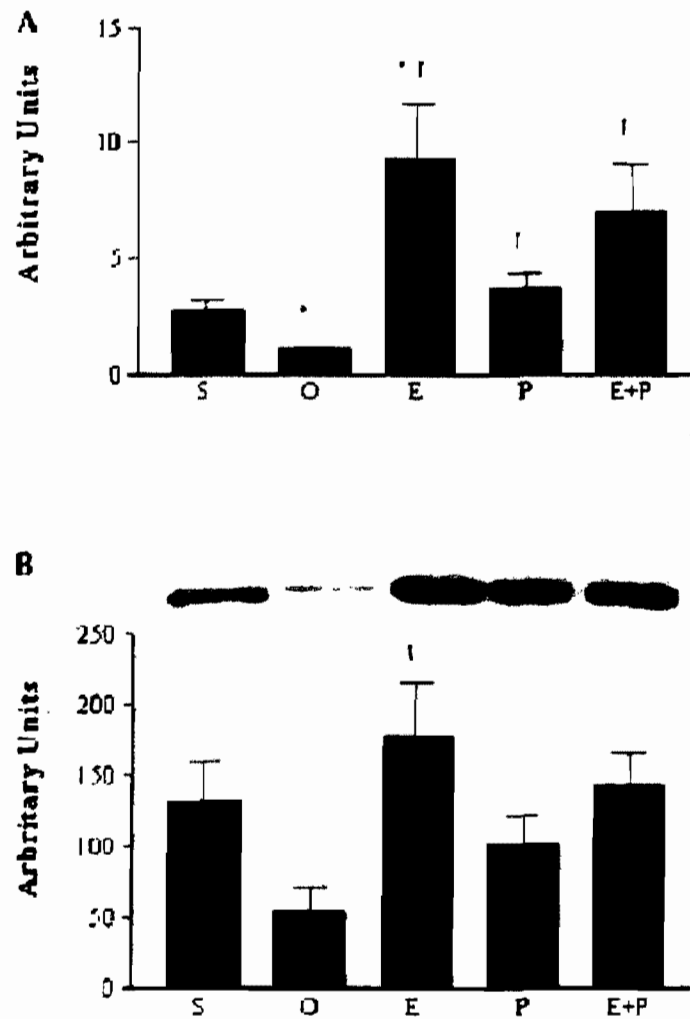


Figure 23. Effet de l'Ovx et des traitements hormonaux (E₂; Progestérone; E₂ + progestérone) sur l'abondance A) des transcrits et B) de la protéine de PPARα dans le gastrocnémus rouge chez la rate. * $P < 0,05$ vs Sham; ↑ $P < 0,05$ vs Ovx. Tiré de Campbell et al. (2003).

2002, Klett et al. 1992, Stavreus-Evers et al. 2001). Étant donné l'importance du maintien de ces fonctions, plusieurs mécanismes de régulation assurent l'intégrité de ER α hépatique. L'hormone de croissance (GH) est le principal facteur qui régule l'expression hépatique de ER α , bien que les hormones thyroïdiennes et les glucocorticoïdes contribuent au maintien de son contenu hépatique (Freyschuss et al. 1994, Norstedt et al. 1981, Stavreus-Evers et al. 1997). Le modèle Ovx a permis de montrer que les concentrations endogènes d'estradiol répriment le contenu hépatique de ER α (Dickson et al. 1979, Eriksson et al. 1982), alors que des concentrations supraphysiologiques d'estradiol par administration exogène ou lors de la grossesse stimulent sa synthèse (Lax et al. 1983, Marr et al. 1980, Staels et al. 1990). Toutefois, les variations des concentrations plasmatiques d'estradiol associées au cycle ovarien n'affectent pas le contenu hépatique de ER α contrairement aux variations rapportées au niveau de l'utérus (Lax et al. 1983, Marr et al. 1980, Stavreus-Evers 1997). Ainsi, la régulation de l'expression de ER dépend du tissu qui l'exprime, en plus d'être influencée par plusieurs facteurs.

1.2.5.1.1. Effet de l'entraînement en endurance sur la régulation de l'expression du récepteur estrogénique

L'entraînement en endurance fait partie des facteurs qui affectent l'expression du récepteur estrogénique, bien que l'information disponible à cet égard soit limitée au muscle squelettique (Lemoine et al. 2002a, Lemoine et al. 2002b, Wiik et al.). Lemoine et al. (2002b) ont rapporté une augmentation des transcrits de ER α dans le muscle gastrocnémien, une diminution de l'expression de ER α dans le muscle extensor digitorum longus et aucune variation des transcrits de ER α dans le muscle soléaire chez des rates soumises à un programme d'entraînement en endurance de 7 semaines (Figures 24 et 25). Ces résultats indiquent que l'entraînement affecte l'expression de ER α de façon spécifique au type de fibre musculaire. Les auteurs de l'étude ont expliqué ce phénomène par une possible autorégulation de l'expression de ER α spécifique à chaque type de fibre musculaire. De plus, Lemoine et al. (2002a) ont montré que les effets de l'entraînement sur l'expression de ER α au niveau du muscle squelettique sont observés exclusivement chez les femelles.

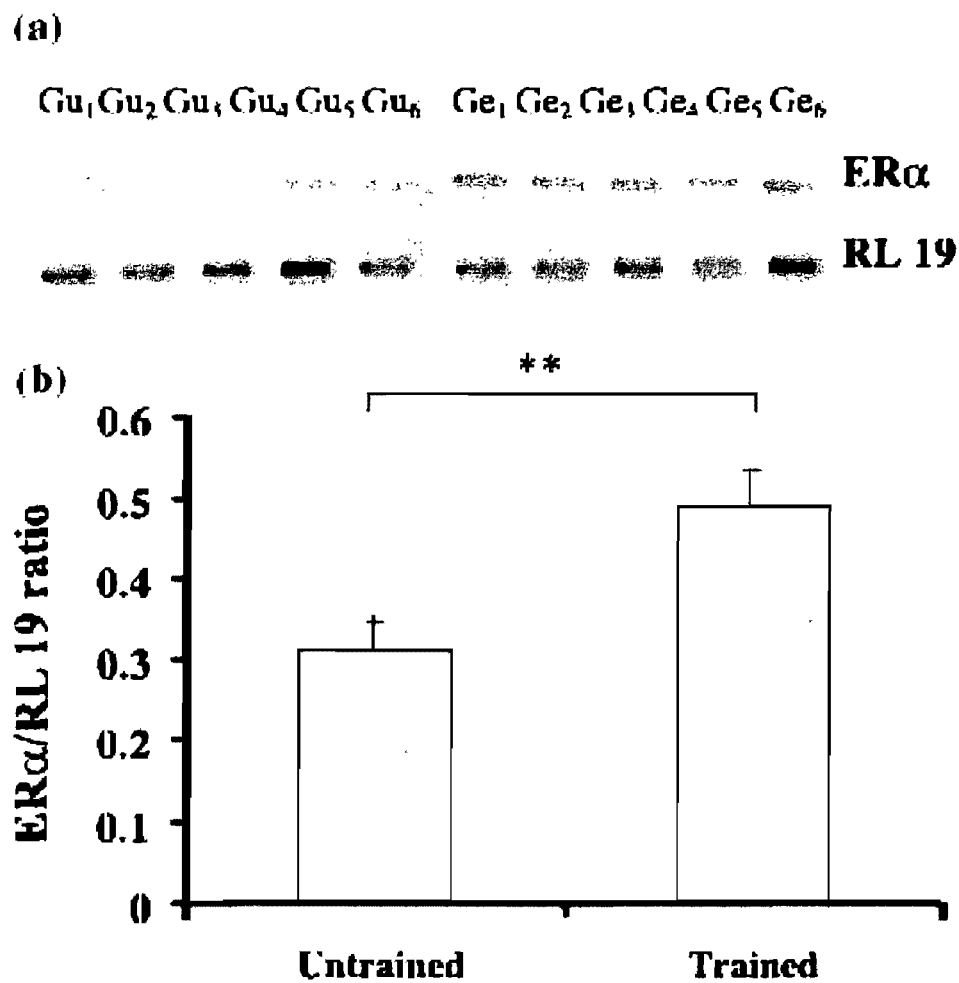


Figure 24. (a) Produits du RT-PCR pour ER α et RL19 dans le muscle gastrocnémien. (b) Effet de l'entraînement en endurance sur l'abondance des ARNm de ER α dans le muscle gastrocnémien des rates non-entraînées (Untrained; $n = 6$) et entraînées (trained; $n=6$). ** $P < 0,01$. Tiré de Lemoine et al. (2002b).

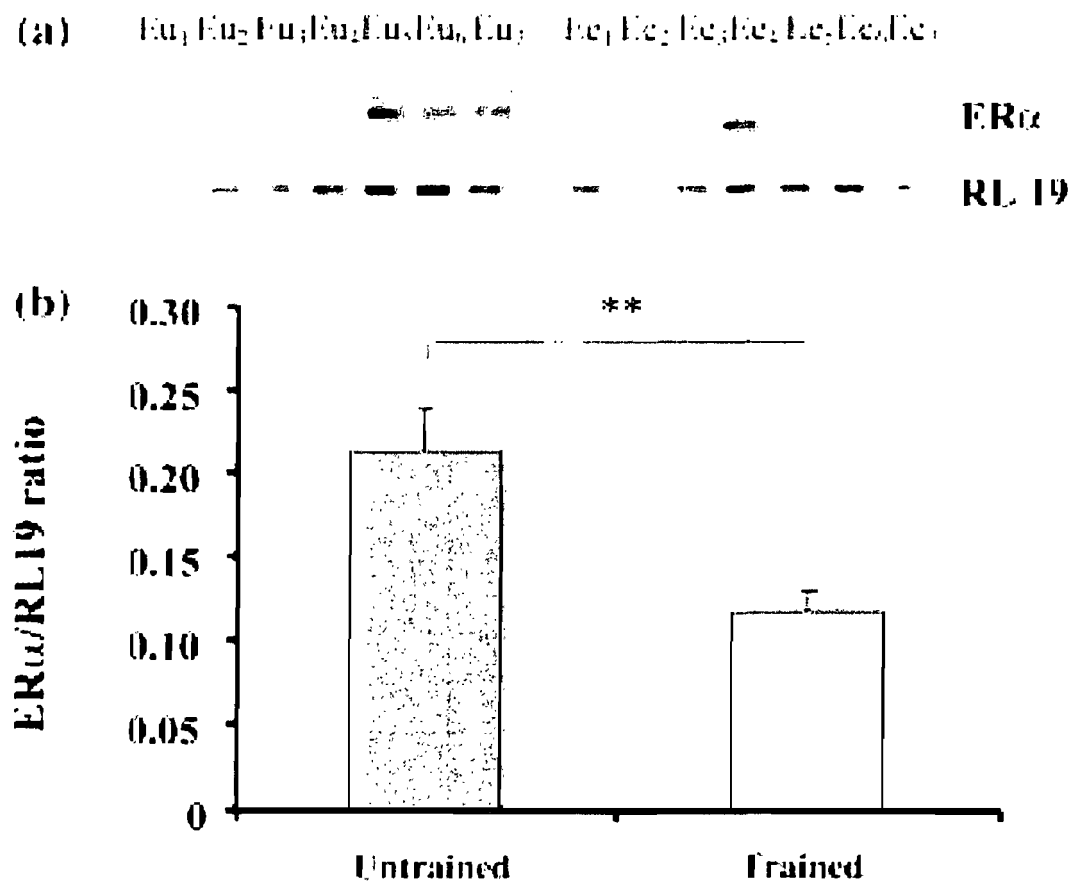


Figure 25. (a) Produits du RT-PCR pour ER α et RL19 dans le muscle extensor digitorum longus. (b) Effet de l'entraînement en endurance sur l'abondance des ARNm de ER α dans le muscle extensor digitorum longus des rates non-entraînées (Untrained; $n = 7$) et entraînées (trained; $n = 7$). ** $P < 0,01$. Tiré de Lemoine et al. (2002b).

L'influence de l'entraînement en endurance ou d'un état d'entraînement sur l'expression de ER a également été rapportée chez l'homme. Une étude conduite par Wiik et al. (2005) a rapporté une augmentation jusqu'à cinq fois plus élevée de l'abondance des transcrits de ER α et ER β dans le muscle vastus lateralis chez des hommes entraînés en endurance en comparaison à des hommes modérément actifs.

Les résultats de ces études suggèrent que certaines adaptations d'entraînement résultent d'une altération de la voie estrogénique. À cet égard, l'action estrogénique et l'exercice physique agissent de façon similaire sur certaines fonctions biologiques, comme par exemple l'amélioration du profil lipidique du plasma et de la fonction endothéliale (Mendelsohn 2002). La stimulation de la biogenèse mitochondriale est une adaptation d'entraînement qui peut aussi être médiée par un mécanisme dépendant de ER dans le muscle squelettique, ce qui pourrait expliquer les adaptations de l'expression de ER en réponse à l'exercice (Wiik et al. 2005).

1.3. Objectifs et hypothèses des études de la thèse

Les objectifs et hypothèses des études de la thèse ont été posés pour mieux comprendre l'implication du retrait de l'action estrogénique dans le développement de la SH à la lumière de l'état des connaissances au moment où ces études ont été élaborées.

L'objectif de l'étude 1 était de déterminer la cinétique d'infiltration lipidique du foie sur une période de 13 semaines chez des rates Ovx, de même que l'impact d'une diète riche en lipides (42% de l'énergie) sur cette réponse. D'une part, nous voulions comparer le patron d'infiltration lipidique du foie des rates Ovx à celui rapporté par Gauthier et al. (2006) chez des rates intactes. D'autre part, nous voulions observer l'effet de la superposition de deux stimuli d'induction de la SH, soit le retrait de l'action estrogénique et la diète riche en lipides, sur la cinétique d'accumulation hépatique de TAG.

Les objectifs des études 2 et 3 ont été posés dans la continuité de l'étude 1. L'étude 2 a été conduite pour investiguer l'effet du déficit estrogénique sur l'expression de PPAR α , SREBP-1c et SCD-1 au niveau du foie des rates Ovx. L'effet du déficit estrogénique sur

l'expression de PPAR α au niveau du foie n'avait été rapporté que chez les souris ArKO par les études du groupe de Shizuta, et l'effet du retrait de l'action estrogénique sur l'expression hépatique de SREBP-1c et SCD-1 n'était pas documenté. L'objectif de l'étude 3 était de déterminer le taux d'oxydation hépatique des acides gras, basé sur l'étude de Huang et al. (2006) chez des rats mâles obèses. Nous avons émis l'hypothèse que la résistance hépatique à la leptine pouvait être un mécanisme par lequel les rates Ovx accumulent des lipides dans le foie.

Enfin, l'objectif de l'étude 4 était de documenter l'effet d'un état d'entraînement en endurance sur l'expression hépatique de ER α et sur l'expression des deux isoformes de ER au niveau du coeur. Étant donné que les seules indications d'un effet d'entraînement sur l'expression de ER provenaient des études de Lemoine et Wiik au niveau du muscle squelettique, nous voulions vérifier si un état d'entraînement pouvait également affecter l'expression de ER dans deux autres tissus métaboliquement actifs, soit le foie et le coeur.

2. Chapitre 2 : Études expérimentales

2.1 Étude 1

Titre

Time course of liver lipid infiltration in ovariectomized rats : Impact of a high-fat diet.

Auteurs

Amélie Paquette, Motoo Shinoda, Rémi Rabasa-Lhoret, Denis Prud'homme et Jean-Marc Lavoie

Journal

Maturitas 58 : 182-190, 2007.

Time course of liver lipid infiltration in ovariectomized rats: impact of a high-fat diet.

Amélie Paquette¹, Motoo Shinoda ², Rémi Rabasa Lhoret³, Denis Prud'homme⁴, and Jean-Marc Lavoie¹

¹Department of kinesiology, University of Montreal, Montreal, Canada


²Dokkyo Medical University, Laboratory Animal Research Center, Mibu-Machi, Tochigi 321-0293, Japan

³Department of nutrition, University of Montreal, Montreal, Canada

⁴School of Human Kinetics, University of Ottawa, Ottawa, Ontario, Canada

Running title: Liver lipid infiltration in ovariectomized rats

Mailing proofs: Amelie Paquette
Department of kinesiology
University of Montreal
C.P. 6128, Succ. centre-ville
Montreal (Quebec) Canada H3C 3J7
Tel: (514) 343-7044
Fax: (514) 343-2181

e-mail: 

Abstract

Objectives: The present study was undertaken to determine the time course of liver lipid infiltration in ovariectomized (Ovx) rats and the impact of high-fat (HF; 42% kJ) feeding on this response.

Methods: In a first step, Ovx rats were compared to sham-operated (Sham) and Ovx rats supplemented with 17 β -estradiol (OvxE2) to evaluate the effect of estrogen removal. In a second time, Ovx rats fed a HF diet (OvxHf) were compared with normally fed Ovx rats. Animals were killed after 3, 8, and 13 wk of their respective treatment ($n = 8$ rats/group). We measured liver triacylglycerol (TAG) content, fat pad mass, and several other plasma parameters.

Results: Ovariectomy resulted in the typical increase in energy intake and body weight. Liver TAG accumulation was 35, 43, and 99% higher in Ovx than in Sham rats after 3, 8, and 13 wk respectively. The ovariectomy-induced liver lipid infiltration was completely prevented by estrogen replacement. On the opposite, plasma TAG concentrations were lower in Ovx than in Sham and OvxE2 rats. HF feeding in Ovx rats resulted in a significant ($P < 0.05$; 38 vs 22 mg/g at 13-wk) accumulation of fat in liver as compared to normally fed Ovx rats.

Conclusions: Ovariectomy results in a progressive accumulation of fat in liver over a 13-wk period. In addition, HF feeding in Ovx rats lead to an even more severe liver lipid infiltration. These data indicate that the absence of estrogens in rat favours fat accretion in liver, which is highly amplified by a HF diet.

Key words: estrogens, hepatic steatosis, menopause, intra-abdominal fat, plasma triacylglycerols

Introduction

Several lines of evidence indicate that estrogens are important regulators of lipid homeostasis [1-4]. Previous studies have shown prevalence for a more atherogenic lipid profile in postmenopausal women, who tend to have higher LDL cholesterol and triacylglycerol levels, elevated small dense LDL particles, and lower HDL cholesterol levels compared with premenopausal women [5, 6]. Progressive withdrawal of estrogens during peri-menopause has also been associated with many features of the metabolic syndrome, including a shift toward central fat accumulation, insulin resistance, hyperinsulinemia, as well as the deteriorations of the blood lipid profile [5, 6]. Among the multifactorial causes that lead to the metabolic syndrome, central obesity and insulin resistance are the most common associated factors [7]. Nevertheless, menopause itself was found as a risk factor for the metabolic syndrome, independently of the influence of estrogen deficiency on central obesity in nondiabetic women [7].

In recent years, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) has been identified as a problem among obese individuals and has been recognized as an integral part of the metabolic syndrome [8-11]. In a study that included over 800 women aged 40-59 years, it was shown that the menopausal status is associated with hepatic steatosis [12]. These findings are consistent with previous reports showing that hepatic steatosis was twice as common in postmenopausal as in premenopausal women, suggesting that estrogen deficiency in postmenopausal women may also play a role in the development of NAFLD [13, 14]. Therefore, the impact of the progressive decrease in plasma estrogens levels on liver lipid infiltration is a new concern that must be characterized to better understand its metabolic implications for postmenopausal women.

Animal studies using different models of estrogen deficiency have led to somewhat intriguing results of liver lipid infiltration. For instance, male and female aromatase knockout (ArKO) mice develop obesity, but only the males present with hepatic steatosis [15, 16]. Similarly, estrogen receptor α knockout (ERKO) mice show increased hepatic triacylglycerol (TAG) concentrations in males but not in females [17]. In an early study [18], ovariectomy (Ovx) in female rats led to an accretion of total lipids in the liver but no change in the percentage of neutral lipids (TAG). Significant accumulation of liver TAG have been more recently reported in female Sprague-Dawley rats 3 wk after ovariectomy [19, 20]. Although these latter data indicate a clear increase of lipids in the liver on a short term basis (3 wk), they do not provide information on the time sequence of liver lipid infiltration over a longer term basis in Ovx rats.

Time course studies are useful to follow the evolution of metabolic disturbances associated with hormonal transitions which take place over a long term period, such as the menopause arrival in women [21]. This type of design facilitates the identification of potential mechanisms leading to different metabolic disorders, among which liver lipid infiltration. Such an approach has been used recently in our laboratory to better characterize liver lipid infiltration under high fat (HF) feeding [22, 23]. We found that HF diet-induced a rapid infiltration of lipids in the liver (1-2 wk), followed by a significant decrease in subsequent weeks (6-16 wk). In that study, we suggested that the liver acts rapidly to buffer the increased flux of lipids in circulation, this buffering effect being transitional since lipids are thereafter released by the liver into circulation. It is not known if estrogen deprivation in Ovx animals leads to such a transient pattern of liver lipid accretion over time. It is not known either the extent to which rats deprived of estrogens

accumulate lipids in the liver in response to a HF diet. In an attempt to better document the development of hepatic steatosis associated with estrogen deficiency, the first aim of the present study was to determine the time course of liver lipid infiltration in rats ovariectomized for 3, 8, and 13 wk. In addition, the extent and the time sequence of liver lipid infiltration in Ovx rats fed a diet high (42% kJ) in saturated fat were determined.

Methods

Animal care

Female Sprague-Dawley rats ($n = 96$) weighing 180-200g (8 wk of age) were obtained from Charles River (St-Constant, PQ, Canada) and housed individually. The 12:12-h light-dark cycle started at 6:00 AM and the room temperature was maintained at 20-23°C. Rats were given free access to usual pellet rat chow, referred to as the standard diet (12.5% fat; 63.2% carbohydrate; 24.3% protein; kJ, Agribands Purina Canada, Woodstock, ON) and tap water. All rats were treated similarly in terms of daily manipulations. The experiments described in this report were conducted according to the directives of the Canadian Council on Animal Care.

Groups

Two days after their arrival in our laboratory, rats were randomly divided into four groups: Sham-operation (Sham; $n = 24$), Ovariectomy (Ovx; $n = 24$), Ovariectomy with 17 β -estradiol replacement (Ovx-E2; $n = 24$), and Ovariectomy with high-fat (HF) feeding (Ovx-Hf; $n = 24$). The HF diet was provided in small pellets (42% fat; 36% carbohydrate, 22% protein; kJ, ICN Pharmaceutical, NY, USA). Body weight and food intake in g were monitored every other day.

Surgery

Animals were injected with antibiotics (Tribrissen 24%; 0.125 cc/kg sc) for seven days, beginning the day before surgery. Ovx was conducted according to the technique described by Robertson *et al.* [24]. For surgery, rats were anaesthetized with a mixture of

ketamine–xylazine (61.5-7.6 mg/kg, ip). For Ovx-E2 rats, a small 17β -estradiol pellet (1.5 mg; 0.025 mg/day) with a biodegradable carrier binder efficient for 90 days (Cat No. NE-121; Innovative Research of America, Sarasota, FL, USA) was placed subcutaneously between the shoulder blades. A placebo 90-day pellet containing the binding carrier only was used in all other rats (Cat No. NC-111). In each group, rats were randomly killed 3, 8, or 13 wk after the ovariectomy.

Sacrifice

Rats were killed between 08:00 and 11:00 AM. Food was removed from the cage 2-3 h before sacrifice. Immediately after complete anaesthesia (pentobarbital sodium; 50 mg/kg ip), the abdominal cavity was opened following the median line of the abdomen and ~5 mL of blood was collected from the abdominal vena cava (< 45s) into syringes pre-treated with ethylenediaminetetraacetic acid (15%; EDTA). Blood was centrifuged (3000 rpm; 4°C; 10 min; Beckman GPR Centrifuge), and several organs and tissues were removed in the following order: liver, uterus, mesenteric, urogenital, retroperitoneal and subcutaneous fat depots along with 6 skeletal muscles of the right limb (soleus, plantaris, medial and lateral gastrocnemius, tibialis, and extensor digitalis longus). The liver median lobe was freeze-clamped and used for triacylglycerol (TAG) determinations. The subcutaneous fat was removed from the region between the caudal border of the rib cage, the dorsal and ventral midlines of the body and the urogenital organs of the right side of the animal. All tissue samples were weighed (Mettler AE 100), immediately frozen in liquid nitrogen, and stored along with plasma samples at -78° C until analyses were performed.

Analytical procedures

Insulin concentrations were determined with a radioimmunoassay kit distributed by MEDICORP Laboratories (Montreal, PQ, Canada). Plasma glucose concentrations were determined with the use of a glucose analyser (Yellow Springs Instruments 2300, Yellow Springs, OH). Plasma FFA and β -hydroxybutyrate acid concentrations were determined with an enzymatic colorimetric assay available from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). Plasma glycerol and TAG concentrations were measured with an enzymatic colorimetric assay available from SIGMA (Saint Louis, Missouri, USA). Liver TAG concentrations were estimated from glycerol released after ethanolic KOH hydrolysis by using a commercial kit from SIGMA (Saint Louis, Missouri). Frayn and Maycock [25] have shown that omitting removal of phospholipids leads to only a $\pm 2\%$ error in the determination of liver TAG.

Statistical analysis

Values are expressed as means \pm S.E. Statistical analyses were performed by a two-way ANOVA for non-repeated measures design for two sets of data. In the first set, Sham, Ovx and OvxE2 rats were compared over time to evaluate the effect of estrogen removal. In the second set, Ovx and OvxHf rats were compared over time to evaluate the effect of HF feeding in Ovx rats. Fisher's post hoc test was used in the event of a significant ($P < 0.05$) ratio.

Results

The ovariectomy resulted in higher ($P < 0.05$) body weight, daily energy intake, and limb muscles weight as compared to Sham rats (Table 1). Intra-abdominal and subcutaneous fat accumulations were also significantly higher ($P < 0.05$) in Ovx than in Sham rats 13 wk (66%), and as soon as 3 wk (26%), respectively, after surgery. The Ovx-induced hyperphagia and weight gain (limb muscles and fat pads) was completely prevented by estrogen substitution. The HF diet in Ovx rats resulted in similar body weight, daily energy intake, limb muscles, and subcutaneous fat pad weights as compared to Ovx rats fed the standard diet (Table 1). However, the weight of the intra-abdominal fat depot was rapidly higher (64% at wk 3) following the HF feeding (OvxHf vs Ovx). All body composition parameters were higher ($P < 0.05$) with time, with the exception of energy intake. Uterus weight was significantly reduced ($P < 0.05$) in Ovx rats without estrogen replacement as compared to Sham rats, which confirms total ovariectomy.

Ovariectomy in rats led to higher ($P < 0.05$) liver TAG content compared to Sham rats as soon as 3 wk after the ovariectomy (35%) to reach levels 2-fold higher at the end of the experimental period (Fig. 1). Estrogen substitution completely prevented liver lipid accumulation. Liver lipid content was rapidly and substantially higher (2-fold; $P < 0.05$) throughout the 13 wk period when Ovx rats were fed the HF diet (OvxHf vs Ovx; Fig. 1).

Plasma TAG levels were lower ($P < 0.05$) in Ovx rats compared to Sham rats, and estrogen substitution restored plasma TAG concentrations to levels measured in Sham rats (Fig. 2). Interestingly, this response of plasma TAG levels revealed a picture somewhat opposite to what was observed with the liver TAG content. HF feeding in Ovx rats had no significant effect on plasma TAG concentrations compared to Ovx rats fed the

standard diet (Fig.2). Opposite to plasma TAG concentrations, there were no differences in plasma FFA levels between groups (Fig. 3). On the whole, plasma TAG and FFA levels were higher ($P < 0.05$) with time (Fig. 2-3).

There was no significant effect of ovariectomy and time on plasma insulin, glucose, glycerol, and β -hydroxybutyrate acid levels, with a few exceptions (Table 2). However, HF feeding in Ovx rats led to increased ($P < 0.05$) levels of plasma glucose and glycerol, and decreased ($P < 0.05$) concentrations of β -hydroxybutyrate acid as compared to Ovx rats fed the SD diet (Table 2). In absence of Sham rats fed the HF diet, results from previous works conducted in our laboratory using the same HF diet in intact female Sprague-Dawley rats of the same age are shown in Fig. 4. These previous data show lower % of liver fat accumulation than values observed in the present OvxHf rats, in addition of a non-continuous accumulation of lipids in the liver over time.

Discussion

The body composition changes associated with ovariectomy have been previously well characterized [26, 27]. The higher energy intake and the large accretion in body weight (fat pads and limb muscles) found in the present Ovx rats concord with earlier results [26, 27]. Our findings also indicate that HF feeding in Ovx rats is especially deleterious for body composition, since Ovx rats depicted a substantial increase in intra-abdominal fat pads compared to Ovx rats fed the standard diet, even if energy intake and body weight were similar.

The primary aim of the study was to better document the development of hepatic steatosis related to estrogen deficiency with time. We report 35, 43 and 99% higher liver lipid content 3, 8, and 13 wk after Ovx, respectively, when compared to Sham rats. This indicates a progressive increase in liver lipid infiltration following Ovx, which was prevented by estrogen supplementation. These findings, based on a time-dependant design, suggest that the accumulation of lipids in liver of postmenopausal women could be increased over several years. Such a continuous accumulation of lipids in liver was not observed in a recent study using HF diet to induce hepatic steatosis over a 16-wk period [22]. In that study, it was proposed that the liver acts as a lipid buffer largely increasing its lipid content in the early stage (2 wk) of HF feeding and decreasing it thereafter. It was then reported that such a transient HF diet-induced hepatic steatosis was closely related to the increased plasma FFA most likely due to the higher lipid content of the diet [22]. This pattern was not observed in the present study. Plasma FFA levels, as well as plasma glycerol concentrations, were not increased to a significant extent by the ovariectomy. This observation is in line with the finding that estrogens enhance adipocyte

lipolysis in the intra-abdominal depot [2, 28], which implies that adipocyte lipolysis is reduced in Ovx animals. In absence of evidence of a greater hepatic lipid uptake, our results suggest that estrogens act intra-hepatically, most likely as protective tools against liver lipid infiltration. The continuous accumulation of lipids in liver over time following estrogen deprivation suggests that lipid accumulation in liver is hardly reversible in this hormonal context.

A secondary aim of the study was to determine the time course and the extent of liver lipid infiltration in Ovx rats fed with a diet high (42% kJ) in saturated fat. Our results reveal a massive and steady accumulation of lipids (93, 108, and 73% higher after 3, 8, and 13 wk, respectively), as compared with normally fed Ovx rats. The difference in the time course and the extent of liver fat accumulation between Ovx and Sham rats submitted to the same HF diet is illustrated in Fig.4. From this comparison, it may be hypothesized that an absence of a normal estrogenic status synergistically favours fat accumulation in liver when combined to HF feeding, which is maintained over time. The propensity of Ovx rats to accumulate lipids in the liver is supported by the observation that neither plasma TAG nor plasma FFA levels were higher in OvxHf than in Ovx, whereas liver TAG levels were doubled. This indicates that a large part of the fat ingested in excess by Ovx rats was stored in the liver. On a clinical basis, it is tempting to associate this response in OvxHf rats with the second hit model put forward by Day and James [29] for the development of NAFLD. In the present case, the first hit would be the removal of estrogen action and the second, the increase in circulating lipids linked to HF feeding. This would lead to a more severe state of hepatic steatosis and maybe, steatohepatitis.

Comparisons between Ovx and rats without estrogen deficiency (Sham and OvxE2) reveal an inverse association between liver TAG and plasma TAG levels. Plasma TAG levels in Sham and OvxE2 rats were higher than levels measured in Ovx rats, while the opposite was observed for liver TAG content (Fig.1-2). A decrease in serum TAG has been previously observed in Ovx rats [30]. Several mechanisms can be put forth to explain the effects of estrogen deficiency on liver fat accumulation and its association with low plasma TAG levels. Among these mechanisms are the role of estrogens upon the liver lipoprotein synthetic system and the modulation of the expression of apolipoproteins. Estrogen treatments in animals and in humans have been shown to stimulate hepatic mRNA and synthesis of apolipoprotein B-100 involved in VLDL synthesis [2, 31-33]. Impaired liver VLDL secretion could explain how estrogen removal in Ovx rats results in TAG accumulation in the liver and in lower plasma TAG levels than in Sham and OvxE2 rats. However, the list of possible roles for estrogens in regard of hepatic lipid metabolism is longer. Examples are the antioxidant effects of estrogens, their influence on insulin action, their interference with the lipid peroxidative system, and their extrahepatic effects on white adipose tissues [1, 28, 34].

Liver fat accumulation has been reported to result in the development of insulin resistance [9]. There is no indication that the accumulation of fat in the liver and in the adipocytes of the present Ovx animals resulted in a perturbation of glucose metabolism as judged from the absence of changes in plasma insulin and glucose levels. It is not exclude, however, that such a perturbation may be demonstrated using a more precise technical approach such as the hyperinsulinemic-euglycemic clamp. Also, we measured

β -hydroxybutyrate acid concentrations as indicators of hepatic lipid oxidation, which was not influenced by estrogen removal or time, but only by HF feeding in Ovx rats.

In summary, estrogen deprivation by ovariectomy in rats resulted in a progressive accumulation of fat in the liver over a 13-wk period. Moreover, liver lipid infiltration in Ovx rats was massively enhanced by HF feeding. Plasma TAG levels showed an inverse relationship with liver TAG accumulation as values in Ovx animals are opposite to those measured in Sham and OvxE2 rats. On the whole, our findings demonstrate the importance of an intact estrogenic status to maintain normal levels of fat accumulation in liver, which seems especially sensitive to HF feeding in a context of estrogen deficiency. On a clinical point of view, the present data confirm recent findings in women showing that menopause is associated with the development of hepatic steatosis [12, 13]. They also imply that hepatic steatosis could be progressively increased over several years in postmenopausal women, especially when ingesting high-fat rich diets. This might contribute to the increased incidence of cardiovascular disease and diabetes with menopause.

Titles and legends to figures

Fig. 1. Liver triacylglycerols (TAG) content in Sham-operated (Sham), ovariectomized (Ovx), ovariectomized + 17 β -estradiol replacement (Ovx-E2), and ovariectomized + high-fat diet (OvxHf) rats after 3, 8 and 13 wk. Values are means \pm SE, $n=8$ rats/group. § Significantly different from corresponding Sham group: $P < 0.05$. * Significant difference between OvxE2 and Ovx groups: $P < 0.05$. + Significant difference between OvxHf and Ovx groups: $P < 0.05$. ^a Significantly different from corresponding values at wk 3: $P < 0.05$. ^b Significantly different from corresponding values at wk 8: $P < 0.05$.

Fig. 2. Plasma triacylglycerols (TAG) concentrations in Sham-operated (Sham), ovariectomized (Ovx), ovariectomized + 17 β -estradiol replacement (Ovx-E2), and ovariectomized + high-fat diet (OvxHf) rats after 3, 8 and 13 wks. Values are means \pm SE, $n=8$ rats/group. § Significantly different from corresponding Sham group: $P < 0.05$. * Significant difference between OvxE2 and Ovx groups: $P < 0.05$. + Significant difference between OvxHf and Ovx groups: $P < 0.05$. ^a Significantly different from corresponding values at wk 3: $P < 0.05$. ^b Significantly different from corresponding values at wk 8: $P < 0.05$.

Fig. 3. Plasma free fatty acids (FFA) concentrations in Sham-operated (Sham), ovariectomized (Ovx), ovariectomized + 17 β -estradiol replacement (Ovx-E2), and ovariectomized + high-fat diet (OvxHf) rats after 3, 8 and 13 wks. Values are means \pm SE, $n=8$ rats/group. § Significantly different from corresponding Sham group: $P < 0.05$. *

Significant difference between OvxE2 and Ovx groups: $P < 0.05$. + Significant difference between OvxHf and Ovx groups: $P < 0.05$. ^a Significantly different from corresponding values at wk 3: $P < 0.05$. ^b Significantly different from corresponding values at wk 8: $P < 0.05$.

Fig. 4. Liver triacylglycerol (TAG) concentrations from other studies measured in intact rats of the same age and submitted to the same high-fat diet (42% fat as energy) as the ovariectomized rats of the present study. Values are means.

References

- [1] Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med* 1999; 340: 1801-1811.
- [2] D'Eon TM, Souza SC, Aronovitz M, Obin MS, Fried SK, Greenberg AS. Estrogen regulation of adiposity and fuel partitioning. *J Biol Chem* 2005; 280: 35983-35991.
- [3] Jones ME, Thorburn AW, Britt KL, Hewitt KN, Wreford NG, Proietto J, et al. Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 12735-12740.
- [4] Basdevant A. Steroids and lipid metabolism: mechanism of action. *Int J Fertil* 1992; 37 Supp 2: 93-97.
- [5] Carr MC. The emergence of the metabolic syndrome with menopause. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 2404-2411.
- [6] Schneider JG, Tompkins C, Blumenthal RS, Mora S. The metabolic syndrome in women. *Cardiol Rev* 2006; 14: 286-291.
- [7] Lin KC, Tsai ST, Kuo SC, Tsay SL, Chou P. Interrelationship between insulin resistance and menopause on the metabolic syndrome and its individual component among nondiabetic women in the Kinmen study. *Am J Med Sci* 2007; 333: 208-214.
- [8] Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001; 414: 799-806.
- [9] Seppala-Lindroos A, Vehkavaara S, Hakkinen AM, Goto T, Westerbacka J,

- Sovijarvi 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: 3023-3028.
- [10] Marchesini G, Marzocchi R, Agostini F, Bugianesi. Nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol* 2005; 16: 421-427.
- [11] Marceau P, Biron S, Hould F-S, Marceau S, Simard S, Thung SN, Kral JG. Liver pathology and the metabolic syndrome X in severe obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 1513-1517.
- [12] Völzke H, Schwarz S, Baumeister E, Wallaschofski H, Schwahn C, Grabe HJ, Kohlmann T, Dören M. Menopausal status and hepatic steatosis in a general female population. *Gut* 2007; 56: 594-595.
- [13] Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. Nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002; 122: 1649-1657.
- [14] Park SH, Jeon WK, Kim SH, Kim HJ, Park DI, Cho YK, Sung IK, Sohn CI, Keum DK, Kim BI. Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease among Korean adults. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 138-143.
- [15] Hewitt KN, Pratis K, Jones MEE, Simpson ER. Estrogen replacement reverses the hepatic steatosis phenotype in the male aromatase knockout mouse. *Endocrinology* 2004; 145:1842-1848.
- [16] Nemoto Y, Toda K, Ono M, Fujikawa-Adachi K, Saibara T, Onishi S, et al. Altered expression of fatty acid-metabolizing enzymes in aromatase-deficient mice. *J Clin Invest* 2000; 105: 1819-1825.
- [17] Lemieux C, Phaneuf D, Labrie F, Giguère V, Richard D, Deshaies Y. Estrogen

- receptor α -mediated adiposity-lowering and hypocholesterolemic actions of the selective estrogen receptor modulator acolbifene. *Int J Obes* 2005; 29: 1236-1244.
- [18] Mukherjea M, Biswas R. Effect of ovariectomy and replacement therapy on the tissue lipid pattern in rats. *Endokrinologie* 1975; 66: 113-121.
- [19] Deshaies Y, Dagnault A, Lalonde J, Richard D. Interaction of corticosterone and gonadal steroids on lipid deposition in the female rat. *Am J Physiol* 1997; 36: E355-E363.
- [20] Picard F, Deshaies Y, Lalonde J, Samson P, Labrie C, Bélanger A, Labrie F, Richard D. Effects of the estrogen antagonist EM-652.HCL on energy balance and lipid metabolism in ovariectomized rats. *Int J Obes* 2000; 24: 830-840.
- [21] McKinlay SM, Brambilla DJ, Posner JG. The normal menopause transition. *Maturitas* 1992; 14: 103-115.
- [22] Gauthier MS, Favier R, Lavoie JM. Time course of the development of non-alcoholic hepatic steatosis in response to high-fat diet-induced obesity in rats. *Br J Nutr* 2006; 95: 273-281.
- [23] Collin P, Chapados N, Dufresne E, Corriveau P, Imbeault P, Lavoie JM. Time course of changes in *in vitro* lipolysis of intra-abdominal fat depots in relation to high-fat diet-induced hepatic steatosis in rats. *Br J Nutr* 2006; 96: 268-275.
- [24] Robertson MC, Owens RE, Klindt J, Friesen HG. Ovariectomy leads to a rapid increase in rat placental lactogen secretion. *Endocrinology* 1984; 114: 1805-1811.
- [25] Frayn N, Maycock, PF. Skeletal muscle triacylglycerol in the rat : methods for sampling and measurement, and studies of biological variability. *J Lipid Res* 1980; 21: 139-144.

- [26] McElroy JF, Wade GN. Short- and long-term effects of ovariectomy on food intake, body weight, carcass composition, and brown adipose tissue in rats. *Physiol Behav* 1987; 39: 361-365.
- [27] Richard D. Effects of ovarian hormones on energy balance and brown adipose tissue thermogenesis. *Am J Physiol* 1986; 250: R245-249.
- [28] Giudicelly Y, Dieudonne MN, Lacasa D, Pasquier YN, Pecquery R. Modulation by sex hormones of the membranous transducing system regulating fatty acid mobilization in adipose tissue. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1993; 48: 91-100.
- [29] Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998; 114: 842-845.
- [30] Liu ML, Xu X, Rang WQ, Li YJ, Song HP. Influence of ovariectomy and 17 β -estradiol treatment on insulin sensitivity, lipid metabolism and post-ischemic cardiac function. *Int J Cardiol* 2004; 97: 485-493.
- [31] Krauss RM, Burkman RT. The metabolic impact of oral contraceptives. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 167: 1177-1184.
- [32] Schaefer EJ, Foster DM, Zech LA, Lindgren FT, Brewer BH, Levy RI. The effects of estrogen administration on plasma lipoprotein metabolism in premenopausal females. *J Clin Endocrinol Metab* 1983; 57: 262-267.
- [33] Srivastava RA, Tang J, Baumann D, Schonfeld G. Hormonal and nutritional stimuli modulate apolipoprotein B mRNA editing in mouse liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 188: 135-141.

- [34] Louet JF, LeMay C, Mauvais-Jarvis F. Antidiabetic actions of estrogen : insight from human and genetic mouse models. *Curr Atheroscler Rep* 2004; 6: 180-185.
- [35] Gauthier M-S, Couturier K, Latour J-G, Lavoie J-M. Concurrent exercise prevents high-fat-diet-induced macrovesicular hepatic steatosis. *J Appl Physiol* 2003; 94: 2127-2134.

Table 1 Body composition parameters in Sham-operated (Sham), ovariectomized (Ovx), ovariectomized + 17 β -estradiol replacement (OvxE2) and ovariectomized + high-fat diet (OvxHf) rats, at three different times after treatment beginning: 3, 8 and 13 wk. OvxHf rats are only compared to Ovx rats.

		Sham	Ovx	OvxE2	OvxHf
	Time (wks)				
Body Weight (g)	3	249 \pm 4	297 \pm 5 [§]	225 \pm 4 ^{§*}	297 \pm 7
	8	297 \pm 10 ^a	356 \pm 10 ^{§a}	243 \pm 6 ^{§**a}	378 \pm 14 ^a
	13	320 \pm 11 ^{ab}	402 \pm 15 ^{§ab}	299 \pm 12 ^{§*ab}	394 \pm 23 ^{ab}
Mean Energy Intake (kJ/day)	3	283 \pm 4	321 \pm 11 [§]	262 \pm 10 ^{§*}	345 \pm 12
	8	282 \pm 9	310 \pm 9 [§]	249 \pm 7 ^{§*}	325 \pm 15
	13	282 \pm 9	314 \pm 10 [§]	278 \pm 8 ^{§*}	294 \pm 14
Sum of Limb Muscles Weight (g)	3	2.35 \pm 0.02	2.65 \pm 0.07 [§]	2.19 \pm 0.05 ^{§*}	2.66 \pm 0.07
	8	2.73 \pm 0.05	3.33 \pm 0.11 ^{§a}	2.51 \pm 0.08 ^{§**a}	3.28 \pm 0.11 ^a
	13	3.04 \pm 0.08	3.44 \pm 0.07 ^{§ab}	2.90 \pm 0.07 ^{§*ab}	3.33 \pm 0.10 ^a
Sum of Intra-Abdominal Fat Depots Weight (g)	3	10 \pm 1	11 \pm 1.0	9 \pm 1*	18 \pm 2 ⁺
	8	21 \pm 2 ^a	25 \pm 2 ^a	13 \pm 1 ^{§*}	40 \pm 4 ^{+a}
	13	25 \pm 3 ^a	41 \pm 3 ^{§ab}	24 \pm 3 ^{*ab}	50 \pm 6 ^{+ab}
Subcutaneous Fat Depot Weight (g)	3	1.14 \pm 0.10	1.43 \pm 0.10 [§]	1.01 \pm 0.06*	1.75 \pm 0.24
	8	1.86 \pm 0.21	3.12 \pm 0.33 ^{§a}	1.38 \pm 0.19*	3.89 \pm 0.29 ^a
	13	2.34 \pm 0.39 ^a	5.29 \pm 0.76 ^{§ab}	2.35 \pm 0.37 ^{*ab}	5.72 \pm 1.05 ^{ab}
Uterus Weight (g)	3	0.60 \pm 0.06	0.12 \pm 0.01 [§]	0.92 \pm 0.10 ^{§*}	0.14 \pm 0.02
	8	0.56 \pm 0.05	0.10 \pm 0.01 [§]	0.95 \pm 0.06 ^{§*}	0.10 \pm 0.01 ^a
	13	0.69 \pm 0.07	0.10 \pm 0.01 [§]	0.66 \pm 0.05 ^{*ab}	0.09 \pm 0.01 ^a

Values are means \pm SE, $n=8$ rats/group. Statistical comparisons were made between Sham, Ovx and OvxE2 and between Ovx and OvxHf. \S Significantly different from corresponding Sham group: $P < 0.05$. * Significant difference between OvxE2 and Ovx groups: $P < 0.05$. + Significant difference between OvxHf and Ovx groups: $P < 0.05$. ^a Significantly different from corresponding values at wk 3: $P < 0.05$. ^b Significantly different from corresponding values at wk-8: $P < 0.05$.

Table 2 Plasma insulin, glucose, glycerol, and beta-hydroxybutyrate concentrations, in Sham-operated (Sham), ovariectomized (Ovx), ovariectomized + 17 β -estradiol replacement (OvxE2) and ovariectomized + high-fat diet (OvxHf) rats, at three different times after treatment beginning: 3, 8 and 13 wk. OvxHf rats are only compared to Ovx rats.

		Sham	Ovx	OvxE2	OvxHf
	Time (wks)				
Plasma Insulin (pM)	3	184 \pm 16	168 \pm 19	179 \pm 9	218 \pm 16
	8	151 \pm 13	224 \pm 8 ^{§a}	146 \pm 16*	210 \pm 9
	13	199 \pm 14 ^b	176 \pm 8 ^b	165 \pm 19	180 \pm 11 ^a
Plasma Glucose (mM)	3	8.0 \pm 0.3	8.6 \pm 0.2	6.8 \pm 0.3 ^{§*}	9.3 \pm 0.2 ⁺
	8	8.1 \pm 0.3	8.7 \pm 0.3	6.4 \pm 0.3 ^{§*}	9.3 \pm 0.5 ⁺
	13	7.6 \pm 0.2	7.7 \pm 0.2 ^{ab}	7.2 \pm 0.3	8.3 \pm 0.1 ^{+ab}
Plasma Glycerol (mM)	3	0.16 \pm 0.02	0.13 \pm 0.02	0.19 \pm 0.02	0.21 \pm 0.02 ⁺
	8	0.26 \pm 0.03 ^a	0.24 \pm 0.05 ^a	0.18 \pm 0.04 ^a	0.35 \pm 0.03 ^{+a}
	13	0.33 \pm 0.04 ^{ab}	0.35 \pm 0.02 ^{ab}	0.27 \pm 0.03 ^{ab}	0.44 \pm 0.06 ^{+ab}
Plasma β-OH (mM)	3	0.053 \pm 0.014	0.052 \pm 0.009	0.043 \pm 0.008	0.031 \pm 0.005 ⁺
	8	0.041 \pm 0.008	0.053 \pm 0.009	0.049 \pm 0.004	0.047 \pm 0.005 ⁺
	13	0.045 \pm 0.007	0.060 \pm 0.008	0.058 \pm 0.006	0.045 \pm 0.006 ⁺

Values are means \pm SE, $n=8$ rats/group. Statistical comparisons were made between Sham, Ovx and OvxE2 and between Ovx and OvxHf. § Significantly different from corresponding Sham group: $P < 0.05$. * Significant difference between OvxE2 and Ovx groups: $P < 0.05$. + Significant difference between OvxHf and Ovx groups: $P < 0.05$. ^a Significantly

different from corresponding values at wk 3: $P < 0.05$. ^b Significantly different from corresponding values at wk-8: $P < 0.05$.

Figure 1

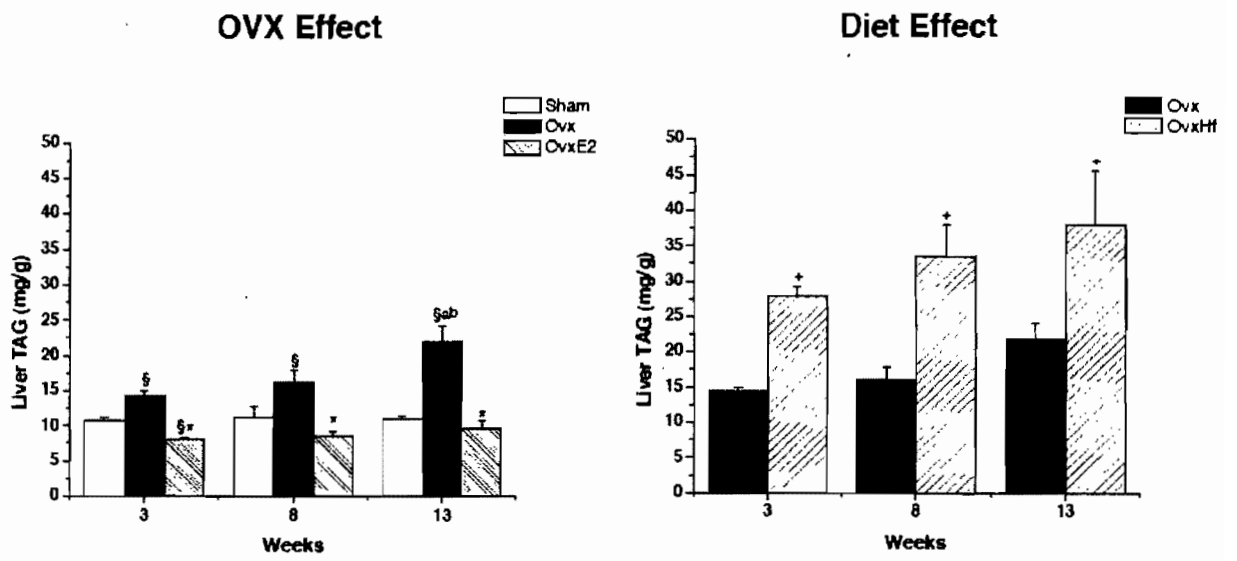


Figure 2

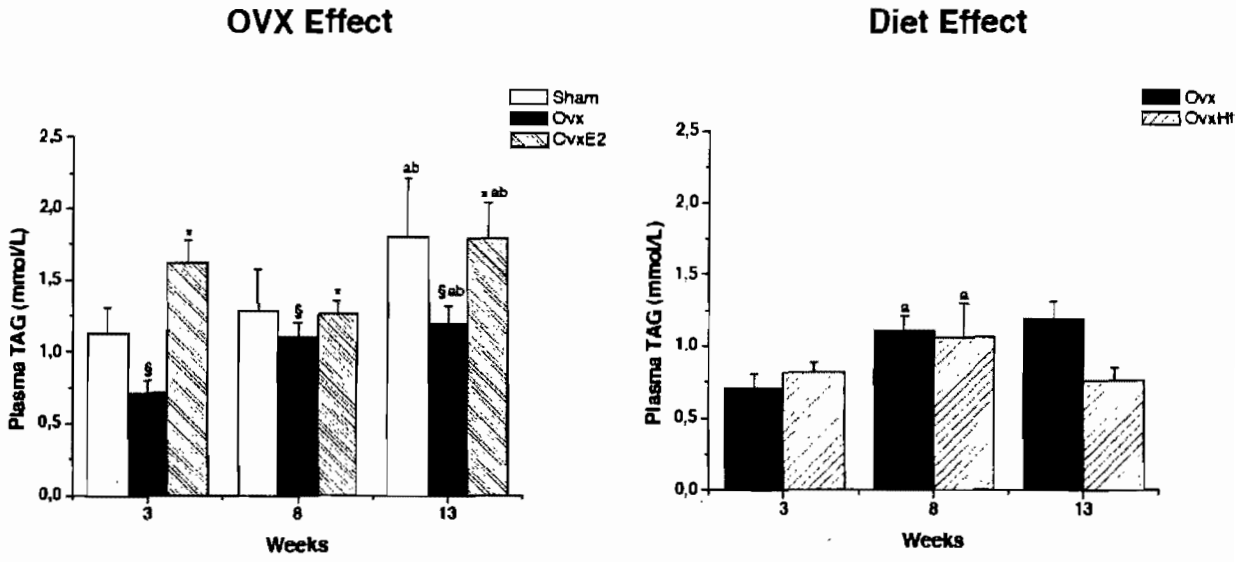


Figure 3

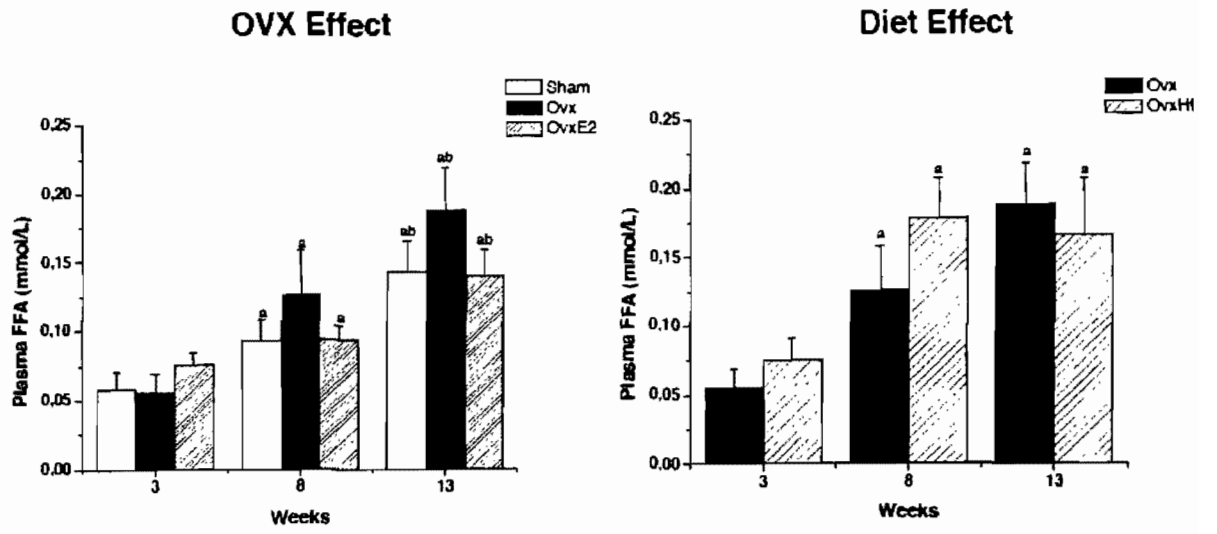
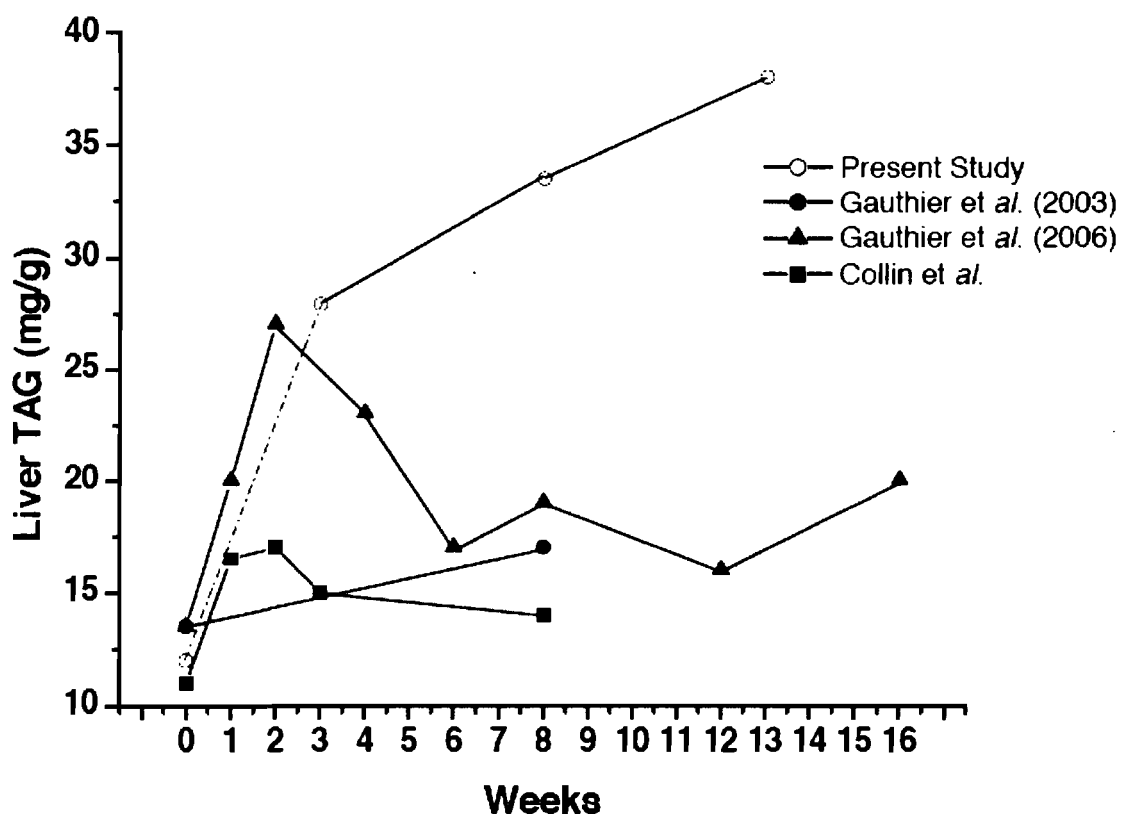


Figure 4



2.2 Étude 2

Titre

Effects of ovariectomy on PPAR α , SREBP-1c, and SCD-1 gene expression in the rat liver.

Auteurs

Amélie Paquette, Donghao Wang, Marek Jankowski, Jolanta Gutkowska et Jean-Marc Lavoie.

Journal

Menopause 2008. Epub ahead of print.

Effects of ovariectomy on PPAR α , SREBP-1c, and SCD-1 gene expression in the rat liver.

Amélie Paquette¹, Donghao Wang², Marek Jankowski², Jolanta Gutkowska², Jean-Marc Lavoie¹

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

²Laboratoire de biochimie cardiovasculaire, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM Hôtel-Dieu), Montréal, Québec, Canada

Running title: Non-alcoholic fatty liver disease in Ovx rats

Mailing proofs: Amélie Paquette

Département de kinésiologie


Université de Montréal

C.P. 6128, Succ. centre-ville

Montréal (Québec) Canada H3C 3J7

Tel: (514) 343-6111 (4867)

Fax: (514) 343-2181

e-mail: 

Abstract

Objective: To investigate whether estrogen deficiency modifies the expression of important genes involved in hepatic lipid regulation – PPAR α , SREBP-1c, and SCD-1 in association with fat accumulation in liver of ovariectomized rats.

Design: 30 female Sprague-Dawley rats were divided into 3 groups: sham-operated (Sham; $n = 12$), ovariectomized (Ovx; $n = 12$), and ovariectomized with 17 β -estradiol replacement (OvxE₂; $n = 6$). All animals were killed 8 wk after surgery. In addition to liver triacylglycerol (TAG) determination, transcripts levels and protein content of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR α), liver sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c), and stearoyl CoA desaturase-1 (SCD-1) were quantified by real-time quantitative PCR (RT-PCR) and Western blot, respectively.

Results: As expected, liver TAG levels were higher (51%; 21.9 ± 2.6 vs 14.5 ± 1.2 mg/g; $P < 0.01$) in Ovx compared to Sham rats. PPAR α mRNA levels were 66% lower ($P < 0.01$), while SREBP-1c and SCD-1 transcripts levels were 80% and 41% higher ($P < 0.05$), respectively, after estrogen removal. Our data on gene expression obtained with RT-PCR for PPAR α and SREBP-1c were confirmed by Western blots. All of the Ovx effects were prevented by 17 β -estradiol replacement, indicating a role for estrogens in the prevention of hepatic fat accumulation.

Conclusion: Our results suggest that a reduction in lipid oxidation and an increase in lipogenesis are defective mechanisms leading to lipid accumulation in liver of Ovx rats. We conclude that estrogen deficiency induced by ovariectomy changes the expression of genes that favour the development of a steatotic phenotype.

Key words: Fatty liver, Estrogens, Lipogenesis, Lipid oxidation, Menopause.

Introduction

Estrogens are important players in hepatic lipid homeostasis and their role as lipid regulators has been enlightened by different models of estrogen deficiency.^{1,2} Postmenopausal women, as well as ovariectomized (Ovx) rats, aromatase (ArKO) and estrogen receptor knock out (ERKO) mice develop non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD).³⁻¹⁰ NAFLD was initially believed to be a benign disorder but is now recognized as a clinical entity that may progress to liver failure.¹¹⁻¹³ NAFLD represents the hepatic component of the metabolic syndrome, with insulin resistance as the critical feature connecting fatty liver, central obesity, dyslipidemia, and hypertension.¹¹⁻¹³ Consequently, in light of the seriousness of NAFLD, it is essential to better document its pathophysiology in estrogen-deficient states. This has important clinical application for postmenopausal women, in which the prevalence of the disease has been recently established.^{3, 4}

In its first stage, NAFLD is characterized by excessive triacylglycerol (TAG) accumulation within the hepatocytes (hepatic steatosis) and occurs in multiple conditions that have in common either abnormal fat metabolism (i.e. obesity, abetalipoproteinemia, polycystic ovarian disease), mitochondrial dysfunction, or exposure to several medications (i.e. Amiodarone, Tamoxifen, Glucocorticoids).¹¹⁻¹³ The primary processes leading to lipid accumulation are not well understood, but an imbalance between pathways of uptake, synthesis, oxidation, or hepatic secretion of lipids, resulting from insulin resistance is highly probable.^{11,14,15} A recent study provided an evaluation of the changes in the expression of lipid metabolism-related genes with hepatic steatosis.¹⁴ Nearly all transcription factor families contribute to lipid regulation, but only a few of them have a

clear predominant role.^{14,15} Among these transcription factors, peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) are instrumental in hepatic lipid regulation.^{14,15}

PPARs are members of the superfamily of nuclear receptors, essentially recognized for their role as lipid sensors and regulators of lipid metabolism.^{15,16} Of the three isotypes identified, PPAR α is the key transcriptional regulator of peroxisomal, mitochondrial, and microsomal fatty acid oxidation systems in liver.^{15,16} SREBPs, on the other hand, are a family of transcription factors that control cholesterol and lipid biosynthesis.^{17,18} SREBP-1c is one member of the SREBPs family that transcriptionally activates genes required for lipogenesis.^{17,18} Moreover, SREBP-1c is a mediator of insulin action on lipogenic genes.¹⁸ Beside PPAR α and SREBP-1c, SCD-1 is an enzyme that appears to represent a pivotal control point in lipid homeostasis.¹⁹ SCD-1 catalyzes a rate limiting step in the biosynthesis of monounsaturated fats, which are required for TAG synthesis and very low density lipoprotein (VLDL) production.^{19,20} In absence of SCD-1, hepatic lipid storage and VLDL production are impaired, and as default, fatty acids are oxidized.^{19,20} Changes in the expression of PPAR α , SREBP-1c, and SCD-1 contribute to hepatic steatosis, which highlights their significant role in hepatic lipid homeostasis.^{14,18,19}

Ovx rats are hyperphagic and this probably explains in part the development of hepatic steatosis in these rats.^{6,8} However, fatty liver occurs even in pair-fed Ovx rats (unpublished data), which suggests the implication of estrogens in hepatic pathways of lipid metabolism. To get an insight into how estrogen deficiency results in liver fat accumulation, we quantified transcripts and protein abundance of PPAR α , SREBP-1c, and

SCD-1 in liver of intact, Ovx, and Ovx rats supplemented with 17β -estradiol, to determine if the expression of these instrumental genes for hepatic lipid metabolism is affected by estrogen deficiency.

Methods

Animal care

Female Sprague-Dawley rats ($n = 30$) weighing 180-200 g (8 wk old) were obtained from Charles River (St-Constant, PQ) and housed individually. The 12:12-h light-dark cycle started at 6:00 AM, and room temperature was maintained at 20-23°C. All animals were given free access to usual pellet rat chow (12.5% fat; 63.2% carbohydrate; 24.3% protein; kJ, Agribrands Purina Canada, Woodstock, ON) and tap water. They were treated similarly in terms of daily manipulations. The experiment described in this report was conducted according to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care after institutional approval.

Groups

Two days after their arrival in our laboratory, rats were randomly assigned to sham-operation (Sham; $n = 12$), ovariectomy (Ovx; $n = 12$), or ovariectomy with 17β -estradiol supplementation (OvxE₂; $n = 6$) groups. Body weight and food intake in g were monitored every other day. All animals were killed 8 wk after the surgical manipulations.

Surgery

Animals were injected with antibiotics (Tribrissen 24%; 0.125 mL/kg sc) for 3 days, beginning the day before surgery. Ovx was performed according to the technique described by Robertson et al.²¹ For surgery, rats were anesthetized with a mixture of ketamine-xylazine (61.5-7.6 mg/kg, ip). For Ovx-E₂ rats, a small 17β -estradiol pellet (0.72 mg;

0.012mg/day) with a biodegradable carrier binder efficient for 60 days (Cat No. SE-121; Innovative Research of America, Sarasota, FL, USA) was placed subcutaneously between the shoulder blades. El-Mas & Abdel-Rahman previously showed that this estrogen regimen produces physiological levels of the hormone.²² A placebo 60-day pellet containing the binding carrier only was used in all other rats (Cat No. SC-111).

Blood and tissue sampling

Rats were killed between 08:00 and 11:00 AM. Food was removed from the cage 2-3 h before sacrifice. Immediately after complete anesthesia (pentobarbital sodium; 50 mg/kg ip), the abdominal cavity was opened along the median line of the abdomen, and ~5 mL of blood were collected from the abdominal vena cava (<45 s) into syringes pre-treated with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA 15%). Blood was centrifuged at 3,000 rpm, 4°C, for 10 min (Beckman GPR Centrifuge). Liver, uterus, and retroperitoneal fat depot were removed. The liver median lobe was freeze-clamped and processed for triacylglycerol (TAG), mRNA, and protein extraction and quantification. All samples were weighed (Mettler AE 100), immediately frozen in liquid nitrogen, and stored along with plasma samples at -78°C until analyses were performed.

Biochemical analyses

Plasma non-esterified fatty acids (NEFA) concentrations were determined by enzymatic colorimetric assay from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). Plasma TAG concentrations were quantified by enzymatic colorimetric assay from Sigma (Saint Louis,

MO). Plasma glucose concentrations were determined with the use of a glucose analyser (Yellow Springs Instruments 2300, Yellow Springs, OH). Insulin concentrations were determined with a radioimmunoassay kit distributed by MEDICORP Laboratories (Montreal, PQ, Canada). Liver TAG concentrations were estimated from glycerol released after ethanolic KOH hydrolysis, employing a commercial kit from Sigma. Frayn and Maycock have demonstrated that omitting removal of phospholipids leads to only $\pm 2\%$ error in the determination of liver TAG.²³

Isolation of RNA and quantitative real-time RT-PCR for PPAR α , SREBP-1c, and SCD-1

Total RNA was extracted from freeze-clamped livers with Trizol reagent (Invitrogen Life Technologies, Inc, Burlington, ON) according to the manufacturer's protocol. To remove genomic DNA, RNA samples were incubated with 2 U deoxyribonuclease I (DNase I; Invitrogen Life Technologies, Inc, Burlington, ON)/ μg RNA for 30 min at 37°C. PCR was carried out in the iCycler IQ Real time PCR detection system (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA), using SYBR® green chemistry. The samples were analysed in duplicate or triplicate. For amplification, 2 μl of diluted cDNA were added to a 20 μl reaction mixture containing 1X iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Inc.) and 200 nM forward and reverse primers. The thermal cycling program was 95°C for 2 min, followed by 40 cycles of 95°C for 30 s, 60°C for 30 s and 72°C for 30 s. The primers were purchased from Invitrogen Life Technologies, Inc. Primer sets served to generate amplicons (Table 1). Optical data were recorded during the annealing step of each cycle. After PCR, the reaction

products were melted for 1 min at 95°C, the temperature was lowered to 55°C, and then gradually increased to 95°C in 1.0°C increments, 10 s per increment. Optical data were collected over the duration of the temperature increments, with a dramatic drop in fluorescence occurring. This was done to ensure that only 1 PCR product was amplified per reaction.

The relative expression of the RT-PCR products was determined by the $\Delta\Delta C_t$ method. This method calculates relative expression using the equation: Fold induction = $2^{-[\Delta\Delta C_t]}$, where C_t = the threshold cycle, i.e. the cycle number at which the sample's relative fluorescence rises above background fluorescence, and $\Delta\Delta C_t = [C_t \text{ gene of interest (unknown sample)} - C_t \text{ GAPDH (unknown sample)}] - [C_t \text{ gene of interest (calibrator sample)} - C_t \text{ GAPDH (calibrator sample)}]$. One of the control samples was chosen as the calibrator sample and tested in each PCR. Each sample was run in duplicate, and mean C_t was taken in the $\Delta\Delta C_t$ equation. GAPDH was chosen for normalization because this gene showed consistent expression relative to other housekeeping genes among the treatment groups in our array experiments.

Western Blot Analyses

Liver samples (~100 mg) were prepared by homogenisation in modified RIPA buffer (1× PBS, 1% Igepal CA-630, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 10 mg/mL PMSF, aprotinin, 100 mM sodium orthovanadate and 4% protease inhibitor) and then centrifuged at 10,000 g for 20 min at 4 °C. The supernatants were collected and the protein concentration was determined by modified Bradford assay. Thirty micrograms of total

protein were applied to each well of 8% SDS (PPAR α and SREBP-1c) and 12% (SCD-1) polyacrylamide gel and electrophoresed for 2 h at 130 V along with a set of molecular weight markers (RPN800, Amersham biosciences). The resolved protein bands were then transferred onto PVDF membranes (Hybond-C; Amersham Pharmacia) at 30 V for 120 min at room temperature using a transfer buffer (25 mmol/L Tris base, 192 mmol/L glycine, and 20% methanol). The blots were blocked overnight at 4 °C with blocking buffer (5% non-fat milk in 10 mmol/L Tris pH 7.5, 100 mmol/L NaCl, 0.1% Tween 20) (Amersham Pharmacia). The membranes were then probed with specific primary antibodies: PPAR α (1:1000, sc-9000, Santa Cruz Biotechnology), SREBP-1c (1:2000, sc-13551, Santa Cruz Biotechnology), SCD-1 (1:4000, kindly provided by Dr J. Ozols, University of Connecticut Health Centre, Connecticut) overnight at 4°C. As an internal control, blots were reprobbed with an anti- β -actin antibody (1:2000; sc-4778, Santa Cruz Biotechnology). Blots were then washed using TBS washing buffer (10 mmol/L Tris pH 7.5, 100 mmol/L NaCl, 0.1% Tween 20) and incubated with horseradish peroxidase-conjugated immunoglobulin G (IgG) (anti-rabbit for PPAR α and SCD-1, 1:10000; anti-mouse for SREBP-1c and β -actin , 1:10000; Santa Cruz Biotechnology) during 1h at room temperature. The blots finally were detected by chemiluminescence detection system (RPN2132, Amersham) and visualized by exposure to Kodak X-Omat film. Densitometric measurement of the bands was performed using Image J software.

Statistical analysis

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

Results

As expected, ovariectomy resulted in higher ($P < 0.01$) body weight, daily energy intake, and retroperitoneal fat depot weight than values observed in Sham rats (Table 2). We report variations in retroperitoneal fat pad weight since it has been documented that changes in this fat compartment is highly representative of changes in total body fat.⁶ Thus, the important gain in retroperitoneal fat (131% higher in Ovx than in Sham rats), even when corrected for body weight gain, reflects the typical fat mass gain associated with ovariectomy.⁶⁻⁸ Uterus weight was significantly lower (84%; $P < 0.01$) in Ovx rats, indicating total ovariectomy (Table 2). All the changes induced by ovariectomy were prevented by 17β -estradiol supplementation (Table 2). Nevertheless, the lower (13%; $P < 0.05$) body weight and higher (25%; $P < 0.05$) uterus weight in OvxE₂ compared to Sham rats suggest that 17β -estradiol supplementation was slightly supraphysiological.

Liver TAG levels were 51% higher (21.9 ± 2.6 vs 14.5 ± 1.2 mg/g; $P < 0.01$) in Ovx than in Sham rats and hepatic fat accumulation was completely prevented by 17β -estradiol replacement (Fig. 1A). Plasma NEFA and TAG concentrations were not significantly affected by Ovx or 17β -estradiol supplementation (Fig. 1B-C).

Results from RT-PCR showed lower (66%; $P < 0.01$) hepatic PPAR α mRNAs in Ovx than in Sham rats (Fig. 2A). On the other hand, hepatic SREBP-1c mRNAs were higher (80%; $P < 0.05$; Fig. 2B) in Ovx rats, as was the transcript of its downstream target, SCD-1 (41%; $P < 0.05$; Fig. 2C). Protein quantification by Western blot analysis confirmed results obtained by RT-PCR for PPAR α and SREBP-1c. We found lower PPAR α (51%; $P < 0.05$; Fig. 3A) and higher SREBP-1c (300%; $P < 0.05$; Fig. 3B) protein

abundance in liver of Ovx rats. Conversely, in spite of increases found in transcript level after ovariectomy, SCD-1 protein expression was similar in Ovx and Sham rats (Fig. 3C). All the changes induced by ovariectomy were prevented by 17 β -estradiol supplementation, resulting in similar transcripts and protein abundance in OvxE₂ and Sham rats. However, SCD-1 transcripts and protein levels were both significantly lower (61%, $P < 0.05$ and 54%, $P < 0.01$, respectively) in OvxE₂ compared to Sham rats (Fig. 2C-3C). Taken together, our results indicate a positive estrogenic control of hepatic PPAR α , but a negative estrogenic control of hepatic SREBP-1c and SCD-1 genes.

Plasma insulin and glucose concentrations were both increased following ovariectomy (28% and 9% higher, respectively, when compared to Sham rats; $P < 0.05$ Fig. 4). 17 β -estradiol supplementation decreased plasma insulin and glucose concentrations to levels even lower than values observed in Sham rats ($P < 0.01$; Fig. 4).

Discussion

It has been reported by us and others that ovariectomy in rats results in liver TAG accretion.⁵⁻⁸ The Ovx-induced hepatic fat accumulation has been partially attributed to the increased food intake,⁶ since pair-feeding in Ovx rats does not completely prevent fat accumulation in liver (unpublished data). Based on this information, we hypothesized that pathways of lipid metabolism are disturbed in absence of estrogens, which promotes fat accumulation in liver of Ovx rats.

The present data are consistent with previous findings on the development of hepatic steatosis following ovariectomy in rat, showing 51% higher liver TAG content in Ovx than in intact rats. In addition, we found that 17 β -estradiol supplementation completely prevented the accumulation of lipids in the liver of Ovx rats, indicating the need for an intact estrogenic status for normal lipid accumulation in liver. Then, we quantified the expression of instrumental genes in hepatic lipid regulation that are altered in NAFLD, to evaluate whether estrogen deficiency affects their expression.

The main findings of the present study are that PPAR transcripts levels are decreased, while SREBP-1c and SCD-1 mRNAs are increased in liver of Ovx rats. These results were confirmed at the protein level for PPAR α and SREBP-1c. This suggests that lipid oxidation systems are depressed while lipogenesis is stimulated in liver of Ovx rats, both potentially contributing to hepatic fat accretion. PPAR α is necessary for constitutive mitochondrial β -oxidation of fatty acids in liver, and transcripts levels correlate with mitochondrial and peroxisomal β -oxidation activities.²⁴⁻²⁶ We found reduced PPAR α gene expression (66% mRNAs and 51% protein) in liver following ovariectomy. In light of

previous findings in PPAR α $-/-$ mice, it seems likely that downregulation of hepatic PPAR α in Ovx rats reflects impaired oxidative pathways.²⁴⁻²⁶ This might explain the Ovx-associated elevation of TAG content in liver. Moreover, because of their role as lipid sensors, inappropriate PPAR α expression in Ovx rats can lead to ineffective PPAR α sensing and thus, in a reduction of fatty acid catabolism as reported in hepatic steatosis.²⁴ We demonstrated that 17 β -estradiol replacement in Ovx rats reverted PPAR α gene expression to the normal level, which suggests estrogens role in regulation of hepatic lipid oxidation. Accordingly, it has been shown that hepatic fatty-acid metabolizing enzymes are positively regulated by 17 β -estradiol in ArKO male mice.²⁷

Beside lower rates of lipid oxidation, increased rates of hepatic lipid synthesis also contribute to the development of fatty liver in obese, insulin-resistant and hyperinsulinaemic *ob/ob* mice.²⁸ In these mice, overexpression of SREBP-1c is responsible for the enhanced expression of genes that promote lipid synthesis.^{28,29} Therefore, we investigated whether the loss of ovarian function affects lipogenic processes in liver by influencing SREBP-1c expression. Our results show higher levels of SREBP-1c mRNA and protein content in liver of Ovx rats, which suggests higher lipogenesis after ovaries removal. We also found that 17 β -estradiol supplementation in Ovx rats prevented any increase in SREBP-1c expression, which indicates a negative control of SREBP-1c gene expression by estrogens. This is in agreement with a previous report of a downregulation of SREBP-1c gene expression by estrogens in mice liver.³⁰ Ovx rats develop obesity and insulin resistance.³¹ In the present study, Ovx rats depicted an important gain in body weight and retroperitoneal fat pad weight. Insulin sensitivity was not evaluated in the

present Ovx rats, but we found higher plasma insulin and glucose levels following ovariectomy. It is possible that along with the impact of estrogens removal, hyperinsulinemia contributed to the induction of SREBP-1c transcription in Ovx rats, thus resulting in increased rates of *de novo* fatty acids biosynthesis in liver.^{18,29}

The increased lipogenic pathway in liver of Ovx rats can also be associated with augmented SCD-1 gene expression. SCD-1 is an enzyme that constitutes a pivotal control point in lipid homeostasis.¹⁹ It catalyzes the rate-limiting step in the biosynthesis of monounsaturated fatty acids necessary for TAG synthesis.¹⁹ The genetic deletion of SCD-1 protects against fatty liver and insulin resistance development in mice.³² In the present study, we found 41% higher SCD-1 mRNAs levels in Ovx rats and a repression after 17 β -estradiol replacement. Ovariectomy and 17 β -estradiol replacement induced variations in SCD-1 that parallel changes found in SREBP-1c mRNAs, which transcriptionally regulates SCD-1.¹⁹ However, we did not find any difference in SCD-1 protein abundance between Ovx and Sham rats. It is possible that SCD-1 transcript stabilisation or translation into protein might have been incompleted, explaining the accretion in SCD-1 observed only at the transcript level in Ovx rats. Furthermore, RT-PCR allows for the amplification of a signal, which is not the case with protein quantification by Western blot.

The conventional explanation for hepatic TAG accumulation is that obesity and insulin resistance result in increased release of NEFA from adipocytes.²⁹ Thus, liver TAG accumulation has been related in part to a greater NEFA uptake by the liver due to their rise in plasma.²⁹ However, the development of hepatic steatosis after Ovx suggests a different mechanism than a greater hepatic NEFA uptake, since Ovx rats in the present study did not

depict higher plasma NEFA levels compared to their intact counterparts. This finding is in line with the fact that estrogens favour lipolysis in adipocytes, which implies that adipocyte lipolysis is reduced in Ovx animals.^{30,33}

Conclusion

It has been suggested that impairment in lipid oxidative and lipogenic systems are the main causes of fat accumulation in NAFLD.²⁴ In the present study, we used ovariectomy as an original model of hepatic steatosis. Our data indicate that three instrumental genes involved in fatty liver etiology – PPAR α , SREBP-1c, and SCD-1 - are changed by ovariectomy and are under estrogenic control. This led us to speculate that a reduction in lipid oxidation and an increase in lipogenesis are defective mechanisms leading to lipid accumulation in liver of Ovx rats. Therefore, we conclude that estrogen deficiency-associated with ovariectomy changes the expression of gene that favour the development of a steatotic phenotype. From a clinical perspective, PPAR α , SREBP-1c, and SCD-1 may serve as targets for therapeutic agents in the prevention and treatment of hepatic steatosis in postmenopausal women, as the menopause status by itself may be considered as a causal factor of fatty liver disease.²⁴

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the professional assistance of Marie-Soleil Gauthier, Pierre Corriveau, and Émilie Roudier.

Grants

This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (JML; T 0602 145.02), and from CIHR MOP 53217, and CIHR NET SRD-63193, Heart and Stroke Foundation of Canada (JG and MJ).

References

1. Basdevant A. Steroids and lipid metabolism: mechanism of action. *Int J Fertil* 1992; 37(Supp 2): 93-97.
2. Krauss RM, Burkman J^r RT. The metabolic impact of oral contraceptives. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 167: 1177-1184.
3. Völzke H, Schwarz S, Baumeister SE, et al. Menopausal status and hepatic steatosis in a general female population. *Gut* 2007; 56: 594-595.
4. Park SH, Jeon WK, Kim SH, et al. Prevalence and risk factor of non-alcoholic fatty liver disease among Korean adults. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 138-143.
5. Mukherjea M, Biswas R. Effect of ovariectomy and replacement therapy on the tissue lipid pattern in rats. *Endokrinologie* 1975; 66: 113-121.
6. Deshaies Y, Dagnault A, Lalonde J, et al. Interaction of corticosterone and gonadal steroids on lipid deposition in the female rat. *Am J Physiol* 1997; 273: E355-E362.
7. Picard F, Deshaies Y, Lalonde J et al. Effects of the estrogen antagonist EM-652.HCl on energy balance and lipid metabolism in ovariectomized rats. *Int J Obes* 2000; 24: 830-840.
8. Paquette A, Shinoda M, Rabasa-Lhoret R et al. Time course of liver lipid infiltration in ovariectomized rats: impact of a high-fat diet. *Maturitas* 2007; 58: 182-190.
9. Hewitt KN, Pratis K, Jones MEE, et al. Estrogen replacement reverses the hepatic steatosis phenotype in the male aromatase knockout mouse. *Endocrinology* 2004; 145: 1842-1848.

10. Lemieux C, Phaneuf D, Labrie F, et al. Estrogen receptor α -mediated adiposity-lowering and hypocholesterolemic actions of the selective estrogen receptor modulator acolbifene. *Int J Obes (Lond)* 2005; 29(10): 1236-1244.
11. Duvnjak M, Lerotic I, Barsic N, et al. Pathogenesis and management issues for non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13(34): 4539-4550.
12. Marchesini G, Marzocchi R, Agostini F, et al. Nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol* 2005; 16: 421-427.
13. Saadeh S. Nonalcoholic fatty liver disease and obesity. *Nutr Clin Pract* 2007; 22:1-10.
14. Kohjima M, Enjoji M, Higuchi N et al. Re-evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med* 2007; 20: 351-358.
15. Desvergne B, Michalik L, Wahli W. Be fit or be sick : peroxisome proliferator-activated receptors are down the road. *Molecular Endocrinology* 2004; 18(6):1321-1332.
16. Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 1999; 20: 649-688.
17. Horton JD. Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. *Biochem Soc Trans* 2002; 1091-1095.
18. Ferré P, Fougère F. SREBP-1c transcription factor and lipid homeostasis:clinical perspective. *Horm Res* 2007; 68: 72-82.
19. Cohen P, Ntambi J, Friedman JM. Stearoyl-CoA desaturase-1 and the metabolic syndrome. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2003; 3: 271-280.

20. Cohen P, Miyazaki M, Socci ND, et al. Role for stearoyl-CoA desaturase-1 in leptin-mediated weight loss. *Science* 2002; 297: 240-243.
21. Robertson MC, Owens RE, Klindt J, et al. Ovariectomy leads to a rapid increase in rat placental lactogen secretion. *Endocrinology* 1984; 114: 1805-1811.
22. El-Mas MM, Abdel-Rahman AA. Effects of long-term ovariectomy and estrogen replacement on clonidine-evoked reductions in blood pressure and hemodynamic variability. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 43:607-615.
23. Frayn KN, Maycock PF. Skeletal muscle triacylglycerol in the rat: methods for sampling and measurement, and studies of biological variability. *J Lipid Res* 1980; 21: 139-144.
24. Reddy JK, Sambasiva Rao M. Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G852-G858.
25. Aoyama T, Peters JM, Iritani N, et al. Altered constitutive expression of fatty acid-metabolizing enzymes in mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α). *J Biol Chem* 1998; 10: 5678-5684.
26. Costet P, Legendre C, Moré J, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor α -isoform deficiency leads to progressive dyslipidemia with sexually dimorphic obesity and steatosis. *J Biol Chem* 1998; 45: 29577-29585.
27. Toda K, Takeda K, Akira S, et al. Alternations in hepatic expression of fatty-acid metabolizing enzymes in ArKO mice and their reversal by the treatment with 17 β -estradiol or a peroxisome proliferator. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001; 79: 11-17.

28. Shimomura I, Bashmakov Y, Horton JD. Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus. *J Biol Chem* 1999; 42: 30028-30032.
29. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 2004; 114: 147-152.
30. D'Eon TM, Souza SC, Aronovitz M et al. Estrogen regulation of adiposity and fuel partitioning. *J Biol Chem* 2005; 280: 35983-35991.
31. Lemieux C, Picard F, Labrie F, et al. The estrogen antagonist EM-652 and dehydroepiandrosterone prevent diet- and ovariectomy-induced obesity. *Obes Res* 2003; 11: 477-490.
32. Miyazaki M, Kim Y-C, Gray-Keller MP, et al. The biosynthesis of hepatic cholesterol esters and triglycerides is impaired in mice with a disruption of the gene for steraroyl-coA desaturase 1. *J Biol Chem* 2000; 275: 30132-30138.
33. Giudicelly Y, Dieudonne M-N, Lacasa D, et al. Modulation by sex hormones of the membranous transducing system regulating fatty acid mobilization in adipose tissue. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1993; 48: 91-100.

Table 1 Oligonucleotide primers used for real-time quantitative PCR. Stearoyl CoA desaturase-1 (SCD-1); sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c); peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR α); glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GADPH).

Gene	Sense primer (5'-3')	Antisense primer (5'-3')	Accession No.
SCD-1	TGCTGATGTGCTTCATCCTG	GGGAAACCAGGATATTCTCC	NM009127
SREBP-1c	TGCCCTAAGGGTCAAAACCA	TGGCGGGCACTACTTAGGAA	L16995
PPAR α	TGCGGACTACCAGTACTTAG	CGACACTCGATGTTTCAGTGC	NM_011144
GADPH	TTCAATGGCACAGTCAAGGC	TCACCCCATTTGATGTTAGCG	NM017008

Table 2 Body weight at sacrifice, daily energy intake, retroperitoneal and relative retroperitoneal fat pad weights, and uterus and relative uterus weights, in sham-operated (Sham), ovariectomized (Ovx), and ovariectomized supplemented with 17 β -estradiol (OvxE₂) rats. Relative organ weights are corrected for body weight gain.

	Sham	Ovx	OvxE ₂
Body Weight (g)	278 \pm 6	374 \pm 11**	241 \pm 6***
Daily Energy Intake (kJ)	262 \pm 5	316 \pm 6**	269 \pm 3**
Retroperitoneal Fat Weight (g)	2.63 \pm 0.35	6.08 \pm 0.50**	1.88 \pm 0.44**
Relative Retroperitoneal Fat Weight (g/100g BW)	0.93 \pm 0.11	1.61 \pm 0.10**	0.77 \pm 0.17**
Uterus Wt (g)	0.61 \pm 0.06	0.10 \pm 0.01**	0.76 \pm 0.05***
Relative Uterus Weight (g/100g BW)	0.219 \pm 0.023	0.026 \pm 0.002**	0.315 \pm 0.024****

Values are means \pm SE, $n = 12$ rats/group ($n = 6$ for OvxE₂). *Significantly different from Sham, $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. ***Significant difference between Ovx and OvxE₂, $P < 0.01$.

Legends

Fig. 1. A) Liver triacylglycerol (TAG) levels, B) plasma non-esterified fatty acid (NEFA), and C) plasma TAG concentrations in sham-operated (Sham), ovariectomized (Ovx), and ovariectomized supplemented with 17 β -estradiol (OvxE₂) rats. Values are means \pm SE, $n = 12$ rats/group ($n = 6$ for OxvE₂). ** Significantly different from Sham, $P < 0.01$. ++ Significant difference between Oxv and OxvE₂, $P < 0.01$.

Fig. 2. A) Hepatic peroxysome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR α), B) sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c), and C) stearyl CoA desaturase-1 (SCD-1) mRNA abundance in sham-operated (Sham), ovariectomized (Ovx), and ovariectomized supplemented with 17 β -estradiol (OvxE₂) rats. Values are means \pm SE, $n = 12$ rats/group ($n = 6$ for OxvE₂). * Significantly different from Sham, $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. + Significant difference between Oxv and OxvE₂, $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$.

Fig. 3. A) Hepatic peroxysome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR α), B) sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c), and C) stearyl CoA desaturase-1 (SCD-1) protein content in sham-operated (Sham), ovariectomized (Ovx), and ovariectomized supplemented with 17 β -estradiol (OvxE₂) rats. Values are means \pm SE, $n = 4$ rats/group. * Significantly different from Sham, $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. + Significant difference between Oxv and OxvE₂, $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$.

Fig. 4. A) Plasma insulin and B) Plasma glucose concentrations in sham-operated (Sham), ovariectomized (Ovx), and ovariectomized supplemented with 17 β -estradiol (OvxE₂) rats. Values are means \pm SE, $n = 12$ rats/group ($n = 6$ for OxvE₂). * Significantly different from Sham, $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. ^{††} Significant difference between Oxv and OxvE₂ $P < 0.01$.

Figure 1

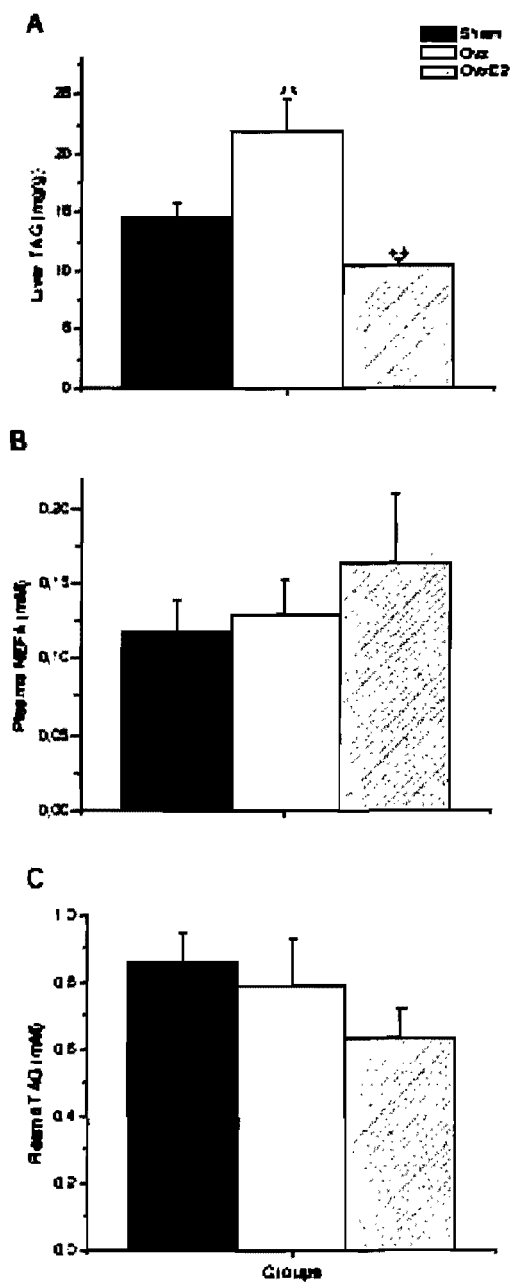


Figure 2

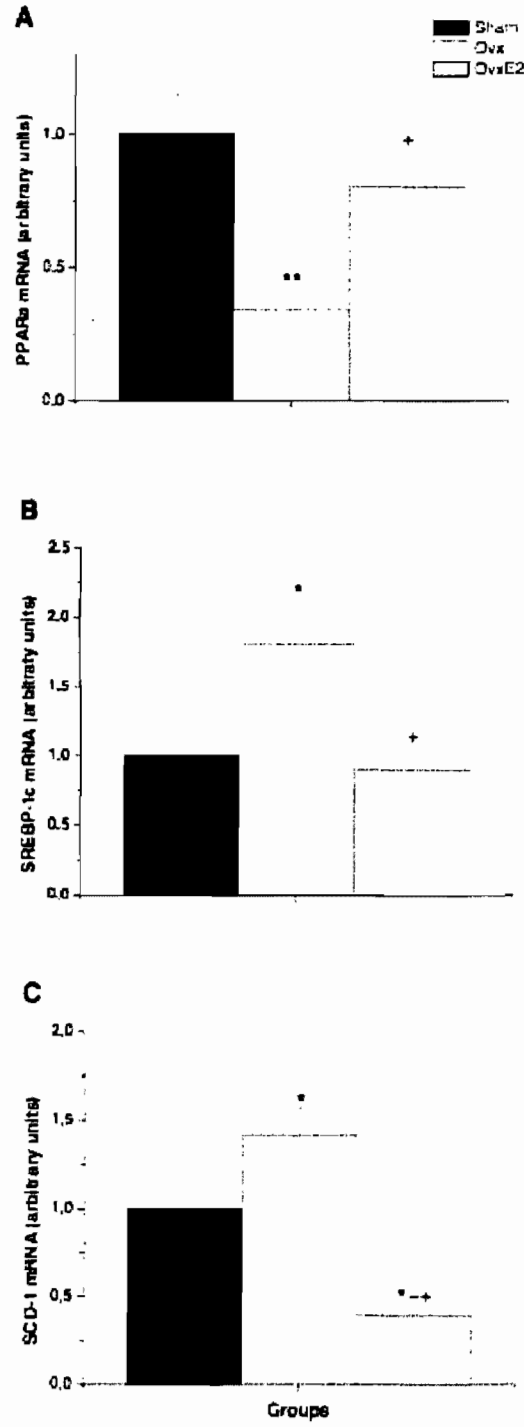


Figure 3

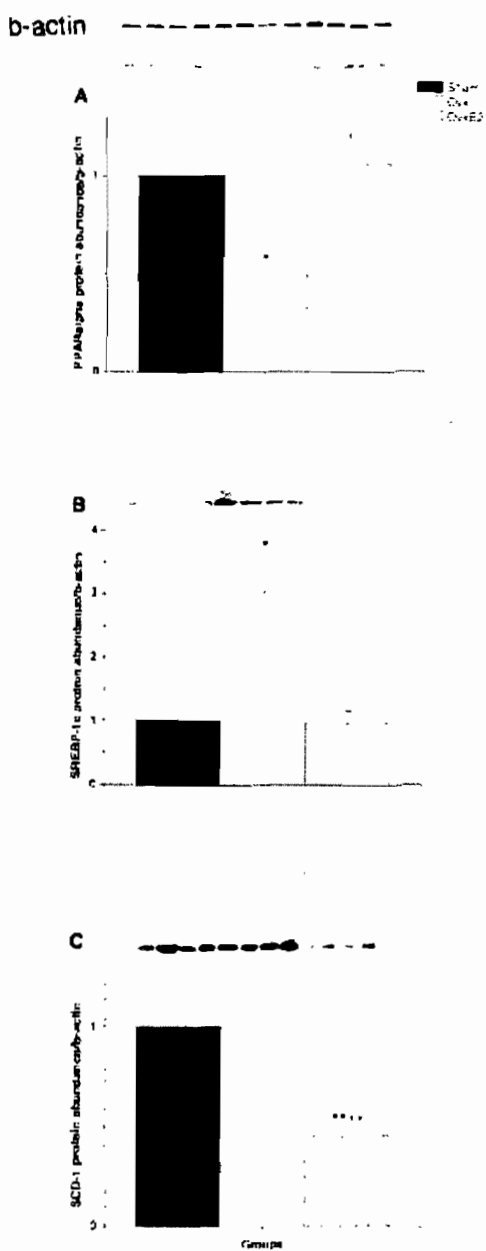
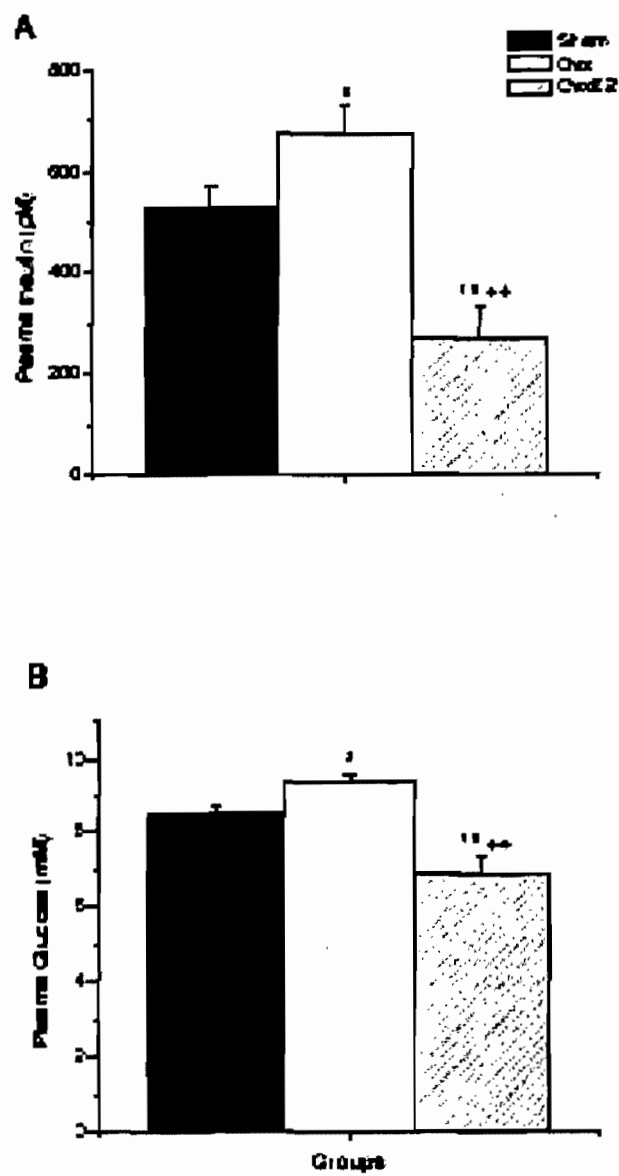


Figure 4



2.3 Étude 3

Titre

Fatty acid oxidation is decreased in liver of ovariectomized rats.

Auteurs

Amélie Paquette, Natalie A Chapados, Raynald Bergeron et Jean-Marc Lavoie.

Journal

Article soumis pour publication à *Horm Metab Res*.

Fatty acid oxidation is decreased in liver of ovariectomized rats.

Amélie Paquette, Natalie A Chapados, Raynald Bergeron, Jean-Marc Lavoie

Département de kinésiologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Running title: Hepatic fat oxidation in ovariectomized rats

Corresponding author: Amélie Paquette

Département de kinésiologie


Université de Montréal

C.P. 6128, Succ. centre-ville

Montréal (Québec) Canada H3C 3J7

Tel: (514) 343-6111 (4867)

Fax: (514) 343-2181

e-mail: 

Abstract

Estrogen-deficient states are associated with hepatic steatosis. Based on previous findings obtained at the molecular and enzymatic levels, it has been suggested that estradiol exerts its lipid-lowering effects in liver through partitioning of triacylglycerols into oxidative pathways. However, information on relevant physiological response was lacking. Therefore, the purpose of the present study was to assess fatty acid oxidation rate in liver of intact and ovariectomized rats. Tritiated water released from liver slices incubated with 9,10- ^3H palmitate was measured as a reflection of *in vivo* fatty acid metabolism. Fatty acid oxidation rate was lowered by 34% ($P < 0.05$), associated with 114% higher ($P < 0.01$) hepatic triacylglycerol content in liver of ovariectomized as compared to intact rats. Estrogen replacement prevented all of these changes. Fatty liver has been linked with hepatic leptin resistance in obese male rats. Since leptin stimulates fatty acid oxidation in liver, we hypothesized that increased liver triacylglycerol content and decreased fatty acid oxidation might be associated with leptin resistance in ovariectomized rats. To this end, acute leptin delivery was performed. The 120-min intravenous leptin infusion increased fatty acid oxidation by 23% ($P = 0.081$; NS) in the liver of ovariectomized rats, which was coupled with 24% lower ($P = 0.067$; NS) hepatic triacylglycerol content. We conclude that fatty acid oxidation is decreased in liver of ovariectomized rats, which is likely to contribute to hepatic steatosis development. Furthermore, contrary to our hypothesis, our results suggest that leptin sensitivity is maintained in liver of ovariectomized rats.

Key words: Lipid oxidation, fatty liver, fatty acid metabolism, leptin, menopause.

Introduction

Hepatic steatosis is characterized by excessive triacylglycerol (TAG) accumulation within the hepatocytes that favours metabolic abnormalities such as insulin resistance [1]. The primary processes leading to lipid accumulation are not fully understood, but are probably related to an imbalance between pathways of uptake, synthesis, oxidation, and hepatic secretion of lipids [2]. Several conditions promote liver TAG accretion, among which the estrogen-deficient states. Postmenopausal women, aromatase receptor (ArKO) and estrogen receptor (ERKO) knockout mice, as well as ovariectomized (Ovx) rats present hepatic steatosis [3-7]. Although fat accretion in the liver of Ovx animals has been partially attributed to increased food intake [6], pair-feeding does not completely prevent fatty liver and the elevated expression of lipogenic genes [8]. All together, these evidences suggest an implication for estrogens in instrumental pathways of hepatic lipid metabolism.

In a recent study, we showed that estrogen removal in Ovx rats decreased the expression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR α), a nuclear receptor that controls the genetic program of fatty acid oxidation [9,10]. Comparable findings have been previously reported in skeletal muscle of Ovx rats and in liver of ArKO mice, including data at the enzyme level [11-13]. Indeed, decreased gene expression of carnitine palmitoyltransferase I (CPT-1) and β -3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase (β -HAD), as well as reduced total activity of fatty acid β -oxidation were reported in these latter studies [11-13]. Thus, it is justified to speculate that downregulation of lipid oxidation is a defective mechanism involved in the development of fatty liver in estrogen-deficient states. However, information on relevant physiological response is still lacking. Therefore, the

primary goal of the present study is to assess fatty acid oxidation rate in the liver of Ovx rats. To strengthen previous findings from molecular and enzymatic studies suggesting a decrease in hepatic oxidative systems following estrogen removal, we measured tritiated water released from liver slices incubated with 9,10- ^3H palmitate as a reflection of *in vivo* fatty acid metabolism.

Systemic leptin infusions *in vivo* stimulate hepatic fatty acid oxidation and reduce hepatic TAG content in lean male rats [14]. However, this lipid-lowering effect of leptin was not observed in diet-induced obesity (DIO) rats, in which fatty liver has been linked to hepatic leptin resistance [14-17]. The acute lipid-depleting effect of leptin might also be impaired in the liver of Ovx rats, since estrogen deficiency has been associated with a decrease in Ob-Rb mRNA expression in the brain and adipose tissue, as well as central leptin insensitivity [18-20]. Thus, as a second aim, we determined leptin action by assessing fatty acid oxidation in liver slices of Ovx rats submitted to an intravenous leptin infusion.

Materials and Methods

Animals and design

Female Sprague-Dawley rats ($n = 36$; 180-200g) (Charles River Laboratories) were maintained under controlled conditions and had free access to tap water and rat chow. Rats were randomly assigned to sham-operation (Sham), ovariectomy (Ovx), or ovariectomy with estrogen replacement (OvxE₂) ($n = 12$ /group). Five weeks after surgery, rats were submitted to cannulation and further assigned to saline (Sham-S; Ovx-S; OvxE₂-S) or leptin-infused groups (Sham-L; Ovx-L; OvxE₂-L) ($n = 6$ /group). Body weight and food intake were monitored twice a week. The experiment described in this report was conducted according to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care after institutional approval.

Surgeries

For both surgeries, animals were anesthetized with a mixture of ketamine-xylazine (61.5-7.6mg/kg, ip).

Ovariectomy. Ovx was performed according to the technique described by Robertson et al [21]. For Ovx-E₂ rats, a small 17 β -estradiol pellet (0.72mg; 0.012mg/day) with a biodegradable carrier binder efficient for 60 days (Cat No. SE-121; Innovative Research of America, USA) was placed subcutaneously between the shoulder blades. El-Mas & Abdel-Rahman showed that this estrogen regimen produces physiological levels of the hormone [22]. A placebo 60-day pellet containing only the binding carrier was used in all other rats (Cat No. SC-111).

Implantation of chronic catheters. Catheter (PE-50, Intramedic, BD Biosciences) was introduced into the right jugular vein (advanced to the right atrium) as previously described [23], exteriorized at the back of the neck, filled with a sterile glycerol:heparin mix (3:1), and flame-sealed. Animals were allowed at least 4 d to recover and had achieved more than 90% of presurgery weight before being submitted to the infusion.

Intravenous (iv) leptin infusion

Conscious 18-h fasted rats received a continuous iv infusion of either vehicle (saline; groups-S) or leptin (recombinant rat leptin, R&D systems, cat # 598-LP; groups-L) using a syringe pump (model 11, Harvard Apparatus) at a rate of $0.2\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ for 120 min (preceded by a 2-min priming dose of $2\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$), according to Huang & al protocol [14]. Volume delivery was $5\text{ml}/\text{kg}\cdot\text{h}$ for both vehicle and leptin infusions. Intact rats received the infusion during the diestrus phase of the estrous cycle, identified following the performance of daily vaginal smears during the two weeks preceding the infusion. Rats were anesthetized (pentobarbital sodique, $40\text{mg}/\text{kg}$ iv) for sacrifice after the 120-min infusion.

Blood and tissue sampling

~ Five mL of blood were collected from the abdominal vena cava (<45s) into syringes pre-treated with EDTA (15%). Blood was centrifuged at 3000 rpm and 4°C for 8 min (Beckman GPR Centrifuge). Liver, uterus, and urogenital fat depots were removed,

weighed, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored along with plasma samples at -78°C until analyses. Rats were killed by exsanguination.

Tissue and plasma measurements

Effects of Ovx or iv leptin infusion on hepatic fatty acid oxidation. Two pieces of liver weighting ~ 35mg each were isolated and immediately incubated with 9,10-[³H] palmitate (GE Healthcare, Code TRK909) for the assessment of fatty acid oxidation as previously described [24]. Briefly, liver sections were incubated in a Krebs-Ringer bicarbonate culture medium containing 5mM glucose, 4% FFA free-BSA, and 3 µCi 9,10-[³H] palmitate in a shaking water bath at 37°C for 60 min. One mL culture medium was then added to 800µL of 2M KCl-HCl + 3mL of Folch solutions and centrifuged at 3000g for 5 min. Two mL of upper phase were transferred to 3mL of chloroform and again, centrifuged at 3000g for 5 min. 750µL of upper phase were collected and counted in liquid scintillation cocktail in a beta-counter. The rate of palmitate oxidation was assessed by measuring the quantity of tritiated water released into the medium.

Effect of Ovx or iv leptin delivery on liver TAG content. Liver TAG content was estimated from glycerol released after ethanolic KOH hydrolysis, employing commercial kits from Sigma (St-Louis, MO).

Plasma measurements. Glucose concentrations were determined with the use of a glucose analyser (Yellow Springs Instruments 2300). Insulin and leptin concentrations were determined with radioimmunoassay kits distributed by LINCO Research (St-Charles, MO).

Statistical analyses

Values are expressed as means \pm SE. Statistical analyses were performed for two sets of data. In the first set, we performed a one-way ANOVA for non-repeated measures between Sham, Ovx, and OvxE₂ (groups-S) to evaluate the effect of estrogen removal. In the second set, we performed a two-way ANOVA for non-repeated measures between Sham-S, Sham-L, Ovx-S, Ovx-L, and OvxE₂-S, OvxE₂-L to evaluate the effect of leptin infusion using group and infusion as main effects. Fisher's post hoc test was used in the event of a significant ($P < 0.05$) ratio.

Results

As expected, Ovx resulted in higher ($P < 0.01$) body weight (22%), daily energy intake (19%), and urogenital fat depot weight (33%; $P < 0.05$) when compared to Sham rats (Table 1). Uterus weight was significantly lower (78%; $P < 0.01$) in Ovx rats, indicating total ovariectomy (Table 1). Plasma glucose and insulin concentrations were not affected by ovaries removal. All the changes induced by ovariectomy were prevented by 17 β -estradiol replacement (Table 1). Nevertheless, the lower ($P < 0.01$) body weight and urogenital fat depot weight ($P < 0.05$), as well as the higher ($P < 0.01$) uterus weight in OvxE₂ compared to Sham rats suggest supraphysiological levels of hormone supplementation, despite information previously reported in a study using the same estrogen supplementation [22].

Effects of estrogen removal on hepatic fatty acid metabolism. Estrogen removal induced a reduction in the rate of 9,10-³H palmitate oxidation, which was significantly lower (34%) in liver slices of Ovx versus Sham rats (12.5 \pm 1.0 vs 18.8 \pm 1.4 nM/g tissue/h; $P < 0.05$) (Fig. 1A). This was associated with higher (114%) TAG content in the liver of Ovx as compared to Sham rats (23.1 \pm 2.4 vs 10.8 \pm 2.3 mg/g; $P < 0.01$) (Fig. 1B). In both cases, 17 β -estradiol replacement completely prevented the alterations induced by Ovx (Fig. 1).

Plasma leptin concentrations. Leptin infusion led to a substantial increase in plasma leptin concentrations, being 772% higher ($P < 0.01$) in Sham-L and 390% higher ($P < 0.01$) in Ovx-L when compared with their saline-infusion counterparts (Table 2). Despite the greater increase in plasma leptin levels obtained in Sham-L than in Ovx-L, group comparisons reveal that plasma leptin concentrations were still significantly higher in Ovx-

L than in Sham-L rats (11.23 ± 2.84 vs 5.23 ± 0.61 ; $P < 0.01$). This might be related to higher basal plasma leptin levels found in Ovx than in Sham rats (2.29 ± 0.48 vs 0.60 ± 0.10 ng/mL; $P < 0.01$). This observation is consistent with the larger adipose tissue mass of Ovx animals (Table 1) [25].

Effects of leptin infusion on hepatic fatty acid metabolism. No significant differences were measured for hepatic fatty acid oxidation or TAG content following leptin infusion when results were analysed using a two-way ANOVA between all groups. However, since we observed strong tendencies for leptin effects in Ovx rats, we subsequently performed unpaired *t* test in Sham, Ovx, and OvxE₂ groups to further evaluate the effects of leptin infusion. We found a tendency for higher (23%) 9,10-[³H] palmitate oxidation rate in liver slices of Ovx rats following leptin infusion (15.3 ± 1.0 vs 12.5 ± 1.0 nM/g tissue/h; $P = 0.081$) (Fig. 2A), coupled with a tendency for lower (24%) hepatic TAG content (17.5 ± 0.5 vs 23.1 ± 2.4 mg/g; $P = 0.067$) (Fig. 2B).

Discussion

The main finding of this study is that estrogen removal decreased the rate of fatty acid oxidation by 34% in liver of Ovx rats. This phenomenon might contribute to the development of hepatic steatosis, since Ovx rats presented more than twice the liver TAG content of intact rats. In a recent study, we showed that ovariectomy induced downregulation of hepatic PPAR α expression [9], thus suggesting a decrease in liver fat oxidation. Similar findings have been reported in gastrocnemius muscles of Ovx rats and in liver of ArKO mice [11-13]. These latter studies also demonstrated that estrogen deficiency suppressed the expression of lipid oxidative genes, e.g. CPT-I and β -HAD, as well as maximal activity of enzymes involved in fatty acid β -oxidation [11-13]. *In vitro* experiments conducted on HepG2 cells also put forward a role for estrogens in lipid catabolism, showing that genistein, a dietary isoflavone exhibiting weak estrogenic properties, increased PPAR α and CPT-1 mRNAs [26]. It was suggested that genistein might be a potential ligand for PPAR α . Therefore, the present data are consistent with previous findings obtained at the molecular and enzymatic level and provide a physiological demonstration that fatty acid oxidation is reduced in liver of estrogen-deficient rats.

Secondly, we hypothesized that estrogen deprivation would lead to hepatic leptin resistance, providing a mechanism by which fatty acid oxidation is lowered in liver of Ovx rats. However, contrary to our hypothesis, systemic leptin infusion tended to stimulate palmitate oxidation rate in liver slices of Ovx rats and this acutely reduced liver fat accumulation. Despite the fact that statistical significance was not reached, we found

relevant to discuss the results. The physiological importance of this finding is intriguing since estrogen sensitizes central leptin signaling and chronic estrogen withdrawal in Ovx rats causes central leptin insensitivity [19,27]. Thus, our results suggest that unlike central leptin responsiveness, hepatic leptin sensitivity is not completely blunted following estrogen removal.

Interestingly, leptin failed to stimulate fatty acid oxidation nor reduce TAG content in liver of intact female rats, which were lean and not expected to present hepatic leptin resistance. This is opposite to what has been reported in lean male rats, in which leptin infusion increased fatty acid oxidation while decreasing liver TAG content [14-17]. This finding suggests an influence of female sexual steroids for the lipid-depleting effects of leptin in liver. In this regards, estradiol shares common physiological functions with leptin by decreasing food intake and body adiposity, and by increasing energy expenditure [28-30]. While the presence of both hormones is centrally needed for the optimal regulation of energy homeostasis as it has been reported in estrogen-deficient rats [20], the lipid-depleting effects of estradiol and leptin in liver might not be additive. Biologic redundancy exists for several cytokines that present similar activity on a tissue or system [1]. As a result, it is infrequent that loss of one cytokine will markedly impair one specific function. Therefore, to some extent, leptin might mimic estradiol action in liver of estrogen-deficient female rats that would be redundant and thus, undetectable in liver of intact female rats.

Differences achieved in plasma leptin concentrations following leptin infusion need to be acknowledged. First, the higher plasma leptin levels measured in Ovx rats are probably related to higher basal concentrations, which is consistent with the larger adipose

mass of estrogen-deficient animals [25]. Leptin infusion in Huang et al. study also led to higher plasma leptin concentrations in DIO than lean rats, probably for the same reason [14]. Second, since calculation of volume delivery for the infusion was based on body weight, we might have over-estimated it in relation with the size of the volume of distribution, namely the vasculature, since growth of adipose tissue might occur ahead of angiogenesis [1]. Nevertheless, following the leptin infusion, the greater increases in plasma leptin concentrations from basal levels were achieved in intact rats, while leptin tended to stimulate hepatic TAG metabolism only in Ovx rats. This observation emphasizes the hepatic responsiveness of Ovx rats for leptin.

In conclusion, our results strengthen previous informations from molecular and enzymatic studies by providing a physiological demonstration showing that fatty acid oxidation is reduced in liver of Ovx rats, which probably contributes to the development of hepatic steatosis in this model of estrogen deficiency. Furthermore, contrary to our hypothesis, we demonstrated that the acute lipid-depleting effect of leptin is maintained in liver of Ovx rats. This finding suggests that hepatic leptin resistance as a mechanism is not involved in fatty liver development in Ovx rats.

References

1. *Qureshi K, Abrams GA*. Metabolic liver disease of obesity and role of adipose tissue in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease, *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3540-3553
2. *Nguyen P, Leray V, Diez M, Serisier S, Le Bloc'h J, Siliart B, Dumon H*. Liver lipid metabolism, *J Anim Physiol Anim Nutr* 2008; 92: 272-283
3. *Völzke H, Schwarz S, Baumeister SE, Wallaschofski H, Schwahn C, Grabe HJ, Kohlmann T, John U, Dören M*. Menopausal status and hepatic steatosis in a general female population, *Gut* 2007; 56: 594-595
4. *Hewitt KN, Pratis K, Jones MEE, Simpson ER*. Estrogen replacement reverses the hepatic steatosis phenotype in the male aromatase knockout mouse, *Endocrinology* 2004; 145: 1842-1848
5. *Lemieux C, Phaneuf D, Labrie F, Giguère V, Richard D, Deshaies Y*. Estrogen receptor α -mediated adiposity-lowering and hypocholesterolemic actions of the selective estrogen receptor modulator acolbifen, *Int J Obes (Lond)* 2005; 29: 1236-1244
6. *Deshaies Y, Dagnault A, Lalonde J, Richard D*. Interaction of corticosterone and gonadal steroids on lipid deposition in the female rat, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1997; 273: E355-E362
7. *Paquette A, Shinoda M, Rabasa-Lhoret R, Prud'homme D, Lavoie JM*. Time course of liver lipid infiltration in ovariectomized rats: impact of a high-fat diet, *Maturitas* 2007; 58: 182-190

8. *D'Eon TM, Souza SC, Aronovitz M, Obin MS, Fried SK, Greenberg AS.* Estrogen regulation of adiposity and fuel partitioning. Evidence of genomic and non-genomic regulation of lipogenic and oxidative pathways, *J Biol Chem* 2005; 280: 35983-35991
9. *Paquette A, Wang D, Jankowski M, Gutkowska J, Lavoie JM.* Effects of ovariectomy on *PPAR α* , *SREBP-1c*, and *SCD-1* gene expression in the rat liver, *Menopause* 2008; Jul 24 Epub ahead of print
10. *Desvergne B, Wahli W.* Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Nuclear Control of Metabolism, *Endocr Rev* 1999; 20: 649-688
11. *Campbell SE, Mehan KA, Tunstall RJ, Febbraio MA, Cameron-Smith D.* 17 β -estradiol upregulates the expression of peroxisome proliferator-activated receptor α and lipid oxidative genes in skeletal muscle, *J Mol Endocrinol* 2003; 31: 37-45
12. *Campbell SE, Febbraio MA.* Effect of ovarian hormones on mitochondrial enzyme activity in the fat oxidation pathway of skeletal muscle, *Am J Endocrinol Metab* 2001; 281: E803-E808
13. *Toda K, Takeda K, Akira S, Saibara T, Okada T, Onishi S, Shizuta Y.* Alternations in hepatic expression of fatty-acid metabolizing enzymes in ArKO mice and their reversal by the treatment with 17 β -estradiol or a peroxisome proliferator, *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001; 79: 11-17
14. *Huang W, Dedousis N, Bandi A, Lopaschuk GD, O'Doherty RM.* Liver triglyceride secretion and lipid oxidative metabolism are rapidly altered by leptin in *Vivo*, *Endocrinology* 2006; 147: 1480-1487

15. Huang W, Dedousis N, Bhatt BA, O'Doherty M. Impaired activation of phosphatidylinositol 3-kinase by leptin is a novel mechanism of hepatic leptin resistance in diet-induced obesity, *J Biol Chem* 2004; 279: 21695-21700
16. Fishman S, Muzumdar RH, Atzmon G, Ma X, Yang X, Einstein FH, Barzilai N. Resistance to leptin action is the major determinant of hepatic triglyceride accumulation *in vivo*, *FASEB J* 2007; 21: 53-60
17. Shimabukuro M, Koyama K, Chen G, Wang MY, Trieu F, Lee Y, Newgard CB, Unger RH. Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues, *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 4637-4641
18. Kimura M, Irahara M, Yasui T, Saito S, Tezuka M, Yamano S, Kamada M, Aono T. The obesity in bilateral ovariectomized rats is related to a decrease in the expression of leptin receptors in the brain, *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 290: 1349-1353
19. Meli R, Pacilio M, Raso GM, Esposito E, Coppola A, Nasti A, Di Carlo C, Nappi C, Di Carlo R. Estrogen and raloxifene modulate leptin and its receptor in hypothalamus and adipose tissue from ovariectomized rats, *Endocrinology* 2004; 145: 3115-3121
20. Ainslie DA, Morris MJ, Wittert G, Turnbull H, Proietto J, Thorburn AW. Estrogen deficiency causes central leptin insensitivity and increased hypothalamic neuropeptide Y, *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; 25: 1680-1688
21. Robertson MC, Owens RE, Klindt J, Friesen HG. Ovariectomy leads to a rapid increase in rat placental lactogen secretion, *Endocrinology* 1984; 114: 1805-1811

22. *El-Mas MM, Abdel-Rahman AA.* Effects of long-term ovariectomy and estrogen replacement on clonidine-evoked reductions in blood pressure and hemodynamic variability, *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 43: 607-615
23. *Bonjorn VM, Latour MG, Bélanger P, Lavoie JM.* Influence of prior exercise and liver glycogen content on the sensitivity of the liver to glucagon, *J Appl Physiol* 2002; 92: 188-194
24. *Ibrahimi A, Bonen A, Blinn WD, Hajri T, Li X, Zhong K, Cameron R, 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* 1999; 274: 26761-26766
25. *Tanaka M, Nakaya S, Kumai T, Watanabe M, Tateishi T, Shimizu H, Kobayashi S.* Effects of estrogen on serum leptin levels and leptin mRNA expression in adipose tissue in rats, *Horm Res* 2001; 56: 98-104
26. *Kim S, Shin HJ, Kim SY, Kim JH, Lee YS, Kim DH, Lee MO.* Genistein enhances expression of genes involved in fatty acid catabolism through activation of PPARalpha, *Mol Cell Endocrinol* 2004; 31: 51-58
27. *Clegg DJ, Brown LM, Woods SC, Benoit SC.* Gonadal hormones determine sensitivity to central leptin and insulin, *Diabetes* 2006; 55: 978-987
28. *Unger RH.* Longevity, lipotoxicity and leptin: the adipocyte defense against feasting and famine, *Biochimie* 2005; 87: 57-64
29. *Mystkowski P, Schwartz MW.* Gonadal steroids and energy homeostasis in the leptin era, *Nutrition* 2000; 16: 937-946

30. *Gao Q, Horvath TL.* Cross-talk between estrogen and leptin signaling in the hypothalamus, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 294: E817-E826

Legends of tables and figures

Table 1. Body weight at sacrifice, daily energy intake, urogenital fat pad and uterus weights, and plasma glucose and insulin concentrations in sham-operated (Sham), ovariectomized (Ovx), and ovariectomized supplemented with 17 β -estradiol (OvxE₂) rats. Values are means \pm SE, $n = 12$ rats/group. *Significantly different from Sham, $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. ++Significant difference between Ovx and OvxE₂, $P < 0.01$.

Table 2. Plasma leptin concentrations following saline (S) or leptin (L) infusion in sham-operated (Sham-S; Sham-L), ovariectomized (Ovx-S; Ovx-L), and ovariectomized supplemented with 17 β -estradiol (OvxE₂-S; OvxE₂-L) rats. Values are means \pm SE, $n = 6$ rats/group. **Significantly different from Sham, $P < 0.01$. &&Significant effect of leptin infusion, $P < 0.01$.

Fig. 1. A) Palmitate oxidation rate in liver slices and B) liver triacylglycerol (TAG) content in sham-operated (Sham), ovariectomized (Ovx), and ovariectomized supplemented with 17 β -estradiol (OvxE₂) rats. Values are means \pm SE, $n = 6$ rats/group. * Significantly different from Sham, $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. +Significant difference between Ovx and OvxE₂, $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$.

Fig. 2. A) Palmitate oxidation rate in liver slices and B) liver triacylglycerol (TAG) content following saline (S) or leptin (L) infusion in sham-operated (Sham-S; Sham-L), ovariectomized (Ovx-S; Ovx-L), and ovariectomized supplemented with 17 β -estradiol

(OvxE₂-S; OvxE₂-L) rats. Values are means \pm SE, $n = 6$ rats/group. ** Significantly different from Sham, $P < 0.01$. ++ Significant difference between Ovx and OvxE₂, $P < 0.01$.

Table 1

	Sham	Ovx	OvxE ₂
Body Weight (g)	251 ± 7	306 ± 7**	227 ± 4*** ⁺⁺
Energy Intake (kJ/day)	283 ± 10	338 ± 9**	276 ± 4 ⁺⁺
Urogenital Fat Weight (g)	6.68 ± 0.67	8.88 ± 0.85*	4.25 ± 0.52*** ⁺⁺
Uterus Weight (g)	0.49 ± 0.03	0.11 ± 0.01**	0.97 ± 0.09*** ⁺⁺
Plasma Glucose (mM)	7.30 ± 0.29	7.78 ± 0.26	5.67 ± 0.32*** ⁺⁺
Plasma Insulin (ng/mL)	1.61 ± 0.39	1.84 ± 0.41	1.94 ± 0.41

Table 2

	Sham-S	Sham-L	Ovx-S	Ovx-L
Plasma Leptin (ng/mL)	0.60 ± 0.10	5.23 ± 0.61 ^{&}	2.29 ± 0.48 ^{**}	11.23 ± 2.84 ^{**&}
Plasma Glucose (mM)	7.30 ± 0.29	6.93 ± 0.13 [*]	7.78 ± 0.26	6.82 ± 0.32 [*]
Plasma Insulin (ng/mL)	1.61 ± 0.39	1.76 ± 0.48	1.84 ± 0.41	2.14 ± 0.67

Figure 1

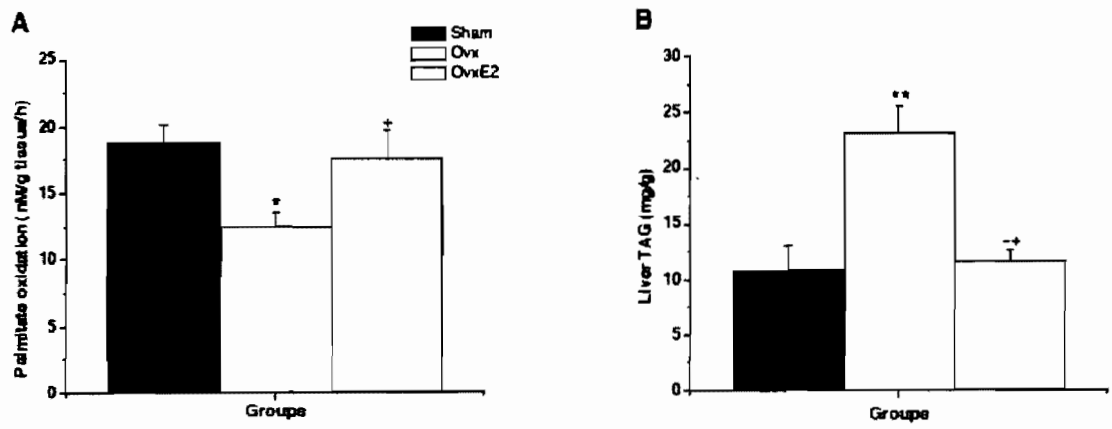
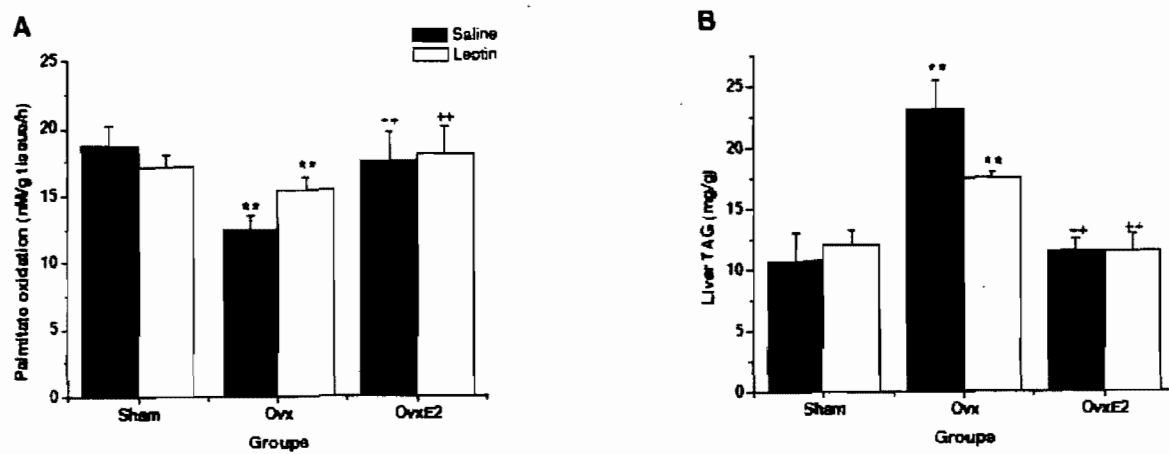


Figure 2



2.4 Étude 4

Titre

Specific adaptations of estrogen receptor α and β transcripts in liver and heart after endurance training in rats.

Auteurs

Amélie Paquette, Donghao Wang, Marie-Soleil Gauthier, Denis Prud'homme, Marek Jankowski, Jolanta Gutkowska et Jean-Marc Lavoie.

Journal

Mol Cell Biochem 306: 179-187, 2007.

Specific adaptations of estrogen receptor α and β transcripts in liver and heart after endurance training in rats.

Amélie Paquette¹, Dongaho Wang², Marie-Soleil Gauthier¹, Denis Prud'homme³, Marek Jankowski², Jolanta Gutkowska², and Jean-Marc Lavoie¹

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

²Laboratoire de biochimie cardiovasculaire, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM Hôtel-Dieu), Montréal, Québec, Canada

³School of Human Kinetics, Faculty of Health Sciences, University of Ottawa, and URCM, Montfort Hospital, Ottawa, Ontario, Canada

Running title: Effect of endurance training on the estrogen receptor in liver and heart

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

e-mail: 

Abstract

Estrogens exert their biological roles mainly through estrogen receptors (ER) that function as ligand-activated transcription factors. ER content in a cell is regulated by many factors and is decisive for estrogen action. The purpose of the present study was to investigate the influence of an 8-wk endurance training program on ER expression in the liver, right atrium (RA), and left ventricle (LV) of intact and ovariectomized (Ovx) rats. We measured ER α and ER β mRNA content by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). We found an important increase in ER α mRNA levels in the liver (300% ; $P < 0.01$) and in ER β mRNA levels in the RA (200% ; $P < 0.05$), and a marked decrease in ER α (80% ; $P < 0.01$) and ER β (40% ; $P < 0.05$) transcripts content in the LV of intact rats after endurance training. On the other hand, ER α mRNA levels were depressed by 50% ($P < 0.01$) in the liver, and increased by 60% ($P < 0.01$) in LV of Ovx rats after exercise training. These results first indicate that endurance training is associated with modifications of ER transcripts levels in the liver, LV, and RA of female rats. More specifically, these effects are tissue and isoform-specific and the direction of the response (increase or decrease) is different in intact and Ovx rats. It is suggested that some of the adaptations to endurance training in liver and heart may be mediated by an ER-dependent mechanism.

Keywords: gene expression, ovariectomy, right atrium, left ventricle, ovarian steroids.

Introduction

It is now well recognized that the effects of estrogens are not limited to the female reproductive system [1, 2]. Almost all organs of the body in both male and female are under estrogenic influence, and especially metabolic tissues such as liver and heart [1]. The biological actions of estrogens occur mainly when they bind to one of the two known estrogen receptor (ER) isoforms - ER α and ER β – specifically distributed among tissues [1, 2]. These nuclear receptors are ligand-activated transcription factors and can stimulate or repress the expression of genes encoding proteins with important physiological functions [1, 2]. In addition, ER can be stimulated independently of estrogen-binding, by phosphorylation of the N-terminal ligand-independent activation function (AF-1 domain), present on the ER gene [3]. Activation of the AF-1 domain allows ER to stimulate the transcription of estrogen-regulated genes [3]. Therefore, some estrogenic effects involving an ER-mechanism are mediated in the absence of estrogens [3].

In the liver, the synthesis of angiotensinogen, blood coagulation factors, LDL receptor, and lipoproteins are under the control of an ER α -dependent mechanism [4-7], the ER β isoform being absent in liver [8]. Estrogens also act in heart through ER α , where estradiol treatment reduces myocardial injury associated with ischemia-reperfusion [9, 10], and through ER β , where estrogens exert a protection against left ventricular hypertrophy [11]. Since the capacity of a cell to mediate an estrogenic response is correlated to the intracellular ER content, it is of interest to study the stimuli that influence ER expression [7, 12, 13].

Hepatic ER α content is principally influenced by growth hormone action, but other pituitary and glucocorticoid hormones are involved [14-16]. It is known from the ovariectomized (Ovx) rat model that endogenous estradiol negatively regulates hepatic ER α content [17-19], whereas hyperphysiological doses of 17 β -estradiol after exogenous administration or during pregnancy stimulates its synthesis [20-22]. Nevertheless, the changes in circulating estradiol levels associated with the estrous cycle do not affect ER α content in liver, unlike the fluctuations in ER α levels reported in uterus [16, 20, 21]. On the other hand, a positive regulation of ER levels by endogenous estrogens was reported in female rat atria using an Ovx model [23]. However, few studies looked at the regulation of ER content in heart, making it less defined and maybe not only endogenous estrogens are implicated. Taken together, it can be concluded that the regulation of ER expression is tissue-specific and can be influenced by several factors.

In addition to the above-mentioned stimuli, an endurance-trained state has also been reported to influence ER expression [24-26]. However, the information in this regard is scarce and limited to skeletal muscle. Two studies conducted by Lemoine *et al.* indicated changes in ER α transcripts levels after a 7-wk endurance training program in skeletal muscle [24, 25]. Furthermore, Wiik *et al.* found higher ER α and ER β transcripts levels in vastus lateralis of highly endurance-trained than in moderately active men [26]. Lemoine *et al.* [24, 25] put forward the concept that an ER-mediated mechanism could contribute to the training adaptations of skeletal muscle. We hypothesized that ER expression is also modulated following endurance training in liver and heart. The rationale for this hypothesis is based on the evidence that both endurance training and estrogen signalling pathway share

physiological targets in liver and heart. Examples of this are repression of the expression and the activity of hepatic lipase in liver [27, 28] and improvement of cardiac recovery after ischemia/reperfusion [29, 30]. In a first step, to increase our understanding of the link between ER and exercise training in these tissues, we determined the effects of an 8 wk endurance training program on ER α and ER β transcripts expression in liver and 2 heart chambers, left ventricle (LV) and right atrium (RA) of intact female rats.

It is well recognized that Ovx in rodents results in an increased adiposity [31, 32], and induces several metabolic disturbances including hepatic steatosis, hypercholesterolemia, hyperinsulinemia [31, 33], and decreased insulin sensitivity [34]. Several of these disturbances are prevented by exercise training [34, 35]. Furthermore, exercise training and estrogen therapy augment cardiac and endothelial function in Ovx rats [36-39]. It is not known if ER transcripts are affected after exercise training in Ovx rats. This question is of interest especially that ER mRNA levels cannot rely on endogenous ovarian hormones anymore. Therefore, a second aim of the present study was to determine the changes in ER transcripts expression following endurance training in liver and heart of ovariectomized rats. We have shown that endurance training is associated with tissue- and isoform-specific ER changes in intact female rats and that the direction of the response is modified by the removal of ovaries.

Material and methods

Animal care

Female Sprague-Dawley rats ($n = 32$) weighing 180-200 g (8 wk old) were obtained from Charles River (St-Constant, PQ) and housed individually. The 12:12-h light-dark cycle started at 6:00 AM, and room temperature was maintained at 20-23°C. All animals were given free access to the usual pellet rat chow (12.5% fat; 63.2% carbohydrate; 24.3% protein; kJ, Agribrands Purina Canada, Woodstock, ON) and tap water. They were treated similarly in terms of daily manipulations. The experiments described in this report were conducted according to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care after institutional approval.

Surgery

Two days after their arrival in our laboratory, the rats were randomly assigned to ovariectomy (Ovx) or sham-operation (Sham) groups. Ovx was performed according to the technique described by Robertson *et al* [40]. The animals were injected with antibiotics (Tribrissen 24%; 0,125 mL/kg sc) for 3 days, beginning the day before surgery. For surgery, the rats were anesthetized with a mixture of ketamine-xylazine (61.5-7.6 mg/kg, ip).

Groups

Two days after surgery, Ovx and Sham rats were submitted to training (Tr), or remained sedentary (Sed), which resulted in a total of 4 groups ($n = 8$ /group) : sham-operated

(Sham), sham-operated + endurance training (ShamTr), ovariectomized (Ovx), and ovariectomized + endurance training (OvxTr). Body weight and food intake in g were monitored every other day. All rats were killed 8 wk after surgical manipulation in the Tr or Sed state.

Endurance training protocol

Exercise training consisted of continuous running on a motor-driven rodent treadmill (Quinton Instruments, Seattle, WA), 5 times /wk for 8 wk. The rats progressively ran from 15 min/day at 15 m/min, 0% slope, up to 60 min/day at 26 m/min, 4% slope, for the last 4 wk. At the end of this 8-wk period, animals were sacrificed 48h after the last exercise bout.

Tissue sampling

Rats were killed between 08:00 and 11:00 AM. Food was removed from the cage 2-3h before sacrifice. Immediately after complete anesthesia (pentobarbital sodium; 50 mg/kg i.p.), the abdominal cavity was opened along the median line of the abdomen. Several organs and tissues were removed in the following order: liver, heart, uterus, femur, mesenteric, urogenital and retroperitoneal fat depots, along with the right triceps surae (soleus, plantaris, and gastrocnemius). The liver median lobe was freeze-clamped and the heart was divided in its 4 chambers. The liver median lobe, the right atrium (RA) and the left ventricle (LV) were processed for ER α and ER β mRNA determination and quantification. All tissue samples were weighed (Mettler AE 100), immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -78°C until further analysis. Finally, the right femur wet

weight was obtained following a short boiling period in a 10% KOH solution in order to remove the surrounding tissue.

Isolation of RNA and RT-PCR for hepatic ER α

ER α mRNA assessment in liver was conducted using RT-PCR while real time RT-PCR was used for determination of ER α and ER β mRNA in heart because of technical problems. Total RNA was isolated from rat frozen liver with Trizol reagent (Life Technologies, Rockville, MD) according to the manufacturer's specifications. Total RNA was then treated with RNase-free DNase I under a standard protocol. The integrity and quality of the purified RNA were controlled by formaldehyde denaturing agarose gel electrophoresis and measurement of the A_{260}/A_{280} ratio. First-strand cDNA was synthesized in a final volume of 40 μ l containing first-strand buffer, 2 μ g RNA, 2 μ g hexanucleotide primer (Life Technologies), and avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (12 units/ μ g RNA, Life Technologies). Five μ l of first-strand cDNA were added to a PCR mixture and amplified for 27 cycles by incubation at 95°C for 1 min, at 55°C for 50 s and at 72°C for 1 min 10 s, with final incubation at 72°C for 3 min, all in a Robocycler gradient 40 thermocycler (Stratagene, La Jolla, CA). The ER α primer sequences are enumerated in Table 1. Amplification of 18S RNA by oligonucleotides was achieved according to the protocol provided by the manufacturer (Ambion, Austin, TX). Control RT-PCR omitted reverse transcriptase or RNA from the reaction mixture. After amplification, the samples were loaded and electrophoresed on 1.5% agarose gel. Bands stained by ethidium bromide were counted and analyzed with the Storm 840 imaging system and ImageQuant software

(Version 4.2, Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). To validate RT-PCR as a tool for the semi-quantitative measurement of mRNA, dose-response curves were charted for different amounts of total RNA extracted from the rat liver, and the samples were quantified in the linear phase of PCR amplification. These data were normalized to the corresponding values of 18S RNA. All samples were run in duplicate. The intra- and inter-assay coefficients of variation were 6 and 8%, respectively.

Isolation of RNA and semi-quantitative real-time PCR for ER α and ER β in heart

Total RNA was extracted from frozen hearts with Trizol (Invitrogen Life Technologies, Inc, Burlington, ON) according to the manufacturer's protocol. To remove genomic DNA, RNA samples were incubated with 2 U deoxyribonuclease I (DNase I; Invitrogen Life Technologies, Inc, Burlington, ON)/ug RNA for 30 min at 37°C. The cDNA synthesis was performed as previously described. PCR was carried out in the iCycler IQ Real time PCR detection system (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA), using SYBR® green chemistry. Samples were analysed in duplicate or triplicate. For amplification, 2 ul of diluted cDNA was added to a 20 μ l reaction mixture containing 1X iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Inc.) and 200 nM forward and reverse primers. The thermal cycling program was 95°C for 2 min, followed by 40 cycles of 95°C for 30 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 30 s. Primers were purchased from Invitrogen Life Technologies, Inc. Primer pairs were chosen to minimise primer dimerization and to generate an amplicon between 150 and 350 bp. The primers used are enumerated in Table 1. Optical data were collected during the annealing step of each cycle. Following PCR, reaction products were

melted for 1 min at 95°C, and then the temperature was lowered to 55°C, and then gradually increased to 95°C in 1.0°C increments, 10 s per increment. Optical data were collected over the duration of the temperature increase with a dramatic drop in fluorescence occurring. This was done to ensure that only one PCR product was amplified per reaction.

The relative expression of the RT-PCR products was determined using the $\Delta\Delta C_t$ method. This method calculates relative expression using the equation: Fold induction = $2^{-[\Delta\Delta C_t]}$, where C_t = the threshold cycle, i.e. the cycle number at which the sample's relative fluorescence rises above the background fluorescence and $\Delta\Delta C_t = [C_t \text{ gene of interest (unknown sample)} - C_t \text{ GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) (unknown sample)}] - [C_t \text{ gene of interest (calibrator sample)} - C_t \text{ GAPDH (calibrator sample)}]$. One of control samples was chosen as the calibrator sample and used in each PCR. Each sample was run in duplicate and the mean C_t was used in the $\Delta\Delta C_t$ equation. GAPDH was chosen for normalisation instead of 18S RNA because the latter is rapidly amplified and taking into consideration the high sensitivity of real time RT-PCR, it is difficult to determine C_t for 18S RNA. GAPDH showed consistent expression relative to other housekeeping genes among the treatment groups in our array experiments.

Statistical analysis

Values are expressed as means \pm S.E. Statistical analyses were performed by a two-way ANOVA for non-repeated measures. Fisher's PLSD post hoc test was used in the event of a significant ($P < 0.05$) ratio.

Results

Comparison of body composition parameters in Sham and Ovx rats confirms that ovariectomies were well performed (Table 2) [31]. Ovx rats showed higher ($P < 0.01$) body weight, energy intake, intra-abdominal fat depot and right triceps surae weights than Sham rats. Moreover, uterus weight was significantly lower in Ovx rats ($P < 0.01$), indicating total ovariectomy.

Endurance training led to increased ($P < 0.05$) body weight and energy intake in Sham rats, suggesting that intact animals did not experience negative energetic balance during the training period (Table 2). Exercise training resulted in a significant ($P < 0.01$) decrease in intra-abdominal fat depot weight when expressed per unit of body weight in both Sham and Ovx rats reflecting the effectiveness of the running program. In addition, femur weight was significantly increased ($P < 0.01$) with training in both Sham and Ovx groups.

The RT-PCR technique was used to demonstrate ER transcripts changes in response to endurance training in the liver and heart chambers (LV and RA) of intact and Ovx female rats. Our results confirmed that ovariectomy induced tissue-specific alterations of ER mRNA levels [41], and showed for the first time that endurance training affects ER expression in liver and heart.

A summary of the results on ER transcripts is presented in Table 3. ER α mRNA levels were increased by 200% in the liver and RA and decreased by 80% in LV of sedentary Ovx compared to Sham rats ($P < 0.05$; Fig. 1). Different effects of endurance training on ER α expression were observed in the liver and heart chambers, and between

intact and Ovx rats. Hepatic ER α transcripts content was significantly higher (300%, $P < 0.01$) in Sham, but 50% lower ($P < 0.01$) in Ovx rats after endurance training (Fig. 1A). On the other hand, ER α mRNA levels in LV were decreased by 80% ($P < 0.05$) in Sham, and increased by 60% ($P < 0.01$) in Ovx rats after endurance training (Fig. 1B). There were no significant effects of training on ER α transcripts content in RA (Fig. 1C).

ER β transcripts levels were completely depressed by Ovx in LV (100%; $P < 0.01$; Fig. 2A), but remained unchanged in RA of sedentary rats (Fig. 2B). ER β mRNA levels were 40% lower ($P < 0.05$; Fig. 2A) in LV, but 200% higher ($P < 0.05$; Fig. 2B) in RA of Sham rats after endurance training. However, endurance training did not change ER β mRNA content in either LV or RA of Ovx rats (Fig. 2A and 2B).

Discussion

The purpose of the present study was to investigate the effects of an 8-wk endurance training regimen on ER transcripts levels in liver and heart of female rats. We found significant alterations of ER expression in the liver, left ventricle, and right atrium of endurance trained animals. More specifically, we showed that these effects are tissue and isoform-specific and that the direction of the changes in transcripts levels is different in Ovx than in intact rats.

Training in Sham rats. The most novel finding of the present study is the clear effect of endurance training on ER transcripts content in liver and heart. We found an important increase (300%) in hepatic ER α mRNA levels, accompanied by a decreased expression of both ER α and ER β genes in LV, and an increase (200%) in ER β transcripts content in RA following endurance training in intact rats. Our results are in line with the tissue-specific regulation of ER, which has been shown to be under the control of several factors including pituitary and gonadal hormones [14, 15, 23]. The present results extend these findings by indicating that an endurance-trained state also influence ER gene expression in liver and heart.

Our results raise the question as to why ER expression changes following endurance training in liver and heart. Endurance training is known to stimulate the expression of transcription factors, leading to the synthesis of proteins involved in the adaptations of skeletal muscle to training. For instance, the increased expression of the transcription factor NRF-1 takes part in the mitochondrial biogenesis processes in muscle in response to endurance training [42]. ERs are themselves transcription factors and variations in their

transcripts levels may lead to stimulation or repression of target genes [1, 2]. Lemoine and *al.* were first to report an effect of endurance training on ER α gene expression in skeletal muscle [24, 25]. They put forward the concept that an ER-mediated mechanism could contribute to the training adaptations of skeletal muscle [24, 25]. The stimulation of mitochondrial biogenesis is an adaptation to training that may also be mediated by an ER-dependent mechanism in skeletal muscle, as a positive correlation was reported between ERs levels and citrate synthase activity [26]. Our data suggest that this concept could be extended to liver and heart. It seems likely that endurance training and estrogens share target genes in the liver. For instance, both endurance training and estrogens, through ER α , repressed the expression and activity of hepatic lipase, leading to increased levels of circulating HDL [22, 27, 28, 43]. We found important increases in hepatic ER α mRNA levels in endurance-trained rats. It is thus possible that the stimulation of the estrogen signalling pathway through endurance training participates in the repression of hepatic lipase by training.

Aside from the liver, the physiological role of estrogens on the myocardium is poorly understood, making the interpretation of our training effects on ER transcript levels more difficult. However, several associations exist for the ER content and myocardial functions and dysfunctions [44, 45]. For instance, ER are involved in the stability of cardiac intercalated discs and an up-regulation of ER content in myocardium is related to myocardial pressure load as a compensatory mechanism [44, 45]. The decreased levels of ER α mRNA content found in LV of our endurance trained rats may, therefore, be interpreted as an indicator of an improvement in heart function. Nevertheless, it is difficult

to reconcile the important decrease in both ER α and ER β genes in LV following endurance training with the known cardioprotective effect associated with training and with the administration of estrogens [46, 47]. It is possible that both of these actions occur through a different mechanism. Recent evidence suggests that ER β attenuation of cardiac dysfunction following trauma-hemorrhage is mediated via a nuclear as well as a mitochondrial action [48]. This reemphasizes our limited understanding of the effects and the mechanism of action of ER α and ER β on the cardiovascular system [49].

Effects of Ovx. It has been proposed that endogenous estrogens may be repressive on hepatic ER α gene expression of intact rats, as an elevation of ER α mRNA levels is observed after Ovx [17, 18]. Accordingly, we found an increase in hepatic ER α mRNA content after Ovx. On the other hand, the consequences of ovaries removal on ER transcripts levels in heart are poorly defined. A positive regulation of ER α levels by endogenous estrogens was reported in female rat atria following Ovx [23], while other reports showed no significant changes [41]. Our study is the first, to our knowledge, to report effects of Ovx on both ER isoforms transcripts levels in two different heart chambers of the female rat. We observed decreased ER α and ER β mRNA levels in LV, and increased content of ER α transcripts in RA by Ovx. These results indicate the positive and negative regulation of ER mRNA levels in LV and RA, respectively, by sex steroids. Therefore, our findings in liver and heart chambers of Ovx rats further highlight the reported tissue-specific regulation of ERs by endogenous ovarian hormones.

Training in Ovx rats. Taking into account the fact that ER transcripts were largely modified by the Ovx, the second major finding of the present study is the different effect of

endurance training found on ER transcripts levels according to the presence or the absence of ovaries. The training adaptations of ER α mRNA content in the liver and LV of Ovx animals was opposite to the training response observed in Sham rats. In addition, while exercise training altered ER β mRNA content in LV and RA of Sham rats, it had no effect in Ovx rats. These findings suggest that the presence or absence of ovaries influence the response of ER gene expression to the stimulus of exercise. This is in line with the action of estradiol in liver that has been reported to depend on the presence of the pituitary hormones [12, 14, 15]. Thus, it seems that the responsiveness of the ER gene in liver and heart to the stimulus of exercise training is different according to the presence of ovarian steroids. The response of ER transcripts to exercise training in the present Ovx rats also suggest that exercise training compensated for the ovarian steroid deprivation in liver and heart. It is important to recall that the transcriptional activity of ER can be modified by factors other than estrogens [3, 50]. Exercise-induced activation of MAPK can lead to phosphorylation of the AF-1 domain of the ER gene, thus resulting in the stimulation or the repression of ER transcriptional activity [51, 52].

Although ER α is the main receptor known to mediate the estrogenic effects, both isoforms mediate specific actions, and the relative importance of the two isoforms is not well understood [2]. Our results also suggest that the ER gene expression in RA is less sensitive to different stimuli, e.g. ovariectomy (ovarian steroids deprivation) and exercise training, than the ER gene expression in the liver and LV.

There are limitations to the present study that need to be addressed. It could be argued that our training program disrupted the estrus cycle of intact rats and altered ER

expression, since circulating estrogens can regulate the levels of their own receptors [23, 53, 54]. However, training-induced disruption of the estrus cycle is often associated with body weight loss and low energy intake [55, 56]. This was hardly the case in our study since intact female rats gained body weight and increased their energy intake with training. Moreover, changes in ERmRNA levels following endurance training were also observed in Ovx rats. Although plasma estradiol levels were not measured in the present study, it seems likely that endurance training was indeed responsible for the changes that we observed on ER expression in both intact and Ovx rats. On the other hand, the physiological interpretation of the present data is limited by the sole measurement of transcripts levels. However, the demonstration that these ER gene transcripts are modified with endurance training in liver and heart constitutes an interesting opening in a new avenue of research linking ER as a possible contributor to the training adaptations in these tissues.

In conclusion, we showed, using the RT-PCR technique that endurance training is associated with modifications of ER gene expression in liver, right atrium, and left ventricle of the heart. We demonstrated that these training effects are tissue and isoform specific and that the responsiveness of the ER gene to the stimulus of endurance training is different in intact and Ovx animals. It is suggested that ER gene expression may mediate some of the adaptative effects of endurance training in liver and heart.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC; JML) and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; JML and DP), and from CIHR MOP 53217, and CIHR NET SRD-63193, Heart and Stroke Foundation of Canada (JG and MJ).

References

1. Ciocca DR, Vargas Roig LM (1995) Estrogen receptors in human nontarget tissues: biological and clinical implications. *Endocr Rev* 16: 35-62
2. Matthews J Gustafsson JA (2003) Estrogen signaling: a subtle balance between ER α and ER β . *Mol Interv* 3: 281-292
3. Kato S, Endoh H, Masuhiro Y et al (1995) Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 270: 1491-1494
4. Brindley DN, Salter AM (1991) Hormonal regulation of the hepatic low density lipoprotein receptor and the catabolism of low density lipoproteins: relationship with the secretion of very low density lipoproteins. *Prog Lipid Res* 30: 349-360
5. Farsetti A, Misiti S, Citarella F et al (1995) Molecular basis of estrogen regulation of Hageman factor XII gene expression. *Endocrinology* 136: 5076-5083
6. Klett C, Ganten D, Hellmann W (1992) Regulation of hepatic angiotensinogen synthesis and secretion by steroid hormones. *Endocrinology* 130: 3660-3668
7. Stavreus-Evers A, Parini P, Freyschuss B (2001) Estrogenic influence on the regulation of hepatic estrogen receptor- α and serum level of angiotensinogen in female rats. *J Steroid Biochem Mol Biol* 78: 83-88
8. Kuiper GGJM, Carlsson B, Grandien K (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinology* 138: 863-870

9. Booth EA, Obeid NR, Lucchesi BR (2005) Activation of estrogen receptor- α protects the in vivo rabbit heart from ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: H2039-H2047
10. Jovanovic S, Jovanovic A, Shen WK et al (2000) Low concentrations of 17 β -estradiol protect single cardiac cells against metabolic stress-induced Ca²⁺ loading. *J Am Coll Cardiology* 36: 948-952
11. Babiker FA, Lips D, Meyer R et al (2006) Estrogen receptor β protects the murine heart against left ventricular hypertrophy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 1524-1530
12. Rudling M, Norstedt G, Olivecrona H et al (1992) Importance of growth hormone for the induction of hepatic low density lipoprotein receptors. *Proc Natl Acad Sci* 89: 6983-6987
13. Webb P, Lopez GN, Greene GL et al (1992) The limits of the cellular capacity to mediate an estrogen response. *Mol Endocrinol* 6: 157-167
14. Freyschuss B, Sahlin L, Masironi B et al (1994) The hormonal regulation of the oestrogen receptor in rat liver: an interplay involving growth hormone, thyroid hormones and glucocorticoids. *J Endocrinol* 142: 285-298
15. Norstedt G, Wrangé O, Gustafsson JA (1981) Multihormonal regulation of the estrogen receptor in rat liver. *Endocrinology* 108: 1190-1196
16. Stavreus-Evers AC, Freyschuss B, Eriksson HA (1997) Hormonal regulation of the estrogen receptor in primary cultures of hepatocytes from female rats. *Steroids* 62: 647-654

17. Dickson RB, Eisenfeld AJ (1979) Estrogen receptor in liver of male and female rats: endocrine regulation and molecular properties. *Biol Reprod* 21: 1105-1114
18. Eriksson HA (1982) Different regulation of the concentration of estrogen receptors in the rat liver and uterus following ovariectomy. *FEBS Lett* 149: 91-95
19. Thompson C, Lucier GW (1983) Hepatic estrogen responsiveness. *Mol Pharmacol* 24: 69-76
20. Lax ER, Tamulevicius P, Muller A et al (1983) Hepatic nuclear estrogen receptor concentrations in the rat – influence of age, sex, gestation, lactation and estrous cycle. *J Steroid Biochem* 19: 1083-1088
21. Marr W, White JO, Elder MG et al (1980) Nucleo-cytoplasmic relationships of oestrogen receptors in rat liver during the oestrous cycle and in response to administered natural and synthetic oestrogen. *Biochem J* 190: 17-25
22. Staels B, Jansen H, Van Tol A et al (1990) Development, food intake, and ethinylestradiol influence hepatic triglyceride lipase and LDL-receptor mRNA levels in rats. *J Lipid Res* 31:1211-1218
23. Jankowski M, Rachelska G, Donghao W et al (2001) Estrogen receptors activate atrial natriuretic peptide in the rat heart. *Proc Natl Acad Sci* 98: 11765-11770
24. Lemoine S, Granier P, Tiffoche C et al (2002) Effect of endurance training on oestrogen receptor alpha transcripts in rat skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 174: 283-289
25. Lemoine S, Granier P, Tiffoche C et al (2002) Effect of endurance training on oestrogen receptor alpha expression in different rat skeletal muscle type. *Acta Physiol Scand* 175: 211-217

26. Wiik A, Gustafsson T, Esbjornsson M et al (2005) Expression of oestrogen receptor α and β is higher in skeletal muscle of highly endurance-trained than of moderately active men. *Acta Physiol Scand* 184: 105-112
27. Bergeron J, Couillard C, Després JP et al (2001) Race differences in the response of postheparin plasma lipoprotein lipase and hepatic lipase activities to endurance exercise training in men. Results from the HERITAGE family study. *Atherosclerosis* 159: 399-406
28. Jones DR, Schmidt RJ, Pickart RT et al (2002) Estrogen receptor-mediated repression of human hepatic lipase gene transcription. *J Lipid Res* 43: 383-391
29. Quindry J, French J, Hamilton K et al (2005) Exercise training provides cardioprotection against ischemia-reperfusion induced apoptosis in young and old animals. *Exp gerontol* 40: 416-425
30. Xu Y, Arenas IA, Armstrong SJ et al (2006) Estrogen improves cardiac recovery after ischemia/reperfusion by decreasing tumor necrosis factor- α . *Cardiovasc Res* 69: 836-844
31. Picard F, Deshaies Y, Lalonde J et al (2000) Effects of the estrogen antagonist EM-652.HCL on energy balance and lipid metabolism in ovariectomized rats. *Int J Obes* 24: 830-840
32. Torto R, Boghossian S, Dube MG et al (2006) Central leptin gene therapy blocks ovariectomy-induced adiposity. *Obesity* 14: 1312-1319

33. Lemieux C, Phaneuf D, Labrie F et al (2005) Estrogen receptor α -mediated adiposity-lowering and hypocholesterolemic actions of the selective estrogen receptor modulator acolbifen. *Int J Obes* 29: 1236-1244
34. Latour MG, Shinoda M, Lavoie JM (2001) Metabolic effects of physical training in ovariectomized and hyperestrogenic rats. *J Appl Physiol* 90: 235-241
35. Shinoda M, Latour MG, Lavoie JM (2002) Effects of physical training on body composition and organ weights in ovariectomized and hyperestrogenic rats. *Int J Obes* 26: 335-343
36. Bupha-Intr T, Wattanapermpool J (2004) Cardioprotective effects of exercise training on myofilament calcium activation in ovariectomized rats. *J Appl Physiol* 96: 1755-1760
37. Moien-Afshari F, Kenyon E, Choy JC et al (2003) Long-term effects of ovariectomy and estrogen replacement treatment on endothelial function in mature rats. *Maturitas* 45: 213-223
38. Patten RD, Pourati I, Aronovitz MJ et al (2004) 17β -estradiol reduces cardiomyocyte apoptosis in vivo and in vitro via activation of phospho-inositide-3 kinase/Akt signaling. *Circ Res* 95: 692-699
39. Rogers J, Sheriff DD (2004) Role of estrogen in nitric oxide- and prostaglandin-dependant modulation of vascular conductance during treadmill locomotion in rats. *J Appl Physiol* 97: 756-763
40. Robertson MC, Owens RE, Klindt J et al (1984) Ovariectomy leads to a rapid increase in rat placental lactogen secretion. *Endocrinology* 114: 1805-1811

41. Mohamed MK, Abdel-Rahman AA (2000) Effect of long-term ovariectomy and estrogen replacement on the expression of estrogen receptor gene in female rat. *Eur J Endocrinol* 142: 307-314
42. Hood DA, Irrcher I, Ljubicic V et al (2006) Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle. *J Exp Biol* 209: 2265-2275
43. Thompson PD, Cullinane EM, Sady SP et al (1991) High density lipoprotein metabolism in endurance athletes and sedentary men. *Circulation* 84: 140-152
44. Mahmoodzadeh S, Eder S, Nordmeyer J et al (2006) Estrogen receptor alpha up-regulation and redistribution in human heart failure. *FASEB J* 20: 929-934
45. Nordmeyer J, Eder S, Mahmoodzadeh S et al (2004) Upregulation of myocardial estrogen receptors in human aortic stenosis. *Circulation* 110: 3270-3275
46. Brown DA, Moore RL (2007) Cardioprotection acquired through exercise. *J Appl Physiol* (Epub ahead of print). doi:10.1152/jappphysiol.00464.2007.
47. Yu HP, Shimizu T, Choudhry MA et al (2006) Mechanism of cardioprotection following trauma-hemorrhagic shock by a selective estrogen receptor-beta agonist: up-regulation of cardiac heat shock factor-1 and heat shock proteins. *J Mol Cell Cardiol* 40: 185-194
48. Hsieh YC, Yu HP, Suzuki T et al (2006) Upregulation of mitochondrial respiratory complex IV by estrogen receptor-beta is critical for inhibiting mitochondrial apoptotic signaling and restoring cardiac functions following trauma-hemorrhage. *J Mol Cell Cardiol* 41: 511-521

49. Gabel SA, Walker VR, London RE et al (2005) Estrogen receptor beta mediates gender differences in ischemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 38: 289-297
50. Bunone G, Briand PA, Miksicek RJ et al (1996) Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO J* 15: 2174-2183
51. Iemitsu M, Maeda S, Jesmin S et al (2006) Activation pattern of MAPK signaling in the hearts of trained and untrained rats following a single bout of exercise. *J Appl Physiol* 101: 151-163
52. Widegren U, Jiang XJ, Krook A et al (1998) Divergent effects of exercise on metabolic and mitogenic signaling pathways in human skeletal muscle. *FASEB J* 12: 1379-1389
53. Carlberg KA, Fregly MJ (1985) Disruption of estrous cycles in exercise-trained rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 179: 21-24
54. Shupnik MA, Gordon MS, Chin WW (1989) Tissue-specific regulation of rat estrogen receptor mRNAs. *Mol Endocrinol* 3: 660-665
55. Harber VJ (2000) Menstrual dysfunction in athletes: an energetic challenge. *Exerc Sport Sci Rev* 28: 19-23
56. Williams NI, Helmreich DL, Parfitt DB et al (2001) Evidence for a causal role of low energy availability in the induction of menstrual cycle disturbances during strenuous exercise training. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 5184-5193

Table 1 Oligonucleotide primers used for reverse transcriptional polymerase chain reaction (RT-PCR), and real-time quantitative PCR. Estrogen receptor-alpha (ER α); estrogen receptor-beta (ER β); glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GADPH). 18S primer pair universal 18S (Ambion, Lot N: 115R057113A) was bought directly from Ambion.

Gene	Sense primer (5'-3')	Antisense primer (5'-3')	Accession No.
ER α	GCGGCTGCCACTGACCATG	CCTCGGGGTAGTTGAACACGG	NM_012689
ER α (real time)	CCAAAGCCTCGGGAATGG	AGCTGCGGGCGATTGAG	NM_012689
ER β (real time)	TTGGTGTGAAGCAAGATCACTA GAG	AACAGGGCAGGCACAACCTG	NM_012754
GADPH (real time)	TTCAATGGCACAGTCAAGGC	TCACCCCATTTGATGTTAGCG	NM_017008
Beta Actin	ACCCACACTGTGGCCCATCTA	GCCACAGGATTCCATACCCA	NM_031144

Table 2 Body weight, daily energy intake, intra-abdominal fat depots, left ventricle weight, femur weight, right triceps surae weight, and uterus weight, in sham-operated (Sham), sham-operated + endurance training (ShamTr), ovariectomized (Ovx), and ovariectomized + endurance training (OvxTr) rats.

	Sham	ShamTr	Ovx	OvxTr
Body weight (g)	287±7	330±14 ⁺	394±9**	377±9*
Energy intake (kJ/day)	259±6	288±10 ⁺	321±8**	310±8
Intra-abdominal fat depot weight (g)	15±2	14±1	33±2**	23±3* ⁺
Intra-abdominal fat depot weight / Body weight (g/g)	0.053 ± 0.005	0.044 ± 0.003 ⁺⁺	0.084 ± 0.005**	0.061 ± 0.007 ^{***++}
Left ventricle weight (mg)	617 ± 28	660 ± 35	732 ± 27**	791 ± 30**
Left ventricle weight/Body weight (mg/g)	2.11 ± 0.06	1.99 ± 0.04	1.84 ± 0.03**	2.09 ± 0.09 ⁺

Femur weight (mg)	728 ± 18	838 ± 39 ⁺⁺	772 ± 18	851 ± 13 ⁺⁺
Femur weight/ Body weight (mg/g)	2.54 ± 0.07	2.60 ± 0.05	1.96 ± 0.04 ^{**}	2.25 ± 0.05 ^{**++}
Right triceps surae weight (g)	2.03±0.05	2.21±0.10	2.46±0.05 ^{**}	2.50±0.04 ^{**}
Uterus weight (g)	0.61±0.08	0.81±0.07	0.11±0.01 ^{**}	0.10±0.01 ^{**}

Values are means ± SE, $n=8$ rats/group. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$: significantly different from corresponding Sham group. + $P < 0.05$ and ++ $P < 0.01$: significantly different from corresponding sedentary rats.

Table 3 Summary of the results on ER transcripts. Estrogen receptor-alpha ($ER\alpha$); estrogen receptor- beta ($ER\beta$); ovariectomy (Ovx); training (Tr); left ventricule (LV); right atrium (RA).

	Effect of Tr (Sham)		Effect of Ovx		Effect of Tr (Ovx)	
	$ER\alpha$	$ER\beta$	$ER\alpha$	$ER\beta$	$ER\alpha$	$ER\beta$
Liver	↑300%	⊗	↑200%	⊗	↓50%	⊗
LV	↓80%	↓40%	↓80%	↓100%	↑60%	N.S.
RA	N.S. (↑150%)	↑200%	↑200%	N.S.	N.S.	N.S.

Comparisons are made with respective control groups. ⊗ The isoform is not expressed in that tissue. N.S. No significant effect, otherwise all other indicated changes are significant, $P < 0.05$.

Figure legends

Fig. 1 ER α mRNA levels in the liver, left ventricle (LV), and right atrium (RA) of sham-operated (Sham), sham-operated + endurance training (ShamTr), ovariectomized (Ovx), and ovariectomized + endurance training (OvxTr) rats. Values are means \pm SE, $n=8$ rats/group. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$: significantly different from corresponding Sham group. + $P < 0.05$ and ++ $P < 0.01$: significantly different from corresponding sedentary rats. Values were normalized to values of Sham-sed groups in Fig 1B and 1C.

Fig. 2 ER β mRNA levels in left ventricle (LV) and right atrium (RA) of sham-operated (Sham), sham-operated + endurance training (ShamTr), ovariectomized (Ovx), and ovariectomized + endurance training (OvxTr) rats. Values are means \pm SE, $n=8$ rats/group. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$: significantly different from corresponding Sham group. + $P < 0.05$: significantly different from corresponding sedentary rats. Values were normalized to values of Sham-sed groups in Fig 1B and 1C. Values for Ovx and OvxTr rats were 0.001 ± 0.0003 and 0.001 ± 0.001 , respectively.

Figure 1

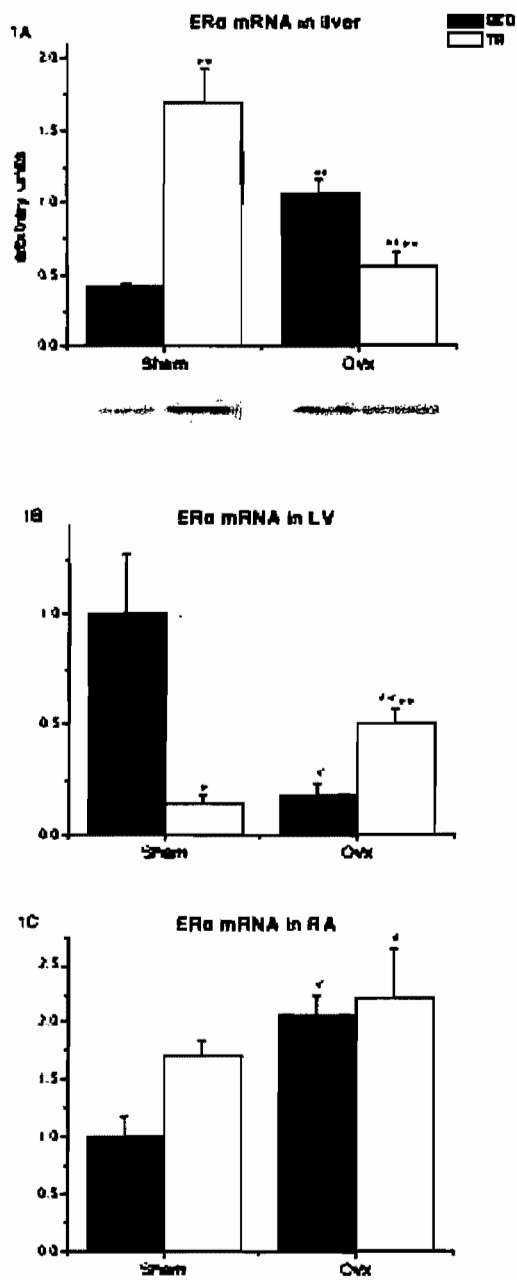
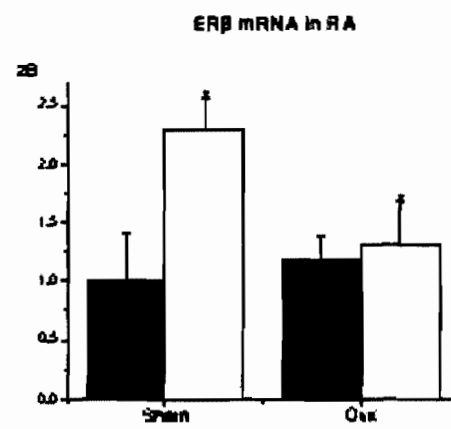
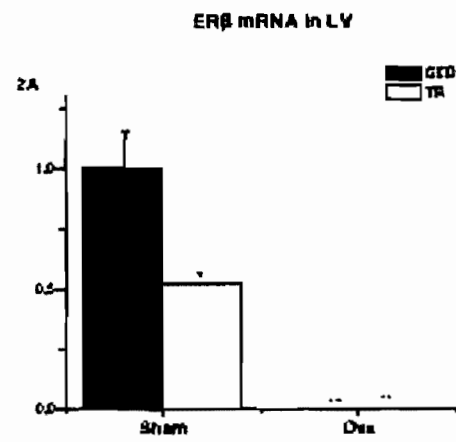


Figure 2



3. Chapitre 3 : Discussion générale

L'objectif général des études qui composent cette thèse était de caractériser le développement de la stéatose hépatique dans le contexte du déficit estrogénique. Nous avons utilisé le modèle d'ovariectomie chez la rate pour étudier ce phénomène dans différentes conditions nutritionnelles et hormonales, et pour mieux comprendre certaines adaptations de la fonction estrogénique en réponse à un stimulus d'entraînement en endurance.

Il convient d'abord de préciser que les conclusions à tirer de l'ensemble des études de cette thèse sont limitées par le modèle expérimental utilisé. En effet, l'interprétation des résultats obtenus chez le rat doit être faite avec prudence lorsque vient le temps de les transposer à l'humain. À cet égard, bien que des analogies puissent être faites entre le retrait de l'action estrogénique par l'ovariectomie et la transition vers la ménopause chez la femme, ces deux conditions demeurent différentes. Notamment, l'ovariectomie est un mode de retrait de l'action estrogénique beaucoup plus agressif que ne l'est la péri-ménopause, qui peut s'échelonner sur plusieurs années (McKinlay et al. 1992). De plus, l'ovaire post-ménopausé continue de sécréter des androgènes qui stimulent le métabolisme de repos, en plus de servir de substrats aux aromatases des tissus de l'organisme pour la production d'estrogènes (Labrie 2003).

En ce qui a trait au choix du modèle lui-même, il aurait été préférable d'imposer une restriction énergétique aux rates Ovx équivalente à la prise alimentaire des rates intactes dans l'ensemble des études de la thèse pour éviter l'effet confondant de l'hyperphagie résultant de l'Ovx. Enfin, il convient de soulever le fait que la supplémentation estrogénique que nous avons utilisée a induit des concentrations plasmatiques supra-physiologiques de l'hormone, sans compter que ce type de supplémentation ne reproduit pas l'action estrogénique endogène, qui est normalement cyclique. Malgré tout, les résultats que nous avons obtenus à l'aide du modèle Ovx permettent de mieux documenter le phénomène de la

stéatose hépatique induite par le retrait de l'action estrogénique.

Puisque les principaux thèmes de discussion des études ont été abordés dans les articles présentés au chapitre précédent, la discussion qui suit sera plutôt consacrée à une synthèse des éléments de discussion individuels et à la présentation de résultats qui n'ont pas été rapportés dans les manuscrits. De plus, certaines hypothèses et spéculations basées sur les résultats que nous avons obtenus dans les études de la thèse seront présentées dans ce chapitre.

Confirmation de la qualité des ovariectomies

Dans les quatre études de la thèse, les ovariectomies que nous avons réalisées ont toutes entraîné une hyperphagie, une prise de poids corporel et d'adiposité, de même qu'une réduction importante de la taille de l'utérus chez les rates soumises à l'intervention. Ces changements morphologiques typiquement associés à l'ovariectomie ont été rapportés dans de nombreuses études et confirment la qualité des interventions que nous avons réalisées (Deshaies et al. 1997, Lemieux et al. 2003, Picard et al. 2000, McElroy et Wade 1986, Wade et al. 1985). De plus, la supplémentation estrogénique a complètement prévenu les changements induits par l'Ovx, ce qui nous permet d'affirmer que les effets que nous avons observés chez les rates Ovx étaient dus au déficit estrogénique.

Effet du retrait de l'action estrogénique par l'Ovx sur le développement de la stéatose hépatique

Les trois premières études de la thèse ont confirmé l'association entre le retrait de l'action estrogénique et le développement de la stéatose hépatique. Dans tous les cas, l'ovariectomie a induit une importante accumulation hépatique de TAG chez les rates Ovx en comparaison aux rates contrôles. Nous avons d'abord caractérisé le développement de la stéatose hépatique induite par le déficit estrogénique à plus ou moins long terme par une cinétique

d'infiltration hépatique échelonnée sur trois temps, soit 3, 8 et 13 semaines après l'Ovx.

Les résultats de cette première étude ont montré une accumulation progressive de lipides dans le parenchyme hépatique des rates Ovx au cours de la période expérimentale de 13 semaines. Par extension, ces observations suggèrent que l'accumulation de lipides dans le foie des femmes post-ménopausées est susceptible d'augmenter au fil des années.

La cinétique d'infiltration que nous avons rapportée chez les rates Ovx diffère de celle décrite par Gauthier et al. (2006) chez des rates intactes soumises à une diète riche en lipides. Dans cette étude, le foie a rapidement accumulé une quantité importante de lipides qu'il a relâchés dans le plasma avant de s'infiltrer à nouveau. Ainsi, le patron d'infiltration lipidique du foie varie en fonction du stimulus d'induction de la stéatose. Il semble que le foie perde sa capacité à relâcher les lipides dans le plasma dans le cas du déficit estrogénique, faisant de la stéatose hépatique une condition difficilement réversible dans ce contexte hormonal.

De plus, ce phénomène est sévèrement amplifié par l'ingestion d'une diète riche en lipides. L'administration aux rates Ovx de la même diète lipidique administrée aux rates intactes de l'étude de Gauthier et al. (2006) a induit une accumulation hépatique de lipides presque deux fois plus importante. La sévérité de la stéatose hépatique rapportée chez les rates Ovx soumises à la diète lipidique nous a amené à supposer que la combinaison d'une diète lipidique et de l'absence d'un statut estrogénique normal crée un effet synergique sur l'accumulation hépatique de lipides. Cette hypothèse rejoint le modèle de la deuxième atteinte (second hit model) proposé par Day et James (1998) selon lequel le foie stéatosé devient vulnérable à des agressions contre lesquelles il se défend normalement, ce qui favorise l'évolution de la stéatose vers des formes plus sévères de lésions hépatiques. Dans notre étude, le retrait de l'action estrogénique aurait constitué la première atteinte et la diète riche en lipides, la deuxième, expliquant la sévérité de la stéatose hépatique que nous avons

rapportée dans cette condition. À cet égard, il aurait été intéressant de confirmer la présence de dommages hépatocytaires par des marqueurs d'inflammation (protéine réactive C dans le plasma) ou idéalement, par des coupes histologiques destinées à caractériser la nature de la stéatose hépatique (macro vs microvésiculaire, fibrose), voire même la présence d'une stéatohépatite.

Gauthier et al. (2006) ont expliqué l'accumulation lipidique rapide dans les hépatocytes par l'augmentation des concentrations plasmatiques d'AGNE induite par la diète riche en lipides. Toutefois, nous n'avons pas observé une telle augmentation des concentrations plasmatiques d'AGNE chez les rates Ovx, ce qui est cohérent avec la perte de l'action lipolytique du tissu adipeux viscéral par le retrait de l'action estrogénique (D'Eon et al. 2005, Giudicelli et al. 1993). Nos résultats suggèrent qu'en l'absence d'une augmentation de la prise des acides gras par le foie, des mécanismes intra-hépatiques sont affectés par le déficit estrogénique. En ce sens, nous avons montré que l'imposition d'une restriction énergétique aux rates Ovx équivalente à la prise alimentaire des rates intactes n'arrive pas à prévenir complètement l'accumulation hépatique de lipides induite par l'Ovx. La Figure 26 montre que malgré une certaine résorption de la stéatose hépatique par la restriction énergétique, le degré d'infiltration lipidique du foie demeure significativement supérieur chez les rates Ovx avec restriction énergétique (OvxPF) que chez les rates intactes. Seule la supplémentation estrogénique prévient complètement le développement de la stéatose hépatique chez les rates Ovx tel que présenté dans l'étude 1. Ainsi, le retrait de l'action estrogénique favorise le développement de la stéatose hépatique indépendamment de la prise alimentaire, probablement via l'altération de mécanismes intra-hépatiques impliqués dans la régulation du métabolisme lipidique.

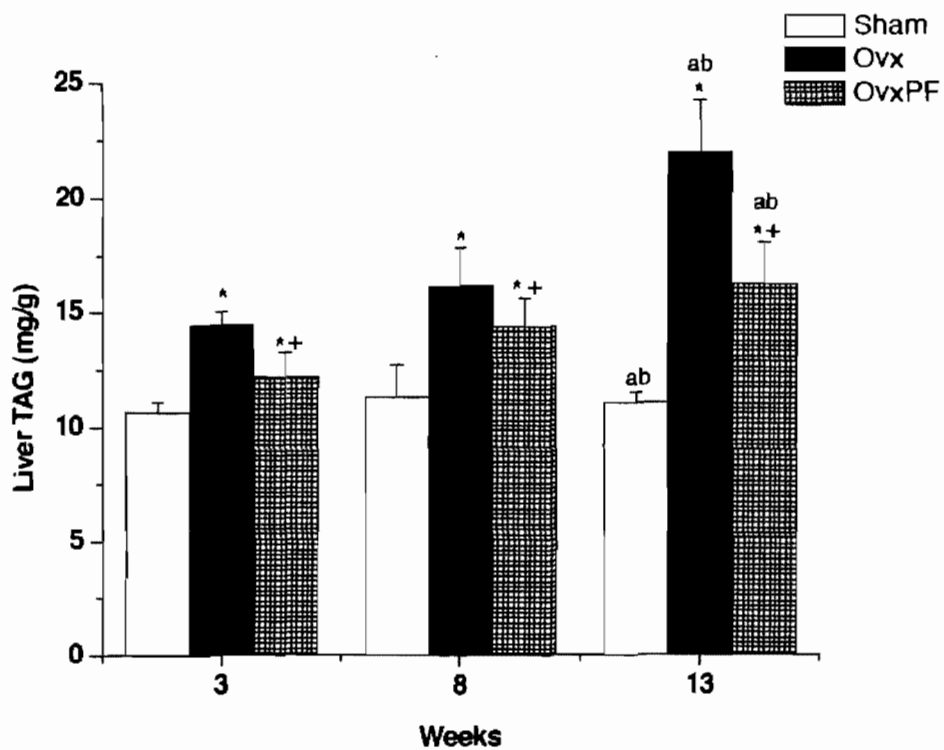


Figure 26. Effet d'une restriction énergétique chez les rates OvX équivalente à la prise alimentaire des rates intactes sur l'accumulation hépatique de TAG. $n = 8/\text{groupe}$. OvX-PF: groupe OvX avec restriction énergétique. * $P < 0,05$, vs Sham; + $P < 0,05$, vs OvX; ^a $P < 0,05$, vs T=3; ^b $P < 0,05$, vs T=8. Données non publiées.

Effet du retrait de l'action estrogénique par l'Ovx sur les voies hépatiques de synthèse et d'oxydation des lipides

Les résultats des études 2 et 3 ont effectivement permis de confirmer que le retrait de l'action estrogénique affecte les voies hépatiques de synthèse et d'oxydation des lipides. Nous avons d'abord montré que le déficit estrogénique stimule l'expression hépatique de SREBP-1c et SCD-1, des médiateurs moléculaires de la lipogenèse hépatique. Il semble que cet effet implique une régulation négative de l'expression de SREBP-1c par les estrogènes via un ERE (D'Eon et al. 2005). Nous avons aussi montré une suppression de l'expression hépatique de PPAR α par l'Ovx, de même qu'une diminution du taux d'oxydation hépatique des acides gras dans ce contexte hormonal.

Dans le but d'identifier un mécanisme par lequel le déficit estrogénique conduit à une diminution du taux d'oxydation hépatique des acides gras, nous avons soumis les rates Ovx à une infusion systémique de leptine. Nos résultats ont montré que le foie des rates Ovx semble demeurer sensible à l'action de la leptine pour stimuler l'oxydation des lipides contrairement à notre hypothèse de départ et contrairement aux observations rapportées chez les rats mâles obèses par Huang et al. (2006). Chez les rates Ovx, cet effet s'est traduit par une tendance vers une diminution du contenu hépatique en TAG. Ces observations sont d'autant plus surprenantes que l'effet de la leptine sur la stimulation de l'oxydation hépatique des acides gras n'a pas été observé chez les rates intactes. Étant donné les similitudes que partagent les estrogènes et la leptine dans leurs effets centraux et dans leur action anti-stéatotique hépatique, nous avons émis l'hypothèse que ces deux hormones stimulent les processus oxydatifs via un mécanisme commun, d'où l'absence d'effet cumulatif chez les rates intactes. L'AMPK pourrait être le médiateur par lequel les estrogènes et la leptine activent les processus oxydatifs hépatiques. Bien que les preuves soient manquantes au niveau du foie, Minokoshi et al. (2002) ont clairement montré que la leptine stimule l'oxydation des lipides via l'activation de l'AMPK au niveau du muscle

squelettique et récemment, D'Eon et al. (2008) ont rapporté que l'estradiol a également la capacité de phosphoryler l'AMPK sur des myotubes. Ainsi, il se pourrait que l'action de la leptine se substitue à celle des estrogènes pour l'oxydation hépatique des acides gras dans le contexte du déficit estrogénique.

Pour confirmer d'avantage nos observations, il aurait été pertinent de mesurer l'effet du déficit estrogénique sur la densité mitochondriale hépatique. Il est possible que le retrait de l'action estrogénique entraîne une diminution de la densité mitochondriale, ce qui expliquerait en partie la diminution du taux d'oxydation hépatique des acides gras que nous avons rapportée chez les rates Ovx. De même, une mesure du taux de synthèse hépatique des acides gras, à l'aide de la technique d'incorporation du C₁₄ aux acides gras par exemple, aurait confirmé les résultats que nous avons obtenus au niveau moléculaire avec SREBP-1c et SCD-1. Cette mesure n'a pas été faite dû à un problème de faisabilité dans notre laboratoire. Enfin, une mesure de production des VLDL aurait permis d'avoir un portrait plus complet des perturbations du métabolisme lipidique hépatique induites par le retrait de l'action estrogénique. En effet, certaines observations indiquent que la supplémentation estrogénique stimule la production de VLDL, ce qui permet de spéculer que cette production est inhibée dans le contexte du déficit estrogénique (Schaefer et al. 1983, Thompson et al. 1983). À cet égard, nous avons montré dans l'étude 1 que l'accumulation de TAG dans le foie des rates Ovx est accompagnée d'une diminution de leurs concentrations plasmatiques, ce qui va dans le sens de cette hypothèse.

Étant donné l'importance du maintien de l'action estrogénique au niveau du foie pour assurer l'homéostasie du métabolisme lipidique, étant donné l'effet bénéfique de l'exercice sur le métabolisme des lipides et étant donné que l'entraînement en endurance peut altérer l'expression de ER au niveau du muscle squelettique, nous avons investigué l'effet d'un état d'entraînement sur l'expression de ER au niveau du foie et du coeur.

Effet d'un programme d'entraînement en endurance sur l'expression de ER au niveau du foie et du coeur

Dans la dernière étude de la thèse, nous avons montré que l'entraînement en endurance modifie l'expression de ER au niveau du foie et du coeur. De plus, cette modification est spécifique au tissu et diffère chez les rates intactes et Ovx. Pour expliquer ces résultats, nous avons conclu comme Wiik et al. (2005) que certaines adaptations d'entraînement passaient peut-être par une modification de la voie estrogénique au niveau du foie et du coeur. La manipulation de ER à l'aide de composés comme le ICI 182,780, un anti-estrogène qui inhibe l'activation transcriptionnelle de ER, nous aurait permis de vérifier cette hypothèse. Sachant que certains gènes sont à la fois la cible de l'action estrogénique et des adaptations d'entraînement, le blocage de la voie estrogénique aurait permis de montrer si ces adaptations d'entraînement sont médiées ou non par l'activation de la voie estrogénique. À titre d'exemple, la lipase hépatique (HL) est une enzyme à la fois négativement régulée par les estrogènes et dont l'activité est réduite chez les athlètes d'endurance, ce qui a comme conséquence d'augmenter les concentrations de HDL-cholestérol (Bergeron et al. 2001, Jones et al. 2002). Enfin, il serait intéressant d'investiguer si l'exercice peut activer ER indépendamment de sa liaison à E₂, par la phosphorylation de son domaine fonctionnel AF-1 par exemple. L'identification d'un tel mécanisme permettrait d'explorer la possibilité que l'exercice puisse compenser l'action estrogénique dans les contextes de déficits estrogéniques.

Conclusion

L'ensemble des résultats des études qui composent cette thèse montrent clairement que le retrait de l'action estrogénique affecte les voies hépatiques de synthèse et d'oxydation des lipides, conduisant à la rétention de TAG dans les hépatocytes. Nous avons mis en évidence que cette conséquence du retrait de l'action estrogénique ne peut être uniquement expliquée par une augmentation de la prise alimentaire. De plus, l'exercice physique ou l'état d'entraînement fait partie des facteurs qui influencent l'expression de ER au niveau du foie et du coeur, ce qui suggère que des adaptations d'entraînement dans ces tissus sont médiées par la voie estrogénique.

Au-delà des résultats que nous avons obtenus chez la rate Ovx, les observations tirées des études de la thèse soulignent l'importance du maintien de l'action estrogénique au niveau du foie pour assurer l'homéostasie du métabolisme lipidique. Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent que les périodes de transitions hormonales qui impliquent les estrogènes, comme la ménopause, la puberté ou la grossesse, sont des périodes durant lesquelles les organes sous influence estrogénique comme le foie sont susceptibles de développer des perturbations métaboliques importantes. L'induction d'un stress métabolique additionnel, comme la consommation d'une diète riche en lipides, serait particulièrement délétère pour le foie durant ces périodes de transition estrogéniques.

Bibliographie

1. **Ackerman GE and Carr BR.** Estrogens. *Rev Endocr Metab Disord* 3: 225-230, 2002.
2. **Ahima RS.** Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity* 14: 242S-249S, 2006.
3. **Ainslie DA, Morris MJ, Wittert G, Turnbull H, Proietto J, and Thorburn AW.** Estrogen deficiency causes central leptin insensitivity and increased hypothalamic neuropeptide Y. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25: 1680-1688, 2001.
4. **Angulo P.** Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 346: 1221-1231, 2002.
5. **Anurag P and Anuradha CV.** Metformin improves lipid metabolism and attenuates lipid peroxidation in high fructose-fed rats. *Diabetes Obes Metab* 4: 36-42, 2002.
6. **Aoki H, Kimura K, Igarashi K, and Takenaka A.** Soy protein suppresses gene expression of acetyl-CoA carboxylase alpha from promoter PI in rat liver. *Biosci Biotechnol Biochem* 70: 843-849, 2006.
7. **Aoyama T, Peters JM, Iritani N, Nakajima T, Furihata K, Hashimoto T, and Gonzalez FJ.** Altered constitutive expression of fatty acid-metabolizing enzymes in mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α). *J Biol Chem* 273: 5678-5684, 1998.
8. **Bajic VB, Tan SL, Chong A, Tang S, Ström A, Gustafsson JA, Lin CY, and Liu ET.** Dragon ERE finder version 2: A tool for accurate detection and analysis of estrogen response elements in vertebrate genomes. *Nucleic Acids Res* 31: 3605-3607, 2003.
9. **Basdevant A.** Steroids and lipid metabolism: mechanism of action. *Int J Fertil* 37: 93-97, 1992.
10. **Basu A, Basu R, Shah P, Vella A, Rizza RA, and Jensen MD.** Systemic and regional free fatty acid metabolism in type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280: E1000-E1006, 2001.
11. **Bergeron J, Couillard C, Després JP, Gagnon J, Leon AS, Rao DC, Skinner JS, Wilmore JH, and Bouchard C.** Race differences in the response of postheparin plasma lipoprotein lipase and hepatic lipase activities to endurance exercise training in men. Results from the HERITAGE family study. *Atherosclerosis* 159 : 399-406, 2001.
12. **Brown AM and Gibbons GF.** Insulin inhibits the maturation phase of VLDL assembly via phosphoinositide 3-kinase-mediated event. *Arteriocler Thromb Vasc Biol* 21: 1656-1661, 2001.
13. **Browning JD and Horton JD.** Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 114: 147-152, 2004.
14. **Bruno S, Maisonneuve P, Castellana P, Rotmensz N, Rossi S, Maggioni M, Persico M, Colombo A, Monasterolo F, Casadei-Giunchi D, Desiderio F, Stroffolini T, Sacchini V, Decensi A, Veronesi U, the Italian Tamoxifen Study Group.** Incidence and risk factors for non-alcoholic steatohepatitis: prospective study of 5408 women enrolled in Italian tamoxifen chemoprevention trial. *BMJ* 333: 1-6, 2005.
15. **Brunt EM.** Pathology of fatty liver disease. *Mod Pathol* 20: S40-S48, 2007.
16. **Bugianesi E, Gastaldelli A, Vanni E, Gambino R, Cassader M, Bladi 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.
17. **Bugianesi E, McCullough AJ, and Marchesini G.** Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology* 42: 987-1000, 2005.
 18. **Campbell SE et Febbraio MA.** Effect of ovarian hormones on mitochondrial enzyme activity in the fat oxidation pathway of skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281: E803-E808, 2001.
 19. **Campbell SE, Mehan KA, Tunstall RJ, Febbraio MA, and Cameron-Smith D.** 17 β -estradiol upregulates the expression of peroxisome proliferator-activated receptor α and lipid oxidative genes in skeletal muscle. *J Mol Endocrinol* 31: 37-45, 2003.
 20. **Carr MC.** The emergence of the metabolic syndrome with menopause. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 2404-2411, 2003.
 21. **Chen G, Liang G, Ou J, Goldstein JL, and Brown MS.** Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of *Srebp-1c* transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. *Proc Natl Acad Sci* 101: 11245-11250, 2004.
 22. **Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, Holmes-Walker J, Hui JM, Fung C, Karim R, Lin R, Samarasinghe D, Liddle C, Weltman M, and George J.** NASH and insulin resistance: insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology* 35: 373-379, 2002.
 23. **Ciocca DR and Vargas RLM.** Estrogen receptors in human nontarget tissues: biological and clinical implications. *Endocr Rev* 16: 35-62, 1995.
 24. **Clark JM, Brancati FL, and Diehl AM.** The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *Am J Gastroenterol* 98: 960-967, 2003.
 25. **Clegg DJ, Brown LM, Woods SC, and Benoit SC.** Gonadal hormones determine sensitivity to central leptin and insulin. *Diabetes* 55: 978-987, 2006.
 26. **Cohen P and Friedman JM.** Leptin and the control of metabolism: role for stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD-1). *J Nutr* 134: 2455S-2463S, 2004.
 27. **Cohen P, Miyazaki M, Socci ND, Hagge-Greenberg A, Liedtke W, Soukas AA, Sharma R, Hudgins LC, Ntambi JM, and Friedman JM.** Role for stearoyl-CoA desaturase-1 in leptin-mediated weight loss. *Science* 297: 240-243, 2002.
 28. **Cooke PS, Heine PA, Taylor JA, and Lubahn DB.** The role of estrogen and estrogen receptor- α in male adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol* 178: 147-154, 2001.
 29. **Costet P, Legendre C, Moré J, Edgar A, Galtier P, and Pineau T.** Peroxisome proliferator-activated receptor α -isoform deficiency leads to progressive dyslipidemia with sexually dimorphic obesity and steatosis. *J Biol Chem* 273: 29577-29585, 1998.
 30. **Day CP.** Non-alcoholic fatty liver disease: current concepts and management strategies. *Clin Med* 6: 19-25, 2006.
 31. **Day CP and James OFW.** Steatohepatitis : a tale of two « Hits »? *Gastroenterol* 114 : 842-845, 1998.
 32. **Denechaud PD, Bossard P, Lobaccaro JMA, Millatt L, Staels B, Girard J, and Postic C.** ChREBP, but not LXRs, is required for the induction of glucose-regulated genes in mouse liver. *J Clin Invest* 118: 956-964, 2008.

33. **Denechaud PD, Dentin R, Girard J, and Postic C.** Role of ChREBP in hepatic steatosis and insulin resistance. *FEBS Lett* 582: 68-73, 2008.
34. **Dentin R, Benhamed F, Hainault I, Fauveau V, Fougelle F, Dyck JRB, Girard J, and Postic C.** Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in *ob/ob* mice. *Diabetes* 55: 2159-2170, 2006.
35. **Dentin R, Pégurier JP, Benhamed F, Fougelle F, Ferré P, Fauveau V, Magnuson MA, Girard J, and Postic C.** Hepatic Glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression. *J Biol Chem* 279: 20314-20326, 2004.
36. **Deshaies Y, Dagnault A, Lalonde J, and Richard D.** Interaction of corticosterone and gonadal steroids on lipid deposition in the female rat. *Am J Physiol* 36: E355-E362, 1997.
37. **Desvergne B, Michalik L, and Wahli W.** Be fit or be sick: peroxisome proliferator-activated receptors are down the road. *Mol Endocrinol* 18: 1321-1332, 2004.
38. **Dickson RB and Eisenfeld AJ.** Estrogen receptor in liver of male and female rats: endocrine regulation and molecular properties. *Biol Reprod* 21: 1105-1114, 1979.
39. **Donnelly KL, Margosian MR, Sheth SS, Lusis 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.
40. **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.
41. **Duncan RE, Ahmadian M, Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, and Sul HS.** Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annu Rev Nutr* 27: 79-101, 2007.
42. **Duvnjak M, Lerotic I, Barsic N, Tomasic V, Jukic LV, and Velagic V.** Pathogenesis and management issues for non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 13: 4539-4550, 2007.
43. **Eckel LA, Houpt TA, and Geary N.** Estradiol treatment increases CCK-induced c-Fos expression in the brains of ovariectomized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283: R1378-R1385, 2002.
44. **Enoch HG and Strittmatter P.** Role of tyrosyl and arginyl residues in rat liver microsomal stearylcoenzyme A desaturase. *Biochemistry* 17: 4927-4932, 1978.
45. **D'Eon TM, Rogers NH, Stancheva ZS, and Greenberg AS.** Estradiol and the estradiol metabolite, 2-hydroxyestradiol, activates AMP-activated protein kinase in C2C12 myotubes. *Obesity* 16 : 1284-1288, 2008.
46. **D'Eon TM, Souza SC, Aronovitz M, Obin MS, Fried SK, and Greenberg AS.** Estrogen regulation of adiposity and fuel partitioning. Evidence of genomic and non-genomic regulation of lipogenic and oxidative pathways. *J Biol Chem* 280: 35983-35991, 2005.
47. **Eriksson HA.** Different regulation of the concentration of estrogen receptors in the rat liver and uterus following ovariectomy. *FEBS Lett* 149: 91-95, 1982.

48. **Farsetti A, Misiti S, Citarella F, Felici A, Andreoli M, Fantoni A, Sacchi A, and Pontecorvi A.** Molecular basis of estrogen regulation of Hageman factor XII gene expression. *Endocrinology* 136: 5076-5083, 1995.
49. **Fernandez-Real JM, Sanchis D, Ricart W, Casamijana R, Balada F, Remesar X, and Alemany M.** Plasma oestrone-fatty acid ester levels are correlated with body fat mass in humans. *Clin Endocrinol* 50: 253-260, 1999.
50. **Ferré P and Foufelle F.** SREBP-1c transcription factor and lipid homeostasis: clinical perspectives. *Horm Res* 68: 72-82, 2007.
51. **Fisher EA and Ginsberg HN.** Complexity in the secretory pathway: the assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins. *J Biol Chem* 277: 17377-17380, 2002.
52. **Fishman S, Muzumdar RH, Atzmon G, Ma X, Yang X, Einstein FH, and Barzilai N.** Resistance to leptin action is the major determinant of hepatic triglyceride accumulation *in vivo*. *FASEB J* 21: 53-60, 2006.
53. **Fong DG, Nehra V, Lindor KD, and Buchman AL.** Metabolic and nutritional considerations in nonalcoholic fatty liver. *Hepatology* 32: 3-10, 2000.
54. **Frayn KN.** Visceral fat and insulin resistance – causative or correlative? *Br J Nutr* 83: S71-S77, 2000.
55. **Freyschuss B, Sahlin L, Masironi B, and Eriksson H.** The hormonal regulation of the oestrogen receptor in rat liver: an interplay involving growth hormone, thyroid hormones and glucocorticoids. *J Endocrinol* 142: 285-298, 1994.
56. **Friedman JM and Halaas JL.** Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395: 763-770, 1998.
57. **Gambacciani M, Ciaponi M, Cappagli B, Piaggese L, De Simone L, Orlandi R, and Genazzani AR.** Body weight, body fat distribution, and hormonal replacement therapy in early postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 414-417, 1997.
58. **Gao Q and Horvath TL.** Cross-talk between estrogen and leptin signaling in the hypothalamus. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294: E818-E826, 2008.
59. **Gauthier MS, Favier R, and Lavoie JM.** Time course of the development of non-alcoholic hepatic steatosis in response to high-fat diet-induced obesity in rats. *Br J Nutr* 95: 273-281, 2006.
60. **Geary N.** Estradiol, CCK and satiation. *Peptides* 22: 1251-1263, 2001.
61. **Gibbons GF, Wiggins D, Brown AM, and Hebbachi AM.** Synthesis and function of hepatic very-low-density lipoprotein. *Biochem Soc Transc* 32: 59-64, 2004.
62. **Giudicelli Y, Dieudonne MN, Lacasa D, Pasquier YN, and Pecquery R.** Modulation by sex hormones of the membranous transducing system regulating fatty acid mobilization in adipose tissue. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 48 : 91-100, 1993.
63. **Gravilova O, Marcus-Samuels B, Graham D, Kim JK, Shulman GI, Castle AL, Vinson C, Eckhaus M, and Reitman ML.** Surgical implantation of adipose tissue reverses diabetes in lipoatrophic mice. *J Clin Invest* 105: 271-278, 2000.
64. **Hall JM, Couse JF, and Korach KS.** The multifaceted mechanisms of estradiol

- and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem* 276: 36869-36872, 2001.
65. **Hamosh M and Hamosh P.** The effect of estrogen on the lipoprotein lipase activity of rat adipose tissue. *J Clin Invest* 55: 1132-1135, 1975.
 66. **Hashimoto T, Cook WS, Qi C, Yeldandi AV, Reddy JK, and Rao MS.** Defect in peroxisome proliferator-activated receptor α -inducible fatty acid oxidation determines the severity of hepatic steatosis in response to fasting. *J Biol Chem* 275: 28918-28928, 2000.
 67. **Heine PA, Taylor JA, Iwamoto GA, Lubahn DB, and Cooke PS.** Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor- α knockout mice. *Proc Natl Acad Sci* 97: 12729-12734, 2000.
 68. **Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Ström A, Treuter E, Warner M, and Gustafsson JA.** Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev* 87: 905-931, 2007.
 69. **Herrero P, Soto PF, Dence CS, Kisrieva-Ware Z, Delano DA, Peterson LR, and Gropler RJ.** Impact of hormone replacement on myocardial fatty acid metabolism: potential role of estrogen. *J Nucl Cardiol* 12: 574-581, 2005.
 70. **Hewitt KN, Pratis K, Jones MEE, and Simpson ER.** Estrogen replacement reverses the hepatic steatosis phenotype in the male aromatase knockout mouse. *Endocrinology* 145: 1842-1848, 2004.
 71. **Homma H, Kurachi H, Nishio Y, Takeda T, Yamamoto T, Adachi K, Morishige KI, Ohmichi M, Matsuzawa Y, and Murata Y.** Estrogen suppresses transcription of lipoprotein lipase gene. *J Biol Chem* 275: 11404-11411, 2000.
 72. **Hu FB, van Dam RM, and Liu S.** Diet and risk of type II diabetes: the role of types of fat and carbohydrates. *Diabetologia* 44: 805-817, 2001.
 73. **Huang W, Dedousis N, Bandi A, Lopaschuk GD, and O'Doherty RM.** Liver triglyceride secretion and lipid oxidative metabolism are rapidly altered by leptin *in vivo*. *Endocrinology* 147: 1480-1487, 2006.
 74. **Huang W, Dedousis N, Bhatt BA, and O'Doherty M.** Impaired activation of phosphatidylinositol 3-kinase by leptin is a novel mechanism of hepatic leptin resistance in diet-induced obesity. *J Biol Chem* 279: 21695-21700, 2004.
 75. **Huang W, Dedousis N, and O'Doherty RM.** Hepatic steatosis and plasma dyslipidemia by a high-sucrose diet are corrected by an acute leptin infusion. *J Appl Physiol* 102: 2260-2265, 2007.
 76. **Iizuka K, Bruick RK, Liang G, Horton JD, and Uyeda K.** Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc Natl Acad Sci* 101: 7281-7286, 2004.
 77. **Jones DR, Schmidt RJ, Pickard RT, Foxworthy PS, and Eacho PI.** Estrogen receptor-mediated repression of human hepatic lipase gene transcription. *Lipid Res* 43: 383-391, 2002.
 78. **Jones MEE, Thorburn AW, Britt KL, Hewitt KN, Misso ML, Wreford NG, Proietto J, Oz OK, Leury BJ, Robertson KM, Yao S, and Simpson ER.** Aromatase-deficient (ArKO) mice accumulate excess adipose tissue. *J Steroid Biochem Mol Biol*

- 79: 3-9, 2001.
79. **Jones MEE, Thorburn AW, Britt KL, Hewitt KN, Wreford NG, Proietto J, Oz OK, Leury BJ, Robertson KM, Yao S, and Simpson ER.** Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. *Proc Natl Acad Sci* 97: 12735-12740, 2000.
 80. **Joseph SB, Laffitte BA, Patel PH, Watson MA, Matsukuma KE, Walczak R, Collins JL, Osborne TF, and Tontonoz P.** Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. *J Biol Chem* 277: 11019-11025, 2002.
 81. **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-E916, 2003.
 82. **Kelly MJ and Levin ER.** Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab* 12: 152-156, 2001.
 83. **Kim S, Shin HJ, Kim SY, Kim JH, Lee YS, Kim DH, and MO L.** Genistein enhances expression of genes involved in fatty acid catabolism through activation of PPARalpha. *Mol Cell Endocrinol* 220:51-58, 2004.
 84. **Kimura M, Irahara M, Yasui T, Saito S, Tezuka M, Yamano S, Kamada M, and Aono T.** The obesity in bilateral ovariectomized rats is related to a decrease in the expression of leptin receptors in the brain. *Biochem Biophys Res Commun* 290: 1349-1353, 2002.
 85. **Klett C, Ganten D, Hellmann W, Kaling M, Ryffel GU, Weimar-Ehl T, and Hackenthal E.** Regulation of hepatic angiotensinogen synthesis and secretion by steroid hormones. *Endocrinology* 130: 3660-3668, 1992.
 86. **Koerner A, Kratzsch J, and Kiess W.** Adipokines: leptin – the classical, resistin – the controversial, adiponectin – the promising, and more to come. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 19: 525-546, 2005.
 87. **Kuiper GGJM, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Häggblad J, Nilsson S, and Gustafsson JA.** Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinology* 138: 863-870, 1997.
 88. **Labrie F.** Extragonadal synthesis of sex steroids : intracrinology. *Ann Endocrinol* 64 : 95-107, 2003.
 89. **Latour MG, Shinoda M, and Lavoie JM.** Metabolic effects of physical training in ovariectomized and hyperestrogenic rats. *J Appl Physiol* 90: 235-241, 2001.
 90. **Lavoie JM and Gauthier MS.** Regulation of fat metabolism in the liver: link to non-alcoholic hepatic steatosis and impact of physical exercise. *Cell Mol Life Sci* 63: 1393-1409, 2006.
 91. **Lax ER, Tamulevicius P, Müller A, and Schriefers H.** Hepatic nuclear estrogen receptor concentrations in the rat – influence of age, sex, gestation, lactation and estrous cycle. *J Steroid Biochem* 19: 1083-1088, 1983.
 92. **Lê KA and Bortolotti M.** Role of dietary carbohydrates and macronutrients in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 11:

- 477-482, 2008.
93. **Lee Y, Yu X, Gonzales F, Mangelsdorf DJ, Wang MY, Richardson C, Witters LA, and Unger RH.** PPAR α is necessary for the lipopenic action of hyperleptinemia on white adipose and liver tissue. *Proc Natl Acad Sci* 99: 11848-11853, 2002.
 94. **Lemieux C, Phaneuf D, Labrie F, Giguère V, Richard D, and Deshaies Y.** Estrogen receptor α -mediated adiposity-lowering and hypocholesterolemic actions of the selective estrogen receptor modulator acolbifen. *Int J Obes (Lond)* 29: 1236-1244, 2005.
 95. **Lemieux C, Picard F, Labrie F, Richard D, and Deshaies Y.** The estrogen antagonist EM-652 and dehydroepiandrosterone prevent diet- and ovariectomy-induced obesity. *Obes Res* 11: 477-490, 2003.
 96. **Lemoine S, Granier P, Tiffocche C, Berthon PM, Rannou-Bekono F, Thieulant ML, Carré F, and Delamarche P.** Effect of endurance training on oestrogen receptor alpha transcripts in rat skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 174: 283-289, 2002. (a)
 97. **Lemoine S, Granier P, Tiffocche C, Berthon PM, Thieulant ML, Carré F, and Delamarche P.** Effect of endurance training on oestrogen receptor alpha expression in different rat skeletal muscle type. *Acta Physiol Scand* 175: 211-217, 2002. (b)
 98. **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.
 99. **Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, and Ott BJ.** Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 55: 434-438, 1980.
 100. **Lundholm L, Movérare S, Steffensen KR, Nilsson M, Otsuki M, Ohlsson C, Gustafsson JA, and Dahlman-Wright K.** Gene expression profiling identifies liver X receptor alpha as an estrogen-regulated gene in mouse adipose tissue. *J Mol Endocrinol* 32: 879-892, 2004.
 101. **Maffei L, Murata Y, Rochira V, Tubert G, Aranda C, Vazquez M, Clyne CD, Davis S, Simpson ER, and Carani C.** Dysmetabolic syndrome in a man with a novel mutation of the aromatase gene: effects of testosterone, alendronate, and estradiol treatment. *J Clin Endocrinol* 89: 61-70, 2004.
 102. **Malmström R, Packard CJ, Caslake M, Bedford D, Stewart P, Yki-Järvinen H, Shepherd J, and Taskinen MR.** Defective regulation of triglyceride metabolism by insulin in the liver in NIDDM. *Diabetologia* 40: 454-462, 1997.
 103. **Mannucci E, Ognibene A, Becorpi A, Cremasco F, Pellegrini S, Ottanelli S, Rizzello SM, Massi G, Messeri G, and Rotella CM.** Relationship between leptin and oestrogens in healthy women. *Eur J Endocrinol* 139: 198-201, 1998.
 104. **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.
 105. **Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Forlani G, and Melchionda N.** Nonalcoholic fatty liver

- disease, a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 50: 1844-1850, 2001.
106. **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.
 107. **Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, and Hill RA.** Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26: 1407-1433, 2002.
 108. **Marr W, White JO, Elder MG, and Lim L.** Nucleo-cytoplasmic relationships of oestrogen receptors in rat liver during the oestrous cycle and in response to administered natural and synthetic oestrogen. *Biochem J* 190: 17-25, 1980.
 109. **Martin ML and Jensen MD.** Effects of body fat distribution on regional lipolysis in obesity. *J Clin Invest* 88: 609-613, 1991.
 110. **McElroy JF and Wade GN.** Short- and long-term effects of ovariectomy on food intake, body weight, carcass composition, and brown adipose tissue in rats. *Physiol Behav* 39: 361-365, 1987.
 111. **McInnes KJ, Corbould A, Simpson ER, and Jones ME.** Regulation of adenosine 5', monophosphate-activated protein kinase and lipogenesis by androgens contributes to visceral obesity in an estrogen-deficient state. *Endocrinology* 147: 5907-5913, 2006.
 112. **McKenzie J, Fisher BM, Jaap AJ, Stanley A, Paterson K, and Sattar N.** Effects of HRT on liver enzyme levels in women with type 2 diabetes: a randomized placebo-controlled trial. *Clin Endocrinol* 65: 40-44, 2006.
 113. **McKinlay SM, Brambilla DJ, and Posner JG.** The normal menopause transition. *Maturitas* 14 : 103-115, 1992.
 114. **Memon RA, Grunfeld C, Moser AH, and Feingold KR.** Fatty acid synthesis in obese insulin resistant diabetic mice. *Horm Metab Res* 26: 85-87, 1994.
 115. **Mendelsohn ME.** Genomic and nongenomic effects of oestrogen in the vasculature. *Am J Cardiol Suppl* 90 : 3F-6F, 2002.
 116. **Mezei O, Banz WJ, Steger RW, Peluso MR, Winters TA, and Shay N.** Soy isoflavones exert antidiabetic and hypolipidemic effects through the PPAR pathway in obese Zucker rats and murine RAW 264.7 cells. *J Nutr* 133: 1238-1243, 2003.
 117. **Miles JM, Park YS, Walewicz D, Russell-Lopez C, Windsor S, Isley WL, Coppack SW, and Harris WS.** Systemic and forearm triglyceride metabolism. Fate of lipoprotein lipase-generated glycerol and free fatty acids. *Diabetes* 53: 521-527, 2004.
 118. **Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Muller C, Carling D, Kahn BB.** Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 415 : 339-343, 2002.
 119. **Miyazaki M, Kim YC, Gray-Keller MP, Attie AD, and Ntambi JM.** The biosynthesis of hepatic cholesterol esters and triglycerides is impaired in mice with a disruption of the genes for stearoyl-CoA desaturase 1: *J Biol Chem* 275: 30132-30138, 2000.
 120. **Moitra J, Mason MM, Olive M, Krylov D, Gavrilova O, Marcus-Samuels B, Feigenbaum L, Lee E, Aoyama T, Eckhaus M, Reitman ML, and Vinson C.** Life without fat: a transgenic mouse. *Genes Dev* 12:3168-3181, 1998.

121. **Montague CT and O'Rahilly S.** The perils of portliness. Causes and consequences of visceral adiposity. *Diabetes* 49: 883-888, 2000.
122. **Mukherjea M and Biswas R.** Effect of ovariectomy and replacement therapy on the tissue lipid pattern in rats. *Endokrinologie* 66:113-121, 1975.
123. **Munoz J, Derstine A, and Gower BA.** Fat distribution and insulin sensitivity in postmenopausal women: influence of hormone replacement. *Obes Res* 10: 424-431, 2002.
124. **Mystkowski P and Schwartz MW.** Gonadal steroids and energy homeostasis in the leptin era. *Nutrition* 16:937-946, 2000.
125. **Nelson LR and Bulun SE.** Estrogen production and action. *J Am Acad Dermatol* 45:S116-S124, 2001.
126. **Nemoto Y, Toda K, Ono M, Fujikawa-Adachi K, Saibara T, Onishi S, Enzan H, Okada T, and Shizuta Y.** Altered expression of fatty acid-metabolizing enzymes in aromatase-deficient mice. *J Clin Invest* 105: 1819-1825, 2000.
127. **Neuschwander-Tetri BA and Caldwell SH.** Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD single topic conference. *Hepatology* 37: 1202-1219, 2003.
128. **Norstedt G, Wrangé Ö, and Gustafsson JA.** Multihormonal regulation of the estrogen receptor in rat liver. *Endocrinology* 108: 1184-1190, 1981.
129. **Ntambi JM, Miyazaki M, Stoehr JP, Lan H, Kendziorski CM, Yandell BS, Song Y, Cohen P, Friedman JM, and Attie AD.** Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. *Proc Natl Acad Sci* 99: 11482-11486, 2002.
130. **Ohlsson C, Hellberg N, Parini P, Vidal O, Bohlooly M, Rudling M, Lindberg MK, Warner M, Angelin B, and Gustafsson JA.** Obesity and disturbed lipoprotein profile in estrogen receptor- α -deficient male mice. *Biochem Biophys Res Commun* 278: 640-645, 2000.
131. **Ota T, Gayet C, and Ginsberg HN.** Inhibition of apolipoprotein B100 secretion by lipid-induced hepatic endoplasmic reticulum stress in rodent. *J Clin Invest* 118: 316-332, 2008.
132. **Park SH, Jeon WK, Kim SH, Kim HJ, Park DI, Cho YK, Sung IK, Sohn CI, Keum DK, and Kim BI.** Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease among Korean adults. *J Gastroenterol Hepatol* 21: 138-143, 2006.
133. **Pedersen SB, Bruun JM, Kristensen K, and Richelsen B.** Regulation of UCP1, UCP2, and UCP3 mRNA expression in brown adipose tissue, white adipose tissue, and skeletal muscle in rats by estrogens. *Biochem Biophys Res Commun* 288: 191-197, 2001.
134. **Pedersen SB, Kristensen K, Hermann PA, Katzenellenbogen JA, and Richelsen B.** Estrogen controls lipolysis by up-regulating α 2A-adrenergic receptors directly in human adipose tissue through the estrogen receptor α . Implications for the female fat distribution. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 1869-1878, 2004.
135. **Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, and Collins F.** Effects of the obese gene product on body weight regulation in *ob/ob* mice.

- Science* 269: 540-543, 1995.
136. **Picard F, Deshaies Y, Lalonde J, Samson P, Labrie C, Bélanger A, Labrie F, and Richard D.** Effects of the estrogen antagonist EM-652.HCL on energy balance and lipid metabolism in ovariectomized rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24: 830-840, 2000.
 137. **Qureshi K and Abrams GA.** Metabolic liver disease of obesity and role of adipose tissue in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 13: 3540-3553, 2007.
 138. **Rao MS and Reddy JK.** PPAR α in the pathogenesis of fatty liver disease. *Hepatology* 40: 783-786, 2004.
 139. **Reddy JK and Rao MS.** Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290: G852-G858, 2006.
 140. **Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JMA, Shimomura I, Shan B, Brown MS, Goldstein JL, and Mangelsdorf DJ.** Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXR α and LXR β . *Genes Dev* 14: 2819-2830, 2000.
 141. **Richard D.** Effects of ovarian hormones on energy balance and brown adipose tissue thermogenesis. *Am J Physiol* 250: R245-R249, 1986.
 142. **Roy EJ and Wade GN.** Role of food intake in estradiol-induced body weight changes in female rats. *Horm Behav* 8: 265-274, 1977.
 143. **Ruderman NB, Saha AK, and Kraegen EW.** Minireview: malonyl CoA, AMP-activated protein kinase, and adiposity. *Endocrinology* 144: 5166-5171, 2003.
 144. **Samuel VT, Liu ZX, 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.
 145. **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. *Gastroenterol* 120: 1183-1192, 2001.
 146. **Schaefer EJ, Foster DM, Zech LA, Lindgren FT, Brewer B, and Levy RI.** The effect of estrogen administration on plasma lipoprotein metabolism in premenopausal females. *J Clin Endocrinol Metab* 57: 262-267, 1983.
 147. **Schneider G, Kirschner MA, Berkowitz R, and Ertel NH.** Increased estrogen production in obese men. *J Clin Endocrinol Metab* 48: 633-638, 1979.
 148. **Schneider JG, Tompkins C, Blumenthal RS, and Mora S.** The metabolic syndrome in women. *Cardiol Rev* 14: 286-291, 2006.
 149. **Schultz JR, Tu H, Luk A, Repa JJ, Medina JC, Li L, Schwendner S, Wang S, Thoolen M, Mangelsdorf DJ, Lustig KD, and Shan B.** Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev* 14: 2831-2838, 2000.
 150. **Seppälä-Lindroos A, Vehkavaara S, Häkkinen AM, Goto T, Westerbacka J, Sovijärvi A, Halavaara J, and Yki-Järvinen 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.
151. **Shimabukuro M, Koyama K, Chen G, Wang MY, Trieu F, Lee Y, Newgard CB, and Unger RH.** Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues. *Proc Natl Acad Sci* 94: 4637-4641, 1997.
 152. **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.
 153. **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.
 154. **Shulman GI.** Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 106: 171-176, 2000.
 155. **Simpson E, Rubin G, Clyne C, Robertson K, O'Donnell L, Jones M, and Davis S.** The role of local estrogen biosynthesis in males and females. *Trends Endocrinol Metab* 11: 184-188, 2000.
 156. **Sorrentino P, Tarantino G, Conca P, Perrella A, Terracciano ML, Vecchione R, Gargiulo G, Gennarelli N, and Lobello R.** Silent non-alcoholic fatty liver disease – a clinical-histological study. *J Hepatol* 41: 751-757, 2004.
 157. **Staels B, Jansen H, van Tol A, Stahnke G, Will H, Verhoeven G, and Auwerx J.** Development, food intake, and ethinylestradiol influence hepatic triglyceride lipase and LDL-receptor mRNA levels in rats. *J Lipid Res* 31: 1211-1218, 1990.
 158. **Stavreus-Evers AC, Freyschuss B, and Eriksson HA.** Hormonal regulation of the estrogen receptor in primary cultures of hepatocytes from female rats. *Steroids* 62: 647-654, 1997.
 159. **Stavreus-Evers AC, Parini P, Freyschuss B, Elger W, Reddersen G, Sahlin L, and Eriksson H.** Estrogenic influence on the regulation of hepatic estrogen receptor- α and serum level of angiotensinogen in female rats. *J Steroid Biochem Mol Biol* 78: 83-88, 2001.
 160. **Tanaka M, Nakaya S, Kumai T, Watanabe M, Tateishi T, Shimizu H, and Kobayashi S.** Effects of estrogen on serum leptin levels and leptin mRNA expression in adipose tissue in rats. *Horm Res* 56: 98-104, 2001.
 161. **Tarttelin MF and Gorski RA.** The effects of ovarian steroids on food and water intake and body weight in the female rat. *Acta Endocrinol (Copenh)* 72: 551-568, 1973.
 162. **Thomas EL, Hamilton G, Patel N, O'Dwyer R, Doré CJ, Goldin RD, Bell JD, Taylor-Robinson SD.** Hepatic triglyceride content and its relation to body adiposity: a magnetic resonance imaging and proton magnetic resonance spectroscopy study. *Gut* 54: 122-127, 2005.
 163. **Thompson C, Hudson PM, and Lucier GW.** Correlation of hepatic estrogen receptor concentrations and estrogen-mediated elevation of very low density lipoprotein. *Endocrinology* 112 : 1389-1397, 1983.

164. **Timlin MT and Parks EJ.** Temporal pattern of de novo lipogenesis in the postprandial state in healthy men. *Am J Clin Nutrition* 81: 35-42, 2005.
165. **Toda K, Takeda K, Akira S, Saibara T, Okada T, Onishi S, and Shizuta Y.** Alternations in hepatic expression of fatty-acid metabolizing enzymes in ArKO mice and their reversal by the treatment with 17 β -estradiol or a peroxisome proliferator. *J Steroid Biochem Mol Biol* 79: 11-17, 2001.
166. **Toshimitsu K, Matsuura B, Ohkubo I, Niiya T, Furukawa S, Hiasa Y, Kawamura M, Ebihara K, and Onji M.** Dietary habits and nutrient intake in non-alcoholic steatohepatitis. *Nutrition* 23: 46-52, 2007.
167. **Trayhurn P and Wood IS.** Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 92: 347-355, 2004.
168. **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.
169. **Unger RH.** Longevity, lipotoxicity and leptin: the adipocyte defense against feasting and famine. *Biochimie* 87: 57-64, 2005.
170. **Vilar L, Oliveira CP, Faintuch J, Mello ES, Nogueira MA, Santos TE, Alves VA, and Carrilho FJ.** High-fat diet: a trigger of non-alcoholic steatohepatitis? Preliminary findings in obese subjects. *Nutrition* Epub ahead of print, 2008.
171. **Völzke H, Schwarz S, Baumeister SE, Wallaschofski H, Schwahn C, Grabe HJ, Kohlmann T, John U, and Dören M.** Menopausal status and hepatic steatosis in a general female population. *Gut* 56: 594-595, 2007.
172. **Wade GN and Gray JM.** Gonadal effects on food intake and adiposity: a metabolic hypothesis. *Physiol Behav* 22: 583-593, 1979.
173. **Wade GN, Gray JM, and Bartness TJ.** Gonadal influence on adiposity. *Int J Obes* 9: 83-92, 1985.
174. **Wiik A, Gustafsson T, Esbjörnsson M, Johansson O, Ekman M, Sundberg CJ, and Jansson E.** Expression of oestrogen receptor α and β is higher in skeletal muscle of highly endurance-trained than of moderately active men. *Acta Physiol Scand* 184: 105-112, 2005.
175. **Xiao CW, Wood C, Huang W, L'Abbé MR, Gilani GS, Cook GM, and Curran I.** Tissue-specific regulation of acetyl-CoA carboxylase gene expression by dietary soya protein isolate in rats. *Br J Nutr* 95: 1048-1054, 2006.
176. **Yahagi N, Shimano H, Hasty AH, Matsuzaka T, Ide T, Yoshikawa T, Amemiya-Kudo M, Tomita S, Okazaki H, Tamura Y, Izuka Y, Ohashi K, Osuga JI, Harada K, Gotoda T, Nagai R, Ishibashi S, and Yamada N.** Absence of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) ameliorates fatty livers but not obesity or insulin resistance in *Lep^{ob}/Lep^{ob}* mice. *J Biol Chem* 277: 19353-19357, 2002.
177. **Yamamoto M, Iwasa M, Iwata K, Kaito M, Sugimoto R, Urawa N, Mifuji R, Konishi M, Kobayashi Y, and Adachi Y.** Restriction of dietary calories, fat and iron improves non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 22: 498-503, 2007.
178. **Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, and Friedman JM.**

Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425-432, 1994.

179. **Zhao H, Tian Z, Hao J, and Chen B.** Extragonadal aromatization increases with time after ovariectomy in rats. *Reprod Biol Endocrinol* 3: 1-9, 2005