MATHIEU LAPLANTE

# MÉCANISMES IMPLIQUÉS DANS LE REMODELAGE DU TISSU ADIPEUX ET DANS L'AMÉLIORATION DE LA LIPÉMIE PAR LES AGONISTES PPAR-γ

Thèse présentée

à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval dans le cadre du programme de doctorat en Physiologie-Endocrinologie pour l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D.)

## DÉPARTEMENT D'ANATOMIE ET DE PHYSIOLOGIE FACULTÉ DE MÉDECINE UNIVERSITÉ LAVAL QUÉBEC

2007

© Mathieu Laplante, 2007

## RÉSUMÉ

Les agonistes des récepteurs activés par les proliférateurs des peroxysomes-y  $(PPAR-\gamma)$  sont utilisés en clinique pour le traitement de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2. En plus de favoriser l'amélioration de la sensibilité à l'insuline, ces agonistes induisent de profondes modifications du métabolisme des lipides. Entre autres, ces composés augmentent l'accumulation des graisses dans le tissu adipeux blanc souscutané et diminuent leur accumulation dans le tissu adipeux blanc viscéral. Aussi, ces agonistes réduisent les triglycérides (TG) et les acides gras libres (AGL) circulants. Les mécanismes impliqués dans ces effets ne sont pas parfaitement élucidés. Les travaux décrits dans cette thèse montrent chez le rat que l'agonisme de PPAR-y augmente l'accumulation des graisses dans le tissu adipeux sous-cutané en augmentant la différenciation adipocytaire et l'expression/l'activité des déterminants métaboliques impliqués dans la captation et la rétention des lipides. Dans le tissu adipeux viscéral, ces déterminants n'ont pas été fortement affectés par le traitement. La dissipation de l'énergie et l'oxydation des lipides fut préférentiellement induite dans le tissu adipeux viscéral, contribuant ainsi à réduire l'accrétion des lipides dans ce tissu. Ces travaux montrent que l'augmentation de l'activité de la lipase lipoprotéique (LPL) dans le tissu adipeux sous-cutané et le tissu adipeux brun contribue fortement à l'augmentation de l'accumulation des graisses dans ces tissus et à la réduction de la triglycéridémie. Ces études soulignent le rôle majeur du tissu adipeux brun dans l'amélioration de la lipémie chez les rongeurs traités avec des agonistes PPAR-y. Bien que la LPL du tissu adipeux soit importante dans l'effet hypotriglycéridémiant des agonistes PPAR-y, les études décrites dans cet ouvrage montrent que sa présence n'est pas essentielle à cet effet. En absence de LPL, la réduction des AGL causée par l'augmentation de la rétention des lipides dans les tissus adipeux a réduit l'accumulation des lipides dans le foie, le potentiel de sécrétion des TG et la triglycéridémie. L'amélioration de l'effet antilipolytique de l'insuline et l'augmentation de l'expression des gènes impliqués dans l'estérification et le recyclage des acides gras dans le tissu adipeux ont contribué à réduire les AGL. Cette diminution s'est produite malgré le fait que l'agonisme de PPAR-y a augmenté le potentiel lipolytique du tissu adipeux en stimulant l'expression des lipases impliquées dans ce sentier métabolique.

#### ABSTRACT

Peroxisome proliferator-activated receptor-γ (PPAR-γ) agonists are used clinically for the treatment of insulin resistance and type 2 diabetes. In addition to improving insulin sensitivity, these agonists induce profound changes in lipid metabolism. Indeed, PPAR-y agonists increase lipid accumulation in subcutaneous fat and reduce lipid deposition in visceral fat. Concomitantly with these changes, PPAR-y agonism reduces circulating triglycerides (TG) and non-esterified free fatty acids (NEFA). The precise mechanisms involved in these effects are not known. The work presented in this thesis shows in rats that PPAR-γ agonism increases lipid accumulation in subcutaneous fat by increasing adipocyte differentiation and the expression/activity of determinants of lipid uptake and retention. In visceral fat, these determinants were not strongly affected by the treatment. In this tissue, energy dissipation and lipid oxidation were preferentially increased, contributing to reduce fat accretion in visceral depots. We show here that PPAR-y agonists increased lipoprotein lipase (LPL) activity especially in subcutaneous and in brown adipose tissues and that this effect was strongly associated with the stimulation of fat accretion in these depots and with the reduction in circulating TG. This work underlies the major role of brown adipose tissue in the hypolipidemic effect of PPAR- $\gamma$  agonism in rodents. Although adipose tissue LPL is important for the reduction in circulating TG in PPAR-y agonist-treated animals, some observations indicate that LPL is not essential in this effect. In mice lacking LPL in fat and muscles, the stimulation of NEFA uptake and retention in adipose tissue reduced lipid accumulation in the liver, TG secretion potential and triglyceridemia. The improvement of insulin's anti-lipolytic action and the stimulation of the expression of genes involved in fatty acid esterification and recycling contributed to reduce circulating NEFA. This effect occurred even if PPAR-y agonism strongly increased the expression of the lipases involved in TG breakdown in adipose tissue.

#### REMERCIEMENTS

La recherche scientifique est avant toute chose une œuvre collective. La personne qui croit pouvoir réussir sans aide, technique ou conceptuelle, travaille malheureusement contre elle-même. La présente thèse est le résultat d'un travail d'équipe soutenu, et je tiens à prendre quelques instants pour remercier les gens qui ont rendu possible sa réalisation.

Tout d'abord, je me dois de remercier mon directeur, le Dr. Yves Deshaies, pour sa contribution directe à mon développement scientifique et personnel. Tout au long de mes études graduées, Yves m'a toujours considéré comme un collègue de travail et cette relation d'égal à égal m'a permis d'acquérir beaucoup d'autonomie. La grande confiance dont il a fait preuve à mon endroit a été contagieuse et m'a permis de réaliser de grandes choses. Merci Yves d'avoir soigneusement mis en place les éléments qui ont rendu possible le succès et l'achèvement de mes travaux.

Je tiens aussi à remercier les gens avec qui j'ai travaillé durant mes études graduées. En premier lieu, je me dois de remercier les membres de l'équipe Deshaies pour leur contribution à mes travaux, mais aussi, et surtout, pour le plaisir que j'ai eu à travailler en leur compagnie durant plusieurs années. Plus spécifiquement, je tiens à remercier Yves Gélinas pour sa grande disponibilité, son enthousiasme et son immense engagement dans la réussite des étudiants. Je me dois aussi de remercier Josée Lalonde de m'avoir enseigné plusieurs techniques et d'avoir contribué à faciliter mon travail et mon intégration lors de mon arrivée dans les laboratoires. Je veux remercier spécialement Magalie Berthiaume et William Festuccia pour leur amitié et pour leur aide. Merci Magalie d'avoir partagé avec moi ton expérience au doctorat et de si bon moments lors des congrès de Monaco et de Paris. Merci William de m'avoir poussé à me dépasser et d'avoir infusé dans mes travaux une vision nouvelle. Notre collaboration a été fructueuse et devra se poursuivre. Finalement, je veux remercier Geneviève Soucy qui, en tant que stagiaire durant deux étés, a beaucoup contribué à l'avancement de mes travaux dans le laboratoire. Je remercie aussi le Dr. Denis Richard et le Dr. Frédéric Picard de même que toute leur équipe (Raphaël Denis, Laurie Rouger, Marie-Claude Roy, Éric Paradis, Dana Baraboi, Sébastien Poulin, Marie-Noëlle Cyr, Chantale Michel, Fanny Therrien, Pierre Samson, Julie Plamondon, Martine Marcotte, Stéphanie Miard, Luce Dombrowski) avec qui j'ai eu tant de plaisir à travailler. Une mention honorable à Raphaël, et William par le fait même, pour les innombrables moments «extra-laboratoires» que nous avons eus autour d'un petit verre. Merci!

Je souhaite remercier tous les membres de ma famille pour le support accordé depuis le tout début de mes études. Une part importante de mes accomplissements vous est directement attribuable. Merci à mon frère et ami, Yan, d'avoir toujours été là pour moi. Merci André et Sylvie d'avoir tout fait en votre possible pour rendre mon parcours plus facile. Vous ne pouvez imaginer à quel point je suis reconnaissant pour l'ensemble des actions que vous avez posées afin de me permettre d'aller toujours un peu plus loin. Vos encouragements ont été précieux tout au long de mes études. Au-delà de toutes considérations professionnelles et scientifiques, je vous remercie d'avoir toujours été présents à chaque moment de ma vie. Je retire de grandes leçons de votre enseignement. C'est sans hésitation que je vous décerne un A+ pour l'amour, les encouragements et le dévouement dont vous avez fait preuve à mon endroit depuis toujours.

Je ne pourrais terminer ces remerciements en laissant de côté le membre le plus important de mon équipe, Audrey. Merci Lee d'avoir toujours été présente, autant dans la réussite que dans les échecs. Ton support est sans aucun doute un élément marquant qui a permis l'achèvement de mes travaux. Sans le savoir, tu m'as permis de garder les pieds sur terre en me rappelant toujours de relativiser l'importance que prend le travail dans ma vie. Merci Audrey d'avoir été là à chaque moment et de bien vouloir continuer cette aventure vers Boston. Accepter de mettre de côté certaines de tes aspirations afin de me permettre de vivre les miennes représente un acte d'amour et de courage qui est tout à ton honneur. Merci ! Finalement, je tiens à remercier le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) de même que le Fonds de recherche en santé du Québec (FRSQ) pour le support financier qu'ils m'ont accordé durant mes études supérieures.

#### AVANT-PROPOS

Le présent ouvrage est déposé à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval pour l'obtention du diplôme de Philosophæ Doctor ès Sciences (Ph.D.). Généralement, cette thèse porte sur l'étude du métabolisme lipidique lors de la stimulation de PPAR-y. Les études décrites dans cet ouvrage s'attardent spécifiquement aux mécanismes impliqués dans la redistribution du tissu adipeux et dans l'amélioration de la lipémie postprandiale par les agonistes PPAR-y. La thèse contient une introduction générale rédigée en français portant sur le métabolisme des triglycérides et des acides gras libres circulants, sur les mécanismes impliqués dans le développement de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2, et sur le mode d'action des agonistes PPAR-y. Les chapitres 1 à 6 constituent le corps de l'ouvrage et relatent en détail les travaux de recherche réalisés pour cette thèse. Ces chapitres sont rédigés en anglais sous forme d'articles scientifiques tels qu'ils ont été présentés ou seront présentés aux éditeurs en vue de leur publication, selon les exigences éditoriales spécifiques des revues. Finalement, une conclusion termine cette thèse en résumant les principaux résultats obtenus et en discutant des voies futures à explorer susceptibles d'améliorer la compréhension des mécanismes d'action des agonistes PPAR-y sur le métabolisme du tissu adipeux et des lipides circulants.

#### ARTICLES PRÉSENTÉS

Les articles qui seront présentés dans cette thèse sont le fruit de mes travaux de maîtrise et de doctorat qui ont été réalisés au cours des cinq dernières années dans les laboratoires du Dr. Yves Deshaies. Chacune de ces études implique mon entière participation, de la mise en place des protocoles à la rédaction finale des manuscrits. Lors de mes études graduées, c'est avec un immense plaisir que j'ai eu la chance de collaborer à de nombreux projets de recherche en marge de mes propres travaux. Les collaborations que j'ai entretenues avec mes collègues ou avec d'autres équipes de recherche ont conduit, ou conduiront sous peu, à la publication de plusieurs manuscrits. La liste qui suit résume les articles découlant de tous mes travaux et collaborations. Les articles précédés d'un astérisque sont ceux qui seront présentés dans cette thèse.

\* Laplante M., Henrike S., McNaul K.L., Richard D., Berger J.P., Deshaies Y. (2003) PPAR-γ activation mediates adipose depot-specific effects on gene expression and lipoprotein lipase activity: mechanisms for modulation of postprandial lipemia and differential adipose accretion. <u>Diabetes</u>, 52: 291-299

Combs T.P, Pajvani U.B, Berg A.H, Lin Y., Jelicks L.A, **Laplante M.**, Nawrocki A.K., Rajala M.W., Parlow A.F., Cheeseboro L., Ding Y.Y., Russell R.G., Lindermann D., Hartley A., Baker G.R., Obici S., Deshaies Y., Ludgate M., Rossetti L., Scherer P.E. (2004) A transgenic mouse with a deletion in the collagenous domain of adiponectin displays elevated circulating adiponectin and improved insulin sensitivity. <u>Endocrinology</u>, 145: 367-383

\* Laplante M., Festuccia W.T., Berthiaume M., Gélinas Y., Deshaies Y. (2006) PPARγ agonism increases rat adipose tissue lipolysis, expression of acylglycerol lipases, and the response of lipolysis to hormonal control. <u>Diabetologia</u>, 10: 2427-2436

- \* Laplante M., Festuccia W.T., Soucy G., Gélinas Y., Lalonde J., Berger J.P., Deshaies Y. (2006) Mechanisms of the depot-specificity of PPAR-γ action on adipose tissue metabolism. <u>Diabetes</u>, 55: 2771-2778
- \* Laplante M., Festuccia W.T., Soucy G., Berthiaume M., Gélinas Y., Lalonde J., Deshaies Y. (2007) Involvement of white and brown adipose tissues in the rapid hypolipidemic action of PPAR-γ agonism in the rat. <u>Am J Physiol Regul Integr Comp</u> <u>Physiol</u>, 292(4): R1408-1417

Berthiaume M., Laplante M., Festuccia W.T., Gélinas Y., Poulin S., Lalonde J., Joanisse D., Thieringer R., Deshaies Y. (2007) Depot-specific modulation of rat visceral adipose tissue lipid metabolism by pharmacologic inhibition of 11βhydroxysteroid dehydrogenase type 1, Endocrinology, 148(5): 2391-2397

Berthiaume M., Laplante M., Deshaies Y., Metabolic improvement by PPAR- $\gamma$  agonism in rats with exogenous hypercorticosteronemia. *Soumis à Int J Obes* (*London*), décembre 2006.

Berthiaume M., Laplante M., Festuccia W.T., Cianflone K., Turcotte L.P., Joanisse D., Olivecrona G., Thieringer R., Deshaies Y. 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibition improves triglyceridemia through reduced liver VLDL secretion and partitions lipids towards oxidative tissues. *Soumis à Journal of Lipid Research*, *décembre 2006*.

Dallaire P., Laplante M., Penfornis P., Peyot M.L., Latour M.G., Lamontagne J., Trujillo, M., Scherer P.E., Prentki M., Deshaies Y., Marette A. Obese mice lacking iNOS are sensitized to the metabolic actions of PPAR-γ agonism. *Soumis à <u>Diabetes</u>*, *décembre 2006*.

Х

Berthiaume M., Laplante M., Festuccia W.T., Berger J.P., Thieringer R., Deshaies Y. Combined action of 11 $\beta$ -HSD-1 inhibition and PPAR- $\gamma$  agonism on hepatic steatosis and triglyceridemia in rats fed an obesity-promoting diet. *Soumis à <u>Am J Physiol</u> Endocrinol Metab, mai 2007*.

Festuccia W.T., Oztezcan S., **Laplante M.**, Berthiaume M., Denis R., Brito M.N., Miller D.S., Banks W.A., Bartness T.J., Richard D., Deshaies Y. PPAR-γ agonism reduces sympathetic outflow to white and brown adipose tissues and thyroid status: implication for whole body energy homeostasis. *En préparation*.

- \* Laplante M., Soucy G., Riederer M., Festuccia W.T., Gélinas Y., Berger J.P., Zechner R., Deshaies Y. Impact of PPAR-γ agonism on triglyceridemia in transgenic mice expressing cardiac, but not adipose tissue or skeletal muscle lipoprotein lipase. *En préparation*.
- \* Laplante M., Festuccia W.T., Soucy G., Berger J.P., Olivecrona G., Deshaies Y. PPAR-γ agonism improves triglyceridemia in rats by increasing adipose depot-specific lipoprotein lipase activity and triglyceride-derived lipid uptake. *En préparation*.

Kim J.Y., Van de Wall, E., **Laplante M.**, Trujillo M., Hofmann, S., Schraw T., Durand J., Li H., Li G., Jelicks L.A., Mehler M.F., Hui D., Deshaies Y., Shulman G.I., Schwarz G.J., Scherer P.E. Obesity-associated improvements in metabolic profile : rescue of the diabetic phenotype through expansion of adipose tissue mass. *En préparation*.

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉii
ABSTRACTiii
REMERCIEMENTS iv
AVANT-PROPOSvii
ARTICLES PRÉSENTÉS viii
LISTE DES TABLEAUX xvi
LISTE DES FIGURES xviii
LISTE DES ABRÉVIATIONS xxii
INTRODUCTION1
1.Obésité, résistance à l'insuline et diabète de type 2       2         1.1 Introduction       2         1.2 Les mécanismes liant l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2       2
<ul> <li>2.Métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides et des acides gras</li></ul>
<ul> <li>2.1.3 Le destin métabolique des particules riches en triglycérides</li></ul>
2.2 Acides gras libres       14         2.2.1 La lipolyse       14         2.2.1.1 Effets des catécholamines       15         2.2.1.2 Effets de l'insuline       16         2.2.2 La glycéronéogenèse       16

3. Les agonistes PPAR-y et leurs effets métaboliques	. 21
3.1 Généralités sur les PPAR	. 21
3.1.1 Distribution tissulaire, fonctions biologiques et ligands	21
3.1.2 Mode de fonctionnement	. 23
3.2 Les thiazolidinediones	. 26
3.3 Effets de la stimulation de PPAR-y sur le tissu adipeux blanc	. 27
3.3.1 La signalisation de l'insuline et le transport du glucose	. 27
3.3.2 L'adipogenèse	. 28
3.3.3 La captation, la synthèse, l'estérification et la mise en réserve des lipides	. 30
3.3.4 La lipolyse	. 31
3.3.5 La biogenèse de mitochondries et l'oxydation des lipides	. 33
3.3.6 La redistribution du tissu adipeux	. 35
3.3.7 La fonction endocrinienne.	. 39
3.3.8 Modèles génétiques	. 43
3.4 Effets de la stimulation de PPAR-y sur le tissu adipeux brun	. 44
3.4.1 La signalisation de l'insuline et le transport du glucose	. 45
3.4.2 L'adipogenèse	. 46
3.4.3 La captation, la synthèse, l'estérification et la mise en réserve des lipides	. 47
3.4.4 La fonction du tissu adipeux brun	. 47
3.4.5 Considérations générales	. 48
3.5 Effets de la stimulation de PPAR-γ sur le muscle squelettique	. 49
3.5.1 La signalisation de l'insuline et le transport/métabolisme du glucose	. 49
3.5.2 Les lipides du muscle	. 51
3.5.3 Modèles génétiques	. 52
3.6 Effets de la stimulation de PPAR-y sur le foie	. 53
3.6.1 La signalisation de l'insuline et le transport/métabolisme du glucose	. 54
3.6.2 Les lipides du foie	. 55
3.6.3 Modèles génétiques	. 57
3.7 Effets de la stimulation de PPAR-γ sur les cellules-β du pancréas	. 58
3.7.1 Effets généraux	. 58
3.8 Résumé	. 59
PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DES TRAVAUX	. 62
	(0
Problématique	. 62
Objectifs des travaux	. 64

CHAPITRE 1	
------------	--

**PPAR-** $\gamma$  activation mediates adipose depot-specific effects on gene expression and lipoprotein lipase activity. Mechanisms for modulation of postprandial lipemia and differential adipose accretion.

Avant-propos	66
Résumé	67
Abstract	68
Introduction	69
Research Design and Methods	71
Results	74
Discussion	78
Acknowledgements	83
References	84
Tables	89
Figure legends	92
Figures	95

CHAPITRE 2	101
------------	-----

## Mechanisms of the depot-specificity of PPAR-y action on adipose tissue metabolism.

Avant-propos		102
Résumé		103
Abstract		104
Introduction		105
Research Design and Methods		106
Results		111
Discussion		115
Acknowledgements		120
References	1	121
Tables		125
Figure legends		127
Figures		129

CHAPITRE 3 1	13	5
--------------	----	---

**PPAR-** $\gamma$  agonism improves triglyceridemia in rats by increasing adipose depot-specific lipoprotein lipase activity and triglyceride-derived lipid uptake.

Avant-propos	136
Résumé	137
Abstract	138
Introduction	139
Research Design and Methods	141
Results	144
Discussion	147
Acknowledgements	151
References	153
Tables	158
Figure legends	162
Figures	163

CHAPITRE	4	16	8
----------	---	----	---

Impact of PPAR- $\gamma$  agonism on triglyceridemia in transgenic mice expressing cardiac, but not adipose tissue or skeletal muscle lipoprotein lipase.

Résumé 1	169
Résumé 1	170
Abstract 1	171
Introduction 1	172
Research Design and Methods 1	174
Results 1	177
Discussion 1	180
Acknowledgements1	185
References 1	186
Tables 1	192
Figure legends 1	195
Figures 1	197

HAPITRE 5	)3
-----------	----

Involvement of adipose tissues in the early hypolipidemic action of PPAR- $\gamma$  agonism in the rat.

Avant-propos	204
Résumé	205
Abstract	206
Introduction	207
Research Design and Methods	209
Results	214
Discussion	218
Acknowledgements	223
References	224
Tables	229
Figure legends	233
Figures	234
*	

CHAPITRE 6	240
------------	-----

# **PPAR-***γ* agonism increases rat adipose tissue lipolysis, expression of acylglycerol lipases, and the response of lipolysis to hormonal control.

Avant-propos	241
Résumé	242
Abstract	243
Introduction	244
Research Design and Methods	246
Results	249
Discussion	252
Acknowledgements	257
References	258
Tables	262
Figure legends	263
Figures	265
Electronic supplementary material - Text 1 to 6	270
Electronic supplementary material - References	274
Electronic supplementary material - Tables	276
Electronic supplementary material - Figure legends	277
Electronic supplementary material - Figure	278

DISCUSSION GÉNÉRALE, PERSPECTIVES DE RECHERCHE ET	
CONCLUSION	280
RÉFÉRENCES	298

## LISTE DES TABLEAUX

## INTRODUCTION

<b>Tableau 1.</b> Liste des gènes impliqués dans la captation, l'estérification réserve des lipides qui sont affectés par la stimulation de PP adipeux	et la mise en AR-γ dans le tissu 
<b>Tableau 2.</b> Revue de la littérature des effets des thiazolidinediones sur lissu adipeux blanc chez l'homme	a redistribution du
CHAPITRE 1	
Table 1. Primer/probe sets used for amplification	
Table 2. Food intake and body weight variables in rats chronically fed s         diet and treated or not with the PPAR-γ agonist COOH for 3 w	standard or HSHF reeks 90
<b>Table 3.</b> Weight and protein content of inguinal and retroperitoneal whi and interscapular brown adipose tissue of rats chronically fed s HSHF diet and treated or not with the PPAR-γ agonist COOH	te adipose tissue standard or for 3 weeks 91
CHAPITRE 2	
Table 1. Primers used for quantitation of mRNA by real-time qPCR	125
Table 2. Morphometric and plasma variables in rats treated or not with weeks	COOH for 3
CHAPITRE 3	
Table 1. Primers used for mRNA quantification by real-time RT-PCR.	
Table 2. Food intake and body weight variables of rats treated or not weeks	ith COOH for 3 159
Table 3. Tissue weights of rats treated or not with COOH for 3 weeks.	
<b>Table 4.</b> Serum metabolite and hormone concentrations of rats treated of for 3 weeks and sacrificed after a 10-h fast or an 18-h fast follow refeeding period.	or not with COOH owed by a 6-h 

## **CHAPITRE 4**

Table 1. F	Primers used for mRNA quantification by real-time qPCR 192
Table 2. N	Morphometric variables of L2 and L0-hLPL mice treated or not with COOH for 4 weeks
Table 3. n b v	nRNA expression of lipid uptake/retention genes in white adipose tissue and prown adipose tissue of L2 and L0-hLPL mice treated or not with COOH for 3 weeks
CHAPITI	RE 5
Table 1. P	Primers used for qPCR
Table 2. E	Body weight, food intake, serum glucose and insulin of control and rosiglitazone- reated rats after 1, 2, 3 and 4 days of treatment

Table 3.	Distribution of radiolabeled	lipids following	the injection of a 3	H-TG emulsion
	into rats treated or not with	rosiglitazone for	3 days	

Table 4. mRNA expression in brown and white adipose tissues after 1 and 4 days of	
treatment with rosiglitazone	232

## CHAPITRE 6

Table 1. Measurements in rosiglitazone-treated and control rats 26	52
--	----

# CHAPITRE 6 – Electronic supplementary material (ESM)

Table 1.	Primers use	ed for the quantifi	cation of mRNA	levels	276
----------	-------------	---------------------	----------------	--------	-----

## LISTE DES FIGURES

## INTRODUCTION

Figure 1. Principales adipokines libérées par le tissu adipeux affectant le métabolisme d'autres cellules, tissus ou organes
Figure 2. Représentation schématisée du métabolisme des triglycérides et des acides gras libres en situation normale et lors dans la résistance à l'insuline
Figure 3. Modèle schématisé de l'activation transcriptionnelle par les PPAR 24
<b>Figure 4.</b> Représentation schématisée des principaux effets des agonistes PPAR-γ sur les tissus et de l'impact de ces modifications sur le métabolisme du glucose et des lipides
CHAPITRE 1
Figure 1. Plasma glucose and insulin concentration in rats fed standard diet or high-sucrose high-fat diet and treated or not with the PPAR-γ agonist COOH
<b>Figure 2.</b> Plasma TG and NEFA concentration in rats fed standard diet or high-sucrose high-fat diet and treated or not with the PPAR-γ agonist COOH
<b>Figure 3.</b> LPL activity in inguinal and retroperitoneal depots in rats fed standard diet or high-sucrose high-fat diet and treated or not with the PPAR-γ agonist COOH 97
<b>Figure 4.</b> LPL activity in interscapular brown adipose tissue in rats fed standard diet or high-sucrose high-fat diet and treated or not with the PPAR-γ agonist COOH 98
Figure 5. Plasma corticosterone concentrations in rats fed standard diet or high-sucrose high-fat diet and treated or not with the PPAR-γ agonist COOH
<b>Figure 6.</b> mRNA levels of LPL, 11-β HSD-1, UCP-1 in inguinal and retroperitoneal adipose tissue in rats fed standard diet or high-sucrose high-fat diet and treated or not with the PPAR-γ agonist COOH
CHAPITRE 2

Figure 2. LPL mRNA level and activity, mRNA level of aP2, uptake of triglyceride- derived labeled fatty acids and mRNA level of DGAT-1 in subcutaneous and visceral fat of rats treated or not with COOH
Figure 3. Basal and insulin-inhibited lipolysis and mRNA level of ATGL in subcutaneous fat and visceral fat of rats treated or not with COOH 131
Figure 4. PEPCK activity and mRNA level, incorporation of [1- <sup>14</sup> C] pyruvate into lipids, and GyK mRNA level in subcutaneous fat and visceral fat of rats treated or not with COOH
Figure 5. mRNA levels of PDK-2, PDK-4, CPT-1, PGC-1, UCP-1 and Acadl and adipocyte O <sub>2</sub> consumption in subcutaneous fat and visceral fat of rats treated or not with COOH
Figure 6. Mitochondrial mass in live adipocytes isolated from subcutaneous fat and visceral fat of rats treated or not with COOH
CHAPITRE 3
Figure 1. LPL activity measured in tissues of rats treated or not with COOH for 23 days
Figure 2. TG clearance following the injection of a synthetic emulsion of TG mimicking chylomicrons in rats treated or not with COOH for 23 days
Figure 3. TG-derived lipid uptake by tissues following the injection of a synthetic emulsion of TG in rats treated or not with COOH for 23 days 165
Figure 4. Correlation between LPL activity and TG-derived lipid uptake in tissues of fasted rats treated or not with COOH for 23 days
Figure 5. Quantitative real-time RT-PCR analysis of mRNA expression in the soleus of rats treated or not with COOH for 23 days
CHAPITRE 4
Figure 1. Fasting and ad libitum-fed plasma TG concentration in L2 and L0-hLPL mice treated or not with COOH
Figure 2. LPL mRNA levels in iWAT, rWAT and BAT of L2 and L0-HLPL mice treated or not with COOH
Figure 3. Liver TG content in L2 and L0-hLPL mice treated or not with COOH 199

Figure 4.	Expression, activity or circulating levels of determinants of VLDL assembly and secretion, FA uptake, synthesis and esterification, and lipid oxidation in the liver of L2 and L0-hLPL mice treated or not with COOH
Figure 5.	Serum NEFA concentration of L2 and L0-hLPL mice treated or not with COOH. Simple regression analysis between liver TG and circulating NEFA and between plasma TG and liver TG
Figure 6.	iWAT, rWAT, and BAT cell size in L2 and L0-hLPL mice treated or not with COOH

## **CHAPITRE 5**

Figure 1. Serum TG and NEFA of rats treated or not with rosiglitazone for 1 to 4 days. 234
Figure 2. Clearance of a radiolabeled TG emulsion in rats treated or not with rosiglitazone for 3 days, and TG appearance rate (TGAR) following Triton WR-1339 in rats treated of not with rosiglitazone for 5 days
Figure 3. Whole tissue LPL activity in BAT, iWAT, and eWAT of rats treated or not with rosiglitazone for 1 to 4 days
Figure 4. <i>Ex vivo</i> oleate uptake by BAT, iWAT and eWAT explants from rats treated or not with rosiglitazone for 1 or 4 days
Figure 5. Weight and total TG content of BAT isolated from rats treated or not with rosiglitazone for 1 to 4 days
Figure 6. Correlation between serum NEFA concentration and the weight of BAT, iWAT, and eWAT of rats treated or not with rosiglitazone for 1 to 4 days
CHAPITRE 6
Figure 1. In vitro basal, noradrenaline- and DBcAMP-stimulated rates of glycerol and NEFA release by explants of ING and RETRO adipose depots of control and rosiglitazone-treated rats
Figure 2. Levels of ATGL, HSL and MGL mRNAs in ING, RETRO, EPI and MES adipose depots of control and rosiglitazone-treated rats
Figure 3. Correlations between glycerol release and levels of ATGL mRNA, HSL mRNA and MGL mRNA

## CHAPITRE 6 - Electronic supplementary material (ESM)

Figure 1. l a a	In vitro noradrenaline-stimulated rates of glycerol and NEFA release by adipocytes isolated from ING and RETRO adipose depots of control and PPAR-γ agonist-treated rats
Figure 2. A a	Activity of PEPCK and GyK, mRNA levels of PEPCK, Gyk, FABP4 and FATP, and triacylglycerol/NEFA cycling rate in ING and RETRO adipose depots of control and rosiglitazone-treated rats
DIC CITCC	AN ANY A REPORT OF THE RECUENCING OF

## DISCUSSION GÉNÉRALE, PERSPECTIVES DE RECHERCHE ET CONCLUSION

Figure 5. Résumé des mécanismes par lesquels l'agoniste PPAR-γ COOH favorise la redistribution du tissu adipeux chez le rat	286
Figure 6. Résumé des effets de la rosiglitazone sur la lipolyse	294

# LISTE DES ABRÉVIATIONS

Abréviations	Définitions
11β HSD-1	11β-hydroxystéroïde déshydrogénase de type 1
15dPGJ-12	15-désoxy- $\Delta^{12-14}$ -prostaglandine J2
AC	Adénylate cyclase
Acadl	Acyl-CoA déshydrogénase, chaîne longue
ACBP	Protéine de liaison à l'acyl-CoA
ACO	Acyl-CoA oxydase
ACS	Acyl-CoA synthase
ADD/SREBP1-c	Adipocyte determination and differentiation factor 1/sterol
	regulatory element binding protein 1c
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADRP	Protéine associée à la différentiation des adipocytes
AF-1	Domaine d'activation de la transcription indépendant du
	ligand/fonction d'activation-1
AF-2	Domaine d'activation de la transcription dépendant du
	ligand/fonction d'activation-2
AG	Acides gras
AGL	Acides gras libres
AGT	Angiotensinogène
AMPe	Adénosine 3',5'-monophosphate cyclique
AMPk	Protéine kinase activée par l'adénosine monophosphate
Angptl-4	Protéine similaire à l'angiopoïétine-4
aP2	Protéine de liaison aux acides gras, isoforme adipocytaire
ARA70	Protéine associée au récepteur des androgènes 70
ARNm	Acide ribonucléique messager
ASP	Facteur de stimulation de l'acylation
ATGL	Lipase des triglycérides du tissu adipeux
ATP	Adénosine triphosphate
CAP	Protéine associée à c-CBL

c-CBL	c-CBL
C/EBP	CCAAT/enhancer binding protein
СЕТР	Enzyme de transfert d'esters de cholestérol
CGI-58	CGI-58
CPT-1	Carnitine palmitoyltransférase-1
CytC	Cytochrome C oxydase
DBD	Domaine de liaison à l'ADN
DGAT	Diacylglycérol acyltransférase
Dio2	Iodothyronine désiodinase 2
DTA	Toxine diphtérique A
EL	Lipase endothéliale
FABP	Protéine de liaison aux acides gras
FAS	Synthase d'acides gras
FAT/CD36	Translocase d'acides gras/CD36
FATP-1	Protéine de transport des acides gras-1
G3P	Glycérol-3 phosphate
G6Pase	Glucose-6 phosphatase
GK	Glucokinase
GyK	Glycérol kinase
GLUT	Transporteur de glucose
GS	Glycogène synthase
HbA1 <sub>c</sub>	Hémoglobine glyquée
hFABP	Protéine de liaison des acides gras, isoforme du coeur
HL	Lipase hépatique
HODE	Acides hydroxyoctadécadiénoïques
HSL	Lipase hormono-sensible
IDL	Lipoprotéine de densité intermédiaire
iNOS	Synthase inductible de monoxyde d'azote
IL-1β	Interleukine-1 <sup>β</sup>
IL-6	Interleukine-6
IRS	Substrat du récepteur de l'insuline

LBD	Domaine de liaison du ligand
LDL	Lipoprotéine de faible densité
LPL	Lipase lipoprotéique
LRP	Récepteur similaire au récepteur LDL
LRTG	Lipoprotéine riche en triglycérides
MAPK	Protéine kinase activée par les signaux mitogènes
Mcad	Acyl-CoA déshydrogénase, chaîne intermédiaire
MCP-1	Protéine attractrice des monocytes-1
ME	Enzyme malique
MGL	Lipase du monoacylglycérol
MTP	Protéine de transfert microsomale des triglycérides
NcoR	Répresseur du récepteur nucléaire
NO	Monoxyde d'azote
p300/CBP	p300/protéine de liaison à l'élément de réponse de l'AMPc
PAI-1	Inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1
PC	Pyruvate carboxylase
PDE3B	Phosphodiestérase 3B
PEPCK	Phosphoénolpyruvate carboxykinase
PDH	Pyruvate déshydrogénase
PDK	Pyruvate déshydrogénase kinase
PGC	Cofacteur de PPAR-y
РІЗК	Phophatidylinositol-3 kinase
РКА	Protéine kinase A
PKB/AKT	Protéine kinase B/AKT
РКС	Protéine kinase C
PLIN	Périlipine A
PPAR	Récepteur activé par les proliférateurs des peroxysomes
PPRE	Élément de réponse aux proliférateurs des peroxysomes
PTP-1B	Protéine tyrosine phosphatase-1B
RIP-140	Protéine d'interaction des récepteurs-140
RBP-4	Protéine de liaison au rétinol-4

RXR	Récepteur X des rétinoïdes
S3-12	S3-12
SCD-1	Stéaroyl-CoA désaturase-1
SMRT	Médiateur silencieux des rétinoïdes et hormones thyroïdiennes
sPPARm	Modulateur sélectif de PPAR
SRC-1	Coactivateur du récepteur des stéroïdes-1
SUMO	Small ubiquitin-related modifier
Т3	Triiodothyronine
TIF-2	Facteur de transcription intermédiaire-2
TG	Triglycéride
TGF-β	Facteur de croissance transformant-β
TGH	Triacylglycérol hydrolase
TNF-α	Facteur de nécrose tumorale-a
TZD	Thiazolidinedione
UCP	Protéine découplante
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VLDL	Lipoprotéine de très basse densité

INTRODUCTION

#### 1. Obésité, résistance à l'insuline et diabète de type 2

#### 1.1 Introduction

L'obésité est un problème de santé majeur qui a atteint au cours des dernières décennies des proportions épidémiques. En 2004, il a été estimé que près de 60% de la population canadienne souffrait de surplus de poids ou d'obésité (Statistique Canada, 2004). La même tendance a été observée dans la plupart des pays industrialisés (James, 2004). Les conséquences de l'obésité sur la santé publique sont considérables. En effet, cette condition est directement responsable de l'augmentation de l'incidence de la résistance à l'insuline, du diabète de type 2, des maladies cardiovasculaires, de certains types de cancers et de la mort prématurée (US Department of Health and Human Services, 2001). Au tournant des années 2000, des études chiffraient à 171 millions le nombre de diabétiques de type 2 dans le monde. Il est estimé que ce nombre doublera d'ici 2030 pour atteindre 366 millions d'individus (Wild *et al.*, 2004). Dans ce contexte, l'étude des mécanismes liant l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2 est primordiale afin de développer des outils permettant de prévenir ou de mieux traiter les conséquences néfastes de ces pathologies.

#### 1.2 Mécanismes liant l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2

La résistance à l'insuline observée chez les personnes obèses et les individus diabétiques de type 2 est caractérisée par l'incapacité des tissus ciblés par l'insuline de répondre normalement à l'action de cette hormone (Petersen et Shulman, 2002). Pour maintenir une glycémie normale en présence de résistance à l'insuline, les cellules- $\beta$  du pancréas augmentant la sécrétion d'insuline. Chez les patients diabétiques de type 2, la résistance à l'insuline précède le diagnostic de cette maladie de dix ou vingt ans (Warram *et al.*, 1990). Suite à cette longue période de compensation par les cellules- $\beta$ , l'intolérance au glucose finit par se développer malgré les niveaux élevés d'insuline. Cette progression est le résultat de la détérioration du profil métabolique et de l'amplification de la résistance des

tissus à l'action de l'insuline. Finalement, la détérioration progressive de la sécrétion d'insuline causé par la défaillance des cellules- $\beta$  provoque la transition de l'insulino-résistance vers le diabète de type 2.

L'accumulation du tissu adipeux, qui définit l'obésité, joue un rôle central dans le développement de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2. Il est maintenant bien connu qu'en plus de voir au stockage des triglycérides, le tissu adipeux exerce une fonction endocrinienne affectant profondément la sensibilité à l'insuline et l'homéostasie métabolique (Kershaw et Flier, 2004; Trujillo et Scherer, 2006). Quelques-uns des facteurs produits et sécrétés par le tissu adipeux (adipokines) sont présentés dans la figure 1.

Les acides gras (AG) libérés par les adipocytes lors de la lipolyse sont suspectés de jouer un rôle de premier plan dans le développement de la résistance à l'insuline. L'hypertrophie et l'hyperplasie adipocytaire, de même que la réduction de l'action antilipolytique de l'insuline, contribuent à l'augmentation des niveaux circulants d'acides gras libres (AGL) chez les obèses (Van Gaal et al., 2006). L'augmentation du contact entre les AGL et le foie, le muscle squelettique et le pancréas favorise l'accumulation de dérivés lipidiques (diacylglycérol, acyl-CoA à longues chaînes, céramides) dans ces tissus (Cooney et al., 2002; Assimacopoulos-Jeannet, 2004). Ces produits réduisent la sensibilité à l'insuline en stimulant l'action de sérine/thréonine kinases reconnues pour phosphoryler en sérine et inactiver les substrats du récepteur à l'insuline (IRS, insulin receptor substrate) -1 et -2 (Shulman, 2000). La réduction de l'activité d'IRS-1 et IRS-2 diminue l'activation de la phophatidylinositol-3 kinase (PI3K), ce qui empêche l'activation normale de la cascade signalétique activée par la liaison de l'insuline à son récepteur. Cet effet diminue le recrutement des transporteurs de glucose 4 (GLUT4) et l'entrée du glucose dans les cellules du muscle et du tissu adiepeux. Il est aussi connu que les dérivés lipidiques favorisent l'apoptose des cellules-β du pancréas (Assimacopoulos-Jeannet, 2004).



Figure 1. Principales adipokines libérées dans la circulation par le tissu adipeux ayant des effets sur le métabolisme d'autres cellules, tissus ou organes.

**Abréviations:** angptl-4, angiopoietin-like protein-4; AGT, angiotensinogen; ASP, acylationstimulating protein; IL-6, interleukin-6; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; NO, nitric oxide; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; RBP-4, retinol binding protein-4; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ ; TGF- $\beta$ , transforming growth factor- $\beta$ ; VEGF, vascular endothelial growth factor. Pour la traduction française, voir la section Liste des abréviations.

Plusieurs protéines produites et libérées par le tissu adipeux sont perçues comme des cibles possibles pouvant lier l'obésité au développement de la résistance à l'insuline. De ces protéines, l'adiponectine est un candidat particulièrement intéressant. L'adiponectine influence la sensibilité à l'insuline en favorisant l'oxydation des lipides et en réprimant la production hépatique de glucose par des mécanismes dépendants de la protéine kinase activée par l'adénosine monophosphate (AMPk, *adenosine monophosphate-activated protein kinase*) (Berg *et al.*, 2001; Combs *et al.*, 2001; Yamauchi *et al.*, 2002). L'étroite association entre l'hypoadiponectinémie observée chez les obèses et

la résistance à l'insuline de même que le diabète de type 2 suggère un rôle central de cette adipokine dans le maintien de l'homéostasie métabolique et énergétique (Weyer *et al.*, 2001). La leptine, qui est produite en fonction des réserves de tissu adipeux, est une autre adipokine reconnue pour influencer positivement la sensibilité à l'insuline en réduisant la prise alimentaire et en stimulant l'oxydation des lipides dans les tissus périphériques (Kershaw et Flier, 2004). Chez l'obèse, il est connu que des mécanismes menant à la résistance à la leptine prennent place et contribuent à augmenter l'accumulation des lipides dans les tissus et la résistance à l'insuline (Unger, 2002, 2003). La récente découverte de l'induction de la résistance à l'insuline par la protéine de liaison au rétinol-4 (RBP-4, *retinol binding protein-4*), une protéine produite par le tissu adipeux se retrouvant en forte concentration plasmatique chez les obèses, montre que cette adipokine pourrait aussi faire le lien entre l'obésité et la résistance à l'insuline (Yang *et al.*, 2005).

Le tissu adipeux est un organe complexe composé entre autres d'adipocytes, de préadipocytes, de cellules endothéliales, de cellules stromales, de monocytes et de macrophages (Wellen et Hotamisligil, 2003). Ces dernières années, il a été découvert qu'une forte infiltration de macrophages se produit dans le tissu adipeux de plusieurs modèles de souris obèses (Weisberg et al., 2003; Xu et al., 2003b). La colonisation du tissu adipeux par les macrophages, un phénomène qui est amplifié par la production de la protéine attractrice des monocytes-1 (MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1) (Kanda et al., 2006; Weisberg et al., 2006), contribue à la surproduction par le tissu adipeux de cytokines pro-inflammatoires telles le facteur de nécrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , tumor *necrosis factor-* $\alpha$ ) et l'interleukine-6 (IL-6). Il est maintenant bien connu que ces cytokines favorisent le développement de la résistance à l'insuline en stimulant la lipolyse du tissu adipeux et en inhibant directement la signalisation de l'insuline (Green et al., 1994; Hotamisligil et al., 1994; Gasic et al., 1999). Bien que les causes précises menant à l'infiltration des macrophages dans le tissu adipeux et à l'inflammation chronique ne soient pas encore élucidées, il reste que ces éléments représentent d'importants mécanismes pouvant lier l'obésité au développement de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2 (Wellen et Hotamisligil, 2003; Neels et Olefsky, 2006).

La distribution des graisses entre les dépôts adipeux périphériques (sous-cutanés) et les dépôts adipeux centraux (viscéraux) joue un rôle de premier plan dans le développement de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2. Plusieurs études ont montré que les individus ayant une importante accumulation de graisses viscérales sont plus à risque de développer le diabète de type 2 et des maladies cardiovasculaires que des individus de même poids qui accumulent leurs graisses dans les tissus adipeux sous-cutanés (Kissebah et al., 1982; Krotkiewski et al., 1983; Kannel et al., 1991). Les adipocytes des dépôts adipeux viscéraux sont reconnus comme étant moins sensibles à l'action anti-lipolytique de l'insuline et plus sensibles à l'action des catécholamines que les adipocytes isolés des dépôts adipeux sous-cutanés (Lewis et al., 2002). Ainsi, l'accumulation préférentielle des graisses dans le tissu adipeux viscéral mène à l'élévation des niveaux d'AGL en circulation et favorise la déposition ectopique des lipides dans les tissus (muscle squelettique, foie, cellules- $\beta$  du pancréas), ce qui favorise le développement de la résistance à l'insuline (Shulman, 2000; Lewis et al., 2002). De plus, le fait que le tissu adipeux viscéral soit intimement lié au foie via la veine porte expose cet organe à de grandes quantités d'AGL. Cette situation exacerbe les effets néfastes des lipides sur le foie et contribue à augmenter la production hépatique de glucose et la sécrétion des triglycérides (TG) (Després et Lemieux, 2006). Il a aussi été démontré que le tissu adipeux viscéral sécrète plus de cytokines proinflammatoires que le tissu adipeux sous-cutané (Lyon et al., 2003). Cet effet pourrait être une conséquence directe d'une infiltration de macrophages plus importante dans le tissu adipeux viscéral (Cancello et al., 2006; Van Gaal et al., 2006).

#### 2. Métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides et des acides gras libres

#### 2.1 Lipoprotéines riches en triglycérides

Bien que les AG représentent une source importante d'énergie, leur métabolisme cellulaire doit être strictement contrôlé. En effet, les AG se retrouvant libres de toute estérification sont la cause d'effets cytotoxiques majeurs menant au dysfonctionnement de plusieurs types cellulaires (Schaffer, 2003). Ainsi, ces derniers sont estérifiés lors des diverses étapes de leur métabolisme. L'une des formes biologiques majeures sous lesquelles se retrouvent les AG est le triacylglycérol ou le triglycéride (TG). Les TG sont formés par l'estérification de trois AG sur une molécule de glycérol. Bien que les TG permettent le stockage des AG sous une forme biologiquement inerte, ces molécules sont extrêmement hydrophobes, ce qui rend leur solubilisation et leur transport dans la circulation sanguine difficile.

Les lipides neutres sont solubilisés et transportés dans la circulation sanguine sous forme de complexes sphériques nommés lipoprotéines. Le coeur des lipoprotéines est formé d'un noyau hydrophobe composé essentiellement de TG et d'esters de cholestérol. La partie externe est pour sa part formée d'une couche de phospholipides et de cholestérol non estérifié dans laquelle s'imbriquent des protéines spécifiques, les apolipoprotéines (Genest, 2003). Les apolipoprotéines servent à établir le destin métabolique des lipoprotéines en favorisant le maintien de leur structure, en permettant l'activation ou l'inhibition d'enzymes impliquées dans leur métabolisme et en facilitant leur interaction avec des récepteurs spécifiques. De par leur composition en lipides et protéines, cinq classes de lipoprotéines ont été répertoriées et classées selon leurs propriétés physicochimiques. Ces différents groupes sont : les chylomicrons, les lipoprotéines de très basse densité (VLDL, very low density lipoproteins), les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL, intermediate density lipoproteins), les lipoprotéines de basse densité (LDL, low density lipoproteins) et les lipoprotéines de haute densité (HDL, high density lipoproteins). De ces groupes, les chylomicrons et les VLDL représentent les principaux transporteurs de TG (Genest, 2003). Comme le présent ouvrage porte en partie sur l'impact des agonistes

des récepteurs activés par les proliférateurs des peroxysomes- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ , *peroxisome proliferator-activated receptor-\gamma*) sur le métabolisme des TG circulants, seules les caractéristiques spécifiques aux chylomicrons et aux VLDL seront abordées en détail dans les prochaines sections.

#### 2.1.1 Les chylomicrons

Les chylomicrons sont des lipoprotéines impliquées dans le transport et la diffusion des lipides exogènes dans l'organisme. Ces lipoprotéines produites dans l'intestin transportent en leur centre lipidique des quantités importantes de TG issus de la digestion des lipides alimentaires.

À la suite du repas, plusieurs lipases contribuent à la dégradation des lipides alimentaires. De ces lipases, notons entre autres les lipases gastrique et pancréatique, la cholestérol estérase pancréatique et la phospholipase pancréatique A<sub>2</sub>. Ces enzymes catabolisent respectivement l'hydrolyse des TG, des esters de cholestérol et des phospholipides à divers endroits du tractus gastro-intestinal. Les AG, le cholestérol et les lysophospholipides ainsi produits, qui sont alors émulsifiés sous forme de micelles avec les sels biliaires, traversent ensuite la membrane des entérocytes (Shen et al., 2001). À l'intérieur de l'entérocyte, les AG sont pris en charge par les protéines de liaison des acides gras (FABP, fatty acid binding protein) (Storch et Thumser, 2000). Les acides gras à courtes chaînes (moins de 12 carbones) traversent l'entérocyte par voie passive et sont mis en circulation liés à l'albumine. Les acides gras à plus longue chaîne sont utilisés pour la synthèse des TG, des esters de cholestérol et des phospholipides dans le réticulum endoplasmique lisse de l'entérocyte. Les chylomicrons sont ensuite assemblés par l'ajout de TG sur une particule composée de phospholipides et de l'apoB-48. Cette réaction est en partie catalysée par la protéine de transfert microsomale des triglycérides (MTP, microsomal triglyceride transfert protein) (Hussain, 2000). Bien que l'apoB-48 représente la principale apolipoprotéine sur laquelle est construite le chylomicron, l'apoA-I, A-II et A-IV peuvent aussi se joindre à la lipoprotéine durant son assemblage. Lorsque la maturation avance, les chylomicrons sont déplacés vers l'appareil de Golgi d'où ils sont excrétés dans

la lymphe. Durant leur passage de la lymphe vers le plasma, les chylomicrons acquièrent d'autres apolipoprotéines (apoC-I, C-II, C-III et -E) en interagissant avec les HDL. L'acquisition de ces nouvelles apolipoprotéines jouera un rôle de premier plan dans le destin métabolique des chylomicrons (voir section 2.1.3).

#### 2.1.2 Les VLDL

Les VLDL sont les principales lipoprotéines produites par le foie. Ces lipoprotéines sont impliquées dans le transport endogène des TG. Bien qu'elles contiennent en leur centre lipidique une mince fraction d'esters de cholestérol, les VLDL sont composées essentiellement de TG. La quantité de TG s'y retrouvant est cependant plus faible que dans les chylomicrons.

Les TG endogènes retrouvés au centre des VLDL proviennent des réserves cytoplasmiques de TG présentes dans les hépatocytes. Ces réserves de lipides accumulées dans le foie sont issues de la synthèse de novo d'AG, de la captation d'AG provenant de l'hydrolyse de lipoprotéines circulantes et de la captation d'AGL circulants dans le plasma (Lewis, 1997). Les TG cytoplasmiques accumulés au foie ne peuvent directement entrer dans la production des VLDL. En effet, ces lipides nouvellement synthétisés doivent être hydrolysés à nouveau avant de pouvoir servir de précurseurs à la formation des VLDL (Gibbons et al., 1992). La triacylglycérol hydrolase (TGH) est l'enzyme qui catalyse cette réaction. Les AG produits par cette réaction sont ensuite réestérifiés en TG par un processus impliquant la diacylglycérol acyltransférase 2 (DGAT-2) (Gibbons et al., 2004). L'assemblage des VLDL se produit en plusieurs étapes dans divers compartiments cellulaires. En premier lieu, l'apoB-100 est synthétisée dans le réticulum endoplasmique rugueux. Lorsque l'apoB-100 est synthétisée, elle se déplace dans le réticulum endoplasmique lisse où des lipides y sont ajoutés pour la formation d'une VLDL naissante. Des gouttelettes de TG y sont ensuite ajoutées jusqu'à la formation complète de VLDL. Tel que décrit dans la section précédente, la MTP joue un rôle important dans l'assemblage de ces lipoprotéines (Shelness et Sellers, 2001). Lorsque matures, les VLDL sont sécrétées dans le plasma où elles acquièrent d'autres apolipoprotéines (apoC-I, C-II, C-III et -E) en

interagissant avec les HDL. Tel que mentionné précédemment pour les chylomicrons, l'acquisition de ces nouvelles apolipoprotéines jouera un rôle de premier plan dans le destin métabolique des VLDL (voir section 2.1.3).

#### 2.1.3 Le destin métabolique des particules riches en triglycérides

La mise en circulation des TG par le foie et l'intestin a pour but de fournir aux tissus périphériques une source d'énergie pouvant être emmagasinée ou utilisée pour le fonctionnement des cellules. L'une des étapes cruciales dans le métabolisme des chylomicrons et des VLDL est leur hydrolyse intravasculaire. Cette étape est catalysée par la lipase lipoprotéique (LPL, *lipoprotein lipase*). La LPL est un membre de la superfamille des lipases qui comprend entre autres la lipase hépatique (HL, hepatic lipase) et la lipase endothéliale (EL, endothelial lipase). Le tissu adipeux, la glande mammaire, le muscle squelettique et le cœur sont les tissus où l'activité de la LPL est la plus importante (Mead et al., 2002). Suite à l'expression et à la synthèse de la LPL dans les cellules parenchymateuses, la LPL est glycosylée dans le Golgi, dimérisée, exportée hors des cellules et ancrée à l'endothélium des capillaires sanguins via une liaison avec des glycosaminoglycans (Goldberg et Merkel, 2001). La disposition de la LPL dans la lumière des capillaires sanguins permet le contact avec les lipoprotéines riches en triglycérides (LRTG) circulantes. Il est bien connu que l'apoC-II présente à la surface des chylomicrons et des VLDL est requise pour l'activation de la LPL et, qu'inversement, l'apoC-III inhibe l'action de l'enzyme (Goldberg et Merkel, 2001). Lorsque le lien s'établit entre la LPL et les lipoprotéines, les TG qui y sont contenus sont hydrolysés en position 1 et 3, libérant localement des AG et du 2-monoacylglycérol. Les AG libérés sont ensuites entreposés sous forme de TG ou oxydés dans les tissus adipeux et musculaires.

L'hydrolyse des chylomicrons par la LPL est responsable de la diminution du contenu en triglycérides de ces lipoprotéines (Redgrave, 2004). Lorsque les TG des chylomicrons sont complètement hydrolysés et qu'il n'y reste pratiquement que des esters de cholestérol, les résidus de chylomicrons sont captés par le foie. L'interaction entre les apoB et E, toujours présent sur le résidu de chylomicron, et le récepteur LDL ou le

11

récepteur similaire au récepteur LDL (LRP, *LPL receptor-related protein*) du foie facilitent l'élimination des résidus de chylomicrons (Hussain *et al.*, 1996).

À l'image des chylomicrons, l'interaction entre les VLDL et la LPL libère des AG qui sont pris en charge par les tissus périphériques. Suite à l'hydrolyse intravasculaire des TG, les VLDL rapetissent et la fraction interne d'esters de cholestérol augmente de façon relative. Lors de l'hydrolyse des VLDL, une partie des phospholipides, de même que l'apoE et les apoC, quittent la surface de la VLDL et sont transférés vers les HDL afin de maintenir l'intégrité de la lipoprotéine. Les particules résultantes, les résidus de VLDL, ou IDL, peuvent ensuite être captés par le foie via le récepteur LDL ou LRP. Une partie des IDL peut tout de même rester dans la circulation sanguine. Les IDL circulantes sont ensuite transformées en LDL suite à leur hydrolyse plus complète par la LPL et la HL. Les LDL se caractérisent par un contenu relativement élevé en cholestérol comparativement à leur teneur en TG. De ce fait, cette classe de lipoprotéines est celle qui véhicule la majeure partie du cholestérol se trouvant dans la circulation sanguine chez l'humain (Genest, 2003).

L'importante fonction hydrolytique qu'exerce la LPL sur les TG circulants suggère que cette lipase joue un rôle de premier plan dans la modulation de la triglycéridémie. La sévère chylomicronémie et la mort prématurée des souris déficientes en LPL confirme le rôle de cette enzyme dans le maintien de l'homéostasie du métabolisme lipidique (Coleman *et al.*, 1995; Weinstock *et al.*, 1995). Chez l'homme, la déficience en LPL est associée au syndrome familial de chylomicronémie, un état caractérisé par des niveaux plasmatiques de TG extrêmement élevés (Goldberg et Merkel, 2001). Comme la LPL est fortement active dans le tissu adipeux, il a été suggéré que l'hydrolyse accrue des TG dans ce tissu puisse jouer un rôle de premier plan dans l'accumulation des graisses (Greenwood, 1985). Étonnamment, la déficience en LPL chez la souris et chez l'homme ne contribue pas à réduire la masse adipeuse. L'augmentation de la lipogenèse et de l'activité de la EL montrent toutefois que des mécanismes alternatifs se mettent en place dans le tissu adipeux pour contrebalancer l'absence de LPL (Wagner *et al.*, 2004; Kratky *et al.*, 2005). Ces mécanismes masquent probablement l'importance de la LPL dans la modulation de l'accumulation des lipides dans le tissu adipeux.
### 2.1.4 La modulation de l'activité de la lipase lipoprotéique

Comme la LPL joue un rôle central dans le métabolisme des TG, de nombreuses études ont été réalisées afin de déterminer les situations physiologiques (facteurs moléculaires) pouvant moduler l'activité de la LPL. De ces éléments, notons entre autres l'état nutritionnel (l'insuline), le stress (les catécholamines, les glucocorticoïdes), l'endotoxémie (les cytokines pro-inflammatoires, le monoxyde d'azote) et le traitement avec des agonistes PPAR-y (les thiazolidinediones). Afin de simplifier la compréhension du présent ouvrage, seuls les effets de l'état nutritionnel et des agonistes PPAR-y seront abordés dans les prochaines sections.

## 2.1.4.1 Effets de l'état nutritionnel

L'activité de la LPL du tissu adipeux et des muscles est fortement affectée lors de la transition entre le jeûne et la phase postprandiale. Lors du jeûne, l'activité de la LPL est réduite dans le tissu adipeux blanc et brun et induite dans le muscle squelettique et le cœur. Inversement, la prise alimentaire stimule l'activité de la LPL dans le tissu adipeux blanc et brun et réduit l'activité de l'enzyme dans le muscle squelettique et cardiaque (Goldberg et Merkel, 2001; Mead *et al.*, 2002). Cette régulation différentielle de l'activité de la LPL contribue à orienter les AG vers l'oxydation dans le muscle en période de jeûne et vers l'estérification dans le tissu adipeux en période d'abondance.

Lors des premières heures de jeûne, des mécanismes post-traductionnels favorisant la dégradation de la LPL et la diminution des niveaux extracellulaires de la LPL active (dimérisée) contribuent à la réduction de l'activité de l'enzyme dans le tissu adipeux (Bergo *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2003). Une étude suggère qu'un gène inconnu, indépendant de la LPL, doit être spécifiquement exprimé pour réduire l'activité de la LPL dans le tissu adipeux lors du jeûne (Bergo *et al.*, 2002). Ce gène n'a pas encore été formellement identifié mais de récents travaux suggèrent fortement qu'il pourrait s'agir de la protéine similaire à l'angiopoïétine-4 (Angptl4, *angiopoietin-like-4*) (Koster *et al.*, 2005; Sukonina *et al.*, 2006). L'Angptl-4, reconnue pour inhiber l'activité de la LPL (Yoshida *et*  al., 2002), est exprimée dans le tissu adipeux et son expression est augmentée dans le jeûne (Li, 2006). Il a été démontré récemment que la liaison de l'Angptl-4 à la LPL favorise la monomérisation et l'inactivation de l'enzyme (Sukonina et al., 2006). La forte réduction de la triglycéridémie et l'augmentation de l'activité de la LPL dans les souris déficientes en Angptl-4 soulignent l'importance de cette protéine dans la régulation de la triglycéridémie (Koster et al., 2005). En plus de ces mécanismes, il a été démontré que le long jeûne réduit l'expression et la synthèse de la LPL dans le tissu adipeux (Lee et al., 1998). Lors de la prise alimentaire, l'élévation de l'insulinémie semble être le déterminant majeur de l'activation de la LPL dans le tissu adipeux (Picard et al., 1999). L'absence de changement de l'expression génique et de la masse de la LPL souligne l'implication de mécanismes post-traductionnels dans la stimulation rapide de l'activité LPL en phase postprandiale (Doolittle et al., 1990). L'augmentation de l'activité de la LPL du tissu adipeux en ces conditions a été associée essentiellement à l'augmentation de la présence extracellulaire de la forme active de la LPL (Wu et al., 2003). Dans le muscle, les mécanismes moléculaires impliqués dans la modulation de l'activité de la LPL par l'état nutritionnel sont moins bien connus. Aussi, les mécanismes de contrôle précis impliqués dans la régulation différentielle de l'activité de la LPL entre le tissu musculaire et le tissu adipeux ne sont toujours pas élucidés.

### 2.1.4.2 Effets des agonistes PPAR-y

Les agonistes PPAR- $\gamma$  de la classe des thiazolidinediones (TZD) sont utilisés en clinique pour le traitement de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2. Les détails relatifs à la biologie de PPAR- $\gamma$  ainsi qu'aux effets physiologiques associés à leur activation seront discutés en détail à la section 3 de la présente introduction. Les TZD sont reconnus pour augmenter l'activité de la LPL dans le tissu adipeux blanc et brun et pour n'avoir aucun impact sur la LPL du muscle (Lefebvre *et al.*, 1997; Sell *et al.*, 2004; Teruel *et al.*, 2005). L'augmentation de l'activité de la LPL semble être causée principalement par la stimulation de l'expression de la LPL dans les tissus adipeux. Chez la souris, il a été démontré que le gène de la LPL porte en position -169 à -157 de son promoteur un élément de réponse aux proliférateurs des peroxysomes (PPRE, *peroxisome proliferator response* 

*element*) (Schoonjans *et al.*, 1996). Le PPRE, qui est formé par la répétition directe d'une séquence consensus (AGGTCA) séparé par un ou deux nucléotides, est reconnu par PPAR- $\gamma$  et sert de point d'ancrage au recrutement de la machinerie transcriptionnelle nécessaire à l'initiation de la transcription des gènes (Berger et Moller, 2002).

# 2.2 Les acides gras libres

Les lipides qui circulent dans le sang sous forme d'AGL ou de TG sont, en période d'abondance, captés et emmagasinés sous forme de TG dans le tissu adipeux. Lors du jeûne ou de l'effort physique, l'hydrolyse des réserves de TG et la libération d'AGL par le tissu adipeux blanc fournit des substrats énergétiques pour répondre aux besoins de l'organisme.

## 2.2.1 La lipolyse

La lipolyse du tissu adipeux est le processus catabolique par lequel l'hydrolyse des TG emmagasinés dans le tissu adipeux conduit à la libération de glycérol et d'AG dans un ratio théorique de 3 pour 1. Trois lipases ont été identifiées comme les principales enzymes du catabolisme intracellulaire des TG : la lipase des triglycérides du tissu adipeux (ATGL, adipose triglyceride lipase), la lipase hormono-sensible (HSL, hormone sensitive lipase) et la lipase du monoacylglycérol (MGL, monoglyceride lipase). Chacune de ces enzymes catalyse préférentiellement une étape du catabolisme des TG. L'ATGL hydrolyse les TG et produit du diacylglycérol et des AG. La HSL libère des AG en hydrolysant le diacylglycérol en monoacylglycérol et en AG. Cependant, cette lipase peut aussi, mais de facon moins efficace, effectuer les deux autres étapes de l'hydrolyse des TG. Finalement, la MGL catalyse l'étape finale du catabolisme des TG en produisant du glycérol et un AG à partir du monoacylglycérol (Yen et Farese, 2006). La contribution réelle de la MGL à la lipolyse est toutefois limitée. En effet, de récents travaux ont montré que, chez le rongeur, près de 95% de la lipolyse est dépendante de l'action de la HSL et de l'ATGL (Schweiger et al., 2006). Des données indiquent toutefois que la contribution de l'ATGL à la lipolyse pourrait être plus limitée chez l'homme que chez les rongeurs (Ryden et al., 2007).

La lipolyse du tissu adipeux est hautement dépendante de changements dans les conditions physiologiques. L'activité lipolytique est affectée par l'action d'hormones et de cytokines telles les catécholamines, l'insuline, les glucocorticoïdes, le peptide natriurétique auriculaire, la leptine, la résistine, le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 (Holm *et al.*, 2000; Arner, 2005). Jusqu'à maintenant, les effets de l'insuline et des catécholamines sur l'activation/la répression de la lipolyse demeurent les mieux caractérisés. La toute récente découverte de l'ATGL et le peu d'attention portée jusqu'ici à la MGL limitent essentiellement ces connaissances à la biologie de la HSL.

# 2.2.1.1 Effets des catécholamines

Les catécholamines (adrénaline, noradrénaline) libérées lors du jeûne sont reconnues pour stimuler fortement la lipolyse. L'effet des catécholamines sur la lipolyse passe par leur liaison aux récepteurs adrénergiques présents à la surface des adipocytes. Chez l'humain, quatre récepteurs sont présents ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ,  $\alpha_2 A$ ) tandis que les adipocytes des rongeurs n'en possèdent que deux les (\u03b31 et \u03b33) (Germack et al., 1997; Arner, 2005). Ces récepteurs sont couplés à des protéines-G qui régulent l'activité de l'adénylate cyclase (AC), une enzyme catalysant la production de l'adénosine 3',5'-monophosphate cyclique (AMPc). La stimulation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques par les catécholamines stimule l'AC, augmente la production d'AMPc et stimule l'activité de la protéine kinase A (PKA). Lorsque activée, la PKA phosphoryle la HSL et la périlipine (PLIN), une protéine reconnue pour protéger la gouttelette lipidique de la lipolyse en situation basale (Brasaemle et al., 2000; Martinez-Botas et al., 2000; Tansey et al., 2001). La phosphorylation de ces protéines favorise la translocation de la HSL sur la gouttelette lipidique et l'augmentation de la lipolyse (Sztalryd et al., 2003). La stimulation adrénergique est aussi reconnue pour activer l'ATGL. Cependant, contrairement à la HSL, aucune phosphorylation ni translocation de l'ATGL n'est observée lors de l'activation de la PKA en réponse à l'isoprotérénol, un agoniste β-adrénergique (Zimmermann et al., 2004). La récente découverte de l'activation de l'ATGL par la protéine CGI-58, une protéine associée à la PLIN, représente une piste intéressante pour éclaircir les mécanismes contrôlant l'activité de cette lipase (Subramanian et al., 2004; Yamaguchi et al., 2004; Lass et al., 2006).

#### 2.2.1.2 Effets de l'insuline

L'insuline représente un important inhibiteur physiologique de la lipolyse induite par les catécholamines. L'effet anti-lipolytique de l'insuline passe par la phosphorylation et l'activation de la phosphodiestérase 3B (PDE3B), une protéine impliquée dans la dégradation de l'AMPc . Au niveau signalétique, la stimulation de la PDE3B par l'insuline implique le récepteur à l'insuline, les IRS, la PI3K et la protéine kinase B (PKB/AKT) (Holm et al., 2000). La réduction des niveaux intracellulaires d'AMPc induite par l'activation de la PDE3B réduit la phosphorylation de la HSL et de la PLIN par la PKA, ce qui conduit à la diminution de la lipolyse. Il a été démontré que l'inactivation spécifique de la PDE3B bloque complètement les effets anti-lipolytiques de l'insuline (Holm et al., 2000). Cependant, des études ont aussi démontré qu'à long terme, l'insuline réduit la lipolyse par des mécanismes indépendants des niveaux intracellulaires d'AMPc (Honnor et al., 1985). L'observation récente de la réduction de l'expression de l'acide ribonucléique messager (ARNm) de l'ATGL en réponse à l'insuline pourrait fournir un mécanisme possible pouvant expliquer ces effets (Kershaw et al., 2006; Kim et al., 2006). Les mécanismes précis par lesquels l'insuline réduit l'expression de l'ATGL ne sont pas encore connus.

# 2.2.2 La glycéronéogenèse

La lipolyse des TG du tissu adipeux n'est pas un procédé parfaitement efficace résultant en la libération de trois AG par molécule de glycérol. Des études ont démontré que de 30% à 70% des AG issus de la lipolyse sont immédiatement ré-estérifiés sous forme de TG dans la cellule adipeuse (Cadoudal *et al.*, 2005). L'établissement d'un tel cycle futile dépend de la production intracellulaire de glycérol-3-phosphate (G3P), la molécule sur laquelle les AG sont estérifiés pour synthétiser des TG. Dans le tissu adipeux, le G3P est produit à partir du glucose, du glycérol, du pyruvate, du lactate et d'acides aminés. Lors du jeûne, la production du G3P dépend principalement du métabolisme du pyruvate, du lactate et des acides aminés et implique l'action de la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK). Ce sentier métabolique, connu sous le nom de glycéronéogenèse, joue un rôle

important dans le contrôle de la libération des lipides en fournissant un substrat sur lequel les AG peuvent être ré-estérifiés (Reshef *et al.*, 2003). La surexpression de la PEPCK dans le tissu adipeux a été associée à la diminution des AGL plasmatiques et à l'augmentation de la masse adipeuse blanche chez la souris (Franckhauser *et al.*, 2002). Inversement, la réduction de l'expression de la PEPCK dans le tissu adipeux a été associée à une augmentation de la libération des AG par les cellules adipeuses et à une diminution du poids du tissu adipeux (Olswang *et al.*, 2002). La glycérol kinase (GyK) est une autre protéine impliquée dans la production de G3P. Cette protéine, qui utilise le glycérol libre pour produire de G3P, a cependant un rôle plus limité que la PEPCK dans le contrôle de la ré-estérification des AG dans le tissu adipeux blanc (Reshef *et al.*, 2003).

### 2.3 La dyslipidémie associée à l'obésité et à la résistance à l'insuline

La dyslipidémie associée à l'obésité et à la résistance à l'insuline est caractérisée par l'augmentation des TG et du cholestérol contenus sous forme de VLDL, par l'augmentation du nombre de LDL petites et denses en circulation et par la réduction des niveaux de HDL cholestérol (Van Gaal *et al.*, 2006). L'hypertriglycéridémie est reconnue comme un élément central et un facteur de risque important favorisant le développement de maladies cardiovasculaires (Hokanson et Austin, 1996). La compréhension des mécanismes impliqués dans son développement est en conséquence très importante pour l'élaboration de nouvelles stratégies visant à réduire la mortalité associée aux maladies cardiovasculaires. L'hypertriglycéridémie observée chez les patients obèses résistants à l'insuline et diabétiques de type 2 est le résultat d'une pléiade de dérèglements métaboliques qui ne sont, pour le moment, que partiellement élucidés.



Figure 2. Représentation schématisée du métabolisme des triglycérides et des acides gras libres en situation normale (A) et dans la résistance à l'insuline (B).

(A) Les acides gras (AG) à courte chaîne (moins de 12 carbones) absorbés dans l'intestin sont mis en circulation sous forme d'acides gras libres (AGL). Les AG à longue chaîne sont quant à eux convertis en triglycérides (TG), incorporés dans les chylomicrons et libérés dans la circulation. Les TG endogènes sont produits par le foie, principalement à partir des AGL. Les chylomicrons et les lipoprotéines de très basse densité (VLDL) sont connus sous le nom de lipoprotéines riches en TG (LRTG). La lipase lipoprotéique (LPL) du muscle et du tissu adipeux hydrolyse les LRTG et libère des AG qui sont utilisés par ces tissus. L'hydrolyse des chylomicrons produit des résidus qui sont éliminés au foie. L'hydrolyse des VLDL par la LPL réduit leur contenu en TG. Les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL) ainsi produites sont captées par le foie ou sont hydrolysées par la LPL et la lipase hépatique (HL) et deviennent des lipoprotéines de basse densité (LDL). En conditions normales, l'insuline produite par le pancréas réduit la lipolyse et la production des VLDL. L'activité de la LPL s'élève dans le tissu adipeux, réduisant ainsi la triglycéridémie postprandiale. (B) L'augmentation de la masse adipeuse et l'hyperphagie augmentent les AGL et les chylomicrons er circulation. L'accumulation des lipides dans le muscle et le foie induit une résistance à l'insuline. Pour contrer cet effet, le pancréas produit plus d'insuline. Avec le temps, l'effet anti-lipolytique de l'insuline est réduit, favorisant la libération des AGL par le tissu adipeux. L'hyperinsulinémie et les niveaux élevés d'AGL stimulent la production des VLDL. La résistance de la LPL à l'insuline exacerbe l'hypertriglycéridémie. En conséquence, les LRTG transitent plus longuement dans la circulation, ce qui augmente les échanges de cholestérol estérifié et de TG entre les LDL et les lipoprotéines de haute densité (HDL) d'une part, et les substrats pour la lipase hépatique (HL), ce qui transforme les LDL en particules plus petites et plus denses. Ces LDL petites

La figure 2 présente les sentiers métaboliques impliqués dans le métabolisme des TG et des AGL. Il est connu que la production de VLDL par le foie est anormalement élevée chez les patients obèses résistants à l'insuline ou diabétiques de type 2 (Ginsberg et al., 2005). Plusieurs éléments sont reconnus pour exacerber la production hépatique des VLDL. L'hypertrophie et l'hyperplasie adipocytaire observées dans l'obésité contribuent à l'augmentation nette de la lipolyse et à l'élévation des niveaux d'AGL en circulation. Aussi, l'accumulation préférentielle des graisses dans le tissu adipeux viscéral, un tissu dans lequel l'insuline exerce un effet anti-lipolytique plus faible, facilite la libération des AGL dans la circulation sanguine. Puisque les AGL représentent un substrat de choix dans le synthèse des VLDL, leur augmentation en circulation stimule la production des VLDL par le foie et l'élévation de la triglycéridémie (Julius, 2003). Les AGL, qui favorisent le développement de la résistance hépatique à l'insuline, stimulent aussi la sécrétion des VLDL en réduisant la dégradation de l'apoB. Les AGL issus de la lipolyse du tissu adipeux viscéral sont considérés par plusieurs comme étant un facteur déterminant favorisant la surproduction des VLDL observée dans l'obésité et la résistance à l'insuline (Lewis, 1997; Adeli et al., 2001). L'hyperinsulinémie, qui stimule la lipogenèse et la synthèse hépatique des TG, est aussi considérée comme un élément important impliqué dans la surproduction hépatique des VLDL chez les patients résistants à l'insuline ou diabétiques (Lewis, 1997). En plus d'augmenter la synthèse des VLDL, la résistance à l'insuline favorise l'hypertriglycéridémie en réduisant la clairance des LRTG (Tushuizen et al., 2005). Des études ont montré que l'activité de la LPL du tissu adipeux devient résistante à l'action de l'insuline chez des rats obèses insulino-résistants (Picard et al., 2002a). L'absence d'élévation de l'activité de la LPL du tissu adipeux en période postprandiale est perçue comme un mécanisme contribuant à exacerber l'hypertriglycéridémie.

L'augmentation de la synthèse des VLDL et la réduction de la clairance des LRTG augmentent leur concentration plasmatique de même que leur temps de résidence dans la circulation. Dans cette situation, les échanges de lipides entre les LRTG, les LDL et HDL sont favorisés par l'action de l'enzyme de transfert d'esters de cholestérol (CETP; *cholesterol ester transfert protein*). Cette situation contribue à enrichir les LDL et les HDL en TG, ce qui augmente l'affinité pour la HL. L'augmentation de l'hydrolyse des LDL par la HL réduit la taille et augmente la densité de ces lipoprotéines. L'enrichissement des HDL en TG favorise leur élimination et la diminution de leur concentration plasmatique. Un tel profil lipidique est aujourd'hui bien reconnu pour favoriser le développement des maladies cardiovasculaires (Després *et al.*, 2001; Van Gaal *et al.*, 2006).

## 3. Les agonistes PPAR-y et leurs effets métaboliques

La section 3 de l'introduction est axée sur la biologie des PPAR. Puisque les objectifs du présent ouvrage se rapportent aux mécanismes d'action des agonistes PPAR- $\gamma$ , une importante partie de cette section décrira les effets de l'agonisme de PPAR- $\gamma$  sur le métabolisme des tissus et sur l'homéostasie métabolique. Les informations générales relatives au métabolisme de base des tissus seront décrites en parallèle avec les effets des agonistes PPAR- $\gamma$  sur ces derniers.

### 3.1 Généralités sur les PPAR

Les PPAR sont des facteurs de transcription appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires. Lorsque associés à des ligands, les PPAR permettent de réguler l'expression des gènes en liant la séquence PPRE contenue dans leur promoteur. Ces récepteurs nucléaires, qui sont activés par les AG alimentaires et leur dérivés ainsi que par des ligands synthétiques, jouent un rôle central dans le maintien de l'homéostasie métabolique en permettant aux cellules d'adapter leur métabolisme en fonction de situations physiologiques variables. Jusqu'à maintenant, trois isoformes distincts encodés par des gènes indépendants ont été identifiés soit PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\beta$  ou - $\delta$  et PPAR- $\gamma$  (Berger et Moller, 2002; Evans *et al.*, 2004).

# 3.1.1 Distribution tissulaire, fonctions biologiques et ligands

Le récepteur PPAR- $\alpha$  est exprimé dans les tissus où le catabolisme des AG est élevé et dans lesquels l'oxydation peroxysomale est importante. De ces tissus, notons le foie, le cœur, le muscle squelettique, les reins, l'intestin et le tissu adipeux brun (Berger et Moller, 2002). L'activation de PPAR- $\alpha$  dans ces tissus est reconnue pour stimuler l'expression des gènes liés à l'oxydation des substrats lipidiques. La stimulation de PPAR- $\alpha$  a été démontrée comme étant cruciale dans la réponse physiologique au jeûne (Kersten *et al.*, 1999). Les ligands naturels de PPAR- $\alpha$  sont les AG saturés et insaturés à longue chaîne. Les agents hypolipidémiants de la classe des fibrates sont reconnus comme les principaux ligands synthétiques de PPAR-α (Berger et Moller, 2002).

Le récepteur PPAR-ò est exprimé dans tous les tissus mais plus fortement dans le muscle squelettique et cardiaque où il joue un rôle important dans l'oxydation des AG (Dressel *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003). Les ligands naturels de PPAR-ò sont les AG à longue chaîne et les prostacyclines alors que le GW501516 est le principal ligand synthétique pour ce récepteur (Desvergne et Wahli, 1999; Evans *et al.*, 2004).

Trois ARNm différents de PPAR-y ont été caractérisés chez l'humain. L'expression de PPAR-y1 et PPAR-y3 donne naissance à une protéine nommée PPAR-y1 tandis que la transcription du gène PPAR-y2 mène à la production de la protéine PPAR-y2. Chez l'humain et les rongeurs, PPAR-y2 possède respectivement 28 et 30 acides aminés supplémentaires à l'extrémité N-terminale (Desvergne et Wahli, 1999; Picard et Auwerx, 2002). PPAR-y1 est retrouvé dans presque tous les tissus, mais préférentiellement dans le tissu adipeux, le gros intestin et les macrophages (Auboeuf et al., 1997; Iijima et al., 1998; Dubois et al., 2000; Loviscach et al., 2000). PPAR-y2 est pour sa part exprimé fortement dans le tissu adipeux blanc où il représente près de 30% de la population de PPAR-γ (Escher et al., 2001). Cet isoforme est aussi retrouvé dans le tissu adipeux brun. Finalement, l'ARNm de PPAR-y3 est retrouvé dans le gros intestin et les macrophages (Fajas et al., 1998). Généralement, PPAR-y est reconnu comme étant un élément crucial dans la différenciation des adipocytes et la lipogenèse (Rosen et al., 2000). Ce récepteur nucléaire joue un rôle de premier plan dans le maintien de l'homéostasie du métabolisme énergétique (Picard et Auwerx, 2002). Les ligands naturels de PPAR-y incluent entres autres les AG polyinsaturés, la 15-désoxy- $\Delta^{12-14}$ -prostaglandine J2 (15dPGJ2) et les acides 9- et 13-hydroxyoctadécadiénoïques (HODE). Bien qu'un bon nombre de ligands synthétiques ont été identifiés pour PPAR-y, les thiazolidinediones (TZD), qui sont utilisés présentement en clinique pour le traitement de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2, demeurent les mieux caractérisés (Berger et Moller, 2002).

#### 3.1.2 Mode de fonctionnement

Les PPAR partagent une structure commune composée de quatre domaines principaux nommés A/B, C, D, et E/F (Auwerx, 1999; Desvergne et Wahli, 1999). Des fonctions particulières ont été assignées à chacun de ces domaines. Le domaine A/B, retrouvé dans la portion N-terminale, contient un domaine d'activation de la transcription indépendant du ligand/fonction d'activation-1 (AF-1). Le domaine C, ou domaine de liaison à l'acide désoxyribonucléique (ADN) (DBD, DNA binding domain), est formé par deux motifs en doigt de zinc qui peuvent reconnaître et lier la séquence PPRE contenue dans le promoteur de gènes cibles. Le domaine D sert quant à lui à établir le lien entre PPAR et les cofacteurs nucléaires. Le domaine E/F est une région arborant diverses structures et fonctions. Cette structure contient le domaine de liaison du ligand (LBD, ligand binding domain), un domaine qui, en plus d'interagir avec les ligands, permet l'interaction de PPAR avec le récepteur X des rétinoïdes (RXR). Aussi, le domaine E/F porte un domaine d'activation de la transcription dépendant du ligand/fonction d'activation-2 (AF-2). La liaison des ligands au domaine LBD des PPAR entraîne une suite d'événements moléculaires menant à l'initiation de la transcription génique (Figure 3). Sommairement, ces événements incluent : l'hétérodimérisation de PPAR avec le RXR, la dissociation des corépresseurs, la liaison entre le complexe PPAR/RXR et le PPRE, le recrutement de coactivateurs, le recrutement de la machinerie transcriptionnelle et l'initiation de l'expression des gènes (Desvergne et Wahli, 1999; Berger et Moller, 2002; Picard et Auwerx, 2002).



Figure 3. Modèle schématisé de l'activation transcriptionnelle par les PPAR.

(1) Le complexe PPAR-RXR est associé avec un corépreseur en absence de ligand. Lorsque le ligand se lie au complexe, il favorise un changement conformationel permettant le déplacement du corépresseur. (2) Le complexe PPAR-RXR associé avec le ligand se lie ensuite à l'ADN sur la séquence PPRE. (3) Ce groupement peut ensuite recruter différents coactivateurs qui, via leur activité histone acétylase, acétyle les histones et favorise le décondensement de la chromatine. (4) Les coactivateurs nouvellement recrutés sur le complexe PPAR-RXR associé au ligand favorise le recrutement de la machinerie transcriptionnelle et l'initiation de la transcription génique. Adapté de Desvergne *et al.*, 1999.

Au-delà de la liaison des ligands par les PPAR, l'activité de ces récepteurs nucléaires peut être régulée à différents niveaux. Tel que mentionné précédemment, des coactivateurs ou corépresseurs peuvent affecter l'activité des PPAR en modulant l'efficacité des interactions observées entre ces récepteurs et le RXR, la chromatine et la machinerie transcriptionnelle. Ces interactions protéine-protéine permettent d'augmenter ou de diminuer l'expression génique. Les coactivateurs des PPAR incluent entre autres le facteur de transcription intermédiaire-2 (TIF-2, transcriptional intermediary factor-2), le coactivateur du récepteur des stéroïdes-1 (SRC-1, steroid receptor coactivator-1), la protéine de liaison à l'élément de réponse de l'AMPc (p300/CBP, cAMP response element binding protein), le coactivateur de PPAR-y (PGC, PPAR-y coactivator) 1 et 2, la protéine associée au récepteur des androgènes 70 (ARA70, androgen receptor associated protein 70), et la protéine d'interaction des récepteurs-140 (RIP-140, receptor interacting protein-140) (Picard et Auwerx, 2002). En plus de faciliter le recrutement de la machinerie transcriptionnelle, certains coactivateurs fournissent une activité histone acétylase au complexe PPAR/RXR/ligand associé à la chromatine. L'acétylation des histones, qui permet le déroulement et le relâchement de la structure de la chromatine, est perçue comme une étape clé favorisant l'initiation de la transcription des gènes par les récepteurs nucléaires (Rosen et Spiegelman, 2001). Pour ce qui est de la répression de l'activité des PPAR, deux principaux corépresseurs ont été identifiés jusqu'ici, soit le répresseur du récepteur nucléaire (NcoR, nuclear receptor corepressor) et le médiateur silencieux des rétinoïdes et hormones thyroïdiennes (SMRT, silencing mediator of retinoid and thyroid hormone) (Yu et al., 2005). En absence de ligands, il a été démontré que ces protéines réduisent l'activité de PPAR en se liant au LBD (Krogsdam et al., 2002; Stanley et al., 2003; Yu et al., 2005)

En plus des cofacteurs nucléaires, l'activité de PPAR est aussi affectée par la phosphorylation. Plusieurs kinases tels la PKA, les protéines kinases C (PKC), les protéines kinases activées par les signaux mitogènes (MAPK, *mitogen-activated protein kinase*) et l'AMPk ont démontré être en mesure de phosphoryler les PPAR (Diradourian *et al.*, 2005). Les conséquences de ces phosphorylations sont complexes et peuvent mener à l'activation ou à la répression de l'activité des PPAR en modulant entre autres la capacité de ces

récepteurs à lier les ligands, les cofacteurs ou l'ADN. Récemment, il a été découvert que PPAR- $\gamma$ , mais non PPAR- $\alpha$  ou - $\delta$ , pouvait être modifié par l'ajout de petits peptides d'environ cent acides aminés sur des résidus lysines retrouvés dans sa structure (Floyd et Stephens, 2004; Ohshima *et al.*, 2004; Yamashita *et al.*, 2004; Pascual *et al.*, 2005). L'ajout de ces petits groupes d'acides aminés similaires à l'ubiquitine (SUMO, *small ubiquitin-related modifier*) a été nommée SUMOylation. La SUMOylation est reconnue pour affecter l'activité, la stabilité et la localisation cellulaire des protéines (Seeler et Dejean, 2003). Il a été démontré à plusieurs reprises que la SUMOylation réduit l'activité transactivatrice de PPAR- $\gamma$  (Floyd et Stephens, 2004; Ohshima *et al.*, 2004; Yamashita *et al.*, 2004; Pascual *et al.*, 2004; Pascual *et al.*, 2005).

### 3.2 Les thiazolidinediones

Les TZD représentent une classe de molécules reconnue pour stimuler PPAR-y. Entre 1997 et 1999, la troglitazone (Rezulin®, Parke-Davis), la rosiglitazone (Avandia®, GlaxoSmithKline) et la pioglitazone (Actos®, Takeda/Eli Lilly) ont été successivement lancées sur le marché pour le traitement de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2. La troglitazone a cependant été retirée du marché nord-américain en 2000 suite à l'observation de plusieurs cas de défaillance hépatique sévère (Scheen, 2001). Les TZD ont tous démontré un fort potentiel pour améliorer la sensibilité à l'insuline et le profil métabolique des patients insulino-résistants et diabétiques. La réduction de la glycémie et de l'insulinémie à jeun ainsi que des niveaux d'hémoglobine glyquée (HbA1C) ont été observés par l'utilisation de ces molécules. Ces agonistes ont aussi démontré être en mesure de réduire les TG et les AGL plasmatiques (Nolan et al., 1994; Fonseca et al., 1998; Patel et al., 1999; Aronoff et al., 2000; Miyazaki et al., 2002a; Tan et al., 2005b). Pour des raisons obscures, les effets des TZD sont généralement beaucoup moins marqués chez l'humain que chez les rongeurs (Girard, 2001; Picard et Auwerx, 2002). Les tissus cibles de même que les mécanismes d'action précis par lesquels les agonistes PPAR-y améliorent la sensibilité à l'insuline et le profil lipidique ne sont toujours pas parfaitement élucidés. Les prochaines sections du présent ouvrage résumeront les principaux effets des agonistes PPAR-y sur le tissu adipeux blanc, le tissu adipeux brun, le muscle squelettique, le foie et le pancréas et souligneront l'impact de ces modulations sur l'amélioration du profil métabolique. Afin de simplifier la compréhension du présent ouvrage, les effets des agonistes PPAR-γ sur d'autres tissus (intestin, cerveau, reins, thyroïde, coeur) ou types cellulaires (macrophages, cellules endothéliales) ne seront pas abordés.

### 3.3 Effets de la stimulation de PPAR-y sur le tissu adipeux blanc

# 3.3.1 La signalisation de l'insuline et le transport du glucose

Plusieurs études ont démontré que les agonistes PPAR-y potentialisent la signalisation de l'insuline dans les adipocytes en modulant l'expression ou en favorisant l'activation de plusieurs protéines impliquées dans cette voie. Dans les adipocytes, l'activation de PPAR-y augmente l'expression de la protéine associée à c-CBL (CAP, c-CBL-associated protein) (Ribon et al., 1998), d'IRS-1 et IRS-2 (Smith et al., 2001; Standaert et al., 2002), de la sous-unité p $85\alpha$  de la PI3K (Rieusset et al., 2001) et de GLUT1 et GLUT4 (Sandouk et al., 1993). Parallèlement à ces modulations, l'activation de PPAR-y dans les cellules adipeuses augmente la phosphorylation/l'activation du récepteur de l'insuline, de la protéine c-CBL, d'IRS-1, d'IRS-2, de la PI3K, de la PKC- $\lambda$  et de la PKB/AKT en réponse à l'insuline (Standaert et al., 2002). L'augmentation de la signalisation de l'insuline induite par les agonistes PPAR-y contribue à favoriser la translocation de GLUT4 à la membrane et l'entrée du glucose dans les adipocytes en culture et dans le tissu adipeux (Young et al., 1995; Shintani et al., 2001; Ciaraldi et al., 2002). Chez le rat, des études ont montré que les effets des agonistes PPAR-y sur la potentialisation de la signalisation à l'insuline dans le tissu adipeux sont observés lors du premier jour de traitement et surviennent de façon concomitante avec la réduction des AGL circulants (Jiang et al., 2002). Ainsi, l'amélioration de la sensibilité à l'insuline du tissu adipeux est perçue comme un élément important pouvant favoriser la sensibilisation systémique à l'insuline en potentialisant l'effet anti-lipolytique de cette hormone et en réduisant les effets négatifs des AGL sur les tissus périphériques (Berger et Moller, 2002; Jiang et al., 2002). Aussi, comme le glucose représente chez les rongeurs un substrat

important pour la synthèse endogène des lipides, l'augmentation de l'effet stimulateur de l'insuline sur le transport du glucose par les TZD représente un élément important pouvant favoriser l'accumulation des graisses dans le tissu adipeux.

## 3.3.2 L'adipogenèse

Les processus majeurs impliqués dans l'adipogenèse sont la prolifération d'une population de cellules souches et la différenciation de ces cellules en adipocytes matures. L'implication de PPAR-y dans l'adipogenèse est supportée par un bon nombre d'observations. En premier lieu, il a été observé que l'expression de PPAR-y survient avant l'expression des gènes impliqués dans le stockage et le métabolisme des lipides tels la protéine de liaison aux acides gras (aP2, adipocyte fatty acid binding protein) et la PEPCK. (Tontonoz et al., 1994a; Tontonoz et al., 1995). La découverte de PPRE dans le promoteur de ces gènes (Tontonoz et al., 1994a; Tontonoz et al., 1995) mais aussi dans celui de nombreux autres gènes impliqués dans le métabolisme des lipides supporte fortement le rôle de PPAR-y dans l'adipogenèse (Tableau 1). Il a ensuite été démontré in vitro que l'infection de fibroblastes ou de myoblastes avec un rétrovirus exprimant PPAR-y stimule la différenciation de ces cellules en adipocytes (Tontonoz et al., 1994b; Tontonoz et al., 1995). L'activation pharmacologique de PPAR-y par différents agonistes contribue aussi à stimuler l'adipogenèse in vivo et in vitro (Sandouk et al., 1993; Okuno et al., 1998; de Souza et al., 2001). En lien avec ces résultats, une réduction de la masse adipeuse a été observée dans plusieurs modèles murins dans lesquels PPAR-y a été complètement ou partiellement inactivé (Barak et al., 1999; He et al., 2003; Koutnikova et al., 2003; Imai et al., 2004; Freedman et al., 2005; Jones et al., 2005). Chez l'humain, les mutations de PPAR-y conduisant à l'activation ou la répression de son activité ont été associées respectivement à l'augmentation (Ristow et al., 1998) et la réduction de l'adipogenèse (Agarwal et Garg, 2002; Savage et al., 2003).

Gène	Fonction spécifique	Références
aP2	Liaison des acides gras	Tontonoz et al., 1994*; Pearson et al., 1996
ACS	Activation des acides gras	Schoonjans et al., 1995*; Bogacka et al., 2004
ACBP	Liaison des acides gras	Helledie et al., 2002*
DGAT-1	Synthèse des triglycérides	Ranganathan et al., 2006
FAS	Synthèse des acides gras	Hallakou et al., 1997, Ranganathan et al., 2006
FAT/CD36	Captation des acides gras	Motojima et al., 1998; Sato et al., 2002
FATP-1	Captation des acides gras	Martin et al., 1997; Frohnert et al., 1999*
GyK	Synthèse du glycérol	Guan et al., 2002; Guan et al., 2005*
hFABP	Liaison des acides gras	Way et al. 2001b
LPL	Hydrolyse des triglycérides	Schoonjans et al., 1996*, Lefebvre et al. 1997
ME	Production de NADPH	Castelein et al., 1994*, Way et al. 2001b
PEPCK	Synthèse de glycérol	Tontonoz et al., 1995*, Duplus et al., 2003
PLIN	Stockage des triglycérides	Nagai et al., 2004*; Arimura et al., 2004*
PC	Synthèse de l'oxaloacétate	Jitrapakdee et al., 2005*, Way et al. 2001b
SCD-1	Synthèse des acides gras	Miller et al., 1996*, Way et al. 2001b
S3-12	Stockage des triglycérides	Dalen et al., 2004*

**Tableau 1.** Liste des gènes impliqués dans la captation, l'estérification et la mise en réserve des lipides qui sont affectés par la stimulation de PPAR-γ dans le tissu adipeux.

\* articles dans lesquels un PPRE fonctionnel a été caractérisé pour le gène en question.

**Description des abréviations:** aP2, adipocyte fatty acid binding protein; ACS, acyl-CoA synthase, ACBP, acyl-CoA binding protein; DGAT-1, diacylglycerol acyltransferase-1; FAS, fatty acid synthase; FAT/CD36, fatty acid translocase/CD36; FATP-1, fatty acid transport protein-1; GyK, glycerol kinase; hFABP, heart fatty acid binding protein; LPL, lipoprotein lipase; ME, malic enzyme; PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase; PLIN, perilipin A; PC, pyryvate carboxylase; SCD-1, stearoyl-CoA desaturase-1. Pour la traduction française, voir la section Liste des abréviations.

Les mécanismes par lesquels PPAR- $\gamma$  contrôle l'adipogenèse sont complexes et impliquent la participation d'autres facteurs de transcription tels C/EBP- $\alpha$ , - $\beta$  et - $\delta$ (C/EBP, CCAAT/enhancer binding protein) et ADD/SREBP1c (ADD/SREBP1c, adipocyte determination and differentiation factor 1/sterol regulatory element binding protein 1c) (Rosen et Spiegelman, 2001). Lors de l'initiation de la différenciation des pré-adipocytes, les niveaux d'expression de C/EBP- $\beta$  et - $\delta$  augmentent rapidement dans les cellules. Cette augmentation induit l'expression de C/EBP- $\alpha$  et de PPAR- $\gamma$ . Il a été démontré que l'induction de C/EBP- $\alpha$  et de PPAR- $\gamma$  contribue à l'établissement d'une boucle de rétroactivation dans laquelle ces protéines favorisent réciproquement leur expression (Fajas et al., 2001). L'existence de cette rétro-activation est perçue comme un mécanisme de contrôle assurant la différenciation complète des cellules lorsque le programme de différenciation a été enclenché. La présence de ADD/SREBP1c contribue pour sa part à stimuler l'adipogenèse en produisant des ligands endogènes pour PPAR-y (Rosen et al., 2000). L'activation de PPAR-y par ces ligands favorise l'augmentation de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et l'évolution du pré-adipocyte en adipocyte mature. En plus de stimuler l'apparition d'une population de petites cellules nouvellement différenciées, les agonistes PPAR-y réduisent la proportion des gros adipocytes, possiblement en augmentant l'apoptose de ces cellules (Okuno et al., 1998; de Souza et al., 2001). L'augmentation du nombre de cellules adipeuses compétentes est perçue comme un élément important dans l'amélioration de la lipémie et de la sensibilité à l'insuline induite par les agonistes PPAR-y (Picard et Auwerx, 2002). La prolifération de cellules aptes à gérer les lipides permet de réduire la déposition ectopique des graisses et le développement de la résistance à l'insuline induite par un contrôle inapproprié des réserves lipidiques (Unger, 2003).

# 3.3.3 La captation, la synthèse, l'estérification et la mise en réserve des lipides

Tel que mentionné dans la section précédente, la stimulation de PPAR-γ dans le tissu adipeux blanc représente un élément clé pour la différenciation primaire et terminale des adipocytes. L'acquisition des caractéristiques adipocytaires par les pré-adipocytes requiert l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'anabolisme lipidique. Au cours des dernières années, plusieurs gènes ont été identifiés comme cibles de PPAR-γ (Tableau 1). De ces gènes, plusieurs ont révélé porter dans leur promoteur un PPRE fonctionnel facilitant leur transactivation par PPAR-γ. Généralement, ces gènes peuvent être classés en quatre groupes, soit ceux impliqués dans la captation (FAT/CD36, FATP-1, LPL), la synthèse (DGAT-1, FAS, ME, SCD-1), l'estérification (aP2, ACS, ACBP, GyK, hFABP, PEPCK, PC) et la mise en réserve des lipides (PLIN, S3-12). L'augmentation de

l'expression de ces gènes liée à l'amélioration de la sensibilité à l'insuline et du transport du glucose dans les adipocytes favorise l'accumulation des graisses dans le tissu adipeux.

En plus de contribuer à l'adipogenèse, l'augmentation de l'expression des gènes listés dans le Tableau 1 est perçue comme un élément important lié à la réduction des AGL et des TG circulants lors du traitement avec des agonistes PPAR-y. La captation et l'estérification des AG dans le tissu adipeux est fortement stimulée in vivo en réponse aux TZD (Ye et al., 2004). La stimulation de l'expression de FATP-1 (Frohnert et al., 1999), FAT/CD36 (Motojima et al., 1998), PEPCK (Tordjman et al., 2003) et de la GyK (Guan et al., 2002) semble être importante à cet effet. L'amélioration de la rétention des AG dans le tissu adipeux diminue les niveaux plasmatiques d'AGL de même que l'accumulation de ces lipides dans les tissus périphériques (Kuhlmann et al., 2003; Ye et al., 2004). Cet effet est reconnu comme un mécanisme important par lequel les agonistes PPAR-y améliorent la sensibilité à l'insuline (Berger et Moller, 2002; Picard et Auwerx, 2002; Unger, 2003). La réduction de la triglycéridémie induite par les agonistes PPAR-y a été principalement associée à l'augmentation de la clairance des TG via l'activation de la LPL dans le tissu adipeux (Lefebvre et al., 1997; McTernan et al., 2002; Bogacka et al., 2004; Nagashima et al., 2005). Aussi, il a été observé dans certaines études que les agonistes PPAR-y diminuent la triglycéridémie en réduisant la sécrétion hépatique des VLDL (Oakes et al., 2001; Tan et al., 2005b). Comme les AGL sont reconnus comme un substrat important pour la synthèse et la sécrétion des TG par le foie (Julius, 2003), leur réduction par les agonistes PPAR-y pourrait contribuer à diminuer la sécrétion hépatique des TG. Ainsi, l'expression des gènes impliqués dans la captation, l'estérification et la mise en réserve des lipides dans le tissu adipeux semble jouer un rôle important dans les effets bénéfiques des agonistes PPAR-y sur la sensibilité à l'insuline et sur la lipémie.

# 3.3.4 La lipolyse

Bien que les effets des agonistes PPAR-y sur la réduction des AGL soient bien connus, les études relatives à l'impact de ces agonistes sur le potentiel lipolytique du tissu adipeux blanc ont mené à des résultats contradictoires. Des études produites in vitro avec des cellules 3T3-L1 ou des explants de tissu adipeux de rats ou d'humains ont montré que les TZD réduisent la lipolyse en stimulant la glycéronéogenèse et le recyclage des AG dans le tissu adipeux (Guan *et al.*, 2002; Tordjman *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005; Leroyer *et al.*, 2006). En accord avec ces résultats, il a été montré que l'utilisation des TZD réduit l'expression des gènes favorisant la lipolyse du tissu adipeux tels le récepteur  $\beta_3$ adrénergique (Bakopanos et Silva, 2000; Sell *et al.*, 2004), la leptine (De Vos *et al.*, 1996; Kallen et Lazar, 1996) et le TNF- $\alpha$  (Hofmann *et al.*, 1994). Aussi, une équipe a observé que l'expression et l'activité de la PDE3B est augmentée chez la souris par le traitement à la pioglitazone (Tang *et al.*, 1999). De plus, de récentes études effectuées dans nos laboratoires suggèrent que l'activité sympathique et thyroïdienne, qui sont toutes deux reconnues comme étant de puissants activateurs de la lipolyse (Cannon et Nedergaard, 2004), sont réduites dans le tissu adipeux blanc de rats traités avec la rosiglitazone (Festuccia et Deshaies, observations non publiées).

Étrangement, des études mesurant la cinétique in vivo des AGL chez le rat ont montré que, durant le jeûne, les agonistes PPAR-γ stimulent la capacité du tissu adipeux blanc de libérer des AG (Oakes *et al.*, 2001; Kalderon *et al.*, 2003). Chez l'humain, des études n'ont remarqué aucun effet de l'agonisme de PPAR-γ sur la lipolyse (Mayerson *et al.*, 2002; Racette *et al.*, 2002) tandis que d'autres ont rapporté que les TZD ont tendance à stimuler la libération des AG par le tissu adipeux (Tan *et al.*, 2005a; Tan *et al.*, 2005b). La stimulation de la lipolyse pourrait être associée à l'augmentation de l'activité des lipases impliquées dans l'hydrolyse intracellulaire des TG. En effet, la rosiglitazone a démontré être en mesure d'augmenter l'expression, les niveaux protéiques et l'activité de la HSL (McTernan *et al.*, 2002; Tan *et al.*, 2005b; Deng *et al.*, 2006). Il a aussi été observé à une reprise que l'expression de la MGL est augmentée dans le tissu adipeux blanc par l'activation de PPAR-γ (Way *et al.*, 2001b). L'effet de la stimulation de PPAR-γ sur l'expression de l'ATGL n'a cependant pas été évalué jusqu'à ce jour.

Les raisons expliquant la divergence de ces résultats sont multiples. L'utilisation de différents modèles cellulaires (3T3-L1, adipocytes primaires, explants de tissu adipeux) issus de sujets humains ou de rongeurs traités dans des conditions variables (avec ou sans

insuline, lors du jeûne ou en période postprandiale) peut assurément avoir contribué à l'hétérogénéité des résultats. Aussi, les différentes techniques utilisées pour mesurer la lipolyse (libération in vitro d'AG ou de glycérol vs. mesure in vivo de la cinétique des produits lipolytiques) ont pu ajouter à la complexité des résultats. Finalement, l'effet de la stimulation de PPAR-γ sur la différenciation des adipocytes, sur l'augmentation de la masse adipeux blanche, sur l'amélioration de la sensibilité à l'insuline, sur la réduction de l'activité adrénergique et thyroïdienne et sur la stimulation du recyclage des produits lipolytiques a pu aussi compliquer l'interprétation des résultats.

# 3.3.5 La biogenèse des mitochondries et l'oxydation des lipides

Plusieurs études réalisées in vivo et in vitro ont montré que la stimulation de PPAR- $\gamma$  par les TZD stimule la biogenèse des mitochondries dans le tissu adipeux blanc et dans les adipocytes blancs en culture (Toseland et al., 2001; Wilson-Fritch et al., 2003; Wilson-Fritch et al., 2004; Bogacka et al., 2005a; Bogacka et al., 2005b; Choo et al., 2006). En plus d'augmenter la masse mitochondriale, les TZD modifient la disposition de même que la forme des mitochondries. Les caractéristiques mitochondriales des adipocytes blancs traités avec les TZD sont étrangement très similaires à celles normalement observées dans les adipocytes bruns (Toseland et al., 2001; Wilson-Fritch et al., 2003; Wilson-Fritch et al., 2004). Aussi, il a été démontré que ces agonistes stimulent l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'oxydation des lipides et la dissipation de l'énergie (Way et al., 2001b; Wilson-Fritch et al., 2004; Boden et al., 2005; Bogacka et al., 2005a; Bogacka et al., 2005b). De ces gènes, notons entre autres ceux de la protéine découplante-1 (UCP-1, uncoupling protein-1), de PGC-1 $\alpha$ , de la carnitine palmitoyltransférase-1 (CPT-1), de la cvtochrome C oxydase (CvtC) et de l'acyl-CoA déshydrogénase, chaîne intermédiaire (Mcad, medium chain acyl-CoA dehydrogenase) et de l'acyl-CoA déshydrogénase, chaîne longue (Acadl, long chain acyl-CoA dehydrogenase). L'augmentation du nombre de mitochondries et de l'expression des gènes mitochondriaux par les TZD a été associée à l'élévation de la consommation d'oxygène et de l'oxydation des AG dans le tissu adipeux (Wilson-Fritch et al., 2004; Bogacka et al., 2005a). Ces effets pourraient améliorer la sensibilité à l'insuline en facilitant l'utilisation des AG par le tissu adipeux et en diminuant les effets négatifs associés à leur déposition ectopique (Wilson-Fritch et al., 2003; Hondares et al., 2006).

Les mécanismes en cause dans l'augmentation de la biogenèse des mitochondries et du potentiel oxydatif du tissu adipeux par l'activation de PPAR-y ne sont pas bien connus mais impliquent probablement l'élévation des niveaux de PGC-1a. Cette protéine, dont l'expression est directement régulée par PPAR-y via la présence d'un PPRE dans son promoteur (Hondares et al., 2006), est reconnue comme étant un élément clé lié à la biogenèse de mitochondries et à l'expression d'UCP-1 dans le tissu adipeux brun (Lin et al., 2005b). L'expression de PGC-1 $\alpha$  est faible ou nulle dans le tissu adipeux blanc et très forte dans le tissu adipeux brun, un dépôt riche en mitochondries impliqué dans la dissipation de l'énergie et la production de chaleur (Puigserver et Spiegelman, 2003). L'observation de caractéristiques d'adipocytes bruns dans des adipocytes blancs surexprimant PGC-1 $\alpha$  supporte un possible rôle de cette protéine dans les effets des agonistes PPAR-y sur la biogenèse des mitochondries (Puigserver et al., 1998; Tiraby et al., 2003). Bien que l'effet des TZD sur la stimulation de la biogenèse des mitochondries et du potentiel oxydatif ait été démontré dans des adipocytes 3T3-L1 en culture (Bogacka et al., 2005a), il est possible qu'une partie des observations faites in vivo concernant l'acquisition de caractéristiques du tissu adipeux brun par le tissu adipeux blanc reflète le développement d'adipocytes bruns dans la masse adipeuse blanche (Sell et al., 2004). Pour le moment, le type cellulaire à partir duquel émergent les adipocytes bruns qui se retrouvent dans le tissu adipeux blanc n'est pas connu. En effet, on ne sait pas si ces cellules proviennent de préadipocytes blancs, de pré-adipocytes bruns, ou si elles sont issues de la transdifférenciation d'adipocytes blancs matures (Nedergaard et al., 2005).

Bien que les agonistes PPAR-γ stimulent la biogenèse mitochondriale et le potentiel oxydatif du adipeux blanc, aucune réduction de la masse adipeuse n'est observée lors de traitement avec ces agonistes. Au contraire, l'activation de PPAR-γ est reconnue pour augmenter l'accumulation des lipides dans ce tissu (de Souza *et al.*, 2001; Shadid et Jensen, 2003; Berthiaume *et al.*, 2004). De plus, aucune étude n'a permis d'observer une modulation de la consommation d'oxygène et de la dépense énergétique pouvant corroborer

les observations relatives à la stimulation de l'oxydation des lipides par les agonistes PPAR- $\gamma$  (Burkey *et al.*, 2000; Sell *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2005). Premièrement, il est possible que l'effet des agonistes PPAR- $\gamma$  sur la stimulation de la consommation d'oxygène du tissu adipeux blanc soit trop faible pour être détectée en chambre métabolique. Aussi, il est possible que la forte augmentation de l'estérification des lipides par le tissu adipeux surpasse sa propre capacité oxydative et favorise l'établissement d'une balance énergétique positive menant à l'accumulation des graisses. Finalement, il est aussi possible que la réduction de l'activité adrénergique et de l'activité de l'axe thyroïdien induite par les TZD puisse contrebalancer l'augmentation du potentiel oxydatif induit par ces agonistes (Thurlby *et al.*, 1987; Sell *et al.*, 2004; Festuccia et al., observations non publiées). Des études supplémentaires sont requises afin de déterminer l'impact précis de la biogenèse des mitochondries sur le métabolisme du tissu adipeux, sur la balance énergétique et sur les effets systémiques des agonistes PPAR- $\gamma$ .

### 3.3.6 Le remodelage du tissu adipeux

Chez l'homme, l'activation de PPAR-γ par les agonistes de la classe des TZD est reconnue pour augmenter légèrement mais significativement l'indice de masse corporelle (Akazawa *et al.*, 2000; Carey *et al.*, 2002; Rasouli *et al.*, 2005). L'augmentation de poids induite par les TZD a été associée à de la rétention d'eau mais aussi à l'augmentation de l'accumulation des graisses dans le tissu adipeux (Picard et Auwerx, 2002). L'effet stimulateur des agonistes PPAR-γ sur l'expression des gènes liés au métabolisme des lipides dans le tissu adipeux représente le mécanisme le plus probable favorisant la déposition des lipides chez les individus traités avec les TZD. Plusieurs études publiées ces dernières années ont démontré que les TZD favorisent l'accumulation des graisses dans les dépôts adipeux sous-cutanés et réduisent, ou maintiennent, la déposition des graisses dans les dépôts adipeux viscéraux (Tableau 2). L'étroite liaison entre la masse adipeuse viscérale et le développement de dérèglements métaboliques tels la résistance à l'insuline, le diabète de type 2, l'hypertriglycéridémie et l'athérosclérose suggère que l'effet des TZD sur la masse adipeuse viscérale puisse jouer un rôle important dans l'amélioration du profil métabolique. L'accumulation préférentielle des lipides dans le tissu adieux sous-cutané, un

dépôt reconnu comme ayant moins d'effets délétères sur le métabolisme (Krotkiewski *et al.*, 1983), contribue probablement aux effets bénéfiques des TZD chez l'homme.

Les mécanismes par lesquels les agonistes PPAR-γ mènent à la redistribution des graisses n'ont pas encore été identifiés. Il a été démontré à quelques reprises que des préadipocytes humains isolés du tissu adipeux sous-cutané se différencient plus efficacement que ceux isolés des dépôts viscéraux (Adams *et al.*, 1997a; Hutley *et al.*, 2003). Ces différences n'ont toutefois pas été observées dans toutes les études (van Harmelen *et al.*, 2002; Grohmann *et al.*, 2005). Récemment, la transfection d'adipocytes humains avec un plasmide portant en sa séquence le PPRE de l'acyl-CoA oxidase (ACO) associé à un gène rapporteur a montré que l'activité transactivatrice de PPAR-γ est plus importante dans les adipocytes du tissu adipeux sous-cutané que dans ceux du tissu adipeux viscéral (Sauma *et al.*, 2006). Les facteurs moléculaires à la base de l'activation différentielle de PPAR-γ ne sont pas connus mais plusieurs hypothèses sont envisagées afin d'expliquer ce phénomène.

En premier lieu, l'expression différentielle de PPAR-y a été envisagée comme un facteur pouvant mener à la redistribution des graisses. Cette hypothèse suggère qu'une expression de PPAR-y plus forte dans le tissu adipeux sous-cutané puisse favoriser préférentiellement la déposition des lipides dans ce tissu lors de l'activation de PPAR-y. Ainsi, plusieurs études ont été produites chez l'humain afin de vérifier l'expression de PPAR-γ dans le tissu adipeux sous-cutané et viscéral. Bien que certaines études aient noté une expression plus forte de PPAR-y dans le tissu adipeux sous-cutané (Lefebvre et al., 1998; Giusti et al., 2003), plusieurs études n'ont noté aucune différence (Yanase et al., 1997; Lefebvre et al., 1998; Montague et al., 1998). Une étude publiée récemment a même rapporté que PPAR-γ est exprimé plus fortement dans le tissu adipeux viscéral que dans le sous-cutané (Quinkler et al., 2006). L'inconsistance des résultats suggère qu'il est peu probable que l'expression différentielle de PPAR-y puisse être la cause de la redistribution des graisses induite par les TZD. Puisque l'expression génique diffère souvent de la synthèse des protéines, il serait intéressant de comparer la masse protéique des différents isoformes de PPAR-γ entre les tissus adipeux. Malheureusement, aucune étude n'a jusqu'ici été publiée à ce propos.

Référence	Agoniste	Dose	Durée	Patients	H/F	IMC	SC	V	V/SC
Kawai et al., 1999	Troglitazone	400mg/j	13 semaines	Diabète de type 2	18/0	22	-	-	Ŷ
	+ diète								
Kawai et al., 1999	Troglitazone	400mg/j	13 semaines	Diabète de type 2	15/0	22	-	-	-
	+ sulfonyluré								
Kelly et al., 1999	Troglitazone	600mg/j	13 semaines	Diabète de type 2	16/5	29	-	ų.	
Mori et al., 1999	Troglitazone	400mg/j	26 semaines	Diabète de type 2	7/11	26	ſ	ų.	↓
Akazama et al., 2000	Troglitazone	400mg/j	52 semaines	Diabète de type 2	7/13	25	ſ	-	.↓
	+ sulfonyluré								
Walli et al., 2000	Troglitazone	400mg/j	13 semaines	Diabète de type 2	?/? (6)	?	ſ	ų.	
				+ VIH					
Arioglu et al., 2000	Troglitazone	200 à	26 semaines	Résistance à l'insuline	2/18	?	ſ	-	
		600mg/j		+ lipodystrophie					
Nakamura et al., 2001	Troglitazone	400mg/j	12 semaines	Obésité viscérale	16/13	29	î	ų.	Ļ
Carey et al., 2002	Rosiglitazone	8mg/j	16 semaines	Diabète de type 2	27/6	30	Î	-	
Gelato et al., 2002	Rosiglitazone	8mg/j	6 à 12	Diabète de type 2	?/? (8)	?	î	↓	-
	+antirétroviral		semaines	+ VIH					
Virtanen et al., 2003	Rosiglitazone	4mg/j	26 semaines	Diabète de type 2	20/8	30	-	↓	
Tiikkainen et al., 2004	Rosiglitazone	4mg/j	16 semaines	Diabète de type 2	3/6	31	-	-	
Van Wijk et al., 2005	Rosiglitazone	4mg/j	26 semaines	Lipodystrophie	39/0	?	î	-	
	+antirétroviral			+ VIH					
Feldt et al., 2006	Rosiglitazone	4mg/j	24 semaines	Lipodystrophie	14/6	24	î	-	↓
	+antirétroviral			+ VIH					
Hirose et al., 2002	Pioglitazone	30mg/j	13 semaines	Diabète de type 2	10/0	26	ſ	-	-
	+ diète/sulfonyluré								
Miyazaki et al., 2002	Pioglitazone	45mg/j	16 semaines	Diabète de type 2	9/4	29	1	↓	↓
	+ diète/sulfonyluré								
Shadid et al., 2003	Pioglitazone	30mg/j	20 semaines	Obésité viscérale	10/10	33	ſ	-	
Prasithsirikul et al.,	Pioglitazone	30mg/j	4 semaines	Lipodystrophie	0/1	?	ſ	₽	
2003	+antirétroviral	2.7		+ VIH					
Rasouli et al., 2005	Pioglitazone	45mg/j	10 semaines	Résistance à l'insuline	?/? (23)	34	-	-	.↓
Smith et al., 2005	Pioglitazone	45mg/j	24 semaines	Diabète de type 2	19/23	32	ſ	-	-
-	±sulfonyluré								
Basu et al., 2006	Pioglitazone	45mg/j	12 semaines	Diabète de type 2	?/? (8)	32	-	-	

Tableau 2. Revue de la littérature des effets des thiazolidinediones sur la redistribution du tissu adipeux blanc chez l'homme.

Abréviations et symboles: H/F, homme/femme; IMC, indice de masse corporelle (kg/m<sup>2</sup>); case vide, aucune mesure; ?, donnée manquante; SC, tissu adipeux sous-cutané; V, tissu adipeux viscéral; V/SC, ratio tissu adipeux viscéral/tissu adipeux sous-cutané; VIH, virus d'immunodéficience acquise; -, aucun effet;  $\uparrow$ , augmentation;  $\downarrow$ , diminution.

Les modifications post-traductionnelles de PPAR-y sont aussi envisagées comme des éléments pouvant contribuer à la redistribution du tissu adipeux par les TZD. Tel que mentionné précédemment, les PPAR sont des protéines phosphorylables. Il est maintenant bien connu que PPAR-y est phosphorylé par la MAPK sur la sérine 112 chez la souris et la sérine 114 chez l'homme (Hu et al., 1996; Adams et al., 1997b; Ristow et al., 1998). Cette phosphorylation, qui a lieu dans le domaine A/B de PPAR-y, mène à la répression de l'activité de PPAR-y en réduisant la fonction AF-1 de même que l'affinité du récepteur pour les ligands (Adams et al., 1997b; Shao et al., 1998). Chez la souris, la mutation Ser112Ala, qui empêche la phosphorylation de PPAR-y et active le récepteur de façon constitutive, a été associée à l'augmentation de l'adipogenèse et à l'amélioration de la sensibilité à l'insuline (Rangwala et al., 2003). Chez l'homme, la mutation Pro115Gln de PPAR-y, qui diminue la phosphorylation du récepteur sur la sérine 114, a été associée à l'obésité et à la réduction de l'insulinémie (Ristow et al., 1998). Comme la phosphorylation de PPAR-y affecte de manière importante l'activité du récepteur, il a été suggéré que cette modification post-traductionnelle puisse être la cause de la spécificité d'action des TZD sur les différents tissus adipeux (Montague, 2002). Malheureusement, la comparaison des niveaux de phosphorylation de PPAR-y entre les dépôts adipeux n'a jusqu'ici jamais été effectuée.

Une autre modification post-traductionnelle de PPAR- $\gamma$ , la SUMOylation, est envisagée comme un facteur pouvant être impliqué dans la redistribution du tissu adipeux par les TZD. Chez la souris, PPAR- $\gamma$  peut être SUMOylé principalement sur la lysine 107 du domaine A/B (Floyd et Stephens, 2004; Ohshima *et al.*, 2004; Yamashita *et al.*, 2004; Pascual *et al.*, 2005). Ce site de SUMOylation correspond à la lysine 109 chez l'homme. La SUMOylation de la lysine 107 dans des cellules en culture a été associée à une forte réduction de l'activité transactivatrice de PPAR- $\gamma$  (Floyd et Stephens, 2004; Ohshima *et al.*, 2004; Yamashita *et al.*, 2004; Pascual *et al.*, 2005). Inversement, la mutation Lys107Arg, qui empêche la SUMOylation de PPAR- $\gamma$ , a été associée à l'activation du récepteur. Il a été observé que la SUMOylation sur la lysine 107 est favorisée par la phosphorylation de PPAR- $\gamma$  sur la sérine 112, ce qui contribue à réduire davantage l'activité du récepteur (Yamashita *et al.*, 2004). La comparaison des niveaux de SUMOylation entre les dépôts adipeux et le rôle de cette modification sur la redistribution du tissu adipeux par les TZD n'ont toujours pas été déterminés.

Finalement, le recrutement différentiel de cofacteurs nucléaires entre les dépôts adipeux est considéré comme un mécanisme probable par lequel les TZD induisent le remodelage de la masse adipeuse. Tel que décrit dans le section 3.1.2, plusieurs protéines peuvent se lier à PPAR-y et affecter son activité transcriptionnelle. Plusieurs études ont montré que le recrutement de cofacteurs nucléaires influence directement l'activité adipogène de PPAR-y et l'expression génique. Par exemple, le recrutement préférentiel de TIF-2 par PPAR-y est reconnu pour favoriser l'expression des gènes impliqués dans l'adipogenèse (Rocchi et al., 2001; Picard et al., 2002b). Au contraire, le recrutement de SRC-1, qui favorise la liaison de PGC-1 $\alpha$  sur PPAR- $\gamma$ , a été associé à l'expression des gènes liés à l'oxydation des substrats (Picard et al., 2002b). Le recrutement des cofacteurs par PPAR-y est un phénomène complexe qui peut être affecté par plusieurs facteurs. Il est connu que les changements de conformations de PPAR-y induits par différents agonistes permettent le recrutement de différents cofacteurs qui influencent l'effet adipogène de ces agonistes (Camp et al., 2000; Rocchi et al., 2001). Les modifications post-traductionnelles (phosphorylation et SUMOylation) affectant aussi la conformation de PPAR-y, sont percues comme des éléments pouvant moduler le recrutement de cofacteurs et affecter l'expression génique. Pour le moment, la contribution du recrutement différentiel de cofacteurs nucléaires par PPAR-y dans les effets des TZD sur la redistribution du tissu adipeux n'a pas été déterminée.

# 3.3.7 La fonction endocrinienne

Le tissu adipeux blanc a pour fonction primaire d'emmagasiner les lipides en période d'abondance et de les libérer lors des périodes de jeûne. Au-delà de cette fonction, il est maintenant bien connu que le tissu adipeux produit et libère dans la circulation un bon nombre d'adipokines et de cytokines pro-inflammatoires ayant des effets majeurs sur le métabolisme et la balance énergétique (Figure 1). Seront décrits dans cette section les effets

des agonistes PPAR-γ sur la sécrétion des principales adipokines et cytokines proinflammatoires influençant le métabolisme énergétique et la sensibilité à l'insuline.

L'adiponectine est une adipokine reconnue pour améliorer le profil métabolique (Trujillo et Scherer, 2006). L'adiponectine influence la sensibilité à l'insuline du foie en favorisant l'oxydation des lipides et en réprimant la production hépatique de glucose par des mécanismes dépendants de l'AMPk (Berg et al., 2001; Combs et al., 2001; Yamauchi et al., 2002). Le lien étroit entre l'hypoadiponectinémie et l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2 suggère un rôle central de l'adiponectine dans le maintien de l'homéostasie métabolique et énergétique (Weyer et al., 2001). Les TZD augmentent les niveaux circulants d'adiponectine chez l'homme et chez les rongeurs (Maeda et al., 2001; Combs et al., 2002). En plus d'augmenter la concentration plasmatique de cette protéine, la stimulation de PPAR-y favorise la mise en circulation des complexes d'adiponectine de haut poids moléculaire, la forme d'adiponectine possédant la plus importante bioactivité (Pajvani et al., 2004). L'étroite similitude observée entre la surexpression de l'adiponectine chez la souris et les traitements avec les TZD suggère un rôle important de cette adipokine dans les effets de ces agonistes (Combs et al., 2004). Le traitement de souris déficientes en adiponectine avec des agonistes PPAR- $\gamma$  a permis d'évaluer le rôle de l'adiponectine dans les effets de ces agonistes. L'amélioration partielle de la sensibilité à l'insuline induite par les TZD en absence d'adiponectine souligne le rôle important, mais non essentiel, de cette protéine dans les effets des TZD (Kubota et al., 2006; Nawrocki et al., 2006).

L'activation pharmacologique de PPAR- $\gamma$  affecte les niveaux circulants de leptine. Les TZD diminuent les niveaux plasmatiques de cette adipokine reconnue comme un facteur de satiété puissant (De Vos *et al.*, 1996; Kallen et Lazar, 1996). La réduction de la leptine par les agonistes PPAR- $\gamma$  est perçue comme un mécanisme pouvant contribuer à l'augmentation de la prise alimentaire et de l'accumulation des graisses observées lors de l'utilisation de tels agonistes (Berger et Moller, 2002).

La découverte d'une étroite liaison entre la sécrétion de TNF- $\alpha$  par le tissu adipeux et la résistance à l'insuline induite par l'obésité a permis de mettre en évidence le rôle de l'inflammation dans le développement de cette pathologie (Hotamisligil et al., 1993; Zinman et al., 1999). Il en ensuite été démontré que le TNF- $\alpha$  induit la résistance à l'insuline en réduisant l'efficacité de la signalisation de l'insuline (Hotamisligil et al., 1994) et en stimulant la lipolyse du tissu adipeux (Green et al., 1994; Gasic et al., 1999). Des études ont montré que les TZD réduisent la sécrétion de TNF- $\alpha$  par le tissu adipeux (Miles *et al.*, 1997). La réduction de la sécrétion du TNF- $\alpha$  par les TZD est perçue comme un mécanisme possible par lequel les TZD contribuent à l'amélioration de la sensibilité à l'insuline (Berger et Moller, 2002). Le degré d'implication des adipocytes dans la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires a récemment été remis en question par la découverte d'une forte infiltration de macrophages dans le tissu adipeux d'animaux obèses (Weisberg et al., 2003; Xu et al., 2003b). La colonisation du tissu adipeux par les macrophages, phénomène qui est amplifié par la production de MCP-1 (Kanda et al., 2006; Weisberg et al., 2006), est désormais considérée comme un nouvel élément pouvant lier l'obésité, l'inflammation et la résistance à l'insuline (Wellen et Hotamisligil, 2003; Neels et Olefsky, 2006). L'activation de PPAR-γ par les TZD diminue l'infiltration des macrophages dans le tissu adipeux (Di Gregorio et al., 2005). Cet effet des TZD pourrait être causé par la réduction de l'expression de MCP-1 (Di Gregorio et al., 2005) et par l'augmentation de l'apoptose des macrophages dans le tissu adipeux (Chinetti et al., 1998; Bodles et al., 2006). La réduction de l'infiltration des macrophages par les TZD pourrait être impliquée dans la réduction de la sécrétion de TNF- $\alpha$  et dans l'amélioration de la sensibilité à l'insuline observée lors de l'utilisation de ces agonistes (Lumeng et al., 2007b).

Il est bien établi que les cytokines pro-inflammatoires telles le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 augmentent la production de monoxyde d'azote (NO, *nitric oxide*) en stimulant l'expression de la synthase inductible de monoxide d'azote (iNOS, *inducible nitric oxide synthase*) (Marette, 2002). Le NO est une molécule qui est surproduite lors de l'endotoxémie, de l'obésité et de la résistance l'insuline. Il a été démontré chez la souris que l'inactivation d'iNOS protège contre le développement de la résistance à l'insuline induit par une diète riche en graisses (Perreault et Marette, 2001). Le NO induit la résistance à l'insuline dans le muscle en favorisant la S-nitrosation et la dégradation de protéines impliquées dans la signalisation de l'insuline (Carvalho-Filho *et al.*, 2005). Des études ont montré que les TZD réduisent les niveaux d'iNOS et la production de NO dans plusieurs types cellulaires dont les myocytes, les adipocytes et les macrophages en culture (Pilon *et al.*, 2004) et dans le tissu adipeux de souris obèses (Dallaire et al., résultats non publiés). Malgré la très courte demi-vie du NO, il a été suggéré que la production de cette molécule par le tissu adipeux puisse avoir un effet paracrine sur la sensibilité à l'insuline du muscle (Marette, 2002). Puisque plus de tissu adipeux se retrouve dans le muscle des personnes obèses, une production locale élevée de NO par les adipocytes et les macrophages pourrait induire la résistance à l'insuline dans les myocytes. Ainsi, la réduction de l'activité d'iNOS dans le tissu adipeux, qui est probablement influencée par la réduction de l'infiltration des macrophages (Lumeng *et al.*, 2007a), est considérée comme un élément pouvant contribuer à l'effet des TZD sur la sensibilité à l'insuline.

Une autre adipokine, la résistine, a été identifiée comme une cible de PPAR- $\gamma$ . À l'origine, la résistine a été caractérisée comme une protéine produite principalement par les adipocytes pouvant causer la résistance à l'insuline (Steppan *et al.*, 2001). Les niveaux élevés de résistine chez les rongeurs obèses et la diminution de ces niveaux par la rosiglitazone suggéraient initialement que cette protéine puisse jouer un rôle dans l'amélioration de la sensibilité à l'insuline induite par les TZD. Toutefois, des études contradictoires publiées ces dernières années mettent fortement en doute les conclusions de cette étude (Way *et al.*, 2001a; Banerjee et Lazar, 2003; Hotamisligil, 2003). Ainsi, le rôle de la résistine dans les effets bénéfiques des TZD sur la sensibilité à l'insuline semble beaucoup moins clair qu'originalement décrit.

La récente découverte de l'induction de la résistance à l'insuline par RBP-4, une protéine produite par le tissu adipeux se retrouvant en forte concentration plasmatique chez les obèses, suggère que cette adipokine puisse faire le lien entre l'obésité et la résistance à l'insuline (Yang *et al.*, 2005). Dans l'étude de Yang et al., il a été démontré que la rosiglitazone réduit l'expression de même que les niveaux circulants de RBP-4. Ces résultats suggèrent qu'une partie des effets bénéfiques de la rosiglitazone sur la sensibilité à l'insuline puissent être causée par une réduction des niveaux circulants de RBP-4. Bien que ces résultats soient très intéressants, d'autres études sont requises afin de préciser les

fonctions exactes de RBP-4, l'impact de cette protéine sur la résistance à l'insuline chez l'homme, les mécanismes par lesquels RBP-4 favorise la résistance à l'insuline et l'implication de cette adipokine dans les effets des TZD.

## 3.3.8 Modèles génétiques

Afin de vérifier le rôle du tissu adipeux dans les effets des agonistes PPAR-y, des souris déficientes en tissu adipeux ont été traitées avec des TZD. Deux modèles de souris lipodystrophiques ont été utilisés. Le premier modèle, la souris A-ZIP/F1, est produit par la surexpression dans le tissu adipeux de la protéine A-ZIP/F, un protéine reconnue pour inhiber l'action des C/EBP en limitant leur liaison à l'ADN (Moitra et al., 1998). Le deuxième modèle, la souris ap2/DTA, est produite en surexprimant la toxine diphtérique A (DTA, *diphteria toxine A*) sous le contrôle du promoteur aP2, un promoteur spécifiquement utilisé dans les adipocytes. L'absence d'effet des TZD sur la glycémie et l'insulinémie des souris A-ZIP/F1 a permis de démontrer que le tissu adipeux est nécessaire pour l'effet antidiabétique de ces agonistes (Chao et al., 2000). Toutefois, l'effet hypolipidémiant des TZD est maintenu en absence de tissu adipeux. Le foie, qui emmagasine normalement des quantités limitées de lipides, devient stéatotique chez les souris A-ZIP/F1 traitées avec les TZD. Des niveaux élevés de PPAR-γ sont retrouvés dans le foie de ces souris, ce qui contribue à augmenter la lipogenèse et l'acquisition de caractéristiques du tissu adipeux par le foie. Afin de déterminer si l'effet hypolipidémiant des TZD est maintenu dans les souris A-ZIP/F1 lorsque le foie ne surexprime pas PPAR-y, des souris A-ZIP/F1 n'exprimant pas PPAR-y dans le foie ont été produites (Gavrilova et al., 2003). Dans ce modèle, les TZD ne sont plus efficaces pour diminuer les TG circulants et la glycémie, ce qui démontre l'importance du tissu adipeux dans les effets de ces agonistes. Le traitement des souris aP2/DTA a conduit à des résultats différents. Ces souris lipodystrophiques montrent une amélioration de la lipémie et de la glycémie lors du traitement avec les TZD (Burant et al., 1997). Comme dans le modèle A-ZIP/F1, des quantités importantes de lipides s'accumulent dans le foie de ces souris lors du traitement avec l'agoniste PPAR-y, ce qui masque probablement le rôle du tissu adipeux dans la diminution des lipides circulants induite par ces agonistes. L'absence d'une lipodystrophie totale pourrait expliquer comment les TZD maintiennent leur effet antidiabétique dans les souris aP2/DTA (Chao *et al.*, 2000). Bien qu'il soit difficile de tirer des conclusions claires à partir des modèles lipodystrophiques, ces études suggèrent un rôle très important, mais non exclusif, du tissu adipeux dans les effets des TZD.

Afin de vérifier directement le rôle de PPAR-y du tissu adipeux dans le maintien de l'homéostasie énergétique et dans les effets des agonistes PPAR-y, différents modèles de souris n'exprimant pas PPAR-γ dans le tissu adipeux ont été générés. Généralement, les souris déficientes en PPAR-y dans le tissu adipeux montrent un poids corporel réduit, une masse adipeuse plus faible, des niveaux de lipides circulants élevés et une accumulation de TG élevée dans le foie (He et al., 2003; Koutnikova et al., 2003; Imai et al., 2004; Jones et al., 2005). Ces résultats confirment le rôle de PPAR-y dans l'adipogenèse. Or, plusieurs observations extrêmement confondantes ont été rapportées relativement à l'effet de l'inactivation de PPAR-y du tissu adipeux sur la sensibilité à l'insuline. Dépendamment des études, l'inactivation de PPAR-γ dans le tissu adipeux cause la résistance à l'insuline (He et al., 2003), une légère intolérance au glucose (Koutnikova et al., 2003) ou aucun effet sur la sensibilité à l'insuline (Jones et al., 2005). Ces variations, qui sont probablement issues des différentes stratégies utilisées pour produire ces souris, rendent difficile l'interprétation du rôle précis de PPAR-y du tissu adipeux dans le maintien de l'équilibre métabolique (Gray et al., 2005). Chez des souris déficientes en PPAR- $\gamma$  dans le tissu adipeux, la rosiglitazone améliore la sensibilité à l'insuline hépatique mais ne réduit pas les niveaux d'AGL circulants (He et al., 2003). Bien que sommaires, ces résultats suggèrent que PPAR- $\gamma$  du tissu adipeux est important, mais non essentiel, dans les effets des TZD.

### 3.4 Effets de la stimulation de PPAR-y sur le tissu adipeux brun

Tel que mentionné précédemment, PPAR-y est fortement exprimé dans le tissu adipeux brun. Ce tissu, qui est présent chez les nouveau-nés et les petits mammifères, contribue significativement à la balance énergétique et au métabolisme en transformant des nutriments issus de l'alimentation en chaleur lors des périodes de besoin. La production de chaleur dans le tissu adipeux brun est dépendante d'UCP-1, une protéine présente dans la membrane interne de la mitochondrie qui découple l'oxydation des substrats énergétiques de la synthèse mitochondriale d'adénosine triphosphate (ATP) (Cannon et Nedergaard, 2004). Le tissu adipeux brun n'est que peu ou pas présent chez l'homme adulte. Comme l'étude des mécanismes d'action des agonistes PPAR-γ se fait généralement dans les modèles murins, il est essentiel d'identifier les effets de l'activation de PPAR-γ sur le tissu adipeux brun et de déterminer l'impact de ces modulations sur l'ensemble du métabolisme. Bien que les informations découlant de l'étude de ce tissu soient difficilement applicables à l'humain, ces dernières demeurent tout de même importantes afin d'approfondir les connaissances de la physiologie et du métabolisme énergétique. De plus, la caractérisation des effets des agonistes PPAR-γ dans le tissu adipeux brun pourrait ultimement fournir des informations nous aidant à comprendre pourquoi ces agonistes sont généralement plus efficaces chez les rongeurs que chez l'homme. Enfin, le développement du phénotype propre à l'adipocyte brun au sein du tissu adipeux blanc humain en réponse aux TZD souligne la pertinence de l'étude de ce tissu chez le rongeur.

### 3.4.1 La signalisation de l'insuline et le transport du glucose

Tel qu'attendu, les études portant sur les effets des agonistes PPAR- $\gamma$  sur le tissu adipeux brun sont beaucoup moins nombreuses que celles portant sur le tissu adipeux blanc. Malgré tout, des informations utiles ont été publiées ces dernières années concernant l'effet des TZD sur la signalisation de l'insuline dans des adipocytes bruns. Il a été démontré que la rosiglitazone augmente l'expression de même que la phosphorylation en tyrosine du récepteur de l'insuline (Hernandez *et al.*, 2003). Cette activation a été associée à une réduction significative de l'activité de la protéine tyrosine phosphatase 1B (PTP-1B), une protéine reconnue pour déphosphoryler et inactiver le récepteur de l'insuline (Elchebly *et al.*, 1999). L'activation du récepteur de l'insuline par la rosiglitazone augmente la phosphorylation en tyrosine de IRS-1 et IRS-2 et potentialise l'activation de la PI3K et de la PKB/AKT en réponse à l'insuline. L'amélioration de la signalisation à l'insuline induite par la rosiglitazone contribue à augmenter la translocation de GLUT4 à la membrane cellulaire et à stimuler le transport du glucose dans les adipocytes bruns en culture (Hernandez *et al.*, 2003). Aussi, de façon similaire à ce qui a été décrit dans les adipocytes blancs, il a été démontré dans les adipocytes bruns que les TZD empêchent le développement de la résistance à l'insuline induite par le TNF- $\alpha$  (Hernandez *et al.*, 2004).

# 3.4.2 L'adipogenèse

Tel que décrit pour les adipocytes blancs (section 3.3.2), la différenciation des adipocytes bruns requiert la présence de C/EBP- $\delta$ , - $\beta$ , - $\alpha$  et de PPAR- $\gamma$  (Uldry *et al.*, 2006). Plusieurs observations supportent un rôle important de PPAR-y dans la formation du tissu adipeux brun. En premier lieu, il a été noté que la délétion de PPAR-y chez des souris conduit à une élimination complète de la masse adipeuse brune (Barak et al., 1999; Rosen et al., 1999; Jones et al., 2005). Aussi, il a été observé que la stimulation de PPAR-y par les TZD augmente la prolifération (Breider et al., 1999; Berthiaume et al., 2004) et la différenciation des adipocytes bruns (Tai et al., 1996). Comparativement aux adipocytes blancs, le programme moléculaire impliqué dans la différenciation des adipocytes bruns se distingue par la stimulation de la biogenèse des mitochondries et par l'expression d'UCP-1 (Klingenspor, 2003). Il a été démontré que l'acquisition de ces caractéristiques morphologiques et transcriptionnelles est fortement induite par la présence de PGC-1a (Puigserver et al., 1998; Tiraby et al., 2003; Uldry et al., 2006). Les agonistes PPAR-y sont reconnus pour stimuler fortement l'expression de PGC-1a, d'UCP-1, d'UCP-2 et d'UCP-3 dans les adipocytes bruns in vivo et in vitro (Foellmi-Adams et al., 1996; Sears et al., 1996; Kelly et al., 1998; Matsuda et al., 1998; Sell et al., 2004; Hondares et al., 2006). La présence d'un PPRE dans le promoteur de PGC-1 $\alpha$  et d'UCP-1 est perçue comme un élément clé favorisant la différenciation terminale des adipocytes bruns lors de l'activation de PPAR-γ (Sears et al., 1996; Hondares et al., 2006). Il est intéressant de noter que cet effet de PPAR-y sur l'expression de PGC-1 $\alpha$  contribue à l'établissement d'une boucle de rétroaction positive qui augmente le potentiel de différenciation de PPAR-y. En effet, il a été démontré que PGC-1 $\alpha$  interagit avec PPAR- $\gamma$  et potentialise la capacité de ce récepteur à transactiver le promoteur de PGC-1 $\alpha$  et d'UCP-1 (Puigserver et al., 1998; Hondares et al., 2006).

### 3.4.3 La captation, la synthèse, l'estérification et la mise en réserve des lipides

L'activation de PPAR-y augmente de façon importante le poids du tissu adipeux brun, un effet qui est lié à l'augmentation de l'accumulation des lipides dans ce dépôt (Kelly et al., 1998; Breider et al., 1999; Burkey et al., 2000; Toseland et al., 2001; Aleo et al., 2003; Sell et al., 2004). Bien que les agonistes PPAR-y favorisent le stockage des graisses dans le tissu adipeux brun, peu d'études ont jusqu'ici mesuré l'effet de ces agonistes sur l'expression des gènes impliqués dans la captation, la synthèse, l'estérification et la mise en réserve des lipides dans ce tissu. Une étude comparant le profil d'expression génique du tissu adipeux brun d'animaux contrôles ou traités avec un agoniste PPAR-γ a permis l'identification de plusieurs gènes du métabolisme lipidique dont l'expression est augmentée par ce traitement (Way et al., 2001b). De ces gènes notons entre autres l'ACS, la FAS, la FAT/CD36, la FATP-1, la hFABP, la LPL, la ME, la SCD-1 et la PC. L'augmentation de l'expression de ces gènes, de même que l'amélioration de la sensibilité à l'insuline et du transport du glucose dans les adipocytes bruns, contribuent probablement à stimuler l'accrétion des lipides dans ce tissu. Bien que l'accumulation de lipides dans le tissu adipeux brun des rongeurs traités avec des agonistes PPAR-y soit importante, la contribution du tissu adipeux brun à l'amélioration de la lipémie induite par ces agonistes n'a pas été déterminée.

### 3.4.4 La fonction du tissu adipeux brun

À l'image du tissu adipeux blanc, la stimulation de l'expression de PGC-1 $\alpha$  et d'UCP-1 dans le tissu adipeux brun par les agonistes PPAR- $\gamma$  n'est associée à aucune augmentation de la consommation d'oxygène globale et de la dépense énergétique (Burkey *et al.*, 2000; Sell *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2005). Au contraire, la déposition des lipides augmente de façon spectaculaire dans ce tissu lors du traitement avec ces agonistes (Kelly *et al.*, 1998; Breider *et al.*, 1999; Burkey *et al.*, 2000; Toseland *et al.*, 2001; Aleo *et al.*, 2003; Berthiaume *et al.*, 2004; Sell *et al.*, 2004). L'augmentation de l'accrétion des lipides observée en présence d'une augmentation de l'expression d'UCP-1 suggère que l'activation sympathique du tissu adipeux brun puisse être réduite par le traitement avec les agonistes
PPAR-γ. Il a été démontré que le traitement de rats avec un agoniste PPAR-γ et un agoniste  $\beta_3$ -adrénergique stimule la consommation d'oxygène au-delà de celle des animaux traités avec ces drogues séparément (Thurlby *et al.*, 1987; Sell *et al.*, 2004). Ces résultats montrent que l'activation de PPAR-γ augmente le potentiel thermogène du tissu adipeux brun sans toutefois permettre sa pleine activation. En plus de ces effets sur l'activité sympathique, des études produites dans nos laboratoires suggèrent que les TZD réduisent aussi l'activité thyroïdienne. En effet, il a été observé que l'expression de l'iodothyronine désiodinase (Dio2), qui est impliquée dans la production de triiodothyronine (T3) dans le tissu adipeux brun, de même que les niveaux circulants de T3, sont réduits par les TZD (Festuccia et Deshaies, observations non publiées). La réduction de l'activité sympathique et thyroïdienne, l'amélioration de la sensibilité à l'insuline et l'augmentation de l'expression de signification, la synthèse et la déposition des lipides sont perçus comme des mécanismes pouvant favoriser la déposition des graisses dans le tissu adipeux brun lors du traitement avec les agonistes PPAR-γ.

## 3.4.5 Considérations générales

L'analyse microscopique de coupes de tissu adipeux brun et blanc provenant d'animaux traités avec des agonistes PPAR- $\gamma$  montre clairement que ces agonistes induisent une convergence phénotypique entre ces types cellulaires (Toseland *et al.*, 2001). Le tissu adipeux brun emmagasine des quantités importantes de lipides suite au traitement avec ces agonistes. Au contraire, l'activation de PPAR- $\gamma$  réduit la taille des cellules adipeuses blanches, contribue à la fragmentation de la vacuole lipidique et augmente dramatiquement le nombre de mitochondries dans ces cellules. Les mécanismes moléculaires précis ainsi que le rôle de cette convergence morphologique dans les effets systémiques des agonistes PPAR- $\gamma$  n'ont pas été caractérisés jusqu'à présent.

## 3.5 Effets de la stimulation de PPAR-y sur le muscle

L'expression de PPAR- $\gamma$  dans le muscle squelettique représente environ 10% de celle du tissu adipeux (Fajas *et al.*, 1997; Vidal-Puig *et al.*, 1997), ce qui suggère un rôle plutôt limité de ce tissu dans les effets des agonistes de PPAR- $\gamma$ . Toutefois, l'importante proportion qu'occupe le muscle squelettique dans la composition corporelle suggère que la faible expression de PPAR- $\gamma$  dans ce tissu puisse tout de même suffire à affecter significativement le métabolisme énergétique (Picard et Auwerx, 2002). Il est toutefois extrêmement difficile de déterminer in vivo les effets directs des agonistes PPAR- $\gamma$  sur le métabolisme musculaire. En effet, l'impact de ces agonistes sur le muscle peut être secondaire à l'amélioration de la sensibilité à l'insuline. Aussi, les effets des agonistes PPAR- $\gamma$  sur le muscle peuvent découler des profondes modifications du métabolisme du tissu adipeux menant par exemple à la réduction des niveaux circulants d'AGL et de TNF- $\alpha$  et à l'augmentation de l'adiponectine. L'utilisation de cellules en culture ou d'explants de tissu est alors très utile afin de séparer les effets directs des effets indirects reliés à l'agonisme de PPAR- $\gamma$ . La distinction entre ces effets sera discutée dans les prochaines sections.

#### 3.5.1 La signalisation de l'insuline, le transport/métabolisme du glucose

Le muscle squelettique représente le principal tissu responsable de l'utilisation du glucose en période postprandiale. En effet, entre de 70 à 80% du glucose circulant est utilisé dans le muscle en ces conditions (Miyazaki *et al.*, 2003). La résistance du muscle à l'action de l'insuline est considérée comme un important facteur impliqué dans le développement de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2 (Shulman, 2000). Puisque les agonistes PPAR- $\gamma$  sont reconnus pour améliorer la sensibilité à l'insuline et la glycémie, plusieurs études ont été réalisées afin de comprendre les effets de ces agonistes sur le métabolisme du muscle squelettique. Plusieurs études ont démontré que les TZD améliorent la signalisation de l'insuline en augmentant la phosphorylation en tyrosine du récepteur de l'insuline et d'IRS-1 de même que l'activité de la PI3K, d'AKT/PKB et des

PKC atypiques (Kobayashi et al., 1992; Hayakawa et al., 1996; Kanoh et al., 2000; Hevener et al., 2001; Jiang et al., 2002; Kim et al., 2002b; Beeson et al., 2003; Miyazaki et al., 2003; Li et al., 2005; Todd et al., 2006). En lien avec ces observations, les TZD améliorent la captation du glucose par le muscle squelettique chez l'humain (Hallsten et al., 2002; Miyazaki et al., 2003; Karlsson et al., 2005) et les rongeurs (Oakes et al., 1994; Zierath et al., 1998; Muurling et al., 2003; Li et al., 2005; Wu et al., 2005). L'augmentation de la captation du glucose par les TZD a été associée à la stimulation de la glycolyse et de la synthèse de glycogène (Sreenan et al., 1999; Jucker et al., 2002; Miyazaki et al., 2003; Li et al., 2005). Des études ont aussi démontré que les TZD stimulent l'oxydation du glucose dans le muscle squelettique. Chez le rat, l'agonisme de PPAR-γ réduit l'expression de la pyruvate déshydrogénase kinase-4 (PDK-4) du muscle après seulement 24 heures de traitement (Way et al., 2001b). Cette enzyme, qui phosphoryle et inactive la pyruvate déshydrogénase (PDH), est reconnue pour réduire l'oxydation du glucose en empêchant le transfert des produits glycolytiques vers la mitochondrie (Sugden et Holness, 2003). La réduction de l'expression de la PDK-4 est considérée comme un mécanisme possible par lequel les TZD stimulent l'activité de la PDH et l'oxydation du glucose dans le muscle squelettique (Oshida et al., 1999; Sreenan et al., 1999).

Beaucoup des effets des agonistes PPAR- $\gamma$  observés dans le muscle in vivo ont aussi été observés in vitro. Dans différents modèles de cellules musculaires en culture, il a été observé que les agonistes PPAR- $\gamma$  améliorent la signalisation de l'insuline (Zhang *et al.*, 1994; Kumar et Dey, 2003) et augmentent le transport du glucose (el-Kebbi *et al.*, 1994; Park *et al.*, 1998; Kumar et Dey, 2003). Cette stimulation du transport du glucose a été associée dans certaines études à l'augmentation de l'expression, de la synthèse et/ou de la translocation de GLUT4 à la surface des cellules musculaires (el-Kebbi *et al.*, 1994; Yonemitsu *et al.*, 2001; Al-Khalili *et al.*, 2005). La synthèse de glycogène est aussi stimulée in vitro par les TZD (Al-Khalili *et al.*, 2005). Ces observations faites in vitro démontrent que les agonistes PPAR- $\gamma$  exercent des effets directs sur le muscle squelettique. Ces effets sont susceptibles de contribuer aux effets bénéfiques de ces agonistes sur l'homéostasie du glucose. Ces dernières années, de nombreuses études produites in vivo et in vitro ont clairement démontré que les agonistes PPAR-γ augmentent l'activité de l'AMPk du muscle chez l'homme et les rongeurs (Fryer *et al.*, 2002; Konrad *et al.*, 2005; Bandyopadhyay *et al.*, 2006; LeBrasseur *et al.*, 2006; Lessard *et al.*, 2006; Ye *et al.*, 2006). Cette kinase joue un rôle central dans le contrôle du métabolisme cellulaire en stimulant l'entrée du glucose et l'oxydation des lipides dans les tissus périphériques lors du déficit énergétique (Long et Zierath, 2006). Ainsi, une partie des effets des agonistes PPAR-γ sur la stimulation du métabolisme du glucose pourrait être attribuable à l'activation de l'AMPk (Konrad *et al.*, 2005; LeBrasseur *et al.*, 2006). L'impact de ces agonistes sur l'activation de l'AMPk est rapide et implique vraisemblablement des mécanismes indépendants de la stimulation de la transcription génique par PPAR-γ (Fryer *et al.*, 2002; Konrad *et al.*, 2005; LeBrasseur *et al.*, 2006).

#### 3.5.2 Les lipides du muscle

Tel que mentionné dans la section 2., l'accumulation des lipides ou de dérivés lipidiques dans le muscle a été associée à de nombreuses reprises au développement de la résistance à l'insuline. Beaucoup d'études ont mesuré l'accumulation des lipides intramusculaires lors de traitements avec des agonistes PPAR-γ. La plupart de ces études produites chez l'humain ou les rongeurs montrent que les TZD réduisent la déposition des TG ou des dérivés lipidiques (diacylglycérol, acyl-CoA à longue chaîne, céramides) dans le muscle (Oakes *et al.*, 1997; Sreenan *et al.*, 1999; Jucker *et al.*, 2003; Kuhlmann *et al.*, 2003; Mathieu-Costello *et al.*, 2003; Ye *et al.*, 2004; Planavila *et al.*, 2005; Bandyopadhyay *et al.*, 2006; Todd *et al.*, 2006). Étrangement, quelques études isolées ont aussi montré que les agonistes PPAR-γ augmentent l'accumulation des lipides dans le muscle (Saha *et al.*, 1994; Muurling *et al.*, 2003; Lessard *et al.*, 2004). L'augmentation de l'adipogenèse entre les fibres musculaires induite par les agonistes PPAR-γ pourrait avoir contribué à induire de la variation dans les conclusions de ces études (Mayerson *et al.*, 2002; Coort *et al.*, 2005; De Coppi *et al.*, 2006; Kook *et al.*, 2006).

La réduction des lipides et dérivés lipidiques accumulés dans les cellules musculaires suite au traitement avec des agonistes PPAR-γ est considérée comme un mécanisme probable favorisant l'amélioration de la sensibilité à l'insuline (Picard et Auwerx, 2002). Les mécanismes par lesquels ces agonistes réduisent la déposition des lipides dans le muscle ne sont pas parfaitement élucidés. La diminution des AGL circulants induite par l'augmentation de la rétention des lipides dans le tissu adipeux représente le principal mécanisme par lequel la stimulation de PPAR-y réduit l'accumulation des lipides dans le muscle. Aussi, plusieurs études produites in vitro et in vivo suggèrent que les agonistes PPAR-y réduisent l'accumulation des lipides dans le muscle en stimulant directement l'oxydation des AG dans les myocytes (Cha et al., 2001; Wilmsen et al., 2003; Bandyopadhyay et al., 2006). L'activation de l'AMPk du muscle par des mécanismes dépendants et indépendants de l'adiponectine, pourrait être responsable de cet effet (Bandyopadhyay et al., 2006; LeBrasseur et al., 2006; Lessard et al., 2006). La phosphorylation de l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) par l'AMPk menant à la réduction de la production du malonyl-CoA, un inhibiteur puissant de la CPT-1, contribue à augmenter le transport des AG vers la mitochondrie pour leur oxydation. Toutefois, l'absence d'effet des TZD sur la consommation d'oxygène des rongeurs et des humains traités avec ces agonistes soulève des questions quant à la contribution réelle de ces effets dans la réduction des lipides musculaires observée lors de l'utilisation des TZD (Burkey et al., 2000; Sell et al., 2004; Smith et al., 2005)

## 3.5.3 Modèles génétiques

Des souris déficientes en PPAR- $\gamma$  dans le muscle squelettique ont été développées récemment par deux équipes de recherche (Hevener *et al.*, 2003; Norris *et al.*, 2003). Dans l'étude de Hevener et al., l'inactivation de PPAR- $\gamma$  dans le muscle mène à la réduction de l'efficacité de la signalisation de l'insuline et de la captation du glucose dans le muscle. En conséquence du développement de la résistance à l'insuline musculaire, ces souris deviennent résistantes à l'insuline dans le tissu adipeux et dans le foie. Dans l'étude de Norris et al., l'inactivation de PPAR- $\gamma$  dans le muscle mène aussi à la résistance systémique à l'insuline. Cependant, aucune différence n'a été observée dans cette étude relativement à la captation du glucose par le muscle. Dans ce modèle, la résistance à l'insuline est observée principalement au niveau du foie. Bien que les conclusions de ces études soient en partie contradictoires, ces dernières indiquent clairement que la présence de PPAR- $\gamma$  dans le muscle joue un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie métabolique et de la sensibilité systémique à l'insuline (Gray *et al.*, 2005; Kintscher et Law, 2005). Afin de déterminer le rôle de PPAR- $\gamma$  du muscle dans les effets des agonistes PPAR- $\gamma$ , les souris déficientes en PPAR- $\gamma$  dans le muscle ont été traitées avec des TZD. Dans les deux études, le traitement de ces souris avec les TZD a permis d'améliorer les paramètres de la sensibilité à l'insuline, soulignant à nouveau le rôle majeur du tissu adipeux et du foie dans les effets des TZD.

## 3.6 Effets de la stimulation de PPAR-y sur le foie

À l'image du muscle, les niveaux de PPAR-y retrouvés dans le foie sont beaucoup plus faibles que ceux observés dans le tissu adipeux (Escher et al., 2001). Cette observation suggère que le tissu adipeux, et non le foie, représente la principale cible des agonistes PPAR-γ. Cependant, puisque le foie joue un rôle central dans le maintien de l'homéostasie du glucose et des lipides, il est probable que cet organe puisse être important dans les effets des agonistes PPAR-y. Il est toutefois extrêmement difficile de déterminer in vivo les effets directs des agonistes PPAR-y sur le métabolisme hépatique. En effet, l'impact de ces agonistes sur le foie peut être secondaire à l'amélioration de la sensibilité à l'insuline. Aussi, les effets des agonistes PPAR-y sur le foie peuvent découler des profondes modifications du métabolisme du tissu adipeux menant par exemple à la réduction des niveaux circulants d'AGL et à l'augmentation de l'adiponectine. Contrairement au muscle, beaucoup moins d'études utilisant des explants de tissu ou des cellules hépatiques ont été réalisées afin de déterminer les effets directs des agonistes PPAR-y sur le métabolisme du foie. Les modèles génétiques d'inactivation de PPAR-y dans le foie représentent la meilleure option afin de déterminer le rôle exact de ce récepteur dans les effets de ces agonistes.

#### 3.6.1 La signalisation de l'insuline et le transport/métabolisme du glucose

Quelques études ont permis d'observer une amélioration de la signalisation de l'insuline dans le foie de rongeurs lors du traitement avec des agonistes PPAR-y (Carpentier et al., 2002; Jiang et al., 2002). Généralement, ces études montrent une augmentation de l'effet de l'insuline sur la phosphorylation du récepteur de l'insuline, d'IRS-1, d'IRS-2 et de PKB/AKT et sur la réduction de l'activité de PTP-1B dans le foie des animaux traités avec des TZD. En accord avec l'amélioration de la signalisation de l'insuline, d'importantes modifications du métabolisme du glucose ont été observées dans le foie d'humains ou de rongeurs traités avec ces agonistes. Il a été démontré in vivo que les agonistes PPAR-y augmentent la captation du glucose par le foie (Iozzo et al., 2003). L'augmentation de la captation et de la rétention du glucose dans le foie en réponse aux agonistes PPAR-y a été associée à la stimulation de l'expression de GLUT-2 et de la glucokinase (GK) (Way et al., 2001b; Kim et Ahn, 2004). Un PPRE fonctionnel a été identifié dans le promoteur de ces gènes (Kim et al., 2000; Kim et al., 2004). L'activité de la glycogène synthase (GS) est aussi stimulée dans le foie de rats traités avec ces agonistes, ce qui favorise la synthèse de glycogène et la rétention du glucose dans le foie (Inoue *et al.*, 1995). En plus de stimuler la captation du glucose, les agonistes PPAR-γ réduisent la production hépatique de glucose (Suter et al., 1992; Oakes et al., 1994; Carpentier et al., 2002; Bajaj et al., 2004; Gastaldelli et al., 2006b; Natali et Ferrannini, 2006). Cet effet, qui est principalement attribuable à une diminution de la gluconéogenèse, est considéré comme un important mécanisme par lequel les agonistes PPAR-y réduisent la glycémie (Gastaldelli et al., 2006a). La réduction de l'expression de la PEPCK et de la glucose-6 phosphatase (G6Pase), deux enzymes impliquées dans la gluconéogenèse, pourrait contribuer à réduire la production endogène du glucose par le foie lors de traitements avec les agonistes PPAR-γ (Way et al., 2001b). L'augmentation des niveaux circulants d'adiponectine, une adipokine reconnue pour diminuer la gluconéogenèse via l'inhibition de l'expression de ces gènes, pourrait être en cause dans ces effets des agonistes PPAR-γ (Combs et al., 2001). L'étroite corrélation entre les niveaux circulants d'adiponectine et la réduction de la production hépatique de glucose par les TZD supporte cette hypothèse (Bajaj et al., 2004; Gastaldelli et al., 2006a). De récents travaux dans lesquels des souris déficientes en adiponectine ont

été traités avec des TZD ont permis de confirmer le rôle de l'adiponectine dans les effets des TZD sur la production hépatique de glucose (Kubota *et al.*, 2006).

Des observations faites in vitro suggèrent que certains des effets positifs des agonistes PPAR-y sur le foie soient des conséquences indirectes de l'activation de PPAR-y dans le tissu adipeux. En effet, il a été observé que l'action des agonistes PPAR-y sur l'amélioration de la signalisation à l'insuline du foie se produit tardivement comparativement au tissu adipeux et au muscle (Jiang et al., 2002). Dans cette même étude, les effets positifs de l'agonisme de PPAR-y sur la signalisation à l'insuline sont observés dans des adipocytes en culture mais ne le sont pas dans des hépatocytes primaires. L'effet rapide des agonistes PPAR-y sur la réduction des AGL circulants (Way *et al.*, 2001b; Jiang et al., 2002), qui sont reconnus pour affecter négativement la signalisation à l'insuline, est perçu comme un mécanisme possible par lequel ces agonistes améliorent indirectement la signalisation à l'insuline du foie. Malgré ces observations qui montrent que les agonistes PPAR-γ agissent indirectement sur le foie, plusieurs évidences suggèrent tout de même que ces agonistes puissent avoir des effets directs. Par exemple, la stimulation de l'expression génique de GLUT2 (Kim et al., 2000) et de la GK (Kim et al., 2004), la réduction de l'expression de la PEPCK (Davies et al., 1999) et de la G6Pase (Davies et al., 1999) de même que la diminution de la gluconéogenèse (Raman et Judd, 2000) observées in vitro lors du traitement d'hépatocytes en culture montre que les agonistes PPAR-γ peuvent exercer certains effets directs sur le métabolisme du foie. D'autres études seront nécessaires afin de mieux comprendre comment l'agonisme de PPAR-γ influence le métabolisme du foie et dans quelle proportion les effets observés dans le foie sont secondaires à ceux induits dans le muscle et le tissu adipeux.

### 3.6.2 Les lipides du foie

De nombreuses études ont démontré que les agonistes PPAR-γ réduisent l'accumulation des TG, ou des dérivés lipidiques, dans le foie de rongeurs (Hockings *et al.*, 2003; Kuhlmann *et al.*, 2003; Ye *et al.*, 2004) ou d'humains (Mayerson *et al.*, 2002; Bajaj *et al.*, 2004; Tiikkainen *et al.*, 2004) traités avec ces molécules. Étrangement, quelques

études produites dans des modèles de souris d'extrême obésité ou de lipodystrophie ont fait mention d'une augmentation de l'accumulation des lipides hépatiques et du potentiel lipogène du foie lors de l'utilisation des TZD (Burant *et al.*, 1997; Chao *et al.*, 2000; Memon *et al.*, 2000). Ces observations doivent toutefois être interprétées avec discernement car des niveaux anormalement élevés de PPAR-γ sont retrouvés dans le foie stéatotique de ces souris. L'expression élevée de PPAR-γ dans le foie est reconnue pour favoriser l'accrétion des lipides dans cet organe (Gavrilova *et al.*, 2003; Matsusue *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2003). Heureusement, aucune augmentation de l'accumulation hépatique des lipides n'a été observée chez des humains obèses (Mayerson *et al.*, 2002; Tiikkainen *et al.*, 2004) ou lipodystrophiques (Yki-Jarvinen *et al.*, 2003; Prasithsirikul et Bunnag, 2004) traités avec des TZD. Au contraire, ces études montrent même que l'agonisme de PPAR-γ réduit la déposition des lipides dans le foie de ces patients. De plus, certaines études récentes ont même montré que les TZD ont des conséquences bénéfiques sur les paramètres histologiques et métaboliques du foie de patients atteints de stéatose hépatique non alcoolique (Belfort *et al.*, 2006).

Les mécanismes impliqués dans la réduction de l'accumulation des lipides au foie par les agonistes PPAR- $\gamma$  sont multiples. En premier lieu, la forte rétention des AG dans le tissu adipeux est perçue comme un important mécanisme par lequel ces agonistes réduisent les niveaux circulants d'AGL et leur accumulation dans le foie (Picard et Auwerx, 2002). L'effet des TZD sur la réduction de la masse adipeuse viscérale, qui est reconnue pour libérer beaucoup d'AGL vers le foie, pourrait aussi contribuer à réduire la déposition hépatique des lipides. La forte induction des niveaux circulants d'adiponectine par les agonistes PPAR- $\gamma$  est considérée comme un autre mécanisme important favorisant la réduction de l'accumulation hépatique des lipides et l'amélioration du métabolisme du foie (Berger et Moller, 2002). L'adiponectine, qui stimule la  $\beta$ -oxydation dans le foie par des mécanismes dépendants de l'AMPk, affecte fortement l'accumulation des lipides dans le foie (Yamauchi *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2003a). Chez l'homme, d'importantes corrélations entre l'augmentation des niveaux circulants d'adiponectine et la diminution des lipides hépatiques ont été décrites suite à l'utilisation d'agonistes PPAR- $\gamma$  (Bajaj *et al.*, 2004; Tiikkainen *et al.*, 2004).

Tel que discuté plus tôt, l'accumulation ectopique des graisses est un important facteur qui contribue au développement de la résistance à l'insuline. La diminution des lipides hépatiques par les agonistes PPAR-y favorise l'amélioration de la sensibilité à l'insuline du foie. Ces effets influencent à leur tour plusieurs aspect du métabolisme. En plus de réduire la production hépatique de glucose et la glycémie, la réduction des lipides hépatiques affecte fortement le métabolisme de l'insuline. Des études produites chez l'humain ont montré que la clairance de l'insuline est fortement associée aux niveaux de TG hépatiques (Goto et al., 1995). Il a été démontré que la rosiglitazone, qui réduit les TG hépatiques, augmente significativement la clairance de l'insuline par le foie (Tiikkainen et al., 2004). Cet effet contribue probablement à la réduction de l'insulinémie observée lors de l'utilisation des TZD. Tel que décrit dans la section 1, le foie est un organe jouant un rôle majeur dans le métabolisme des TG. Il est connu que la sécrétion hépatique des VLDL est intimement liée aux TG accumulés dans le foie (Adiels *et al.*, 2006). La réduction des TG hépatiques et de la sécrétion des TG par le foie est ainsi percue comme un mécanisme potentiel pouvant contribuer à la diminution de la triglycéridémie lors du traitement avec des agonistes PPAR-y. Cependant, bien que plusieurs études chez les rongeurs aient observé une diminution de la sécrétion des TG par les agonistes PPAR-γ (Chicco et al., 2000; Oakes et al., 2001; Carpentier et al., 2002), d'autres études n'ont vu aucune différence (Kaumi et al., 1996; Lefebvre et al., 1997; Oakes et al., 1997). Des études supplémentaires sont requises afin de préciser le rôle du foie dans la réduction de la triglycéridémie induite par les agonistes PPAR-y.

#### 3.6.3 Les modèles génétiques

Afin de déterminer le rôle de PPAR-γ du foie dans le maintien de l'homéostasie métabolique et dans les effets des agonistes PPAR-γ, deux équipes de recherche ont développé des modèles murins déficients en PPAR-γ dans le foie. Ces modèles ont été développés chez la souris obèse *ob/ob* (Matsusue *et al.*, 2003) et la souris lipodystrophique A-ZIP/F1 (Gavrilova *et al.*, 2003). Généralement, ces études montrent que l'inactivation de PPAR-γ du foie réduit l'expression des gènes codant pour des protéines impliquées dans la lipogenèse, ce qui réduit l'accrétion des lipides dans le foie. Malgré ces effets positifs,

l'inactivation de PPAR- $\gamma$  du foie exacerbe l'hyperlipidémie, réduit la clairance des TG et augmente la résistance périphérique à l'insuline. Bien que les mécanismes impliqués dans cette détérioration du profil métabolique soient obscurs, ces résultats montrent tout de même que PPAR- $\gamma$  du foie joue un rôle central dans le métabolisme hépatique des lipides et dans l'équilibre métabolique. Le maintien de l'efficacité des TZD dans les souris *ob/ob* ou sauvages n'exprimant pas PPAR- $\gamma$  dans le foie a permis de démontrer que PPAR- $\gamma$  du foie n'est pas nécessaire aux effets bénéfiques de ces agonistes (Matsusue *et al.*, 2003).

# 3.7 Effets de la stimulation de PPAR-y sur les cellules-ß du pancréas

## 3.7.1 Effets généraux

Il est généralement accepté que la dysfonction et la réduction de la masse des cellules- $\beta$  du pancréas contribuent à la déficience en insuline observée chez les patients diabétiques de type 2. Les traitements visant la préservation des cellules- $\beta$  du pancréas et la restauration de la sécrétion de l'insuline sont perçus comme des éléments pouvant aider la prévention et le traitement du diabète de type 2 (Kahn, 2003).

L'ARNm et la protéine de PPAR- $\gamma$  sont tous deux retrouvés dans les cellules- $\beta$  du pancréas (Dubois *et al.*, 2000). Plusieurs études produites in vivo montrent que la stimulation de PPAR- $\gamma$  améliore la fonction et prévient la défaillance des cellules- $\beta$  du pancréas. Les TZD ont bien démontré être en mesure de stimuler la sécrétion d'insuline chez des patients insulino-résistants (Cavaghan *et al.*, 1997) ou diabétiques (Prigeon *et al.*, 1998; Kubo, 2002; Miyazaki *et al.*, 2002b) et dans de nombreux modèles murins diabétiques (de Souza *et al.*, 1995; Diani *et al.*, 2004). Chez les rongeurs, il a été observé que l'agonisme de PPAR- $\gamma$  augmente la masse des cellules- $\beta$  du pancréas en prévenant l'apoptose de ces cellules (Finegood *et al.*, 2001). Les dérivés lipidiques qui s'accumulent dans les cellules- $\beta$  du pancréas sont reconnus pour favoriser l'apoptose cellulaire (Unger et Zhou, 2001). Ainsi, il est possible que l'activation de PPAR- $\gamma$  dans les tissus périphériques puisse indirectement contribuer à réduire l'apoptose des cellules- $\beta$  du pancréas en réduisant

la lipotoxicité. Cette hypothèse est supportée par le fait que la troglitazone n'exerce aucun effet anti-apoptotique dans des cellules- $\beta$  cultivées in vitro en présence d'AG (Cnop *et al.*, 2002). En plus de ces effets sur l'apoptose, la stimulation de PPAR- $\gamma$  contribue à maintenir la masse des cellules- $\beta$  du pancréas en améliorant la sensibilité à l'insuline dans le muscle et dans le foie. La réduction de la glycémie induite par l'agonisme de PPAR- $\gamma$  contribue à réduire la défaillance et l'apoptose des cellules- $\beta$  du pancréas en réduisant le stress associé à la surproduction d'insuline (Buchanan *et al.*, 2002).

Plusieurs études ont montré que les agonistes PPAR-y exercent des effets directs sur le métabolisme des cellules- $\beta$  du pancréas. En premier lieu, contrairement à l'étude de Cnop et al., plusieurs équipes ont observé un effet anti-apoptotique des agonistes PPAR-y sur des cellules-β du pancréas cultivées in vitro. Dans ces études, la stimulation de PPAR-γ réduit l'apoptose des cellules- $\beta$  induite par l'accumulation de polypeptide amyloïde (Lin *et* al., 2005a), par l'hyperglycémie (Zeender et al., 2004), par l'interleukine 1ß (IL-1ß) (Shimabukuro et al., 1997; Zeender et al., 2004) et par les AG (Shimabukuro et al., 1998). Des études supplémentaires sont toutefois requises afin de déterminer si ces observations faites in vitro sont représentatives des événements qui se produisent dans des modèles animaux ou humains traités avec des agonistes PPAR-y. En plus des effets sur l'apoptose, les agonistes PPAR-y stimulent l'expression de GLUT2 et de la GK dans les cellules- $\beta$  en culture. Un PPRE fonctionnel a été identifié dans le promoteur de ces gènes (Kim et al., 2000; Kim et al., 2002a). L'augmentation de l'expression de ces protéines pourrait stimuler l'entrée du glucose et déclencher les étapes initiales menant à la libération de l'insuline (Kim et Ahn, 2004). Toutes ces observations faites in vivo et in vitro supportent un rôle, direct et/ou indirect, des agonistes PPAR- $\gamma$  sur la protection des cellules- $\beta$ . Ces effets contribuent probablement à l'amélioration de l'homéostasie du glucose observée chez les patients insulino-résistants et diabétiques traités avec ces agonistes.

# 3.8 Résumé

Tel que décrit tout au long de la section 3, l'activation de PPAR-γ induit de profondes modulations dans le métabolisme du tissu adipeux, du muscle squelettique, du

foie et des cellules- $\beta$  du pancréas. Ces modulations induites par les agonistes PPAR- $\gamma$  influencent chacunes à leur façon la sensibilité à l'insuline et le métabolisme du glucose et des lipides. La figure 4 résume les principaux effets des agonistes PPAR- $\gamma$  sur les tissus de même que l'impact de ces modifications sur le métabolisme du glucose et des lipides.



# Figure 4. Représentation schématisée des principaux effets des agonistes PPAR-γ sur les tissus et de l'impact de ces modifications sur le métabolisme du glucose et des lipides.

La stimulation de PPAR-y induit un remodelage du tissu adipeux en favorisant l'apoptose des grosses cellules adipeuses et la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes matures. Parallèlement, l'agonisme de PPARy augmente l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la captation, la synthèse et l'estérification des AG, ce qui favorise la rétention des AGL dans le tissu adipeux. Chez l'humain, les TZD sont reconnus pour réduire l'accumulation des graisses dans le tissu adipeux viscéral, un dépôt intimement relié à plusieurs problèmes métaboliques. La stimulation de PPAR-y augmente la biogenèse des mitochondries dans le tissu adipeux, ce qui pourrait contribuer à réduire les AGL circulants. Les agonistes PPAR-y stimulent l'expression et l'activation de nombreuses protéines impliquées dans la signalisation de l'insuline et dans le transport du glucose. En plus d'augmenter la captation du glucose par le tissu adipeux, cet effet contribue à réduire la lipolyse du tissu adipeux. La stimulation de PPAR-y réduit l'infiltration des macrophages dans le tissu adipeux de même que la production des cytokines pro-inflammatoires. La fonction endocrinienne du tissu adipeux est altérée en réponse aux agonistes PPAR-γ. La diminution des AGL, du TNF-α, de RBP-4 et l'augmentation de l'adiponectine en circulation améliorent le métabolisme des tissus périphériques. Bien que l'agonisme de PPAR-y ait des effets directs sur le foie, le muscle et le pancréas, les effets des agonistes PPAR-y sur ces adipokines sont perçus comme des éléments clés favorisant l'amélioration du métabolisme de ces tissus. L'amélioration de la sensibilité à l'insuline dans ces tissus permet la réduction de l'insulinémie et de la glycémie. La diminution de la triglycéridémie est causée par l'augmentation de l'hydrolyse des TG dans le tissu adipeux et peut-être aussi par la réduction de la sécrétion des TG par le foie. Pour des détails relatifs aux abréviations, voir la section Liste des abréviations.

# PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS DES TRAVAUX

## Problématique

L'accumulation des graisses dans les dépôts adipeux blancs viscéraux est associée à une détérioration du profil métabolique pouvant conduire à la résistance à l'insuline, au diabète de type 2, aux dyslipidémies, à l'hypertension et aux maladies cardiovasculaires.

Les agonistes PPAR- $\gamma$  de la classe des TZD utilisés présentement en clinique pour le traitement de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2 ont démontré être en mesure de diminuer l'accumulation des graisses dans les dépôts adipeux blancs viscéraux et d'augmenter leur déposition dans les dépôts adipeux blancs sous-cutanés. La nature plus inerte et la localisation périphérique du tissu adipeux sous-cutané font en sorte que ce tissu n'est que très peu impliqué dans la détérioration du profil métabolique. L'augmentation de la rétention des lipides par le tissu adipeux sous-cutané est perçue comme étant un élément clé pouvant protéger les tissus périphériques (muscles squelettiques, foie, pancréas) contre le développement de la résistance à l'insuline induite par la déposition ectopique des lipides.

En conséquence, le remodelage de la masse adipeuse blanche favorisant la diminution de l'accumulation des graisses dans les dépôts viscéraux et l'augmentation de la déposition dans les dépôts périphériques représente un mécanisme possible par lequel les agonistes PPAR- $\gamma$  contribuent à l'amélioration du profil métabolique. Bien que les effets des agonistes PPAR- $\gamma$  sur la redistribution des graisses soient bien caractérisés, il n'en demeure pas moins que les mécanismes en cause dans cet effet ne sont pas encore connus. Le fait que les TZD induisent des effets variables sur la masse adipeuse viscérale chez les rongeurs a compliqué jusqu'ici l'étude des mécanismes en cause dans la redistribution du tissu adipeux.

En plus de leurs effets sur l'amélioration de la sensibilité à l'insuline et sur le remodelage de la masse adipeuse blanche, les agonistes PPAR- $\gamma$  sont reconnus pour

améliorer le profil lipidique. La diminution des TG circulants lors de traitement avec ces agonistes a été associée à l'augmentation de l'hydrolyse intravasculaire des TG dans le tissu adipeux et à la diminution de la sécrétion des TG. L'activation de la LPL du tissu adipeux par les agonistes PPAR- $\gamma$  est considérée comme un élément important favorisant la réduction de la triglycéridémie. Jusqu'à ce jour, la contribution relative des divers tissus adipeux et du foie à l'effet hypotriglycéridémiant des agonistes PPAR- $\gamma$  n'a pas été déterminée. Aussi, l'impact de l'activation différentielle de la LPL sur le remodelage du tissu adipeux blanc n'est toujours pas connu.

Les agonistes PPAR- $\gamma$  sont reconnus pour diminuer fortement les niveaux d'AGL plasmatiques. Cet effet est aujourd'hui considéré comme un facteur important contribuant à l'amélioration de la sensibilité à l'insuline par ces agonistes. Les mécanismes impliqués dans la réduction des AGL par les agonistes PPAR- $\gamma$  ne sont toujours pas clairement identifiés. Bien qu'il ait été bien démontré que ces molécules augmentent la rétention des AG dans les adipocytes, des observations faites dans certaines études suggèrent que la lipolyse du tissu adipeux puisse être augmentée et non réduite par la stimulation de PPAR- $\gamma$ . L'impact des agonistes PPAR- $\gamma$  sur la lipolyse et sur l'expression des principaux gènes contrôlant ce sentier métabolique n'a pas été formellement étudié. De plus, les effets des agonistes PPAR- $\gamma$  sur la lipolyse n'ont jamais été mesurés dans les différents tissus adipeux blancs.

## **Objectifs des travaux**

- Déterminer les mécanismes par lesquels l'agonisme de PPAR-γ favorise le remodelage de la masse adipeuse blanche.
- Comprendre comment les modulations du métabolisme du tissu adipeux contribuent à l'amélioration de la lipémie lors de traitement avec des agonistes PPAR-γ.

# **Objectifs spécifiques**

- Mesurer dans le tissu adipeux sous-cutané et dans le tissu adipeux viscéral les effets de la stimulation de PPAR-γ sur les déterminants métaboliques impliqués dans la captation, l'estérification et la déposition des graisses.
- Évaluer dans le tissu adipeux sous-cutané et dans le tissu adipeux viscéral les effets de la stimulation de PPAR-γ sur les déterminants métaboliques impliqués dans la libération des AGL.
- Déterminer dans le tissu adipeux sous-cutané et dans le tissu adipeux viscéral les effets de la stimulation de PPAR-γ sur les déterminants métaboliques impliqués dans l'oxydation des substrats et la dissipation de l'énergie.
- Déterminer les mécanismes primaires à la base des effets hypotriglycéridémiants des agonistes PPAR-γ et évaluer la contribution des divers tissus adipeux à ces effets.
- 2.b) Évaluer l'impact des agonistes PPAR-γ sur la lipolyse des divers tissus adipeux blancs et déterminer la contribution de ces modulations sur la réduction d'AGL induite par ces agonistes.

# CHAPITRE 1

# PPAR-γ ACTIVATION MEDIATES ADIPOSE DEPOT-SPECIFIC EFFECTS ON GENE EXPRESSION AND LIPOPROTEIN LIPASE ACTIVITY Mechanisms for modulation of postprandial lipemia and differential adipose accretion

Mathieu LAPLANTE<sup>1</sup>, Henrike SELL<sup>1</sup>, Karen L. McNAUL<sup>2</sup>, Denis RICHARD<sup>1</sup>, Joel P.BERGER<sup>2</sup> and Yves DESHAIES<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Anatomy and Physiology, Laval Hospital Research Center, School of Medicine, Laval University, Québec, Qc, Canada, G1K 7P4

<sup>2</sup> Department of Metabolic Disoders, Merck Research Laboratories, Rahway, NJ, USA, 07065-900

> "Copyright © 2003 American Diabetes Association From Diabetes<sup>®</sup>, Vol. 52, 2003; 291-299 Reprinted with permission from *The American Diabetes Association*."

article publié dans Diabetes 52:291-299, 2003

## AVANT-PROPOS

Ce travail, réalisé sous la direction du Dr. Yves Deshaies, a été rendu possible grâce à la collaboration de Henrike Sell (étudiante à la maîtrise avec le Dr. Denis Richard), Karen L. McNaul (Merck Laboratories), du Dr. Denis Richard (CRHL) et du Dr. Joel P. Berger (Merck Laboratories). La récolte de données par Henrike Sell (analyse microscopique) et Karen L. McNaul (mesure de l'expression génique par PCR en temps réel) de même que la collaboration technique de Josée Lalonde et de Yves Gélinas, représentent des facteurs déterminants qui ont conduit à la publication du présent article. L'utilisation du COOH a été rendue possible grâce au Dr. Joel P. Berger, qui a de plus grandement alimenté les discussions lors de l'écriture du manuscrit. Cette étude implique mon entière participation quant à la réalisation de l'ensemble des étapes menant à la publication de cet article, soit la planification, l'exécution du protocole, la mesure des variables plasmatiques et tissulaires et l'analyse statistique. Suite aux corrections du directeur, l'article a été révisé par l'ensemble des coauteurs et a été soumis aux éditeurs de la revue *Diabetes*. Cet article a été accepté pour fin de publication en octobre 2002 et il a été publié en février 2003.

# RÉSUMÉ

Cette étude a été réalisée afin de déterminer si les effets des agonistes des récepteurs nucléaires activés par les proliférateurs des peroxysomes-y (PPAR-y) sur la redistribution du tissu adipeux (sous-cutané [TASC] vs. viscéral [TAV]) sont associés à des changements dans l'expression de la lipase lipoprotéique (LPL) ou d'autres gènes impliqués dans le métabolisme des lipides. Ces travaux ont aussi été réalisés afin de déterminer dans quelle mesure les changements de l'activité de la LPL induits par la stimulation de PPAR-y affectent la triglycéridémie. Des rats ont été nourris durant 3 semaines avec une diète standard ou avec une diète promouvant l'obésité. Ces animaux ont été traités ou non avec l'agoniste non-thiazolidinedione COOH. Les effets de l'agoniste furent essentiellement les mêmes dans les deux cohortes alimentaires. Le COOH n'a pas affecté le poids corporel des rats, mais a augmenté le poids du TASC (inguinal) par deux fois et réduit le poids du TAV (rétropéritonéal) de moitié. Des modulations des niveaux d'ARNm de la 11ßhydroxystéroïde déshydrogénase (11β-HSD-1) et de la protéine découplante-1 (UCP-1) pouvant expliquer la redistribution du tissu adipeux ont été observées. L'agoniste COOH a augmenté le poids du tissu adipeux brun (BAT) et l'activité de la LPL du BAT entre 5 et 8 fois. Dans les animaux réalimentés avec la diète standard après un jeûne de 24 heures, le COOH a réduit l'insulinémie de moitié. L'agoniste a augmenté l'expression et l'activité de la LPL dans le TASC, mais n'a eu aucun effet dans le TAV. L'augmentation de 2 à 3 fois des niveaux de triglycérides (TG) circulants observée en réponse à la prise alimentaire a été littéralement abrogée par le traitement avec le COOH. Cet effet est probablement attribuable à la forte augmentation de l'activité de la LPL dans le TASC et le BAT. Ainsi, l'agoniste COOH a eu des effets différentiels puissants sur le métabolisme du tissu adipeux et sur l'accrétion des lipides qui ont pu favoriser l'amélioration de la triglycéridémie postprandiale. La régulation différentielle de l'expression de la LPL, de la 11\beta-HSD-1 et d'UCP-1 pourrait être en cause dans ces effets.

#### ABSTRACT

This study sought to determine whether the adipose depot-specific (subcutaneous [SF] vs. visceral [VF]) action of peroxisome proliferator activated receptor-y (PPAR-y) agonists on fat deposition extends to the expression of lipoprotein lipase (LPL) and other key adipose lipid metabolism genes, and whether changes in LPL impact triglyceridemia. Rats were fed a standard diet or an obesity-promoting diet for 3 weeks, with or without treatment with COOH, a non-thiazolidinedione PPAR-y agonist. Treatment effects were essentially similar in both dietary cohorts. COOH did not affect weight gain, but increased SF (inguinal) fat mass twofold and reduced VF (retroperitoneal) accretion by half. Corresponding depot-specific alterations were observed in mRNA levels of the glucocorticoid-activating enzyme 11-\beta-hydroxysteroid dehydrogenase-1 (11\beta-HSD-1) and the thermogenic modulator uncoupling protein 1 (UCP-1). COOH increased brown adipose tissue (BAT) weight and LPL availability by five- to eightfold. In rats refed standard diet after a 24-h fast, COOH reduced the insulin excursion by half. The agonist increased SF LPL activity and mRNA levels, but had no effect on VF LPL. The two- to threefold postprandial increase in plasma triglycerides (TGs) was abrogated in COOH-treated rats, likely in part because of increased LPL in SF and BAT. Thus PPAR-y agonist treatment had a powerful, site-specific effect on adipose metabolism and lipid deposition, and greatly impacted the postprandial handling of TG-rich lipoproteins. These depot-specific effects may be mediated by differential regulation of key metabolic genes, including LPL, 11β-HSD-1, and UCP-1.

#### INTRODUCTION

Elevated postprandial triglyceridemia is considered to be highly atherogenic and is frequently associated with obesity, particularly its visceral form (1-3). Endothelium-bound lipoprotein lipase (LPL; EC 3.1.1.34) hydrolyzes circulating triglycerides (TGs) (4) and is therefore a key modulator of postprandial triglyceridemia (5). Recently, it was shown that white adipose tissue (WAT) LPL activity becomes transiently resistant to insulin, the necessary and sufficient postprandial activator of adipose LPL (6), in both a genetic and a dietary model of the resistance of glucose metabolism to insulin (insulin resistance) (7,8). In the dietary model, the blunted postprandial increase in adipose LPL has been associated with hypertriglyceridemia without changes in intravascular TG input, which would therefore suggest a causal role for LPL.

Peroxisome proliferator activated receptor-y (PPAR-y) is a ligand-activated nuclear receptor whose 2 form is highly expressed in WAT, where it regulates the expression of a number of genes involved in lipid metabolism, including LPL. The net result of PPAR-y activation is a remodeling of WAT with a larger number of smaller adipocytes (9-12). PPAR-y activation also efficaciously ameliorates whole-body and muscle insulin resistance (9,13,14) and hypertriglyceridemia (10,15). Synthetic thiazolidinedione (TZD) PPAR-y ligands are used clinically to treat insulin resistance and type 2 diabetes (14,16). At least part of the insulin-sensitizing action of PPAR-y agonists is thought to derive from enhanced lipid retention by WAT that reduces exposure of insulin-sensitive tissues to fatty acids. Because PPAR-y agonists positively modulate WAT LPL expression, the first objective of the present study was to assess whether increased transcription of the LPL gene by a PPAR-γ agonist would influence LPL activity and thereby impact postprandial triglyceridemia. PPAR-y agonists have been reported to exert a depot-specific action on lipid accumulation in subcutaneous fat (SF) and visceral fat (VF) in humans (17-20). Because LPL acts as a gateway for the entry of TG-derived fatty acids into WAT, the second objective of the study was to verify whether there existed some depot specificity in the PPAR- $\gamma$ -mediated modulation of LPL expression, as well as that of other PPAR- $\gamma$ responsive enzymes and modulators of adipose lipid metabolism (21,22). These included

 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase-1 (11 $\beta$ -HSD-1), which converts inactive glucocorticoids into potent glucocorticoid receptor agonists in WAT, and uncoupling protein 1 (UCP-1), which dissipates energy from fatty acid oxidation as heat in brown adipose tissue (BAT).

The above objectives were pursued by chronically treating rats with the non-TZD PPAR-γ agonist COOH, which bears a carboxylic acid pharmacophore in place of the TZD moiety found in glitazones. As shown earlier (23), this non-TZD compound is a potent and highly selective PPAR-γ full agonist with many features (except structure) similar to rosiglitazone. The response of WAT LPL to refeeding in 24-h–fasted, insulin-sensitive, and diet-induced obese, insulin-resistant rats (7,24–27) was quantified. The length of fasting was selected for its ability to reduce both insulinemia and adipose LPL of obese rats to that of lean animals (7), thereby allowing assessment of LPL responsiveness to food intake against similar fasting backgrounds. Pelleted standard diet was given to both dietary cohorts during refeeding to allow comparison of the LPL response to an identical nutritional stimulus.

#### RESEARCH DESING AND METHODS

Animals and treatments. Male SD rats (n 96; 90-100 g) were purchased from Charles River Laboratories (St. Constant, Canada) and housed individually in stainless steel cages in a room kept at 23±1°C with a 12:12 h light-dark cycle (lights on at 20:00 h). The animals were cared for and handled in conformance with the Canadian Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, and the protocols were approved by our institutional animal care committee. For the first 2 days, rats had free access to tap water and a stock diet (Charles River Rodent Diet #5075; Ralston Products, Woodstock, Canada; digestible energy content: 12.9 kJ/g). Then rats were divided into two groups: 48 rats were given the ground stock diet (standard diet) and the remaining 48 animals were fed a purified high-sucrose, high-fat (HSHF) diet, the composition of which is detailed elsewhere (7). The HSHF diet rapidly induces insulin resistance in peripheral tissues, including adipose tissue and muscles (24,28). Half of the animals in each dietary cohort were given the non-TZD PPARy agonist COOH [2-(2-(4-phenoxy-2-propylphenoxy)ethyl)indole-5-acetic acid] as an adjunct to their diet at a dosage of 30 mg·kg<sup>-1</sup>day<sup>-1</sup> for the entire feeding period of 3 weeks. The amount of COOH was adjusted twice weekly to the average consumption of each diet. At the end of the treatment, the animals were killed 1 h after the beginning of the lighted period, after either a 24-h fast or a 24-h fast followed by 1, 3, or 6 h of refeeding, but within the same 3-h period of the day to allow comparison of groups at the same point in the circadian glucocorticoid rhythm. All rats were refed pelleted standard diet, without the agonist, to allow comparison of treatment-related changes independent of meal size and composition (7,8).

**Plasma and tissue sampling.** Rats were killed by decapitation. Their blood was centrifuged (1,500g, 15 min at 4°C) and the plasma was stored at  $-70^{\circ}$ C until later biochemical measurements. Inguinal (SF) and retroperitoneal (VF) WAT and interscapular BAT were excised and weighed. Tissue samples were homogenized and processed exactly as described earlier (6), and were stored at  $-70^{\circ}$ C until measurement of LPL activity.

**Plasma determinations.** Plasma glucose concentrations were measured by the glucose oxidase method with the Beckman glucose analyzer. Insulin and corticosterone levels were determined by radioimmunoassay (RIA; Linco Research, St. Charles, MO) with rat insulin and corticosterone as standards, respectively. Plasma TGs were measured by an enzymatic method (Roche Diagnostics, Montreal, Canada), as were plasma nonesterified fatty acids (NEFAs; Wako Pure Chemical Industries, Richmond, VA).

**Tissue lipoprotein lipase activity.** Enzyme activity in adipose tissues was determined exactly as described (6). Briefly, tissue homogenates were incubated with a substrate mixture containing [carboxyl-<sup>14</sup>C]triolein, and NEFAs released by LPL were separated and counted. LPL activity was expressed as microunits ( $1\mu U = 1$  mol NEFA released per hour of incubation at 28°C). The interassay coefficient of variation was 4.1%, and was determined using bovine skim milk as a standard source of LPL. To account for diet- and agonist-induced differences in tissue TG content, data are expressed as LPL activity per gram of total tissue protein (29). LPL activity per total adipose depot is depicted for some time points to illustrate its global tissue availability.

**RNA** isolation and analysis. Total RNA was prepared from WAT of rats chronically fed the standard diet, both in the fasted state and after refeeding for 6 h, using the Ultraspec Total RNA Isolation Reagent (Biotecx, Houston, TX) and the RNAeasy 96 total RNA isolation kit (Qiagen, Valencia, CA) according to the manufacturers' protocols. RNA concentration was estimated from absorbance at 260 nm. The expression level of specific mRNAs was quantitated using quantitative fluorescent real-time PCR. RNA was first reverse transcribed using random hexamers according to the manufacturer's protocol (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). Amplification of each target cDNA was then performed with TaqMan PCR Reagent Kits in the ABI Prism 7700 Sequence Detection System according to the manufacturer's protocols (PE Applied Biosystems). Primer/probe sets were selected using the Primer Express program (PE Applied Biosystems) and were synthesized by the same company. The levels of mRNA were normalized to the amount of 18S ribosomal RNA (primers and probes from PE Applied Biosystems) detected in each sample. Results are expressed as target mRNA/18 S mRNA. The primer/probe sets in Table

1 were used for the amplification step.

Statistical analysis. Data are presented as means  $\pm$  SE. The main and interactive effects of the chronic diet and agonist on variables related to food intake and body and organ weight were analyzed by a 2 x 2 (standard diet/HSHF diet and control/COOH) factorial ANOVA. The main and interactive effects of the chronic diet, agonist, and nutritional status on variables measured at various times of refeeding were analyzed separately for the effect of diet and the agonist. The effect of diet was analyzed by a 2 x 4 (standard diet/HSHF diet and 0/1/3/6 h of refeeding) factorial ANOVA in the control and COOH-treated cohorts separately. Likewise, the effect of agonist treatment was analyzed by a 2 x 4 (control/COOH and 0/1/3/6 h of refeeding) factorial ANOVA in the standard diet fed and HSHF diet–fed cohorts separately. When justified by a significant treatment interaction, differences between individual group means were analyzed by Fisher's protected least squares difference (PLSD) test. The effects of agonist treatment (control, COOH) and dietary status (fasted, 6-h refed) on mRNA levels in adipose depots (inguinal, retroperitoneal) were compared according to a 2 x 2 x 2 factorial ANOVA. Differences were considered statistically significant at P < 0.05.

#### RESULTS

Cumulative energy intake was larger (17%) in the HSHF diet–fed than in the standard diet fed cohort, and treatment with the PPAR- $\gamma$  agonist slightly increased food intake (7%) independent of diet (Table 2). Final body weight and weight gain were proportionally increased (gain of 15%) by the HSHF diet, but not by the agonist, which only tended to increase body weight gain (5%; *P* = 0.06). Food efficiency (grams of weight gain per megajoule energy ingested) was not affected by diet or COOH. Upon refeeding, the HSHF diet–fed rats unexpectedly ingested less diet (-3.5 g) than did those chronically fed the standard diet, whereas PPAR- $\gamma$  agonist treated rats ingested more food acutely (+2.5 g). Over 6 h of refeeding standard diet, rats ingested ~67% of their daily ad libitum food intake.

As depicted in Table 3, the inguinal depot weight was increased 61% in the HSHF diet cohort compared to in the standard diet-fed cohort, whereas COOH treatment increased inguinal weight by 46% independent of diet. Total protein content of the depot was increased 21% by diet, and was doubled by PPAR-y agonist treatment in both dietary cohorts. Therefore, the metabolic (protein) mass of the tissue was increased by both the HSHF diet and the agonist, but more so by the latter, with these effects being additive. In sharp contrast, diet and the agonist had opposite effects on retroperitoneal adipose depot weight. Retroperitoneal weight was roughly doubled by ingestion of the HSHF diet compared to standard diet, whereas COOH treatment reduced retroperitoneal pad accretion by 28% in standard diet fed rats, and even more so (65%) in HSHF diet rats (diet X agonist interaction). Total protein content of VF was increased ~60% by the HSHF diet in both control and treated rats, and protein content was increased by the PPAR-y agonist by the same amount in both dietary cohorts. Diet and agonist effects were fully additive. Inasmuch as the inguinal and retroperitoneal fat depots are representative of SF and VF, respectively, in general, the sum of the weight of the two depots and their weight ratio were computed to obtain a crude representation of total body fat and distribution. As is shown in Table 3, chronic consumption of the HSHF diet roughly doubled the sum of the two depots, whereas the PPAR-y agonist did not affect this sum. The inguinal/retroperitoneal weight ratio was the same in both dietary cohorts, but was doubled in COOH-treated animals compared to their untreated counterparts regardless of diet. Therefore, the HSHF diet increased fat deposition equally in both SF and VF, whereas the PPAR-γ agonist brought about a redistribution of fat deposition toward SF at the expense of VF. Diet and agonist treatment interacted with BAT and protein content. The HSHF diet did not increase BAT weight and protein in untreated rats, but did in COOH-treated animals (weight, +41%; protein, +18%). Similarly, COOH increased BAT weight in both dietary cohorts, but slightly more so in HSHF diet-fed (weight: 7.7-fold; protein: 5.1-fold) than in standard diet fed animals (weight, 6.4-fold; protein, 4.6-fold).

As shown in Fig. 1, diet exerted a significant effect (P < 0.002) on glycemia, with glucose being higher in HSHF diet-fed than in standard diet fed animals, but there was no diet-related difference in glucose levels in COOH-treated rats (Fig. 1*A*). Overall, the PPAR- $\gamma$  agonist slightly raised plasma glucose levels (P < 0.02) in standard diet-fed rats, but no between-group difference was significant at any individual time point (including fasting). The agonist did not affect plasma glucose in HSHF diet-fed rats. The nature of the chronic diet did not influence fasting or postprandial plasma insulin levels in either control or COOH-treated rats (Fig. 1*B*). The PPAR- $\gamma$  agonist did not affect fasting insulinemia in either dietary cohort, but greatly reduced the postprandial insulin rise in both groups (0.03 > P < 0.0001).

The postprandial increase in TG upon refeeding with the standard diet was of a lesser magnitude in rats fed the HSHF diet long term than in those on the standard diet (Fig. 2*A*). COOH abrogated the postprandial TG increase in both dietary cohorts, and even reduced postprandial TG levels below fasting values in the cohort on the standard diet (agonist X time interaction). As expected, plasma NEFA levels were largely reduced upon refeeding, but less so in HSHF diet–fed than in standard diet fed rats with or without COOH (diet X time interaction, 0.02 > P < 0.008) (Fig. 2*B*). The postprandial fall in plasma NEFA levels was not affected by COOH in standard diet fed rats, but was potentiated by the agonist in HSHF diet–fed rats (agonist X time interaction in HSHF diet–fed rats (agonist X time interaction in HSHF diet–fed rats (agonist X time interaction in HSHF diet–fed rats, P < 0.006).

The typical adipocyte remodeling elicited by PPAR- $\gamma$  agonist treatment was confirmed in the present study, as both inguinal and retroperitoneal depots displayed an increased number of small adipocytes and fewer large adipocytes (data not shown). In the standard diet fed cohort, PPAR-y agonist treatment increased inguinal LPL activity at all time points, including in the fasted state, whereas in the HSHF diet-fed rats, COOH prolonged LPL activation until the 6-h time point without affecting enzyme activity earlier during the refeeding period (Fig. 3A). Diet interacted with time on retroperitoneal LPL activity, as evidenced by the fact that LPL was increased twofold by standard diet refeeding in rats fed that diet chronically, but was only minimally affected in HSHF diet-fed animals, thereby indicating insulin resistance (Fig. 3B). COOH had no effect on retroperitoneal LPL regardless of the chronic diet. Such depot specificity was independent of the time that elapsed after COOH was last ingested, as it was identical to that observed in fasted and postprandial rats treated short-term with COOH (not shown). To illustrate the diet and agonist effects on global LPL availability, LPL activity per total depot in the fasted state is depicted in Fig. 3C. As expected after the 24-h fast, total inguinal LPL activity was identical in both dietary cohorts. PPAR-y agonist treatment increased total inguinal LPL nearly fourfold independently of diet. In the retroperitoneal depot, total LPL activity remained unaffected by diet (P = 0.06) and COOH treatment.

As is shown in Fig. 4*A*, refeeding did not alter BAT LPL regardless of the chronic diet, but COOH slightly increased postprandial LPL in standard diet fed rats (P < 0.02). However, fasting enzyme activity per total depot was enhanced five- to eightfold by the PPAR- $\gamma$  agonist in both dietary cohorts (Fig. 4*B*). In the present study, diet and agonist effects on skeletal muscle (soleus and vastus lateralis) LPL activity were minor and not significant (data not shown). Refeeding decreased corticosterone levels in all groups (Fig. 5). Fasting corticosterone levels in standard diet fed rats were not significantly affected by COOH, whereas the fasting hypercorticosteronemia present in rats chronically fed the HSHF diet was abrogated by chronic PPAR- $\gamma$  agonist treatment. Overall, the PPAR- $\gamma$  agonist potentiated the refeeding-induced reduction in corticosterone (agonist X time interaction, 0.02 > P < 0.003).

Chronic COOH treatment increased LPL mRNA in inguinal SF, but not in retroperitoneal VF (agonist X depot interaction, P < 0.004) regardless of the nutritional status, which, as expected, also had no effect (Fig. 6*A*). In sharp contrast, the PPAR- $\gamma$  agonist did not affect 11 $\beta$ -HSD-1 mRNA expression in SF, but greatly decreased it in VF (agonist X depot interaction, P < 0.02), again independently of nutritional status (Fig. 6*B*). UCP-1 mRNA was affected by adipose depot location, nutritional status, and COOH treatment, and all factors interacted with each other (depot X nutrition X agonist interaction, P < 0.01) (Fig. 6*C*). Refeeding increased UCP-1 mRNA more robustly in rats previously treated with the PPAR- $\gamma$  agonist than in untreated rats, whereas in both the fasted and fed states, COOH treatment increased UCP-1 mRNA to a much higher level in VF than in SF.

#### DISCUSSION

This study demonstrated that activation of PPAR-γ abrogates the postprandial rise in TG levels seen in rats chronically fed diets that maintain either a low or high lipid flux. In association with this change in TG levels, COOH increased LPL expression and activity in an adipose depot specific manner. Also, PPAR-γ activation increased subcutaneous fat deposition at the expense of visceral fat. Such remodeling was accompanied by a congruent depot specificity of changes in the mRNA levels of proteins associated with increased (LPL and 11β-HSD-1) or reduced (UCP-1) lipid accumulation.

We have previously shown that rats fed the HSHF diet are frankly hypertriglyceridemic and hyperinsulinemic compared to standard diet-fed rats after a shortterm (overnight) fast as well as after being refed their habitual diet (24). In the present study, based on our previous work on the insulin resistance of adipose LPL (7,8), rats were fasted for 24 h and refed standard diet. This, along with a slightly lower food intake upon refeeding, explains the weaker TG response in HSHF diet-fed compared to standard dietfed rats (liver lipogenesis from carbohydrate precursors is lowered by chronic high-fat feeding) (30) and their similar postprandial rise in insulin (glucose-mediated insulin secretion is hampered in high-fat fed rats) (31). These observations should not be interpreted as an absence of glucose metabolism insulin resistance in HSHF diet rats, which has been amply demonstrated (7,24-27), but rather as a naive metabolic response to a first encounter with the high-carbohydrate diet. Insulin resistance in HSHF diet-fed rats was illustrated by their higher postprandial glucose excursion and weaker NEFA reduction in the face of identical insulinemia compared to standard diet-fed rats and by the lack of response of their visceral WAT LPL to refeeding (7). Likewise, the lack of effect of COOH on fasting levels of glucose, insulin, and lipids is undoubtedly attributable to the long duration of the fasting period. Remarkably, PPAR-y activation greatly reduced the insulin response to refeeding in both standard diet-fed and HSHF diet-fed animals. This confirms the well-established insulin-sensitizing action of PPAR-y agonists (9,13,14), which extends to the insulin-mediated inhibition of lipolysis, as demonstrated by decreased plasma NEFA concentrations.

COOH administration resulted in adjpocyte remodeling (smaller, more numerous cells) typical of PPAR-y agonists in general (9-11) in both inguinal and retroperitoneal depots. As has been determined in pilot studies, SF yields approximately fourfold more total RNA than VF, most likely because it is richer in nonadipocyte cells. Furthermore, 2 weeks of exposure to PPAR-y agonists such as rosiglitazone doubles the amount of total RNA per unit tissue weight, which reflects the increase in cell number. In the present study, COOH exerted strong, depot-specific actions on LPL activity, which extended to LPL gene expression, as suggested by mRNA levels. In standard diet-fed rats, COOH upregulated LPL activity relative to total protein in inguinal WAT specifically, resulting in higher fasting LPL. Interestingly, the postprandial activation of LPL was relatively larger in COOH-treated rats than in controls, as enzyme activation appeared to be prolonged beyond 3 h, a time at which LPL had stabilized in untreated rats. This effect of COOH is all the more remarkable because it occurred in the face of a much reduced postprandial insulin increase. This raises the intriguing possibility that the PPAR-y agonist could affect the posttranslational activation of LPL. Alternatively, the upregulation of LPL expression by PPAR- $\gamma$  agonists seen here and previously (32–34) could simply make more enzyme available for activation. In HSHF rats, although total depot LPL activity was greatly elevated by COOH, there was no increase in fasting LPL relative to total protein, as was observed in standard diet-fed rats. However, as in the latter, the agonist prolonged the late postprandial rise in enzyme activity.

In sharp contrast to its action on subcutaneous WAT LPL, COOH had no effect on retroperitoneal LPL regardless of diet. Whether the lack of effect of PPAR-γ activation on LPL expression in VF is the result of PPAR-γ's inability to directly affect LPL gene transcription through its previously identified peroxisome proliferator response element (33) or is secondary to PPAR-γ-induced changes in other signaling pathways that modulate LPL expression is unknown. As was shown in our previous study (7), retroperitoneal LPL in HSHF diet-fed animals was unresponsive to postprandial activation. The PPAR-γ agonist was unable to overcome the resistance of visceral LPL to feeding-induced activation, thus indicating that any PPAR-γ agonist mediated insulin sensitization of adipocytes (35) did not extend to insulin-mediated postprandial activation of LPL in VF.

As was the case in visceral WAT, COOH did not affect LPL activity relative to total protein in BAT. However, in contrast to visceral fat, the large increase in BAT weight elicited by PPAR- $\gamma$  agonist treatment was accompanied by a parallel sixfold elevation in total tissue availability of the enzyme. It can be suggested that the latter contributed substantially to the seven- to eightfold increase in BAT weight through lipid uptake. COOH and other PPAR- $\gamma$  agonists (36,37) therefore appear to direct BAT metabolism toward lipid storage.

The present findings extend those of previous studies that have reported a robust hypotriglyceridemic effect of PPAR-γ agonists, as assessed through single time point measurements (10,15), by demonstrating that chronic PPAR-γ activation abolished the postprandial increase in TG at least until the 6th h of refeeding. This action was all the more powerful because refeeding elicited almost a threefold increase in plasma TG levels. In fact, in rats chronically fed standard diet, COOH decreased triglyceridemia postprandially to half of that seen after a 24-h fast. In the absence of an effect of PPAR-γ activation on muscle LPL, it is reasonable to conclude that the COOH-induced increase in the availability of LPL in subcutaneous WAT and BAT contributed significantly to such a large reduction in circulating TGs. In addition to increasing LPL expression and activity in these tissues, PPAR-γ agonists may favor TG clearance through vasodilation (38), which could conceivably augment the delivery rate of TG-rich lipoproteins to LPL-rich tissues. By virtue of its potentiating effect on the postprandial lowering of NEFAs, COOH may also have lowered hepatic VLDL TG secretion. The respective contribution of these major determinants of triglyceridemia remains to be established.

Treatment with COOH was depot specific, not only at the level of LPL activity, but also at the level of lipid deposition. Indeed, the agonist nearly doubled inguinal depot mass (most of that being stored TGs), whereas it decreased retroperitoneal depot accretion by half despite overt adipogenesis. This effect is similar to that reported for other PPAR- $\gamma$  agonists in humans (17–20). Although the mechanisms by which lipid deposition is blunted in VF by COOH remain to be understood, several possible explanations can be proposed. The lack of effect of the PPAR- $\gamma$  agonist on LPL expression and activation in VF, as

opposed to the large increase in SF, may in part limit lipid uptake by visceral relative to subcutaneous adipocytes, but at the same time argues against a contribution of decreased uptake of TG-derived fatty acids to the frank reduction in VF accretion. Enhanced lipolysis and fatty acid export from VF is also improbable because plasma NEFAs were not increased, and were even further decreased postprandially, by COOH. These considerations raise the as yet unproven possibility that COOH may have enhanced fatty acid oxidation specifically in VF. This hypothesis is supported by the observation that COOH upregulated UCP-1 expression by a much greater magnitude in the visceral than in the subcutaneous depot. As a result, locally increased thermogenesis may have favored lipid loss in the retroperitoneal versus the inguinal depot, without overtly affecting whole-body energy balance. It must be noted, however, that although PPAR-y agonists stimulate fatty acid oxidation in adipocytes (39,40), the ability of PPAR- $\gamma$  agonists to do so is unestablished. Furthermore, the metabolic efficiency of UCP-1 in PPAR-y agonist treated rodents remains speculative because, as was seen here and in previous studies (36), increased expression of UCP-1 in BAT by PPAR-γ agonists occurs in the face of a large expansion of the tissue, thereby suggesting that at least in BAT, newly synthesized UCP-1 is not actively uncoupling mitochondrial respiration.

A second PPAR- $\gamma$  modulated pathway that has been shown to be responsible for adipose tissue homeostasis involves the enzyme 11 $\beta$ -HSD-1 (23), which locally converts inactive corticosteroids into potent glucocorticoid receptor agonists (41,42). Here we found that PPAR- $\gamma$  agonist treatment caused 11 $\beta$ -HSD-1 expression to be greatly diminished in VF, but not in SF. As a result, the local production of bioactive glucocorticoids in VF, to which it is particularly sensitive because of high glucocorticoid receptor density (43,44), may have been decreased, thereby reducing the local lipogenic drive and supporting the noted diminution in fat accretion in this depot. In this regard, it is worth noting that patients with hypercorticosteroidism display increased visceral obesity (45,46) and metabolic maladies that show a striking similarity to type 2 diabetes (47). Furthermore, 11 $\beta$ -HSD-1 null mice are resistant to diet-induced insulin resistance (48), whereas transgenic mice overexpressing 11 $\beta$ -HSD-1 exhibit increased corticosterone levels, visceral obesity, and insulin resistant diabetes (49). Therefore, it is not unreasonable to suggest that a decrease in adipocyte and systemic glucocorticoid levels may contribute to the global adipose depot specific effects of PPAR-γ activation and to global insulin sensitization as well.

In conclusion, this study demonstrated that the PPAR-γ agonist COOH exerted depot-specific effects on adipose LPL expression and activity that were accompanied by equally depot-specific differences in fat deposition. COOH increased LPL activity in BAT and subcutaneous WAT, but not in visceral WAT. It is likely that such changes in LPL contributed, at least in part, to the abrogation of postprandial hypertriglyceridemia through increased TG clearance. The depot specificity of COOH action extended to fat deposition, with SF being increased at the expense of VF. Our data demonstrated that such depot-specific actions may be mediated by the differential expression of genes involved in the modulation of various aspects of lipid metabolism, including LPL, UCP-1, and 11β-HSD-1. A more profound understanding of the role of PPAR-γ agonists in preventing VF accretion in humans and rodent models now awaits the assessment of the effects of such compounds on metabolic parameters, including fatty acid oxidation, thermogenesis, glucocorticoid metabolism, and lipogenesis, in individual fat tissues.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research. During the initial phase of the study reported herein, M.L. was an undergraduate student at the Faculty of Sciences and Engineering, Université Laval, and the recipient of a studentship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. The authors wish to acknowledge the invaluable professional assistance of Joseée Lalonde, Isabelle Caron, Julie Ferland, Sébastien Poulin, Neelam Sharma, and Gino Castriota. The authors are also grateful to Dr. David E. Moller for his critical review of the manuscript.
#### REFERENCES

- 1. Zilversmit DB: Atherogenic nature of triglycerides, postprandial lipidemia, and triglyceride-rich remnant lipoproteins. *Clin Chem* 41:153–158, 1995
- Després J-P, Lemieux I, Prud'homme D: Treatment of obesity: need to focus on high risk abdominally obese patients. *BMJ* 322:716–720, 2001
- 3. Roche HM, Gibney MJ: The impact of postprandial lipemia in accelerating atherothrombosis. J Cardiovasc Risk 7:317–324, 2000
- Goldberg IJ, Merkel M: Lipoprotein lipase: physiology, biochemistry, and molecular biology. *Front Biosci* 6:D388–D405, 2001
- Cohen JC, Berger GM: Effects of glucose ingestion on postprandial lipemia and triglyceride clearance in humans. *J Lipid Res* 31:597–602, 1990
- Picard F, Naïmi N, Richard D, Deshaies Y: Response of adipose tissue lipoprotein lipase to the cephalic phase of insulin secretion. *Diabetes* 48:452–459, 1999
- Picard F, Boivin A, Lalonde J, Deshaies Y: Resistance of adipose tissue lipoprotein lipase to insulin action in rats fed an obesity-promoting diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282:E412–E418, 2002
- Picard F, Richard D, Timofeeva E, Deshaies Y: Abnormal insulin and β-adrenergic modulation of lipoprotein lipase during refeeding after prolonged fasting in the Zucker rat. *Diabetologia* 43:866–874, 2000
- Spiegelman BM: PPAR-γ : adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. Diabetes 47:507–514, 1998
- Auwerx J, Schoonjans K, Fruchart JC, Staels B: Regulation of triglyceride metabolism by PPARs: fibrates and thiazolidinediones have distinct effects. *J Atheroscler Thromb* 3:81–89, 1996
- de Souza CJ, Eckhardt M, Gagen K, Dong M, Chen W, Laurent D, Burkey BF: Effects of pioglitazone on adipose tissue remodeling within the setting of obesity and insulin resistance. *Diabetes* 50:1863–1871, 2001
- Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Murakami K, Motojima K, Komeda K, Ide T, Kubota N, Terauchi Y, Tobe K, Miki H, Tsuchida A, Akanuma Y, Nagai R, Kimura S, Kadowaki T: The mechanisms by which both heterozygous peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-gamma) deficiency and PPAR-gamma agonist improve insulin resistance. *J Biol Chem* 276:41245–41254, 2001

- Saltiel AR, Olefski JM: Thiazolidinediones in the treatment of insulin resistance and type II diabetes. *Diabetes* 45:1661–1669, 1996
- Picard F, Auwerx J: PPAR-γ and glucose homeostasis. Annu Rev Nutr 22:167–197, 2002
- Lefebvre AM, Peinado Onsurbe J, Leitersdorf I, Briggs MR, Paterniti JR, Fruchart JC, Fievet C, Auwerx J, Staels B: Regulation of lipoprotein metabolism by thiazolidinediones occurs through a distinct but complementary mechanism relative to fibrates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:1756–1764, 1997
- Willson TM, Lambert MH, Kliewer SA: Peroxisome proliferator-activated receptor γ and metabolic disease. *Annu Rev Biochem* 70:341–367, 2001
- Kawai T, Takei I, Oguma Y, Ohashi N, Tokui M, Oguchi S, Katsukawa F, Hirose H, Shimada A, Watanabe K, Saruta T: Effects of troglitazone on fat distribution in the treatment of male type 2 diabetes. *Metabolism* 48:1102-1107, 1999
- Kelly IE, Han TS, Walsh K, Lean ME: Effects of a thiazolidinedione compound on body fat and fat distribution of patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 22:288– 293, 1999
- Miyazaki Y, Mahankali A, Matsuda M, Glass L, Mahankali S, Ferrannini E, Cusi K, Mandarino LJ, DeFronzo RA: Improved glycemic control and enhanced insulin sensitivity in type 2 diabetic subjects treated with pioglitazone. *Diabetes Care* 24:710– 719, 2001
- Mori Y, Murakawa Y, Okada K, Horikoshi H, Yokoyama J, Tajima N, Ikeda Y: Effect of troglitazone on body fat distribution in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 22:908–912, 1999
- Way JM, Harrington WW, Brown KK, Gottschalk WK, Sundseth SS, Mansfield TA, Ramachandran RK, Willson TM, Kliewer SA: Comprehensive messenger ribonucleic acid profiling reveals that peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation has coordinate effects on gene expression in multiple insulin-sensitive tissues. *Endocrinology* 142:1269–1277, 2001
- Albrektsen T, Frederiksen KS, Holmes WE, Boel E, Taylor K, Fleckner J: Novel genes regulated by the insulin sensitizer rosiglitazone during adipocyte differentiation. *Diabetes* 51:1042–1051, 2002
- Berger J, Tanen M, Elbrecht A, Hermanowski-Vosatka A, Moller DE, Wright SD, Thieringer R: Peroxisome proliferator-activated receptor-γ ligands inhibit adipocyte 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression and activity. J Biol Chem 276:12629–12635, 2001

- Fajardo N, Deshaies Y: Long-term α<sub>1</sub>-adrenergic blockade attenuates diet-induced dyslipidemia and hyperinsulinemia in the rat. J Cardiovasc Pharmacol 32:913–919, 1998
- Reaven GM, Risser TR, Chen Y-DI, Reaven EP: Characterization of a model of dietary-induced hypertriglyceridemia in young, nonobese rats. *J Lipid Res* 20:371–378, 1979
- Storlien LH, James DE, Burleigh KM, Chisholm DJ, Kraegen EW: Fat feeding causes widespread in vivo insulin resistance, decreased energy expenditure, and obesity in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 251: E576–E583, 1986
- Kraegen EW, James DE, Storlien LH, Burleigh KM, Chisholm DJ: In vivo insulin resistance in individual peripheral tissues of the high fat fed rat: assessment by euglycaemic clamp plus deoxyglucose administration. *Diabetologia* 29:192–198, 1986
- Hallfrisch J, Cohen L, Reiser S: Effects of feeding rats sucrose in a high fat diet. J Nutr 111:531–536, 1981
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193:265–275, 1951
- Wilson MD, Blake WL, Salati LM, Clarke SD: Potency of polyunsaturated and saturated fats as short-term inhibitors of hepatic lipogenesis in rats. J Nutr 120:544– 552, 1990
- Chan CB, De Leo D, Joseph JW, McQuaid TS, Ha XF, Xu F, Tsushima RG, Pennefather PS, Salapatek AM, Wheeler MB: Increased uncoupling protein-2 levels in beta-cells are associated with impaired glucose-stimulated insulin secretion: mechanism of action. *Diabetes* 50:1302–1310, 2001
- Staels B, Schoonjans K, Fruchart JC, Auwerx J: The effects of fibrates and thiazolidinediones on plasma triglyceride metabolism are mediated by distinct peroxisome proliferator activated receptors (PPARs). *Biochimie* 79:95–99, 1997
- Schoonjans K, Peinado Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, Staels B, Auwerx J: PPAR-α and PPAR-γ activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J* 15:5336– 5348, 1996
- Kobayashi J, Nagashima I, Hikita M, Bujo H, Takahashi K, Otabe M, Morisaki N, Saito Y: Effect of troglitazone on plasma lipid metabolism and lipoprotein lipase. Br J Clin Pharmacol 47:433–439, 1999

- 35. Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, Ueki K, Mori Y, Iwamoto K, Umesono K, Akanuma Y, Fujiwara T, Horikoshi H, Yazaki Y, Kadowaki T: Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. J Clin Invest 101:1354–1361, 1998
- 36. Kelly LJ, Vicario PP, Thompson GM, Candelore MR, Doebber TW, Ventre J, Wu MS, Meurer R, Forrest MJ, Conner MW, Cascieri MA, Moller DE: Peroxisome proliferator-activated receptors γ and α mediate in vivo regulation of uncoupling protein (UCP-1, UCP-2, UCP-3) gene expression. *Endocrinology* 139:4920–4927, 1998
- Fukui Y, Masui S, Osada S, Umesono K, Motojima K: A new thiazolidinedione, NC-2100, which is a weak PPAR-gamma activator, exhibits potent antidiabetic effects and induces uncoupling protein 1 in white adipose tissue of KKAy obese mice. *Diabetes* 49:759–767, 2000
- Fujishima S, Ohya Y, Nakamura Y, Onaka U, Abe I, Fujishima M: Troglitazone, an insulin sensitizer, increases forearm blood flow in humans. *Am J Hypertens* 11:1134– 1137, 1998
- Vazquez M, Roglans N, Cabrero A, Rodriguez C, Adzet T, Alegret M, Sanchez RM, Laguna JC: Bezafibrate induces acyl-CoA oxidase mRNA levels and fatty acid peroxisomal beta-oxidation in rat white adipose tissue. *Mol Cell Biochem* 216:71–78, 2001
- Cabrero A, Alegret M, Sanchez RM, Adzet T, Laguna JC, Vazquez M: Bezafibrate reduces mRNA levels of adipocyte markers and increases fatty acid oxidation in primary culture of adipocytes. *Diabetes* 50:1883–1890, 2001
- Sandeep TC, Walker BR: Pathophysiology of modulation of local glucocorticoid levels by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Trends Endocrinol Metab* 12:446–453, 2001
- Quinkler M, Oelkers W, Diederich S: Clinical implications of glucocorticoid metabolism by 11β-hydroxysteroid dehydrogenases in target tissues. *Eur J Endocrinol* 144:87–97, 2001
- Pedersen SB, Borglum JD, Moller-Pedersen T, Richelsen B: Characterization of nuclear corticosteroid receptors in rat adipocytes: regional variations and modulatory effects of hormones. *Biochim Biophys Acta* 1134: 303–308, 1992
- Pedersen SB, Jonler M, Richelsen B: Characterization of regional and gender differences in glucocorticoid receptors and lipoprotein lipase activity in human adipose tissue. J Clin Endocrinol Metab 78:1354–1359, 1994

- Rebuffé-Scrive M, Krotkiewski M, Elfverson J, Bjorntörp P: Muscle and adipose tissue morphology and metabolism in Cushing's syndrome. J Clin Endocrinol Metab 67:1122–1128, 1988
- Mayo-Smith W, Hayes CW, Biller BM, Klibanski A, Rosenthal H, Rosenthal DI: Body fat distribution measured with CT: correlations in healthy subjects, patients with anorexia nervosa, and patients with Cushing syndrome. *Radiology* 170:515–518, 1989
- Peeke PM, Chrousos GP: Hypercortisolism and obesity. Ann N Y Acad Sci 771:665– 676, 1995
- 48. Kotelevtsev Y, Holmes MC, Burchell A, Houston PM, Schmoll D, Jamieson P, Best R, Brown R, Edwards CR, Seckl JR, Mullins JJ: 11β–hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice show attenuated glucocorticoid inducible responses and resist hyperglycemia on obesity or stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:14924–14929, 1997
- Masuzaki H, Paterson J, Shinyama H, Morton NM, Mullins JJ, Seckl JR, Flier JS: A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science* 294:2166– 2170, 2001

## TABLES

# Table 1. Primers/probe set used for PCR amplification.

Gene	5' Primer (5'-3')	3' Primer (5'-3')	Probe (5'-3')		
LPL	CTAAACTATGTACTTCAGGCTTACCTTGAA	ATGGTTATCAAGCTCCCAGCAC	TCTCAACCATCCTGCCTTGGCTTCCT		
11β-HSD-1	GAAACAGAGCAATGGCAGCAT	CAAACTTGCTTGCAGAGTAGGAAG	CTCCATGGCTGGGAAAATGACCCAA		
UCP-1	CATCACCTTCCCGCTGGA	CTAATAGTACTGGAAGCCTGGCCT	CAAAGTCCGCCTTCAGATCCAAGGTG		

Table 2. Food intake and body weight variables in rats chronically fed standard or	HSHF
diet and treated or not with the PPAR-γ agonist COOH for 3 weeks.	

	Standard diet		HSHF diet		ANOVA		
	Placebo	COOH	Placebo	COOH	Diet	Agonist	$Diet \times agonist$
Food intake (MJ)	$6.2 \pm 0.1$	$6.8 \pm 0.1$	$7.4 \pm 0.2$	$7.7 \pm 0.1$	< 0.0001	0.0002	NS
Body weight (g)	$294 \pm 5$	$302 \pm 4$	$316 \pm 5$	$323 \pm 5$	< 0.0001	NS	NS
Body weight gain (g)	$136 \pm 5$	$144 \pm 4$	$157 \pm 4$	$165 \pm 4$	< 0.0001	NS	NS
Food efficiency (g/MJ)	$22.1 \pm 0.6$	$21.2 \pm 0.5$	$21.2 \pm 0.4$	$21.4 \pm 0.4$	NS	NS	NS
6-h refeeding intake (g)	$15.4 \pm 1.1$	$17.9 \pm 0.9$	$12.1 \pm 0.8$	$14.4 \pm 1.4$	0.005	0.04	NS

Data are means  $\pm$  SE of 24 animals. The ANOVA columns represent the level of significance of the effects of diet with two levels (standard and HSHF diets) and agonist (placebo and COOH) and their interaction. Food efficiency represents grams of body weight gain per megajoule of ingested food. NS, not significant.

**Table 3.** Weight and protein content of inguinal and retroperitoneal white adipose tissue and in interscapular brown adipose tissue of rats chronically fed standard or HSHF diet and treated or not with the PPAR-γ agonist for 3 weeks.

	Standard diet		HSHF diet		ANOVA		
	Control	COOH	Control	COOH	Diet	Agonist	$Diet \times agonist$
Ing weight	$1.16 \pm 0.05$	$1.80 \pm 0.07$	$1.98 \pm 0.10$	$2.80 \pm 0.11$	< 0.0001	< 0.0001	NS
Ing protein (mg)	$32 \pm 2$	$66 \pm 4$	$40 \pm 4$	$81 \pm 6$	0.007	< 0.0001	NS
Ret weight (g)	$1.06 \pm 0.07^{u}$	$0.76 \pm 0.05^{b}$	$2.36 \pm 0.10^{\circ}$	$1.43 \pm 0.09^{d}$	< 0.0001	< 0.0001	0.0001
Ret protein (mg)	$14 \pm 1$	$24 \pm 1$	$24 \pm 1$	$37 \pm 2$	< 0.0001	< 0.0001	NS
Sum Ing + Ret weight (g)	$2.2 \pm 0.1$	$2.6 \pm 0.1$	$4.3 \pm 0.2$	$4.2 \pm 0.2$	< 0.0001	NS	NS
Ing/Ret weight ratio	$1.1 \pm 0.1$	$2.5 \pm 0.1$	$0.9 \pm 0.0$	$2.1 \pm 0.1$	0.0009	< 0.0001	NS
BAT weight (g)	$0.29 \pm 0.02^{\circ}$	$1.86 \pm 0.12^{b}$	$0.36 \pm 0.02^{n}$	$2.76 \pm 0.15^{\circ}$	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
BAT protein (mg)	$33 \pm 2^{a}$	$153 \pm 8^{+}$	$35 \pm 2^{n}$	$180 \pm 9^{\circ}$	0.02	< 0.0001	0.05

Data are means  $\pm$  SE of 24 animals. The ANOVA columns represent the level of significance of the effects of diet with two levels (standard and HSHF diets) and agonist (placebo and COOH) and their interaction. When a treatment interaction was detected by ANOVA, post hoc individual between-group comparisons (Fisher's PLSD) were performed. For the latter variables, means not sharing a common superscript are significantly different from each other, P < 0.05. Ing, inguinal; Ret, retroperitoneal.

#### FIGURES LEGENDS

**Figure 1.** Plasma glucose (*A*) and insulin (*B*) concentrations after a 24-h fast (0-h time point) and after 1, 3, or 6 h of refeeding with standard diet ad libitum, in rats chronically fed standard or HSHF diet and treated (filled circles) or not (empty circles) with the PPAR- $\gamma$  agonist COOH for 3 weeks. Each point represents the average ± SE of six animals. The 2 X 2 ANOVA results that follow represent the level of significance (*P* value) of the main effects of diet (D) and time (T) and their interaction (D X T) in untreated and COOH-treated rats, and that of the main effects of agonist (A) and time and their interaction (A X T) in standard diet-fed and HSHF diet-fed rats. Glucose: in untreated (controls), D = 0.002, T < 0.0001, D X T = NS; in COOH-treated, D = NS, T < 0.0001, D X T = NS; in standard diet-fed, A = 0.02, T < 0.0001, A X T = NS; in HSHF diet-fed, A NS, T < 0.0001, A X T = NS. Insulin: in untreated, D = NS, T < 0.0001, D X T = 0.05; in HSHF diet-fed, A < 0.0001, D X T = NS; in standard diet-fed, A = 0.03, T < 0.0001, A X T = 0.05; in HSHF diet-fed, A < 0.0001, T < 0.0001, A X T = NS.

**Figure 2.** Plasma TG (*A*) and NEFA (*B*) concentrations after a 24-h fast (0-h time point) and after 1, 3, or 6 h of refeeding with standard diet ad libitum in rats chronically fed standard or HSHF diet and treated (filled circles) or not (empty circles) with the PPAR- $\gamma$  agonist COOH for 3 weeks. Each point represents the average ± SE of six animals. The 2 X 2 ANOVA results that follow represent the level of significance (*P* value) of the main effects of diet (D) and time (T) and their interaction (D X T) in untreated and COOH-treated rats, and that of the main effects of agonist (A) and time and their interaction (A X T) in standard diet-fed and HSHF diet-fed rats. TGs: in untreated, D = 0.008, T < 0.0001, D X T = NS; in COOH-treated, D = 0.002, T = 0.002, D X T = NS; in standard diet-fed, A < 0.0001, T = 0.0003, A X T < 0.0001; in HSHF diet-fed, A = 0.002, T < 0.0001, A X T = NS. NEFAs: in untreated, D = NS, T < 0.0001, D X T = 0.008; in COOH-treated, D < 0.001, T < 0.0001, D X T = 0.02; in standard diet-fed, A = NS, T < 0.0001, A X T = NS; in HSHF diet-fed, A = 0.04, T < 0.0001, A X T = 0.006.

Figure 3. Relative (per unit total protein) LPL activity in inguinal (A) and retroperitoneal (B) depots after a 24-h fast (0-h time point) and after 1, 3, or 6 h of refeeding with standard diet ad libitum in rats chronically fed standard (STD) or HSHF diet and treated (filled circles) or not (empty circles) with the PPAR-y agonist COOH for 3 weeks. The 2 X 2 ANOVA results that follow represent level of significance (P value) of the main effects of diet (D) and time (T) and their interaction (D X T) in untreated and COOH-treated rats, and that of the main effects of agonist (A) and time and their interaction (A X T) in standard diet-fed and HSHF diet-fed rats. Inguinal relative LPL: in untreated, D = NS, T = 0.002, D X T = NS; in COOH-treated, D = 0.05, T < 0.0001, D X T = NS; in standard diet-fed, A = 0.0002, T = 0.0005, A X T = NS; in HSHF diet-fed, A = 0.03, T = 0.0008, A X T = 0.03. Retroperitoneal relative LPL: in untreated, D = 0.002, T < 0.0001,  $D \ge T = 0.007$ ; in COOH-treated, D < 0.0001, T < 0.0001, D X T = 0.02; in standard diet-fed, A = NS, T < 0.0001, A X T = NS; in HSHF diet-fed, A = NS, T < 0.04, A X T = NS. C: Total LPL activity per depot in the fasted state. \*Different from control in corresponding dietary cohort, P < 0.004. Each point or column represents the average  $\pm$  SE of six animals. Hatched columns, control ; filled column, COOH.

**Figure 4.** Relative (per unit total protein) LPL activity in interscapular BAT (*A*) after a 24h fast (0-h time point) and after 1, 3, or 6 h of refeeding with standard diet ad libitum in rats chronically fed standard or HSHF diet and treated (filled circles) or not (empty circles) with the PPAR- $\gamma$  agonist COOH for 3 weeks. The 2 X 2 ANOVA results that follow represent level of significance (*P* value) of the main effects of diet (D) and time (T) and their interaction (D X T) in untreated and COOH-treated rats, and that of the main effects of agonist (A) and time and their interaction (A X T) in standard diet-fed and HSHF diet-fed rats. Relative LPL: in untreated, D = NS, T = NS, D X T = NS; in COOH-treated, D = NS, T = NS, D X T = NS; in standard diet-fed, A = 0.02, T = NS, A X T = NS; in HSHF dietfed, A = NS, T = NS, A X T = NS. *B*: Total LPL activity per depot in the fasted state. \*Different from control in corresponding dietary cohort, *P* < 0.0001. Each point or column represents the average  $\pm$  SE of six animals. Hatched columns, control; filled column, COOH. **Figure 5.** Plasma corticosterone concentrations after a 24-h fast (0 h time point) and after 1, 3, or 6 h of refeeding with standard diet ad libitum in rats chronically fed standard or HSHF diet and treated (filled circles) or not (empty circles) with the PPAR- $\gamma$  agonist COOH for 3 weeks. Each point represents the average ± SE of six animals. The 2 X 2 ANOVA results that follow represent level of significance (*P* value) of the main effects of diet (D) and time (T) and their interaction (D X T) in untreated and COOH-treated rats, and that of the main effects of agonist (A) and time and their interaction (A X T) in standard diet-fed and HSHF diet-fed rats. In untreated, D = NS, T < 0.0001, D X T = 0.001; in COOH-treated, D = NS, T = 0.002, D X T = NS; in standard diet-fed, A = NS, T = 0.001, A X T = 0.02; in HSHF diet-fed, A = 0.04, T = 0.0003, A X T = 0.003.

**Figure 6**. mRNA levels of LPL (*A*), 11β-HSD-1 (*B*), and UCP-1 (*C*) in inguinal (*left*) and retroperitoneal (*right*) adipose tissue after a 24-h fast and after 6 h of refeeding with standard diet ad libitum in rats chronically fed standard diet and treated or not with the PPAR- $\gamma$  agonist COOH for 3 weeks. Each column represents the average SE of six animals. Note different scales in *C* for retroperitoneal and inguinal depots. The 2 X 2 X 2 ANOVA results that follow represent level of significance (*P* value) of the main effects of depot (De), nutritional state (Nu), and agonist (A) and their interactions. Only *P* < 0.05 values are given; other effects and interactions were NS. LPL: De < 0.0001, A < 0.0001, De X A 0.004, De X Nu X A = 0.03. 11β-HSD-1: A < 0.0001, De X A = 0.02. UCP-1: De = 0.003, Nu = 0.006, A = 0.005, De X Nu = 0.006, De X A = 0.005, Nu X A = 0.009, De X Nu X A 0.01. Hatched columns, control; filled columns, COOH.

## FIGURES















Figure 3.

Figure 4.









Figure 6.

CHAPITRE 2

## MECHANISMS OF THE DEPOT-SPECIFICITY OF PPAR-γ ACTION ON ADIPOSE TISSUE METABOLISM

Mathieu LAPLANTE<sup>1</sup>, William T. FESTUCCIA<sup>1</sup>, Geneviève SOUCY<sup>1</sup>, Yves GÉLINAS<sup>1</sup>, Josée LALONDE<sup>1</sup>, Joel P.BERGER<sup>2</sup> and Yves DESHAIES<sup>1</sup>

 <sup>1</sup> Laval Hospital Research Center, Department of Anatomy and Physiology, School of Medicine, Laval University, Québec, Qc, Canada, G1V 4G5
<sup>2</sup> Department of Metabolic Disoders, Merck Research Laboratories, Rahway, NJ, USA,

07065-900

"Copyright © 2006 American Diabetes Association From Diabetes<sup>®</sup>, Vol. 55, 2006; 2771-2778 Reprinted with permission from *The American Diabetes Association*."

article publié dans Diabetes 55:2771-2778, 2006

#### AVANT-PROPOS

Ce travail, réalisé sous la direction du Dr. Yves Deshaies, a été rendu possible grâce à la collaboration du Dr. William T. Festuccia (stagiaire post-doctoral avec le Dr. Yves Deshaies), de Geneviève Soucy (stagiaire, étudiante en médecine à l'Université Laval), de Yves Gélinas (M.Sc., assistant de recherche), de Josée Lalonde (M.Sc., assistante de recherche) et du Dr. Joel P. Berger (Merck Laboratories). La mesure de l'activité de la PEPCK de même que les canulations ont été réalisées par le Dr. William T. Festuccia. De plus, ce dernier a apporté une aide technique et conceptuelle précieuse lors de la réalisation des protocoles. Il en va de même pour Geneviève Soucy qui, en plus de s'occuper des animaux, a contribué étroitement à la récolte des échantillons et la mesure de certains paramètres. La collaboration technique de Josée Lalonde et l'aide précieuse d'Yves Gélinas lors des mise au point des méthodes ont rendu possible la publication de ces travaux. L'utilisation du COOH a été rendue possible grâce au Dr. Joel P. Berger, qui a de plus grandement contribué aux discussions lors de l'écriture du manuscrit. Cette étude implique mon entière participation quant à la réalisation de l'ensemble des étapes menant à la publication de cet article, soient la planification, l'exécution du protocole, la mesure des variables plasmatiques et tissulaires et l'analyse statistique. Suite aux corrections du directeur, l'article a été révisé par l'ensemble des coauteurs et a été soumis aux éditeurs de la revue *Diabetes*. Cet article a été accepté pour fin de publication en juillet 2006 et il a été publié en octobre 2006.

### RÉSUMÉ

Dans cette étude, nous désirions mettre à jour les mécanismes par lesquels la stimulation des récepteurs activés par les proliférateurs des peroxysomes-y (PPARy) favorisent l'accumulation des graisses dans le tissu adipeux sous-cutané (TASC) et diminuent leur accumulation dans le tissu adipeux viscéral (TAV). Chez des rats traités avec l'agoniste COOH (30mg • kg<sup>-1</sup> • jour<sup>-1</sup>) durant 3 semaines, le poids du TASC a doublé et celui du TAV a été réduit de 30% comparativement aux animaux témoins. La captation d'acides gras dérivés de l'hydrolyse des triglycérides a été fortement induite dans le TASC (14 fois). Cet effet du COOH était moins marqué dans le TAV (4 fois). La forte stimulation de la captation des lipides dans le TASC a été associée à l'augmentation de l'expression des gènes codant pour des protéines impliquées dans la captation (lipase lipoprotéique), la rétention (aP2) et l'estérification (diacylglycérol acyltransférase-1) des lipides. La lipolyse basale et le recyclage des acides gras ont été stimulés par le COOH également entre les tissus adipeux. L'agoniste a favorisé l'augmentation de l'expression des gènes codant pour des protéines impliquées dans l'oxydation et la thermogenèse plus fortement dans le TAV que dans le TASC. Des changements similaires ont été observés relativement à la consommation d'O2 par des adipocytes isolés des deux dépôts. La biogenèse des mitochondries a été stimulée également entre les tissus. Ces observations démontrent que la stimulation de PPAR-y induit la redistribution du tissu adipeux en stimulant le potentiel de captation et d'estérification des lipides dans le tissu adipeux sous-cutané. La balance entre la captation et l'oxydation des lipides a favorisé la déposition des graisses dans le TASC. Dans le TAV, la faible augmentation de la captation des lipides associée à la forte stimulation du potentiel d'oxydation ont conduit à la réduction de l'accumulation des graisses dans ce dépôt.

#### ABSTRACT

This study aimed to establish the mechanisms whereby PPARy agonism brings about redistribution of fat toward subcutaneous (SF) depots and away from visceral fat (VF). In rats treated with the full PPARy agonist COOH (30 mg/kg/d) for 3 weeks, SF mass was doubled and that of VF was reduced by 30% relative to untreated rats. Uptake of triglyceride-derived nonesterified fatty acids was greatly increased in SF (14-fold) and less so in VF (4-fold), with a concomitant increase, restricted to SF only, in mRNA levels of the uptake-, retention-, and esterification-promoting enzymes lipoprotein lipase, aP2, and diacylglycerol acyltransferase-1. Basal lipolysis and fatty acid recycling were stimulated by COOH in both SF and VF, with no frank quantitative depot specificity. The agonist increased mRNA levels of enzymes of fatty acid oxidation and thermogenesis much more strongly in VF than in SF, concomitantly with a stronger elevation in O<sub>2</sub> consumption in the former than in the latter. Mitochondrial biogenesis was stimulated equally in both depots. These findings demonstrate that PPARy agonism redistributes fat by stimulating the lipid uptake and esterification potential in SF, which more than compensates for increased  $O_2$  consumption; conversely, lipid uptake is minimally altered and energy expenditure is greatly increased in VF, with consequent reduction in fat accumulation.

#### INTRODUCTION

Individuals with visceral fat deposition are at high risk of developing the metabolic syndrome, type 2 diabetes, and cardiovascular disease (1,2), in contrast with those with similar amounts of adipose tissue stored in subcutaneous depots (3). Visceral fat (VF) releases into the circulation more nonesterified fatty acids (NEFA) than subcutaneous fat (SF) (4,5), which is liable to expose the liver to high amounts of NEFA and to increase hepatic glucose production and VLDL secretion (6,7). High plasma NEFA lead to lipid accumulation in non-adipose tissues and interfere with insulin signaling (8,9). Also, enlarged VF secretes a wide range of pro-inflammatory cytokines that reduce insulin signaling and promotes endothelial dysfunction (10).

Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) is a ligand-activated nuclear receptor that is highly expressed in mammalian white adipose tissue (WAT) where it regulates the expression of a number of genes involved in lipid and glucose metabolism. PPAR $\gamma$  agonists of the thiazolidinedione (TZD) class are currently used for the treatment of insulin resistance and type 2 diabetes. The mechanisms involved in the insulin-sensitizing effect of PPAR $\gamma$  agonists are not completely understood but appear to involve changes in WAT metabolism to a large extent. In WAT, TZDs affect adipokine secretion and favor lipid uptake, retention, and fatty acid (FA) oxidation (11,12), which together lessen the pro-inflammatory and lipid burden on non-adipose tissues.

Thiazolidinediones increase overall adiposity (13,14) by favoring lipid deposition in SF while reducing or maintaining VF mass (14-16). Redistributing fat from lipolytic VF to more anabolic SF is thought to play a role in the insulin-sensitizing activity of PPAR $\gamma$  agonists in humans. The mechanisms of such fat redistribution are not known. Thiazolidinediones strongly induce differentiation of human preadipocytes isolated from SF but not those from VF (17,18). However, the depot specificity of PPAR $\gamma$  agonism on overall adipose lipid metabolism has not been addressed in detail. Our previous study suggested that PPAR $\gamma$  agonism may lead to the redistribution of WAT by exerting depot-specific actions on several aspects of adipose lipid metabolism (19).

Fat storage represents the balance between accretion (uptake, synthesis, esterification) and depletion (release of lipolytic products, oxidation, energy-consuming cycling, thermogenesis). This study aimed to establish by which of these pathways PPAR $\gamma$  agonism leads to depot-specific fat accretion. To this end, determinants of adipose lipid metabolism were assessed in SF and VF, including TG-derived FA uptake and retention, lipolysis, FA reesterification, and energy expenditure. Quantification of the level of expression of major genes of these pathways was combined with their assessment at the functional level.

### RESEARCH DESIGN AND METHODS

Animals and treatment. Male Sprague Dawley rats (90-100g, n=12 per protocol, 3 protocols; Charles River Laboratories, St.Constant, QC, Canada) were housed individually in stainless steel cages (23 ± 1°C, 12:12 h light:dark cycle, lights on at 0700). The animals were cared for and handled in conformance with the Canadian Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, and the protocols were approved by our institutional animal care committee. Initially, rats had free access to tap water and a stock diet (Charles River Rodent Diet #5075; Ralston Products, Woodstock, ON, Canada). Rats were then fed a purified high-sucrose, high-fat diet (HSHF, composition detailed in (20)) to maximize the effect of PPAR $\gamma$  agonism on lipid flux. During the 3-week feeding period, half of the animals were given the non-TZD PPAR $\gamma$  agonist COOH [2-(2-(4-phenoxy-2-propylphenoxy)ethyl)indole-5-acetic acid] as an adjunct to their diet at a dose of 30 mg/kg<sup>'</sup>day, previously shown to bring about frank redistribution of fat in the rat (19).

Serum and tissue sampling. Rats were killed by decapitation after a 10-h fast, trunk blood was centrifuged ( $1500 \times g$ , 15 min, 4°C), and serum was stored at -80°C. Tissue samples (inguinal depot as representative of SF and retroperitoneal depot as representative of VF) were homogenized and processed exactly as described earlier (21,22), and stored at -80°C until measurements of enzyme activities. Fresh samples were used for fat cell isolation and explant incubation as described below.

Adipose tissue mRNA levels. Total RNA was isolated using QIAzol and the RNeasy Lipid Tissue Kit (QIAGEN, Mississauga, ON, Canada). For cDNA synthesis, Expand reverse transcriptase (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) was used following manufacturer's instructions and cDNA was diluted in DNase-free water (1:25) before quantification by real-time PCR (primers listed in Table 1). mRNA transcript levels were measured using a Rotor Gene 3000 system (Montreal Biotech, Montreal, QC, Canada). Chemical detection of the PCR products was achieved with SYBR Green I (Molecular Probes, Willamette Valley, OR). Data are expressed as the ratio between the expression of the target gene and the housekeeping gene L27.

Adipocyte isolation and cell size distribution. Adipocytes were isolated from fat pads by a slight modification of Rodbell's method (23). Briefly, fat pads were removed and placed in 2.5% Krebs-Ringer bicarbonate (KRB) buffer. The minced tissue was incubated in 2.5% KRB containing 0.25 mg/ml collagenase (Invitrogen) at 37°C for 18–21 min with shaking at 150 cycles/min. Cells were then filtered through a nylon mesh, and collagenase was removed by repeated (3×) washings with fresh KRB. Cell size distribution (in 10  $\mu$ m increments, 20-260  $\mu$ m) was determined microscopically in cell suspensions containing 0.4% trypan blue. Structures <20 $\mu$ m were not considered. Cell diameter was measured in at least 300 cells per depot for each rat.

Adipose tissue uptake of TG-derived FA. Control and COOH-treated (18 days) rats were cannulated into the jugular vein under isoflurane anesthesia. After 3 days of recovery, 10-h fasted rats were injected through the jugular catheter with 0.15 ml/kg of 10% Intralipid containing <sup>3</sup>H-9,10-labeled trioleoylglycerol (570 dpm/nmol FA; kindly provided by Drs. T. and G. Olivecrona, Umeå University, Sweden) diluted 1:6 with 20% Intralipid (165 mg/kg of TG were injected), and prepared as described previously (24). Twenty min after injection, rats were killed by ketamine-xylazine injection. Radioactivity content of tissues was quantified as described previously (24). Lipid uptake is expressed as % injected dose.

Adipose tissue LPL activity. Tissue homogenates were incubated with a substrate mixture containing [carboxyl-<sup>14</sup>C]triolein, and <sup>14</sup>C-NEFA released by LPL were separated and counted (21). LPL activity is expressed as microunits (1  $\mu$ U = 1  $\mu$ mol NEFA/h at 28°C) per total depot to illustrate global tissue availability.

*Adipose tissue PEPCK activity.* Tissue homogenates were incubated with [<sup>14</sup>C]bicarbonate and incorporation of radioactivity into acid-stable malate was measured after <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> evaporation (22). PEPCK activity was calculated as nmol phospho*enol*pyruvate converted to malate per min at 37°C, and is expressed per unit total tissue protein (25).

[1-<sup>14</sup>C]pyruvate incorporation into lipids. As a measure of FA reesterification into TG (26), isolated adipocytes (~7500/well) were incubated for 2 h in 2.5% KRB without glucose in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% O<sub>2</sub> at 37°C. KRB was supplemented with 5 mmol/l pyruvate and 1  $\mu$ Ci [1-<sup>14</sup>C]pyruvic acid (Na salt, Amersham, Piscataway, NJ). Total lipids were extracted (27) and [1-<sup>14</sup>C]pyruvate incorporation was counted.

*Lipolysis.* Pieces of tissue (20-25 mg) obtained from 10 h-fasted rats were incubated 2 h in 1 ml 2.5% KRB with or without insulin (100 pmol/l) in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% O<sub>2</sub> at 37°C. Explants were then removed and incubation media were frozen until measurement of NEFA (Wako, Richmond, VA) and glycerol (Sigma, Oakville, ON, Canada). NEFA and glycerol release are expressed per unit DNA determined using the DNeasy Tissue Kit (QIAGEN).

**Oxygen consumption.** Isolated adipocytes were washed in 2.5% KRB. Excess buffer was removed and 200  $\mu$ l of floating packed cells were divided into aliquots in a BD Oxygen Biosensor System (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada) in triplicate. Plates were read on a Fluostar Galaxy fluorometer (BMG Technologies, Durham, NC) at 1-min intervals for 120 min at an excitation wavelength of 485 nm and emission wavelength of 610 nm. Results are expressed as the slope of fluorescence intensity/time (s) × 1000/ $\mu$ g DNA.

*Mitochondrial mass.* Isolated adipocytes were incubated at 37°C for 30 min in 2.5% KRB with 100 nmol/l MitoTracker Green FM (Molecular Probes, Invitrogen), a mitochondrion-specific dye, and images were acquired with an Evolution QEi camera (MediaCybernetics, Silver Spring, MD) mounted on an Olympus BX51 microscope (Olympus America, Melville, NY). Quantification was achieved using Image Pro Plus 5.0 (MediaCybernetics).The fluorescence/cell surface × 100 ratio was measured on 25 different cells for each depot and averages were calculated for each rat.

*Plasma analytes.* Thawed plasma samples were used to measure levels of glucose (glucose oxidase method, YSI 2300 STAT Plus glucose analyzer), insulin (RIA, Linco Research, St. Charles, MO), TG (enzymatic, Roche Diagnostics, Montreal, QC, Canada), NEFA and glycerol (as above).

Statistical analysis. Data are means  $\pm$  SEM. Morphometric and serum variables were analyzed by Student's unpaired *T* test. Adipose tissue variables were first analyzed by factorial ANOVA to establish the individual and interactive effects of fat localization, with two levels (SF, VF), and PPAR<sub>Y</sub> agonist treatment, with two levels (Control, COOH). Individual pairwise between-group comparisons were then made using Fisher's Protected Least Significant Difference test. Significance was set at *P*<0.05.

#### RESULTS

#### Morphometry, serum variables, and fat distribution

The 21-day COOH treatment tended to increase food intake, body weight and body weight gain, however the effect did not reach significance (Table 2). The agonist did not affect fasting glucose but significantly reduced circulating insulin (-72%). As also anticipated, circulating TG and NEFA were reduced by the agonist (-28% and -42%, respectively). Serum glycerol was slightly increased (24%) by COOH, resulting in a large decrease (-43%) in the serum NEFA/glycerol ratio. Confirming WAT remodeling by COOH, SF weight accretion from beginning to end of the 3-week treatment was more than 2-fold larger in treated (gain of 9.5 g) than control rats (gain of 4.5 g), whereas that of VF was reduced by 32% in treated (gain of 3.6 g) vs. control rats (gain of 5.3 g), such that the VF/SF weight ratio was reduced by more than half (Control, 1.0 vs. COOH, 0.4) (Fig. 1A). Total DNA content was markedly increased by COOH in SF (3-fold), but remained unaffected in VF (Fig. 1B). PPARy2 expression level was higher in VF than in SF, and was not affected by the agonist (Fig. 1C). COOH brought about the expected shift in adipocyte size distribution toward smaller cell diameters in SF and VF, the shift being however much more marked in the latter than in the former (Fig. 1C). Indeed, COOH reduced peak diameter by <10 µm in SF and by ~25 µm in VF. Of note was the large COOH-induced increase in the relative number of cells of the smallest diameters (>50  $\mu$ m) in SF, likely representing newly differentiated adipocytes, such increase being barely detectable in VF.

#### Determinants of adipose FA uptake and esterification

To gain insight into the mechanisms implicated in COOH-induced WAT remodeling, we first examined the expression of genes involved in FA handling, and measured functional uptake of FA derived from lipoprotein-bound TG. COOH increased both the mRNA level (Fig. 2A) and total tissue activity (Fig. 2B) of the TG-hydrolyzing enzyme LPL 2-fold in SF, but remained without effect in VF. Levels of mRNA of the fatty acid binding protein aP2, a major adipose PPARγ target involved in adipogenesis, long-

chain FA uptake and retention (28,29) was increased 2-fold by COOH in SF, but remained unaffected in VF (Fig. 2C). At the functional level, COOH increased the in vivo uptake of FA derived from the hydrolysis of TG in both depots, the effect being however much more marked in SF (14-fold) than in VF (4-fold) (Fig. 2D). DGAT-1 catalyzes the terminal, rate-limiting step in TG synthesis, and its overexpression favors fat gain (30). COOH increased DGAT-1 expression 2-fold in SF (Fig. 2E), suggesting an increase in FA commitment to TG synthesis, whereas DGAT-1 mRNA in VF was unchanged by the agonist.

#### Lipolysis

Although PPARy agonism reduces serum NEFA levels, there is evidence that it stimulates adipocyte lipolysis (31-33), concomitantly with stimulation of FA reuptake and reesterification that counter the release of lipolytic products. The possible contribution of COOH-mediated modulation of lipolysis to differential fat accretion was therefore assessed. In control rats, as anticipated, basal glycerol and NEFA release was higher in VF than in SF (Fig. 3A, top panel). COOH increased basal glycerol release in both SF (3-fold) and VF (2-fold). Because of increased FA reesterification (see below), the effect of COOH on NEFA release was of lesser magnitude (nil in the case of VF, Fig. 3A, middle panel) than that predicted by the increase in glycerol release, resulting in a 40% reduction in the NEFA/glycerol ratio in both depots (Fig. 3A, bottom panel). The combined stimulatory effects of COOH on lipolysis and FA reesterification observed in vitro were reflected in plasma levels of lipolytic products, that is higher glycerol and lower NEFA and NEFA/glycerol ratio in COOH vs. control rats (Table 2). A physiological concentration of insulin did not affect glycerol and NEFA release from tissues of untreated rats (Fig. 3B), but did tend to reduce glycerol and NEFA release in tissues of COOH-treated rats, suggesting sensitization of adipose lipolysis to insulin action. Of note is the fact that FA cycling (reflected by the reduced NEFA/glycerol ratio) was amplified in the presence of insulin (SF, -56%; VF, -67% compared to untreated, vs. -40% without insulin), indicating additivity of the positive action of chronic COOH and acute insulin on FA reesterification. Finally, expression levels of ATGL (Fig. 3C), recently highlighted as an important determinant of basal lipolysis, were higher in VF than in SF, and were increased by COOH

in both VF (2.3-fold) and SF (1.5-fold), in general congruence with treatment effects on lipolytic rates.

#### Determinants of glycerol and FA cycling

PPARγ agonism stimulates in WAT the reesterification into TG of both glycerol and FA released by intracellular lipolysis, thereby favoring lipid retention, through enhancing the expression of GyK (glycerol phosphorylation) and PEPCK (glyceroneogenesis) (26). Their possible contribution to differential fat accretion was therefore assessed. COOH increased PEPCK activity (Fig. 4A) and mRNA levels (Fig. 4B) in both depots. Basal activity and mRNA of PEPCK were lower in SF, and the relative increase induced by the PPARγ agonist was slightly larger in SF than in VF. In parallel with PEPCK, [1-<sup>14</sup>C]pyruvate incorporation into lipids (a functional measure of glyceroneogenesis) was more important in VF than in SF, and was increased by COOH in both depots (Fig. 4C). COOH also increased mRNA levels of GyK 2-3-fold in both SF and VF (Fig. 4D).

### Determinants of FA oxidation and energy expenditure

Despite favoring whole body positive energy balance, PPAR $\gamma$  agonists locally increase WAT energy expenditure (11). We therefore sought to determine whether COOH favored the latter differentially in SF and VF. PDK-2 and PDK-4 phosphorylate and inactivate the pyruvate dehydrogenase complex (PDC) and thereby facilitate FA oxidation. PDK-2 mRNA expression was augmented by COOH only in VF, and PDK-4 mRNA was increased much more strongly in VF than in SF (Fig. 5A). A similar pattern (stimulation by COOH in both depots, but more marked in VF than in SF) was observed for mCPT-1, the limiting enzyme in FA transport to the mitochondrion, PGC-1 $\alpha$ , a major cofactor involved in thermogenesis, and Acadl, which plays an important role in  $\beta$ -oxidation. Likewise, COOH increased the expression of UCP-1, a key thermogenic gene, to a much greater extent in VF than in SF (note scale change in Fig 5A). At the functional level, in accordance with its effect on gene expression, COOH increased O<sub>2</sub> consumption in both adipose depots, but significantly more so in VF than in SF (Fig. 5B).

COOH increased mitochondrial density identically (2.5-fold) in adipocytes isolated from SF and VF (Fig. 6A), and induced important changes in mitochondrial distribution, morphology, and interaction with lipid stores in both depots (Fig. 6B; only VF cells are depicted). Unlike in control cells, mitochondria in adipocytes of COOH-treated rats displayed a reticular shape, and appeared to surround clusters of small lipid droplets, indicating a major rearrangement of the cell's lipid-metabolizing infrastructure.

#### DISCUSSION

This study aimed to identify the mechanisms whereby PPAR $\gamma$  agonism results in the redistribution of adipose tissue to subcutaneous depots at the expense of visceral fat. It was found that COOH, a non-TZD agonist that mimicks the fat remodeling seen in humans treated with TZDs, increased lipid uptake and esterification capacity to a greater extent in SF than in VF. Conversely, COOH enhanced the expression of genes involved in FA oxidation and thermogenesis as well as O<sub>2</sub> consumption to a greater degree in VF than in SF. In this model, fat redistribution elicited by PPAR $\gamma$  agonism is therefore the consequence of concerted changes in multiple pathways of adipose lipid metabolism.

Remodeling of WAT by COOH included cell proliferation exclusively in SF, in which numerous very small adipocytes were present, as well as a reduction in peak adipocyte size indicative of reduced fat content, which was much more marked in VF than in SF. The study is in line with the depot-specific action of PPAR $\gamma$  agonism on fat cell differentiation established in isolated human preadipocytes (17,18). In addition to its effect on fat remodeling, COOH promoted changes in plasma variables that are hallmarks of PPAR $\gamma$  agonism, namely decreases in fasting insulinemia, triglyceridemia, and NEFA (29).

The induction of 'lipid trapping' by WAT is regarded as one important mechanism of the insulin-sensitizing action of PPAR<sub>Y</sub> agonism, and the lipid trapping-insulin sensitivity relationship has been directly demonstrated in rodents (34). The present study extends these findings by demonstrating that PPAR<sub>Y</sub> agonism increases the uptake by WAT not only of circulating NEFA (34,35), but of lipoprotein TG-derived FA as well. In congruence with this functional depot specificity, LPL expression and activity as well as aP2 expression were increased by COOH specifically in SF, extending our previous findings on the role of LPL in this important phenomenon (19). The increase in newly differentiating adipocytes avidly taking up NEFA released from hydrolysis of circulating TG likely contributed to this depot-specific effect of COOH. The study also revealed an as yet unrecognized, SF-specific increase in mRNA levels of DGAT-1, suggestive of a preferential commitment of FA taken up by SF toward esterification (30). The agonist also increased TG-derived FA uptake in VF, albeit to a much lesser extent than in SF, without altering LPL or aP2, however these two proteins are not the only factors affecting TG-derived lipid uptake (36). Finally, in a separate study with chow-fed rats treated with COOH for 3 weeks and then fasted for 24 h, quantification of mRNA levels of SREBP-1c, a PPARy target and a master regulator of the expression of lipogenic genes, revealed a 2-3-fold COOH-induced stimulation that was identical in SF and VF (Laplante M, Deshaies Y, unpublished observations). Taken together, the above findings establish that, specifically in SF, COOH increased the relative number of small adipocytes as well as the potential for hydrolysis of lipoprotein-bound TG and subsequent FA uptake, sequestering and esterification, thus creating conditions favoring fat accretion.

A stimulatory effect of PPARy agonists on adipose lipolysis was reported earlier in obese Zucker rats (31,32), and was confirmed here and in our recent study (33). Higher lipolysis is counteracted by increased FA reesterification into TG, as discussed below, as well as by increased FA reuptake by adipocytes (34,35). In the present study, basal lipolysis in untreated rats was, as expected, higher in VF than in SF, and was robustly increased by COOH in both depots. Of note is the fact that lipolysis was reduced by a low, physiological concentration of insulin only in fat explants from COOH-treated animals, confirming higher sensitivity to the antilipolytic effect of insulin (31,32). Thus, increased FA cycling together with potentiation of the sensitivity of lipolysis to insulin action counteract net FA release from adipocytes. COOH stimulated lipolysis in both depots roughly equally, and lipolytic rate did not appear to contribute to the depot-specific effect of COOH on fat accretion. The study also confirmed our previous study (33) showing that ATGL is a PPARy target. Quantitative depot specificity of the COOH effect on ATGL mRNA appeared more pronounced than that on lipolysis, however other lipolysis-related enzymes are altered by PPARy agonism (33) and likely influence, together with depot differences in reesterification rates, the net release of lipolytic products.

The TZD-induced reduction in circulating NEFA was recently shown to be associated with an increase in PEPCK-mediated glyceroneogenesis in WAT (26). However, the contribution of this pathway to PPAR $\gamma$ -induced fat redistribution has not been addressed. As shown previously (26), basal PEPCK expression and activity as well as  $[1 \ ^{14}C]$ -pyruvate incorporation into lipids were higher in VF than in SF. The expression levels of GyK, which under control conditions does not contribute much to glycerol recycling, was similar in both depots. We show here that COOH robustly increased PEPCK,  $[1-^{14}C]$ -pyruvate incorporation into lipids, and GyK expression in both depots. The relative increase (fold over control) tended to be larger in SF than in VF, however absolute values remained higher in the latter than in the former. Therefore, as in the case of lipolysis, the rate of reesterification of lipolytic products does not appear to contribute to a large extent to the depot-specific action of PPAR<sub>Y</sub> agonism on fat accretion in this model.

Thiazolidinediones increase the expression of genes involved in lipid oxidation and energy expenditure (28,29), and promote mitochondrial biogenesis in WAT (11,12,37,38). The resulting increase in energy expenditure likely comprises contributions from FA oxidation, energy-consuming FA/TG cycling, and uncoupling of oxidative phosphorylation. In concordance with the above actions, COOH was found here to increase the expression of several transcripts involved in FA oxidation, thermogenesis, and mitochondrial proliferation. Firstly, mRNA levels of PDK-2 and 4, which lower glucose utilization and facilitate FA oxidation (39), were increased by COOH. PPARy agonism was earlier shown to reduce PDK-4 expression in muscle but to increase its expression in WAT (40). The present study extends these findings by showing that stimulation of PDK-4 expression is more marked in VF than in SF, and further revealed a concomitant stimulation of PDK-2, which occurred exclusively in VF. In addition, the expression of mCPT-1, Acadl and UCP-1 followed the same pattern, with a particularly striking between-depot difference in the case of UCP1, confirming and extending our previous study (19). Such differential gene expression had a functional impact because COOH stimulated O2 consumption in both tissues, but more strongly so in VF than in SF, such that energy expenditure, which was similar in both depots of control rats, became nearly 3-fold higher in VF than in SF of COOH-treated rats. Stimulation of energy expenditure contributed in all likelihood to restrain fat accretion in VF. In SF, the stimulation of lipid uptake clearly overwhelmed the increase in energy expenditure, leading to the establishment of a balance favoring fat deposition.

The higher activation of  $O_2$  consumption in VF than SF led us to postulate that COOH might exert depot-specific effects on mitochondrial biogenesis. However, it was found that COOH strongly increased mitochondrial mass in both depots, indicating that the larger stimulation of energy expenditure in VF relative to SF was instead associated with the increase in oxidative/uncoupling capacity resulting from the changes in enzyme expression described above. In addition to increasing the number of mitochondria, COOH induced important changes in mitochondrial distribution, morphology, and interaction with lipid stores, as reported earlier in rats and dogs treated with rosiglitazone (11,37). The augmentation of mitochondrial mass coupled with a higher contact surface between mitochondria and lipid droplets may have contributed to the overall stimulatory action of COOH on O<sub>2</sub> consumption.

The observed COOH-induced increase in the potential for FA oxidation, energy dissipation, mitochondrial biogenesis, and O2 consumption confirm earlier findings with TZDs (11,38) and indicate that white adipocytes, either newly differentiated or mature, have acquired features that normally characterize brown adipose cells. A further indication of this is the COOH-induced increase in the expression of PGC-1a, a molecular switch that turns on several key components of the adaptive thermogenic program in brown fat (41). Overexpression of PGC-1a in white adipocytes increases UCP-1 expression, proteins of the respiratory chain, and FA oxidation exactly as occurs in brown adipose cells (42). In the present study, the stronger COOH-mediated induction of PGC-1a expression in VF than in SF therefore constitutes a likely mechanism explaining the depot-specific magnitude of the activation of oxidative/thermogenic gene expression and O2 consumption. Why such depot specificity of action of COOH on PGC-1a did not translate into differences in mitochondrial mass is unknown, but may conceivably involve interaction with the many other factors modulating the complex mitochondrial biogenesis program (11). Finally, it is worth noting that the PPARy-mediated increase in WAT energy expenditure does not appear to be of sufficient magnitude to impact whole body energy balance.

The reasons why various pathways of lipid metabolism are differentially recruited by PPAR<sub>γ</sub> agonism in SF and VF have yet to be established. There is no major difference in PPARγ expression between human SF and VF (43-45), whereas higher expression in VF compared to SF observed here confirms an earlier study in high fat-fed rats (46). PPARγ2 expression was unchanged by COOH, ruling out the possibility that receptor expression levels might explain the depot-specific modulation of fat accretion by exogenous PPARγ agonism. PPARγ activity is however highly regulated by the recruitment of a vast array of nuclear coactivators and corepressors (47,48) with widely diverging metabolic consequences. Differential recruitment of such cofactors in SF and VF by the PPARγ receptor-agonist complex constitutes an attractive possibility to explain, at the molecular level, the depot-specific actions of PPARγ agonism.
# ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research to YD. ML was the recipient of a Studentship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. WTF was the recipient of a Postdoctoral Fellowship from a CIHR Training In Obesity Program grant.

### REFERENCES

- Kissebah AH, Vydelingum N, Murray R, Evans DJ, Hartz AJ, Kalkhoff RK, Adams PW: Relation of body fat distribution to metabolic complications of obesity. J Clin Endocrinol Metab 54:254-260, 1982
- Kannel WB, Cupples LA, Ramaswami R, Stokes J, 3rd, Kreger BE, Higgins M: Regional obesity and risk of cardiovascular disease: the Framingham Study. J Clin Epidemiol 44:183-190, 1991
- Krotkiewski M, Bjorntorp P, Sjostrom L, Smith U: Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution. J Clin Invest 72:1150-1162, 1983
- Wajchenberg BL: Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. Endocr Rev 21:697-738, 2000
- 5. Jensen MD: Lipolysis: contribution from regional fat. Annu Rev Nutr 17:127-139, 1997
- Lam TK, Carpentier A, Lewis GF, van de Werve G, Fantus IG, Giacca A: Mechanisms of the free fatty acid-induced increase in hepatic glucose production. Am J Physiol Endocrinol Metab 284:E863-873, 2003
- Lewis GF: Fatty acid regulation of very low density lipoprotein production. Curr Opin Lipidol 8:146-153, 1997
- Kanety H, Hemi R, Papa MZ, Karasik A: Sphingomyelinase and ceramide suppress insulin-induced tyrosine phosphorylation of the insulin receptor substrate-1. J Biol Chem 271:9895-9897, 1996
- Yu C, Chen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H, Wang Y, Bergeron R, Kim JK, Cushman SW, Cooney GJ, Atcheson B, White MF, Kraegen EW, Shulman GI: Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. J Biol Chem 277:50230-50236, 2002
- Lyon CJ, Law RE, Hsueh WA: Minireview: adiposity, inflammation, and atherogenesis. *Endocrinology* 144:2195-2200, 2003
- Wilson-Fritch L, Nicoloro S, Chouinard M, Lazar MA, Chui PC, Leszyk J, Straubhaar J, Czech MP, Corvera S: Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone. *J Clin Invest* 114:1281-1289, 2004
- Boden G, Homko C, Mozzoli M, Showe LC, Nichols C, Cheung P: Thiazolidinediones upregulate fatty acid uptake and oxidation in adipose tissue of diabetic patients. *Diabetes* 54:880-885, 2005

- de Souza CJ, Eckhardt M, Gagen K, Dong M, Chen W, Laurent D, Burkey BF: Effects of pioglitazone on adipose tissue remodeling within the setting of obesity and insulin resistance. *Diabetes* 50:1863-1871, 2001
- Mori Y, Murakawa Y, Okada K, Horikoshi H, Yokoyama J, Tajima N, Ikeda Y: Effect of troglitazone on body fat distribution in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 22:908-912, 1999
- 15. Miyazaki Y, Mahankali A, Matsuda M, Mahankali S, Hardies J, Cusi K, Mandarino LJ, DeFronzo RA: Effect of pioglitazone on abdominal fat distribution and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 87:2784-2791, 2002
- Smith SR, De Jonge L, Volaufova J, Li Y, Xie H, Bray GA: Effect of pioglitazone on body composition and energy expenditure: a randomized controlled trial. *Metabolism* 54:24-32, 2005
- Adams M, Montague CT, Prins JB, Holder JC, Smith SA, Sanders L, Digby JE, Sewter CP, Lazar MA, Chatterjee VK, O'Rahilly S: Activators of peroxisome proliferatoractivated receptor γ have depot-specific effects on human preadipocyte differentiation. *J Clin Invest* 100:3149-3153, 1997
- Sewter CP, Blows F, Vidal-Puig A, O'Rahilly S: Regional differences in the response of human pre-adipocytes to PPARγ and RXRα agonists. *Diabetes* 51:718-723, 2002
- Laplante M, Sell H, MacNaul KL, Richard D, Berger JP, Deshaies Y: PPAR-γ activation mediates adipose depot-specific effects on gene expression and lipoprotein lipase activity: mechanisms for modulation of postprandial lipemia and differential adipose accretion. *Diabetes* 52:291-299, 2003
- Picard F, Boivin A, Lalonde J, Deshaies Y: Resistance of adipose tissue lipoprotein lipase to insulin action in rats fed an obesity-promoting diet. Am J Physiol Endocrinol Metab 282:E412-418, 2002
- Picard F, Naimi N, Richard D, Deshaies Y: Response of adipose tissue lipoprotein lipase to the cephalic phase of insulin secretion. *Diabetes* 48:452-459, 1999
- 22. Brito MN, Brito NA, Brito SR, Moura MA, Kawashita NH, Kettelhut IC, Migliorini RH: Brown adipose tissue triacylglycerol synthesis in rats adapted to a high-protein, carbohydrate-free diet. Am J Physiol 276:R1003-1009, 1999
- Rodbell M: Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. J Biol Chem 239:375-380, 1964
- 24. Hultin M, Carneheim C, Rosenqvist K, Olivecrona T: Intravenous lipid emulsions: removal mechanisms as compared to chylomicrons. *J Lipid Res* 36:2174-2184, 1995

- 25. Festuccia WT, Kawashita NH, Garofalo MA, Moura MA, Brito SR, Kettelhut IC, Migliorini RH: Control of glyceroneogenic activity in rat brown adipose tissue. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 285:R177-182, 2003
- Tordjman J, Chauvet G, Quette J, Beale EG, Forest C, Antoine B: Thiazolidinediones block fatty acid release by inducing glyceroneogenesis in fat cells. J Biol Chem 278:18785-18790, 2003
- MacDonald MJ, Grewe BK: Inhibition of phosphoenolpyruvate carboxykinase, glyceroneogenesis and fatty acid synthesis in rat adipose tissue by quinolinate and 3mercaptopicolinate. *Biochim Biophys Acta* 663:302-313, 1981
- Berger J, Moller DE: The mechanisms of action of PPARs. Annu Rev Med 53:409-435, 2002
- Spiegelman BM: PPAR-γ: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. Diabetes 47:507-514, 1998
- Chen HC, Stone SJ, Zhou P, Buhman KK, Farese RV, Jr.: Dissociation of obesity and impaired glucose disposal in mice overexpressing acyl coenzyme a:diacylglycerol acyltransferase 1 in white adipose tissue. *Diabetes* 51:3189-3195, 2002
- Oakes ND, Thalen PG, Jacinto SM, Ljung B: Thiazolidinediones increase plasmaadipose tissue FFA exchange capacity and enhance insulin-mediated control of systemic FFA availability. *Diabetes* 50:1158-1165, 2001
- 32. Kalderon B, Mayorek N, Ben-Yaacov L, Bar-Tana J: Adipose tissue sensitization to insulin induced by troglitazone and MEDICA 16 in obese Zucker rats in vivo. Am J Physiol Endocrinol Metab 284:E795-803, 2003
- 33. Festuccia WT, Laplante M, Berthiaume M, Gélinas Y, Deshaies Y: PPARγ agonism increases rat adipose tissue lipolysis, expression of acylglycerol lipases, and the response of lipolysis to hormonal control. *Diabetologia* In press, 2006
- 34. Ye JM, Dzamko N, Cleasby ME, Hegarty BD, Furler SM, Cooney GJ, Kraegen EW: Direct demonstration of lipid sequestration as a mechanism by which rosiglitazone prevents fatty-acid-induced insulin resistance in the rat: comparison with metformin. *Diabetologia* 47:1306-1313, 2004
- 35. Coort SL, Coumans WA, Bonen A, van der Vusse GJ, Glatz JF, Luiken JJ: Divergent effects of rosiglitazone on protein-mediated fatty acid uptake in adipose and in muscle tissues of Zucker rats. *J Lipid Res* 46:1295-1302, 2005
- Faraj M, Sniderman AD, Cianflone K: ASP enhances in situ lipoprotein lipase activity by increasing fatty acid trapping in adipocytes. J. Lipid Res. 45:657-666, 2004

- Toseland CD, Campbell S, Francis I, Bugelski PJ, Mehdi N: Comparison of adipose tissue changes following administration of rosiglitazone in the dog and rat. *Diabetes Obes Metab* 3:163-170, 2001
- Bogacka I, Xie H, Bray GA, Smith SR: Pioglitazone induces mitochondrial biogenesis in human subcutaneous adipose tissue in vivo. *Diabetes* 54:1392-1399, 2005
- Holness MJ, Sugden MC: Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity by reversible phosphorylation. *Biochem Soc Trans* 31:1143-1151, 2003
- 40. Way JM, Harrington WW, Brown KK, Gottschalk WK, Sundseth SS, Mansfield TA, Ramachandran RK, Willson TM, Kliewer SA: Comprehensive messenger ribonucleic acid profiling reveals that peroxisome proliferator-activated receptor γ activation has coordinate effects on gene expression in multiple insulin-sensitive tissues. *Endocrinology* 142:1269-1277, 2001
- Lin J, Handschin C, Spiegelman BM: Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab* 1:361-370, 2005
- 42. Tiraby C, Tavernier G, Lefort C, Larrouy D, Bouillaud F, Ricquier D, Langin D: Acquirement of brown fat cell features by human white adipocytes. J Biol Chem 278:33370-33376, 2003
- 43. Yanase T, Yashiro T, Takitani K, Kato S, Taniguchi S, Takayanagi R, Nawata H: Differential expression of PPAR γ1 and γ2 isoforms in human adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 233:320-324, 1997
- 44. Lefebvre AM, Laville M, Vega N, Riou JP, van Gaal L, Auwerx J, Vidal H: Depotspecific differences in adipose tissue gene expression in lean and obese subjects. *Diabetes* 47:98-103, 1998
- Montague CT, Prins JB, Sanders L, Zhang J, Sewter CP, Digby J, Byrne CD, O'Rahilly S: Depot-related gene expression in human subcutaneous and omental adipocytes. *Diabetes* 47:1384-1391, 1998
- 46. Rodriguez E, Ribot J, Rodriguez AM, Palou A: PPAR-γ2 expression in response to cafeteria diet: gender- and depot-specific effects. *Obes. Res.* 12:1455-1463, 2004
- 47. Picard F, Gehin M, Annicotte J, Rocchi S, Champy MF, O'Malley BW, Chambon P, Auwerx J: SRC-1 and TIF2 control energy balance between white and brown adipose tissues. *Cell* 111:931-941, 2002
- Leonardsson G, Steel JH, Christian M, Pocock V, Milligan S, Bell J, So PW, Medina-Gomez G, Vidal-Puig A, White R, Parker MG: Nuclear receptor corepressor RIP140 regulates fat accumulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:8437-8442, 2004

## TABLES

Gene	Accession #	5' Primer (5'-3')	3' Primer (5'-3')
aP2	NM_053365	ATGTGTGATGCCTTTGTGGG	CCCAGTTTGAAGGAAATCTC
Acadl	NM_012819	AGCTCCCACAGGAAAGGCTT	CTCGAGCATCCACGTAGGCT
ATGL	XM_341960	CACTTTAGCTCCAAGGATGA	TGGTTCAGTAGGCCATTCCT
DGAT-1	NM_053437	TATTACTTCACTTTTGCTTCC	AAAGTAGGTGACAGACTCAG
GyK	NM_024381	CCTGTCCATTGAAATGTGTCATCC	GCCATGAAGCCATGACAATTAGTG
LPL	NM_012598	AACCTTTGTGGTGATCCATGGA	CGAAATCCGCATCATCAGGA
L27	NM_022514	CTGCTCGCTGTCGAAATG	CCTTGCGTTTCAGTGCTG
mCPT-1	NM_013200	CGGAAGCACACCAGGCAGTA	GCAGCTTCAGGGTTTGTCGGAATA
PDK-2	NM_030872	GGGGTGTCCCCTTGAGGAAGAT	TTCTTGGGCTCTGTGCTGGG
PDK-4	NM_053551	TTCTACTCGGATGCTCATGA	CACCTCGGTCAGAAATCTTG
PEPCK	NM_198780	TGGGTGATGACATTGCCTGG	ACCTTGCCCTTATGCTCTGCAG
PGC-1a	NM_031347	TCCTGTTACTATTATGAATCAAGCC	AAACCATAGCTGTCTCCATCATCC
PPARy2	AF156666	GGTGAAACTCTGGGAGATCC	TGAGGGAGTTTGAAGGCTCTTC
UCP-1	NM_012682	TGGTGAGTTCGACAACTTCC	GTGGGCTGCCCAATGAATAC

**Table 1.** Primers used for quantitation of mRNA by real-time qPCR

Abbreviations: aP2, adipose fatty acid binding protein; Acadl, long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase; ATGL, adipose triglyceride lipase; DGAT-1, diacylglycerol acyltransferase 1; GyK, glycerol kinase; LPL, lipoprotein lipase; mCPT-1, muscle-type carnitine palmitoyltransferase 1; PDK-2 and -4, pyruvate dehydrogenase kinase 1 and 4; PEPCK, phospho*enol*pyruvate carboxykinase; PGC-1 $\alpha$ , PPAR $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$ ; PPAR $\gamma$ 2, peroxisome proliferator-activated receptor 2; UCP-1, uncoupling protein 1.

	Control	СООН
Food intake (MJ)	8.4±0.4	8.8±0.5
Final body weight (g)	326±13	356±20
Body weight gain (g)	172±11	199±15
Glucose (mmol/L)	7.8±0.2	7.5±0.2
Insulin (pmol/L)	252±53	70±11 *
Triglycerides (mmol/L)	2.4±0.3	1.4±0.2 *
NEFA (mmol/L)	0.61±0.02	0.44±0.05 *
Glycerol (mmol/L)	0.17±0.01	0.21±0.02 *
NEFA/glycerol ratio	3.7±0.2	2.1±0.2 *

Table 2. Morphometric and plasma variables in rats treated or not with COOH for 3 weeks

Data are mean  $\pm$  SEM of 6 rats. \* Different from Control, P < 0.05.

#### FIGURE LEGENDS

**Figure 1**. Depot weight (A), total DNA (B), PPAR $\gamma$ 2 mRNA level (C), and adipocyte size distribution (D) of SF and VF of rats treated or not with COOH for 3 weeks. In (A), hatched areas indicate depot weights measured in a separate group of rats at the beginning of the 3-week treatment period. In (D), numbers on *x* axis indicate upper limit of a 10 µm range; SEM were omitted for clarity. Data are expressed as mean ± SEM of 6 rats. \* *P* < 0.05 vs. same depot in control group, † *P* < 0.05 vs. SF in same treatment group.

**Figure 2.** LPL mRNA level (A) and hydrolytic activity (B), mRNA levels of aP2 (C), uptake of chylomicron TG-derived labeled FA (D), and mRNA level of DGAT-1 (E) in SF and VF of rats treated or not with COOH for 3 weeks. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of 6 rats. \* *P* < 0.05 vs. same depot in control group, † *P* < 0.05 vs. SF in same treatment group.

**Figure 3**. Basal (A) and insulin-inhibited (B) release of glycerol (top panels) and NEFA (middle panels), NEFA/glycerol ratio (A, B, bottom panels), and mRNA level of ATGL (C) in SF and VF explants isolated from rats treated or not with COOH for 3 weeks. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of 6 rats. \* *P* < 0.05 vs. same depot in control group, † *P* < 0.05 vs. SF in same treatment group, ‡ *P* < 0.05 vs. same depot and treatment incubated without insulin (A).

**Figure 4**. PEPCK activity (A) and mRNA level (B), incorporation of  $[1-^{14}C]$ -pyruvate into lipids (C), and GyK mRNA level (D) in SF and VF of rats treated or not with COOH for 3 weeks. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of 6 rats. \* *P* < 0.05 vs. same depot in control group, † *P* < 0.05 vs. SF in same treatment group.

**Figure 5**. mRNA levels of PDK-2, PDK-4, mCPT-1, PGC-1 $\alpha$ , UCP-1, and Acadl (A), and adipocyte O<sub>2</sub> consumption (B) in SF and VF of rats treated or not with COOH for 3 weeks. Data are expressed as mean ± SEM of 6 rats. \* *P* < 0.05 vs. same depot in control group, † *P* < 0.05 vs. SF in same treatment group.

Figure 6. Mitochodrial mass in live adipocytes isolated from SF and VF of rats treated or not with COOH for 3 weeks (A), and representative micrographs of adipocytes isolated from the retroperitoneal depot of control and COOH-treated rats (B). In (A), data are expressed as the mean  $\pm$  SEM of 6 rats in each of which 25 cells were analyzed. \* *P* < 0.05 vs. same depot in control group. In (B), white arrows indicate clusters of small lipid droplets surrounded by mitochondria.

# FIGURES







Figure 2.



Figure 3.







Figure 5.



Figure 6.

# **CHAPITRE 3**

# PPAR-γ AGONISM IMPROVES TRIGLYCERIDEMIA IN RATS BY INCREASING ADIPOSE DEPOT-SPECIFIC LIPOPROTEIN LIPASE ACTIVITY AND TRIGLYCERIDE-DERIVED LIPID UPTAKE

Mathieu LAPLANTE<sup>1</sup>, William T. FESTUCCIA<sup>1</sup>, Geneviève SOUCY<sup>1</sup>, Joel P. BERGER<sup>2</sup>, Gunilla OLIVECRONA<sup>3</sup> and Yves DESHAIES<sup>1</sup>

- <sup>1</sup> Laval Hospital Research Center, Department of Anatomy and Physiology, School of Medicine, Laval University, Québec, Qc, Canada, G1V 4G5
- <sup>2</sup> Department of Metabolic Disoders, Merck Research Laboratories, Rahway, NJ, USA, 07065-900
- <sup>3</sup>Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Umeå University, Umeå, Sweden

article en préparation, 2007

### AVANT-PROPOS

Ce travail, réalisé sous la direction du Dr. Yves Deshaies, a été rendu possible grâce à la collaboration du Dr. William T. Festuccia (stagiaire post-doctoral avec le Dr. Yves Deshaies), de Geneviève Soucy (stagiaire, étudiante en médecine à l'Université Laval), de Yves Gélinas (M.Sc., assistant de recherche), du Dr. Joel P. Berger (Merck Laboratories) et de la Dre. Gunilla Olivecrona (Umeå University). Les canulations ont été réalisées par le Dr. William T. Festuccia. De plus, ce dernier a apporté une aide technique et conceptuelle précieuse lors de la réalisation des protocoles. Il en va de même pour Geneviève Soucy qui, en plus de s'occuper des animaux, a contribué étroitement à la mise au point des méthodes et à la récolte des échantillons. L'utilisation du COOH a été rendue possible grâce au Dr. Joel P. Berger, qui a de plus grandement contribué aux discussions lors de l'écriture du manuscrit. La Dre. Gunilla Olivecrona a contribué à ces travaux en nous fournissant l'émulsion de lipides radioactifs. Cette dernière a aussi aidé à l'achèvement de cet article en partageant son expérience avec notre équipe. Cette étude implique mon entière participation quant à la réalisation de l'ensemble des étapes menant à la publication de cet article, soit la planification, l'exécution du protocole, la mesure des variables plasmatiques et tissulaires et l'analyse statistique. Suite aux corrections du directeur, l'article a été révisé par l'ensemble des coauteurs et il sera éventuellement soumis pour publication.

# RÉSUMÉ

Les récepteurs activés par les proliférateurs des peroxysomes  $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) sont des récepteurs nucléaires hautement exprimés dans le tissu adipeux, dans lequel ils régulent l'expression de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et du glucose. Il est connu que les agonistes PPAR-y réduisent les triglycérides (TG) dans les études produites chez les rongeurs et dans certaines études effectuées chez l'homme. Cette étude avait pour but de quantifier la contribution des tissus (tissus adipeux, muscles, foie) à l'effet hypotriglycéridémiant d'un agoniste PPAR-y. Des rats ont été traités avec l'agoniste PPARy COOH (30 mg/kg/jour) durant 3 semaines. À la fin du traitement, une émulsion synthétique de TG marqués a été injectée à ces animaux et la partition de la radioactivité entre les tissus a été évaluée. L'activité de la lipase lipoprotéique (LPL) a été quantifiée dans les tissus. Cette étude montre que l'agonisme de PPAR-y favorise la clairance des TG en augmentant l'activité de la LPL et la captation des lipides issus de l'hydrolyse des TG de facon spécifique à chaque tissu. Le COOH a fortement augmenté l'activité de la LPL et la captation de lipides marqués dans le tissu adipeux blanc sous-cutané inguinal (TASCi) et dans le tissu adipeux brun (TAB). Des trois tissus adipeux blancs viscéraux récoltés (épididydimaire [TAVe], mésentérique [TAVm], rétropéritonéal [TAVr]), seul le TAVm a montré une augmentation de l'activité de la LPL et de la captation de lipides. De fortes corrélations ont été observées entre la captation de lipides marqués et l'activité de la LPL dans le tissu adipeux, soulignant l'importance de cette enzyme dans l'hydrolyse intravasculaire des TG. Le COOH n'a pas induit la LPL dans les muscles. L'augmentation de la captation des lipides marqués par le muscle des rats traités fut apparemment induite par un procédé indépendant de la LPL. L'augmentation de l'expression des gènes codant pour des protéines impliquées dans la liaison intracellulaire (protéine de liaison des acides gras [aP2]) et dans le transport des acides gras (protéine de transport des acides gras-1 [FATP-1], translocase d'acides gras/CD36 [FAT/CD36]) dans le muscle des animaux traités avec l'agoniste a pu faciliter la captation des acides gras issus de l'hydrolyse des TG dans le muscle et dans le tissu adipeux. Lorsque considérés dans leur ensemble, ces résultats montrent que la LPL adipeuse joue un rôle important dans l'effet hypotriglycéridémiant de l'agonisme de PPAR-y.

#### ABSTRACT

Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-y is a ligand-activated nuclear receptor that is highly expressed in adipose tissue, in which it regulates the expression of numerous genes involved in lipid and glucose metabolism. It is know that PPAR-y agonism reduces circulating triglycerides (TG) in rodent and in some human studies. This study aimed to quantify the relative contribution of tissues (adipose tissues, muscles and liver) to the hypotriglyceridemic effect of a PPAR-y agonist. Rat were treated with the PPAR-y full agonist COOH (30mg/kg/day) for 3 weeks. At the end of the treatment, rats were injected with a synthetic emulsion of radiolabeled TG and the partition of radioactivity between the tissues was evaluated. Lipoprotein lipase (LPL) activity also measured in the tissues collected. This study demonstrates that PPAR-y agonism favors TG clearance by increasing adipose tissue LPL activity and TG-derived lipid uptake in a depot-specific manner. The agonist COOH strongly increased LPL activity and TG-derived lipid uptake in subcutaneous inguinal white adipose tissue (iWAT) and in brown adipose tissue (BAT). Of the three visceral fat depots examined (epididymal [eWAT], mesenteric WAT [mWAT], retroperitoneal WAT [rWAT]), only mWAT showed a constant increase in LPL activity and TG-derived lipid uptake in response to COOH. Robust correlations were observed between TG-derived lipid uptake by adipose tissue and LPL activity, underlining the important role of LPL in this process. The agonist did not increase LPL activity in muscles. The enhancement of TG-derived lipid uptake observed in muscles of COOH-treated rats was apparently mediated by a post-lipolytic process independent of LPL availability. Increased expression of genes coding for proteins involved in fatty acid binding (fatty acid biding protein [aP2]) and transport (fatty acid translocase/CD36 [FAT/CD36], fatty acid transport protein-1 [FATP-1]) in muscles of COOH-treated rats may have facilitated the uptake of fatty acids arising from LPL-mediated hydrolysis of TG, either in adipose tissue or in the muscles themselves. Taken together, these findings establish the major contribution of adipose tissue LPL to the hypotriglyceridemic effect of PPAR-y agonism.

#### INTRODUCTION

Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-γ is a ligand-activated nuclear receptor that is highly expressed in adipose tissue, in which it regulates the expression of numerous genes involved in lipid and glucose metabolism (3). PPAR-γ agonists of the thiazolidinedione (TZD) class are currently used for the treatment of insulin resistance and type 2 diabetes. In addition to improving peripheral insulin sensitivity, PPAR-γ agonists have been shown to reduce circulating triglycerides (TG) in studies using rodents (16, 26, 34, 45) and in some (2, 10, 42), but not all (11, 20, 38) studies performed in humans. Generally, the effect of TZDs on circulating TG is stronger in rodents than in humans. It has been suggested that this inter-species difference may be associated with the presence of brown adipose tissue (BAT) in rodents (25). This fat depot, which is nearly absent in adult humans, has been shown to avidly take up lipids from the circulation in TZD-treated rats.

Plasma TG represent the balance between gut- and liver-derived TG-rich lipoprotein secretion and lipoprotein lipase (LPL)-mediated clearance in various extrahepatic tissues. It is now known that PPAR-γ agonists increase intravascular hydrolysis of TG-rich particles by increasing LPL expression and activity in white adipose tissue (WAT) (26, 27, 29). This effect is mediated by the presence of a functional peroxisome proliferator response element (PPRE) in the promoter of LPL (40). Although several studies did not find a reduction in hepatic very-low density lipoprotein (VLDL) secretion rate in response to PPAR-γ agonists (18, 25, 27), other did so (4, 34), suggesting that reduced secretion of TG-rich particles may contribute to the hypolipidemic effect of these molecules under certain conditions. Discrepancies among the above studies are likely the result of the use of different models and by differences in treatment procedures (agonist, dose, duration). Although the hypotriglyceridemic effect of PPAR-γ agonism may be related to changes in both arms of TG kinetics (clearance and secretion), the increase in TG clearance seen in virtually all studies is likely to play a major role therein.

In humans, TZDs stimulate fat deposition in subcutaneous fat and maintains or reduces fat accretion in visceral WAT (32, 33, 41). Considering that individuals with high

amounts of visceral fat are at high risk for developing metabolic complications compared with individuals with similar amounts of subcutaneous fat (17, 21, 23), the redistribution of WAT by PPAR- $\gamma$  agonism is thought to be important in the amelioration of the metabolic profile. Recent studies using a non-TZD PPAR- $\gamma$  full agonist (COOH) in rats have shown that the redistribution of fat induced by PPAR- $\gamma$  stimulation was associated with increased lipid uptake and esterification in subcutaneous fat and with stimulation of energy expenditure in visceral fat (24, 26). The depot-specific activation of LPL in subcutaneous fat was suggested as a probable mechanism contributing to the redistribution of WAT and the improvement of postprandial triglyceridemia (26). However, direct assessment of TG-derived lipid uptake by tissues (adipose, muscle and liver) and determination of the contribution of these tissues to the hypotriglyceridemic action of PPAR- $\gamma$  agonists have not been evaluated to date.

This study was designed to characterize the contribution of lipid clearance to the reduction in circulating triglycerides (TG) by PPAR-γ agonism. By injecting into rats a synthetic emulsion of radiolabeled TG and by measuring the partition of radioactivity between the tissues, this study aimed to quantify the relative contribution of tissues (adipose tissues, muscles and liver) to the hypotriglyceridemic effect of the agonist COOH.

#### RESEARCH DESING AND METHODS

Animals and treatments. Male Sprague-Dawley rats (90g-100g) (n=24-32 per protocol, 2 protocols) were purchased from Charles River Laboratories (St. Constant, QC, Canada) and housed individually in stainless steel cages in a room kept at  $23 \pm 1^{\circ}$ C with a 10:14-h light-dark cycle (lights on at 1200, off at 2200). The animals were cared for and handled in conformance with the Canadian Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, and the protocols were approved by our institutional animal care committee. Upon arrival, rats had free access to tap water and a ground stock diet (Charles River Rodent Diet #5075; Ralston Products, Woodstock, ON, Canada; digestible energy content: 12.9 kJ/g). Rats were then fed a purified high-sucrose, high-fat diet (HSHF), to maximize the effect of PPAR- $\gamma$  agonism on lipid flux. The composition of the obesity-promoting diet is detailed elsewhere (37). For 23 days, half of the animals were given the non-TZD PPAR- $\gamma$  agonist COOH [2-(2-(4-phenoxy-2-propylphenoxy)ethyl)indole-5-acetic acid] as an adjunct to their diet at a dose of 30 mg/kg/day, previously shown to bring about a frank redistribution of fat in the rat (24, 26). The amount of COOH was adjusted every other day to the average consumption of the diet.

**Triglyceride clearance rate and tissue uptake.** Control and COOH-treated (19 days) rats were cannulated into the jugular vein under isoflurane anesthesia. After 3 days of recovery, rats of the Fasted groups had their food removed for 10 h (from 2300 to 0900). Rats of the Refed groups were first fasted for 17h (from 1200pm to 0500) and were then refed a high-sucrose diet without fat during 6 h. Following the fasting and refeeding periods, the animals were injected through the jugular catheter with 0.150 ml/kg of 10% Intralipid containing <sup>3</sup>H-9,10-labeled trioleoylglycerol (570 dpm/nmol fatty acid) diluted 1:6 with 20% Intralipid [165 mg/kg TG were injected] and prepared as described previously (13). Blood samples (0.15 ml) were collected with an EDTA-containing syringe 1, 2, 5, 10 and 20 min after the injection. Twenty minutes after injection, rats were killed by ketamine-xylazine injection. The radioactivity content of tissues (and blood) was quantified as described previously (13). Lipid uptake is expressed as log % injected dose.

**Serum collection.** Because the radioactive blood from rats injected with the emulsion could not be used for serum determinations, a separate protocol with 24 rats was performed. At the end of the treatment, rats were fasted or refed as described above and animals were killed by decapitation. Trunk blood was centrifuged ( $1500 \times g$ , 15 min, 4°C) and serum was stored at -70°C until later biochemical measurements.

Lipoprotein lipase activity. For the measurement of LPL activity, 100 µl of thawed tissue homogenates were incubated under gentle agitation for 1 h at 28°C with 100 µl of a substrate mixture consisting of 0.2 mol/l Tris-HCl buffer, pH 8.6, which contained 10 MBq/l [*carboxyl*-1 4C]triolein (Amersham, Oakville, Canada) and 2.52 mmol/l cold triolein emulsified in 50 g/l gum arabic, as well as 20 g/l fatty acid–free bovine serum albumin, 10% human serum as a source of apolipoprotein C-II, and either 0.2 or 2 M NaCl. Free oleate released by LPL was then separated from intact triolein and mixed with Universol (Du Pont-NEN, Montréal, Canada), and sample radioactivity was determined in a scintillation counter. LPL activity was calculated by subtracting lipolytic activity determined in a final NaCl concentration of 0.1 M. LPL activity was expressed as microunits (1  $\mu$ U = 1  $\mu$ mol NEFAs released per hour of incubation at 28°C). Results for LPL activity are presented per total tissue to illustrate its global tissue availability in relation to lipid uptake.

**RNA isolation and analysis.** Total RNA was isolated from adipose depots using QIAzol and the RNAeasy Lipid Tissue Kit (QIAGEN, Mississauga, ON, Canada). For cDNA synthesis, Expand Reverse Transcriptase (Roche Diagnostics, Montreal, QC, Canada) was used following manufacturer's instructions and cDNA was diluted in DNase free water (1:25) before quantification by real-time quantitative PCR (qPCR). mRNA transcript levels were measured in duplicate samples using a Rotor Gene 3000 system (Montreal Biotech, Montreal, QC, Canada). The primers used for the PCR reactions are presented in Table 1. Chemical detection of the PCR products was achieved with SYBR Green I (Molecular Probes, Willamette Valley, OR). At the end of each run, melt curve analyses were performed and a few samples representative of each experimental group

were run on agarose gel to verify specificity of the amplification. Data were normalized by calculating the ratio between the expression of the target gene and the housekeeping gene 36B4. Results are expressed as relative expression of candidate genes in COOH-treated rats vs. control rats.

Serum/plasma determinations. Serum glucose concentrations were measured by the glucose oxidase method with the YSI 2300 STAT plus glucose analyzer. Serum insulin was determined by radioimmunoassay (Linco Research, St. Charles, MO) with rat insulin as standard. Serum/plasma TG (Roche Diagnostics, Montreal, QC, Canada), NEFA (NEFA C test kit, Wako Pure Chemical Industries, Richmond, VA) and glycerol (Sigma, Oakville, ON, Canada) were measured enzymatically.

#### RESULTS

As shown in Table 2, treatment with COOH slightly increased cumulative food intake (5%, p=0.05), final body weight (5%, p=0.08) and body weight gain (8%, p=0.04). The agonist did not affect food efficiency (g weight gain per MJ energy ingested). Upon refeeding after 18 h of fasting, PPAR- $\gamma$ -treated rats ingested significantly more food (17%, p=0.01).

Although changes in body weight were relatively modest, COOH led to profound modifications of adipose and non-adipose tissue weight (Table 3). The agonist significantly increased subcutaneous inguinal white adipose tissue (iWAT) (35%, p=0.001). The weight of the visceral retroperitoneal (rWAT) and epididymal (eWAT) depots were both reduced by the agonist (-42% and -35% respectively, p<0.0001). The other visceral adipose tissue examined, the mesenteric WAT (mWAT), was not affected by COOH. Brown adipose tissue (BAT) is known as a major target of PPAR- $\gamma$  agonists in rodents. Here, COOH increased BAT weight by more that 7-fold (p<0.0001). The agonist reduced the weight of the soleus (-15%, p=0.001) and the diaphragm (-26%, p<0.0001). No effect on liver or kidney weight was observed.

Serum variables measured in fasted and refed rats treated or not with COOH are presented in Table 4. Refeeding rats a high-sucrose diet without fat significantly increased serum glucose and insulin concentrations while causing a reduction in nonesterified fatty acid (NEFA) and glycerol levels. As expected, serum TG of control rats did not rise upon refeeding the fat-free diet. However, postprandial TG were reduced by 68% compared to fasting TG in COOH-treated animals. The agonist did not change serum glucose but strongly reduced fasting and postprandial insulinemia (-75% and -25%, respectively). In parallel with these changes, COOH reduced fasting (-26%) and postprandial NEFA (-36%). The absence of effect of the agonist on circulating glycerol led to a significant reduction in the NEFA/glycerol ratio, an indicator of relative NEFA reesterification in adipose tissue.

Lipoprotein lipase, the rate-limiting enzyme in circulating TG catabolism, is considered a key modulator of postprandial triglyceridemia (6). The activation of LPL increases local hydrolysis of TG, providing fatty acids for their storage or use by tissues. In order to determine how COOH led to an increase in TG clearance, LPL activity was measured in several quantitatively important tissues. The activity of LPL is expressed per total adipose depot to reflect the contribution of the whole tissue to TG kinetics. As expected, the activity of LPL was strongly increased upon refeeding in iWAT (Nutritional state effect (N) : p=0.0003), BAT (N: p=0.0002), rWAT (N: p=0.02) and mWAT (N: p<0.0001) but no effect was observed in eWAT (Fig. 1). No major effect of refeeding was observed in muscles. In response to COOH, LPL activity was increased in iWAT (Treatment effect (T): p=0.004), BAT (T: p=0.001) and mWAT (T: p=0.02) and slightly reduced in eWAT (T: p=0.03) and rWAT (T: p=0.07). The activity of LPL was reduced in the diaphragm of COOH-treated rats and no effect was observed in the soleus.

To evaluate the impact of COOH on TG clearance, an emulsion of radiolabeled TG was injected to rats and blood samples were collected at various time points. As expected, the emulsion was rapidly cleared from the circulation (Fig. 2). As also shown in Fig. 2, TG clearance was strongly increased by COOH. No difference between fasting and refeeding was observed in either control or COOH-treated animals.

Twenty minutes after the emulsion injection, rats were killed and tissues were collected. Total lipids were extracted from the tissues and radioactivity was measured as an indicator of TG-derived lipid uptake. As depicted in Fig. 3, COOH strongly increased lipid uptake in iWAT of fasted (14-fold) and refed (3-fold) rats (T: p<0.0001). As expected, higher uptake of lipid in iWAT was observed in refed animals compared to their fasted counterparts (N: p=0.003). The most robust changes in lipid uptake in BAT 44-fold and 9-fold in fasted and refed rats, respectively (T: p<0.0001). Different observations were made in visceral fat depots. Firstly, no treatment or nutritional effects were observed in eWAT. In rWAT, the agonist increased radioactivity uptake only in the fasted state (4-fold) (T: p=0.001). Here again, higher lipid uptake was observed in refed compared to fasted rats (N:

p=0.007). Secondly, visceral mWAT showed a strong increase in lipid uptake in response to COOH. The agonist increased radiolabel content of mWAT in both the fasted (4-fold) and refed (3-fold) states, and a significant effect of refeeding was observed in this tissue (N: p=0.001). In the soleus, COOH increased lipid uptake only in refed rats (4-fold). A significant interaction was noted in this tissue, in which refeeding reduced lipid uptake in control but not in COOH-treated animals (N x T: 0.05). A similar trend was noted in the diaphragm. In addition to adipose depots and muscles, other tissues were collected to further characterize the impact of COOH on TG-derived lipid uptake. As shown previously with the use of synthetic lipid emulsions (13), the amount of radioactivity found in the liver was elevated compared to adipose or skeletal muscles. Notably, treatment with COOH strongly reduced (by half) lipid uptake in the liver of fasted and refed animals (T: p=0.0002). As expected from the clearance curves presented in Fig. 2, the amount of radioactivity that remained in the blood 20 min after the injection was lower in COOHtreated than in control rats (T: p=0.003). The nutritional status did not affect the level of radioactivity remaining in the blood. Finally, COOH treatment and refeeding did not affect the uptake of lipid by the kidneys.

As depicted in Figure 4, strong correlations were observed between LPL activity and TG-derived lipid uptake by adipose tissues, strongly suggesting that the clearance of the emulsion and tissue uptake of radiolabeled lipids is mainly dependent on LPL-mediated hydrolysis of TG. In muscles, no correlations were observed between LPL activity and TGderived lipid uptake. In these tissues, COOH increased lipid uptake in the absence of any change in LPL activity. This suggests that the COOH-mediated increase in TG-derived lipid in muscles is partly independent from changes in LPL availability *per se*. Notably, however, COOH significantly increased muscle expression of genes coding for FAT/CD36, fatty acid transporter-1 (FATP-1) and adipocyte fatty acid binding protein (aP2) (Fig. 5), which are involved in NEFA uptake and binding and which may have contributed to increase muscle TG-derived lipid uptake by increasing LPL efficiency.

#### DISCUSSION

This study demonstrates that PPAR-γ agonism favors TG clearance by increasing adipose tissue LPL activity and TG-derived lipid uptake in a depot-specific manner. The agonist COOH strongly increased LPL activity and TG-derived lipid uptake in subcutaneous fat (iWAT) and in BAT. Of the three visceral fat depots examined (eWAT, mWAT and rWAT), only mWAT showed a constant increase in LPL activity and TG-derived lipid uptake in response to COOH. Robust correlations were observed between TG-derived lipid uptake by adipose tissue and LPL activity, underlining the important role of LPL in this process. The agonist did not increase LPL activity in muscles. The enhancement of TG-derived lipid uptake observed in muscles of COOH-treated rats was apparently mediated by a post-lipolytic process independent of LPL availability. Increased expression of genes coding for proteins involved in fatty acid binding (aP2) and transport (FAT/CD36, FATP-1) in muscles of COOH-treated rats may have facilitated the uptake of fatty acids arising from LPL-mediated hydrolysis of TG, either in adipose tissue or in the muscles themselves. Taken together, these findings establish the major contribution of adipose tissue LPL to the hypotriglyceridemic effect of PPAR-γ agonism.

Increased food intake and body weight is a hallmark of treatment with PPAR-γ agonists. The reduction in circulating leptin is thought to contribute to increased food intake (36). In addition, PPARγ agonists stimulate adipocyte differentiation and the expression of genes involved in fatty acid uptake and esterification in adipose tissue, thus favoring fat mass accretion (3). In humans, TZDs stimulate fat deposition in subcutaneous fat and maintain or reduce fat accretion in visceral fat (32, 33, 41). Our recent studies have shown that, in rats, the redistribution of fat induced by the PPAR-γ agonist COOH is associated with increased lipid uptake and esterification in subcutaneous fat and with stimulation of energy expenditure in visceral fat (24, 26). The present study confirms that COOH increases fat deposition in subcutaneous WAT (iWAT) and BAT and reduces fat accretion in visceral WAT (rWAT) (26). The present results extend these observations by showing that COOH differentially affect the accumulation of fat in structurally distinct visceral fat depots. Indeed, COOH reduced rWAT and eWAT but did not affect mWAT

weight. The agonist reduced soleus and diaphragm weight. The effect of COOH on the reduction in muscle mass has not been reported to date and requires further investigation.

The activity of LPL is regulated inversely in adipose tissue and muscle during fasting and feeding. Fasting reduces LPL activity in adipose tissue and increases its activity in the muscle. The opposite situation is observed during feeding. This depot-specific modulation of LPL activity allows TG-derived fatty acids to be either oxidized in the muscle or esterified in adipose tissue depending on the energy status (30). Here, refeeding clearly increased LPL activity in several fat depots but, unexpectedly, did not reduce LPL activity in muscles (Fig. 1). Although muscle LPL activity was not reduced during refeeding, TG-derived lipid uptake by the muscles were generally reduced in this condition (Fig. 3). The discrepancy between LPL activity and TG-derived lipid uptake by muscle tissues may be related to the very strong propensity of circulating TG to be hydrolyzed by adipose tissues, which would leave less TG substrates available for hydrolysis in muscle tissues.

The PPAR-γ-mediated increase in adipose tissue LPL activity (26, 27, 29) is thought to be mediated by the presence of a functional PPRE in the promoter of LPL (40). Our recent work has found that PPAR-γ agonism increases LPL activity in an adipose depotspecific manner (26). This previous report showed that COOH increased LPL activity in subcutaneous fat (iWAT) and BAT and reduced LPL activity in visceral fat (rWAT). The results presented here extend these observations by showing that COOH differentially affects LPL activity in structurally distinct visceral fat depots. Of the three visceral fat depots examined (eWAT, rWAT, mWAT), only mWAT showed a significant increase in LPL activity in response to COOH. Considering that COOH increases the expression of oxidative genes, mitochondrial biogenesis, and oxygen consumption in adipose tissues (24), this increase in LPL activity and TG-derived lipid uptake in mWAT may help counteract the reduction in fat accretion in this tissue that is observed in the other visceral depots. As expected, the agonist did not increase LPL activity in the muscles. The molecular mechanisms leading to the depot-specific activation of LPL by PPAR-γ agonism has yet to be established. PPAR-γ agonists have been shown to reduce circulating TG in studies using rodents (16, 26, 34, 45) and in some (2, 10, 42), but not all (11, 20, 38), studies performed in humans. In order to evaluate the impact of PPAR-γ-induced depot-specific modulation of LPL activity on triglyceridemia and lipid uptake by the tissues, rats were injected with a synthetic emulsion of radiolabeled TG and the partition of radioactivity in the blood and the tissues was quantified. As shown in Table 4, fasting TG were not lowered by COOH, however, clearance of the chylomicron-like emulsion from the plasma of fasted rats was robustly increased by COOH (Fig.2). This effect was associated with higher LPL activity and TG-derived lipid uptake in adipose tissues (iWAT, mWAT, BAT) (Fig.1 and 3). These data suggest that, in the fasted state, the increased availability of LPL does not reduce plasma VLDL-TG of endogenous origin below a certain threshold, likely because intravascular LPL-lipoprotein interactions are optimal in the fasted state. Hence, administration of the lipid emulsion would saturate the available LPL in untreated, but not in COOH-treated animals.

Following fasting, rats were refed their habitual high-sucrose diet but without fat to evaluate the clearance of the radiolabeled emulsion in conditions of elevated postprandial insulin levels without the contribution of dietary lipids. As expected, refeeding untreated animals with this diet maintained postprandial TG to the level observed in fasted animals. In COOH-treated rats, postprandial TG were significantly lowered compared to controls (Table 4). The elevation in TG-derived lipid uptake mediated by the increase in LPL activity in adipose tissue (iWAT, mWAT, BAT) is likely to have played a role in the improvement in postprandial triglyceridemia in COOH-treated rats. Although the possibility that COOH may have reduced circulating TG by improving insulin-mediated suppression of hepatic VLDL secretion cannot be excluded, the frank induction of TG clearance and TG-derived lipid uptake by tissues show that TG catabolism plays a major role in the improvement in postprandial triglyceridemia in COOH-treated animals. In addition, the dramatic increase in TG-derived lipid uptake by BAT of treated rats supports the notion that this tissue is important in the hypolipidemic effect of PPAR-γ agonists in the rat (25). The absence of this tissue in humans may partly explain why PPAR-y agonists are less potent in reducing triglyceridemia in humans.

A lipid emulsion similar to that used in the present work has been previously shown to mimic only partially native chylomicrons (13). In this previous report, the comparison of this lipid emulsion with native chylomicrons showed that significant differences exist in how these TG-rich particles are removed from the circulation. A significant proportion of synthetic emulsions has been shown to accumulate in the tissues without or with little LPLmediated lipolysis of the TG core (13). This LPL-independent uptake of lipids may explain some of the discrepancies observed between LPL activity and TG-derived lipid uptake by the tissues. However, the significant correlations observed between LPL activity and TGderived lipid uptake by adipose tissues strongly supports the notion that an important part of the emulsion was removed from the circulation in an LPL-dependent fashion (Fig. 4).

A significant portion of the lipid emulsion was removed from the circulation by the liver. Synthetic lipid emulsions can be removed from the circulation independently of LPL by the resident macrophage system (14, 15). In the present study, a significant reduction in radiolabeled lipid uptake was observed in the liver of COOH-treated rats. The fact that this reduction occurred in the face of a significant increase in TG clearance from the blood of treated rats argues against the notion that COOH may have blunted the ability of Kupffer cells to take up lipids, thereby increasing lipid availability for uptake by adipose tissues. The data suggest instead that the increase in LPL-mediated TG catabolism in adipose tissue of treated rats reduced plasma label availability, thus contributing to lower the net removal of radiolabeled lipids by the liver.

It has been shown that the uptake of NEFA following LPL-mediated hydrolysis is facilitated within the micro-environment of the tissues by proteins such as ASP (8) and FAT/CD36 (12), which promote NEFA cellular uptake, thereby relieving product inhibition of LPL action. Increased expression of genes involved in NEFA uptake, binding and retention in adipose tissue has been characterized as a classical effect of PPAR-γ agonists (3, 36) and may participate in the stimulation of TG-derived lipid uptake in adipose tissues of COOH-treated animals. However, the strong correlations observed between LPL activity and TG-derived lipid uptake by adipose tissues strongly suggest that TG-derived lipid uptake in adipose tissue is mainly dependent on LPL-mediated hydrolysis of TG. In

muscles, no such correlations were observed, showing that the COOH-mediated increase in TG-derived lipid uptake by these tissues is partly independent from changes in LPL availability *per se.* Notably, however, COOH significantly increased muscle expression of genes coding for proteins involved in NEFA uptake and binding. Increased expression of FAT/CD36, FATP-1 and aP2 may have contributed to increase the efficiency of LPL action and TG-derived lipid uptake in muscles. In addition, increased expression of aP2, a fatty acid binding protein recognized as a marker of adipocyte differentiation (44), suggests that COOH may have increased lipid uptake in muscle by stimulating intramuscular adipocyte proliferation. This finding is in accordance with a recent report showing an increase in extramyocellular lipid content in the muscles of humans treated with rosiglitazone (28). The observation that muscle satellite cells treated with rosiglitazone show a net increase in their adipogenic potential and their ability to differentiate into adipose-like cells supports the possibility that COOH may have increased adipogenesis in muscle (7, 22).

In summary, this study shows that the hypotriglyceridemic effect of PPAR-γ agonism is mediated by depot-specific activation of LPL and TG-derived lipid uptake in adipose tissues. The agonist COOH strongly increased LPL activity and TG-derived lipid uptake in subcutaneous fat (iWAT) and in BAT. Of the three visceral fat depots examined (eWAT, mWAT and rWAT), only mWAT showed an increase in LPL activity and TG-derived lipid uptake in response to COOH. Without excluding the possibility that PPAR-γ agonism may reduce circulating TG by lowering TG secretion by the liver, the results presented here provide strong evidence that increased LPL activity in some adipose tissues represent a major mechanism contributing to the reduction in triglyceridemia in rats treated with PPAR-γ agonists.

## AKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to acknowledge the most helpful contribution of Yves Gélinas for expert technical assistance.

## GRANTS

This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to YD. ML was the recipient of a Studentship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, followed by a Studentship from the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ). WTF was the recipient of a Postdoctoral Fellowship from a CIHR Training In Obesity Program grant. GS was the recipient of a Summer Research Studentship from the Faculty of Medicine, Laval University.

# REFERENCES

- 1. Abumrad N, Harmon C, and Ibrahimi A. Membrane transport of long-chain fatty acids: evidence for a facilitated process. *J Lipid Res* 39: 2309-2318, 1998.
- Aronoff S, Rosenblatt S, Braithwaite S, Egan JW, Mathisen AL, and Schneider RL. Pioglitazone hydrochloride monotherapy improves glycemic control in the treatment of patients with type 2 diabetes: a 6-month randomized placebo-controlled dose-response study. The Pioglitazone 001 Study Group. *Diabetes Care* 23: 1605-1611, 2000.
- Berger J and Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. Annu Rev Med 53: 409-435, 2002.
- 4. Carpentier A, Taghibiglou C, Leung N, Szeto L, Van Iderstine SC, Uffelman KD, Buckingham R, Adeli K, and Lewis GF. Ameliorated hepatic insulin resistance is associated with normalization of microsomal triglyceride transfer protein expression and reduction in very low density lipoprotein assembly and secretion in the fructose-fed hamster. *J Biol Chem* 277: 28795-28802, 2002.
- Coburn CT, Knapp FF, Jr., Febbraio M, Beets AL, Silverstein RL, and Abumrad NA. Defective uptake and utilization of long chain fatty acids in muscle and adipose tissues of CD36 knockout mice. *J Biol Chem* 275: 32523-32529, 2000.
- Cohen JC and Berger GM. Effects of glucose ingestion on postprandial lipemia and triglyceride clearance in humans. *J Lipid Res* 31: 597-602, 1990.
- De Coppi P, Milan G, Scarda A, Boldrin L, Centobene C, Piccoli M, Pozzobon M, Pilon C, Pagano C, Gamba P, and Vettor R. Rosiglitazone modifies the adipogenic potential of human muscle satellite cells. *Diabetologia* 49: 1962-1973, 2006.
- 8. **Faraj M, Sniderman A, and Cianflone K.** ASP enhances in situ lipoprotein lipase activity by increasing fatty acid trapping in adipocytes. *J Lipid Res*, 2004.
- Febbraio M, Abumrad NA, Hajjar DP, Sharma K, Cheng W, Pearce SF, and Silverstein RL. A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *J Biol Chem* 274: 19055-19062, 1999.
- Fonseca VA, Valiquett TR, Huang SM, Ghazzi MN, and Whitcomb RW. Troglitazone monotherapy improves glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized, controlled study. The Troglitazone Study Group. J Clin Endocrinol Metab 83: 3169-3176, 1998.
- Freed MI, Ratner R, Marcovina SM, Kreider MM, Biswas N, Cohen BR, and Brunzell JD. Effects of rosiglitazone alone and in combination with atorvastatin on the metabolic abnormalities in type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 90: 947-952, 2002.

- Goudriaan JR, den Boer MA, Rensen PC, Febbraio M, Kuipers F, Romijn JA, Havekes LM, and Voshol PJ. CD36 deficiency in mice impairs lipoprotein lipasemediated triglyceride clearance. *J Lipid Res* 46: 2175-2181, 2005.
- Hultin M, Carneheim C, Rosenqvist K, and Olivecrona T. Intravenous lipid emulsions: removal mechanisms as compared to chylomicrons. *J Lipid Res* 36: 2174-2184, 1995.
- Hussain MM, Mahley RW, Boyles JK, Fainaru M, Brecht WJ, and Lindquist PA. Chylomicron-chylomicron remnant clearance by liver and bone marrow in rabbits. Factors that modify tissue-specific uptake. J Biol Chem 264: 9571-9582, 1989.
- Hussain MM, Mahley RW, Boyles JK, Lindquist PA, Brecht WJ, and Innerarity TL. Chylomicron metabolism. Chylomicron uptake by bone marrow in different animal species. *J Biol Chem* 264: 17931-17938, 1989.
- Jiang G, Dallas-Yang Q, Li Z, Szalkowski D, Liu F, Shen X, Wu M, Zhou G, Doebber T, Berger J, Moller DE, and Zhang BB. Potentiation of insulin signaling in tissues of Zucker obese rats after acute and long-term treatment with PPARgamma agonists. *Diabetes* 51: 2412-2419, 2002.
- Kannel WB, Cupples LA, Ramaswami R, Stokes J, 3rd, Kreger BE, and Higgins M. Regional obesity and risk of cardiovascular disease; the Framingham Study. *Journal of clinical epidemiology* 44: 183-190, 1991.
- Kaumi T, Hirano T, Odaka H, Ebara T, Amano N, Hozumi T, Ishida Y, and Yoshino G. VLDL triglyceride kinetics in Wistar fatty rats, an animal model of NIDDM: effects of dietary fructose alone or in combination with pioglitazone. *Diabetes* 45: 806-811, 1996.
- Kim JK, Gimeno RE, Higashimori T, Kim HJ, Choi H, Punreddy S, Mozell RL, Tan G, Stricker-Krongrad A, Hirsch DJ, Fillmore JJ, Liu ZX, Dong J, Cline G, Stahl A, Lodish HF, and Shulman GI. Inactivation of fatty acid transport protein 1 prevents fat-induced insulin resistance in skeletal muscle. J Clin Invest 113: 756-763, 2004.
- King AB. A comparison in a clinical setting of the efficacy and side effects of three thiazolidinediones. *Diabetes Care* 23: 557, 2000.
- 21. Kissebah AH, Vydelingum N, Murray R, Evans DJ, Hartz AJ, Kalkhoff RK, and Adams PW. Relation of body fat distribution to metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 54: 254-260, 1982.

- Kook SH, Choi KC, Son YO, Lee KY, Hwang IH, Lee HJ, Chang JS, Choi IH, and Lee JC. Satellite cells isolated from adult Hanwoo muscle can proliferate and differentiate into myoblasts and adipose-like cells. *Molecules and cells* 22: 239-245, 2006.
- Krotkiewski M, Bjorntorp P, Sjostrom L, and Smith U. Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution. J Clin Invest 72: 1150-1162, 1983.
- Laplante M, Festuccia WT, Soucy G, Gelinas Y, Lalonde J, Berger JP, and Deshaies Y. Mechanisms of the Depot Specificity of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma Action on Adipose Tissue Metabolism. *Diabetes* 55: 2771-2778, 2006.
- 25. Laplante M, Festuccia WT, Soucy G, Gelinas Y, Lalonde J, and Deshaies Y. Involvement of adipose tissues in the early hypolipidemic action of PPARgamma agonism in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2006.
- Laplante M, Sell H, MacNaul KL, Richard D, Berger JP, and Deshaies Y. PPARgamma Activation Mediates Adipose Depot-Specific Effects on Gene Expression and Lipoprotein Lipase Activity: Mechanisms for Modulation of Postprandial Lipemia and Differential Adipose Accretion. *Diabetes* 52: 291-299, 2003.
- 27. Lefebvre AM, Peinado-Onsurbe J, Leitersdorf I, Briggs MR, Paterniti JR, Fruchart JC, Fievet C, Auwerx J, and Staels B. Regulation of lipoprotein metabolism by thiazolidinediones occurs through a distinct but complementary mechanism relative to fibrates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 1756-1764, 1997.
- Mayerson AB, Hundal RS, Dufour S, Lebon V, Befroy D, Cline GW, Enocksson S, Inzucchi SE, Shulman GI, and Petersen KF. The effects of rosiglitazone on insulin sensitivity, lipolysis, and hepatic and skeletal muscle triglyceride content in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 51: 797-802, 2002.
- McTernan PG, Harte AL, Anderson LA, Green A, Smith SA, Holder JC, Barnett AH, Eggo MC, and Kumar S. Insulin and rosiglitazone regulation of lipolysis and lipogenesis in human adipose tissue in vitro. *Diabetes* 51: 1493-1498, 2002.
- Mead JR, Irvine SA, and Ramji DP. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. J Mol Med 80: 753-769, 2002.
- 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.
- 32. Miyazaki Y, Mahankali A, Matsuda M, Mahankali S, Hardies J, Cusi K, Mandarino LJ, and DeFronzo RA. Effect of pioglitazone on abdominal fat distribution and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. J Clin Endocrinol Metab 87: 2784-2791, 2002.
- Mori Y, Murakawa Y, Okada K, Horikoshi H, Yokoyama J, Tajima N, and Ikeda Y. Effect of troglitazone on body fat distribution in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 22: 908-912, 1999.
- Oakes ND, Thalen PG, Jacinto SM, and Ljung B. Thiazolidinediones increase plasma-adipose tissue FFA exchange capacity and enhance insulin-mediated control of systemic FFA availability. *Diabetes* 50: 1158-1165, 2001.
- 35. Olivecrona T. The metabolism of 1-C14-palmitic acid labeled chylomicrons in rats. *Acta Physiol Scand* 55: 170-176, 1962.
- Picard F and Auwerx J. PPAR-gamma and glucose homeostasis. Annu Rev Nutr 22: 167-197, 2002.
- 37. **Picard F, Boivin A, Lalonde J, and Deshaies Y.** Resistance of adipose tissue lipoprotein lipase to insulin action in rats fed an obesity-promoting diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E412-418, 2002.
- Raskin P, Rappaport EB, Cole ST, Yan Y, Patwardhan R, and Freed MI. Rosiglitazone short-term monotherapy lowers fasting and post-prandial glucose in patients with type II diabetes. *Diabetologia* 43: 278-284, 2000.
- Roust LR and Jensen MD. Postprandial free fatty acid kinetics are abnormal in upper body obesity. *Diabetes* 42: 1567-1573, 1993.
- Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, Staels B, and Auwerx J. PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *Embo J* 15: 5336-5348, 1996.
- 41. Smith SR, De Jonge L, Volaufova J, Li Y, Xie H, and Bray GA. Effect of pioglitazone on body composition and energy expenditure: a randomized controlled trial. *Metabolism* 54: 24-32, 2005.
- 42. Tan GD, Fielding BA, Currie JM, Humphreys SM, Desage M, Frayn KN, Laville M, Vidal H, and Karpe F. The effects of rosiglitazone on fatty acid and triglyceride metabolism in type 2 diabetes. *Diabetologia* 48: 83-95, 2005.
- 43. Teusink B, Voshol PJ, Dahlmans VE, Rensen PC, Pijl H, Romijn JA, and Havekes LM. Contribution of fatty acids released from lipolysis of plasma triglycerides to total plasma fatty acid flux and tissue-specific fatty acid uptake. *Diabetes* 52: 614-620, 2003.

- 44. Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, and Spiegelman BM. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev* 8: 1224-1234, 1994.
- 45. Way JM, Harrington WW, Brown KK, Gottschalk WK, Sundseth SS, Mansfield TA, Ramachandran RK, Willson TM, and Kliewer SA. Comprehensive messenger ribonucleic acid profiling reveals that peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation has coordinate effects on gene expression in multiple insulin-sensitive tissues. *Endocrinology* 142: 1269-1277, 2001.

# TABLES

Table 1. Primers used for mRNA quantification by real-time RT-PCR.

Gene	Accession #	5' primer (5'3')	3' primer (5'3')		
36B4	NM_022402	TAAAGACTGGAGACAAGGTG	GTGTAGTCAGTCTCCACAGA		
aP2	NM_053365	ATGTGTGATGCCTTTGTGGG	CCCAGTTTGAAGGAAATCTC		
FAT/CD36	NM_031561	AGTAATCTCAAATAACTGTACGTCG	CTGCAAGCACAGTATGAAATCATAA		
FATP-1	NM_053580	TCTGCGGCGCTTCGATGGCTAT	TTGTGGGGGGTCTGCAATGGC		
hFABP	NM_024162	ACATGAAGTCACTCGGTGTG	ACATTGCCATGGGTGAGAGT		

	Control	COOH	p value
Food intake (MJ)	8.3±0.2	8.7±0.2*	0.05
Initial body weight (g)	153±3	154±3	NS
Final body weight (g)	334±7	350±5	(0.08)
Body weight gain (g)	182±5	196±4*	0.04
Food efficiency (g/MJ)	22.0±0.5	22.6±0.7	NS
6-h food intake (g)	13.2±0.6	15.4±0.4*	0.01

**Table 2.** Food intake and body weight variables of rats treated or not with COOH for 3 weeks.

Data are mean ±SEM 11-12 rats. \* Different from Control, p<0.05. NS, not significant.

	Control	СООН	p value
iWAT	8.0±0.5	11.6±0.8*	0.001
rWAT	6.6±0.4	3.8±0.2*	< 0.0001
eWAT	6.9±0.5	4.5±0.2*	< 0.0001
mWAT	2.6±0.2	2.6±0.2	NS
BAT	0.46±0.03	3.41±0.41*	< 0.0001
Soleus	0.13±0.01	0.11±0.01*	0.001
Diaphragm	0.72±0.03	0.53±0.03	<0.0001
Liver	13.8±0.6	13.0±0.3	NS
Kidneys	2.7±0.1	2.6±0.1	NS

Table 3. Tissue weights (g) of rats treated or not with COOH for 3 weeks.

Data are mean ±SEM 11-16 rats. \* Different from Control, p<0.05. NS, not significant

	Fasted		Refed		ANOVA		
-	CTRL	СООН	CTRL	СООН	Nutr. state (N)	Treatment (T)	N ×T
Glucose (mmol/L)	8.1±0.2	7.9±0.3	9.9±0.3	9.4±0.3	< 0.0001	NS	NS
Insulin (pmol/L)	337±66	85±22	729±95	545±72	< 0.0001	0.01	NS
TG (mmol/L)	1.6±0.1	$1.4\pm0.1$	1.9±0.4	0.6±0.1	NS	0.006	0.02
FFA (mmol/L)	0.66±0.05	0.49±0.03	0.22±0.06	0.07±0.01	< 0.0001	0.002	NS
Glycerol (mmol/L)	0.20±0.03	0.22±0.02	0.11±0.01	0.07±0.01	< 0.0001	NS	NS
FFA/glycerol ratio	3.4±0.3	2.3±0.1	1.9±0.3	$1.0{\pm}0.1$	<0.0001	0.0002	NS

**Table 4.** Serum metabolite and hormone concentrations of rats treated or not with COOH for 3 weeks and sacrificed after a 10-h fast or an 18-h fast followed by a 6-h refeeding period.

Data are means  $\pm$ SEM 4-6 rats. NS, not significant. The ANOVA values represent the level of significance of the Nutritional state with 2 levels (Fasting, Refed) and agonist treatment with 2 levels (Control, COOH), and their interaction (N × T).

#### FIGURE LEGENDS

Figure 1 – LPL activity in tissues of fasted (10 h) or refed (6 h) rats treated or not with COOH for 23 days. Each column represents the mean  $\pm$  SEM of 4-6 rats. \* P < 0.05 vs. untreated rats with the same nutritional status;  $\dagger P < 0.05$  vs. fasted rats of the same treatment group.

**Figure 2** – TG clearance following the injection of a synthetic emulsion of TG mimicking chylomicrons in fasted (10 h) or refed (6 h) rats treated or not with COOH for 23 days. Each point represents the mean  $\pm$  SEM of 4-6 rats. Symbols : control/fasting ( $\triangle$ ); COOH/fasting ( $\Box$ ); control/refed ( $\blacktriangle$ ); COOH/refed ( $\blacksquare$ ).

**Figure 3** – TG-derived lipid uptake by tissues 20 min following the injection of a synthetic emulsion of TG mimicking chylomicrons in fasted (10 h) or refed (6 h) rats treated or not with COOH for 23 days. Each column represents the mean  $\pm$  SEM of 4-6 rats. \* P < 0.05 vs. untreated rats with the same nutritional status; † P < 0.05 vs. fasted rats of the same treatment group.

**Figure 4** – Correlations between LPL activity and TG-derived FA uptake in tissues of fasted (10 h) or refed (6 h) rats treated or not with COOH for 23 days. Each point represents the value of an individual rat.

**Figure 5** – Quantitative real-time RT-PCR analysis of mRNA expression in the soleus of rats treated or not with COOH for 23 days. Data are expressed as relative expression of candidate genes in COOH-treated rats vs. control (untreated) rats. Each column represents the mean  $\pm$  SEM of 10-12 rats. \* *P* < 0.05 vs. untreated rats.

# FIGURES











# Adipose tissues



### Muscles



Others







Muscles





Figure 5.

### CHAPITRE 4

# IMPACT OF PPAR-γ AGONISM ON TRIGLYCERIDEMIA IN TRANSGENIC MICE EXPRESSING CARDIAC, BUT NOT ADIPOSE TISSUE OR SKELETAL MUSCLE LIPOPROTEIN LIPASE

Mathieu LAPLANTE<sup>1</sup>, Geneviève SOUCY<sup>1</sup>, William T. FESTUCCIA<sup>1</sup>, Monika RIEDERER<sup>2</sup>, Joel P. BERGER<sup>3</sup>, Rudolf ZECHNER<sup>2</sup> and Yves DESHAIES<sup>1</sup>

- <sup>1</sup> Laval Hospital Research Center, Department of Anatomy and Physiology, School of Medicine, Laval University, Québec, Qc, Canada, G1V 4G5
- <sup>2</sup> Institute of Molecular Biosciences, University of Graz, Heinrichstrasse, Austria
- <sup>3</sup> Department of Metabolic Disoders, Merck Research Laboratories, Rahway, NJ, USA, 07065-900

article en préparation, 2007

#### AVANT-PROPOS

Ce travail, réalisé sous la direction du Dr. Yves Deshaies, a été rendu possible grâce à la collaboration de Geneviève Soucy (stagiaire, étudiante en médecine à l'Université Laval), du Dr. William T. Festuccia (stagiaire post-doctoral avec le Dr. Yves Deshaies), de Monika Riederer (assistante de recherche avec le Dr. Rudolf Zechner), du Dr. Joel P. Berger (Merck Laboratories) et du Dr. Rudolf Zechner. Le création des souris transgéniques a été réalisée par l'équipe du Dr. Rudolf Zechner. Le traitement des animaux, de même que la récolte des échantillons, ont été effectués par Monika Riederer. Geneviève Soucy a contribué à ces travaux en effectuant plusieurs mesures sur les échantillons de tissu adipeux et de foie. Le Dr. William T. Festuccia a quant à lui apporté une aide conceptuelle importante à l'avancement et à l'aboutissement de ces travaux. L'utilisation du COOH été rendue possible grâce au Dr. Joel P.Berger, qui a de plus grandement contribué aux discussions lors de l'écriture du manuscrit. Cette étude implique mon entière participation quant à la réalisation de l'ensemble des étapes menant à l'aboutissement des ces travaux, soit la planification, les décisions relatives aux mesures effectuées, la mesure des variables plasmatiques et tissulaires, l'analyse statistique et l'écriture du manuscrit. Suite aux corrections du directeur, l'article a été envoyé aux coauteurs pour révision. Des analyses sont présentement en cours (hiver 2007) afin de récolter certaines données qui faciliteront la publication de ce manuscrit.

### RÉSUMÉ

Les agonistes des récepteurs activés par les proliférateurs des peroxysomes y (PPAR-y) sont des agents sensibilisateurs à l'insuline reconnus pour améliorer la lipémie chez les rongeurs en augmentant l'activité de la lipase lipoprotéique (LPL) dans le tissu adipeux. Afin de tester l'importance de la LPL dans l'effet hypotriglycéridémiant des agonistes PPAR-y, des souris transgéniques exprimant la LPL humaine seulement dans le muscle cardiaque (L0-hLPL) ont été traitées avec l'agoniste PPAR-y COOH (30mg/kg/j, 28 jours). Il a été démontré que le COOH réduit les triglycérides (TG) circulants chez le rat. L'hypertriglycéridémie observée chez les souris L0-hLPL nourries avec une diète riche en graisse a été corrigée par le traitement avec le COOH, ce qui indique que la LPL du tissu adipeux n'est pas essentielle à l'effet hypotriglycériémiant de l'agoniste COOH dans ce modèle. La réduction des TG plasmatiques chez les souris L0-hLPL par le COOH a été associée à la diminution de l'accrétion des TG dans le foie de ces souris ( $r^2=0.70$ , p<0.01). Aucun changement de l'expression des déterminants impliqués dans l'assemblage des VLDL (TGH, DGAT-2, MTP) et la captation (ACS, LFABP), la synthèse (FAS, SCD-1, ACC) et l'estérification (DGAT-1) des acides gras n'a permis d'expliquer les effets du COOH sur la réduction des TG du foie. La diminution des TG hépatiques a été associée à la réduction de l'activité de la HL dans le foie et des acides gras libres (AGL) plasmatiques (AGL, r<sup>2</sup>=0.63, p<0.01). Le COOH a réduit les AGL en augmentant l'expression des gènes impliqués dans leur rétention (aP2, CD36, PEPCK, GyK) dans le tissu adipeux blanc (TAB) et le tissu adipeux brun (TABr). Le poids du TABr a été fortement augmenté par le traitement. Le COOH a fortement augmenté les niveaux circulants d'adiponectine, une adipokine reconnue pour stimuler l'oxydation des lipides dans le foie, chez les souris sauvages et L0-hLPL. L'expression de la CPT-1a était plus élevée dans le foie des souris L0-hLPL. Ces effets ont pu agir de concert pour potentialiser l'oxydation des lipides dans le foie des souris L0-hLPL. Ces résultats indiquent que la LPL du tissu adipeux n'est pas essentielle à la diminution des TG par le COOH. La rétention des AGL dans le tissu adipeux et la stimulation de l'oxydation hépatique des graisses peuvent expliquer la diminution des TG du foie, la réduction du potentiel de sécrétion des TG et l'amélioration de la triglycéridémie chez les souris L0-HLPL traitées avec le COOH.

#### ABSTRACT

Agonists of the peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) are insulin sensitizers that potently improve lipemia in rodents, with concomitant enhancement of lipoprotein lipase (LPL)-mediated lipid uptake by adipose tissues. In order to test the importance of adipose LPL in the hypotriglyceridemic effect of PPAR-y agonism, mice expressing a human LPL transgene only in cardiac muscle (L0-hLPL) were treated with the non-TZD PPAR-y agonist COOH (30mg/kg/day, 28 days) previously shown to reduce circulating triglycerides (TG) in the rat. Hypertriglyceridemia observed in L0-hLPL mice fed a high-fat diet was corrected by COOH, demonstrating that adipose LPL is not essential for the hypotriglyceridemic effect of the agonist in this model. The reduction in plasma TG by COOH in L0-hLPL mice was strongly associated with a reduction in hepatic TG content  $(r^2=0.70, p<0.01)$ . The effect of COOH on liver TG was not the result of major changes in expression levels of hepatic determinants of VLDL assembly (TGH, DGAT-2, MTP), fatty acid uptake (ACS, LFABP), synthesis (FAS, SCD-1, ACC) and esterification (DGAT-1), but was associated with a reduction of HL activity and circulating nonesterified fatty acids (NEFA,  $r^2=0.63$ , p=0.01). The COOH-mediated reduction in circulating NEFA was associated with increased expression of genes involved in adipose fatty acid retention (aP2, CD36, PEPCK, GyK) in both brown (BAT) and white adipose tissue (WAT). A robust increase in fat accretion was noted in BAT. In addition, COOH greatly increased circulating adiponectin, a potent inducer of liver FA oxidation, in both wild type and L0hLPL mice. The expression of CPT-1a was higher in the liver of L0-hLPL mice. Such effects may have acted synergistically to facilitate FA oxidation in the liver of L0-hLPL mice. These findings show that adipose LPL is not essential for the long-term hypotriglyceridemic action of PPAR-y agonism. In mice lacking adipose LPL, PPARy agonism-induced FA retention in adipose tissue as well as FA oxidation in the liver, possibly mediated via adiponectin, likely explain the reduction in hepatic TG accumulation and TG secretion potential, and the consequent lowering of triglyceridemia.

#### INTRODUCTION

Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-γ is a ligand-activated nuclear receptor that is highly expressed in adipose tissue, in which it regulates the expression of numerous genes involved in lipid and glucose metabolism (1). PPAR-γ agonists of the thiazolidinedione (TZD) class are currently used for the treatment of insulin resistance and type 2 diabetes. In addition to improving peripheral insulin sensitivity, PPAR-γ agonists have been shown to reduce circulating triglycerides (TG) in studies using rodents (2-5) and in some (6-8) but not all (9-11) studies performed in humans. Generally, the effect of TZDs on circulating TG is stronger in rodents than in humans. It has been suggested that this inter-species difference may be associated with the presence of brown adipose tissue (BAT) in rodents. This fat depot, which is nearly absent in adult humans, has been shown to avidly take up lipids from the circulation in TZD-treated rats (12).

Plasma TG represent the balance between gut- and liver-derived TG-rich lipoprotein secretion and LPL-mediated clearance in various extrahepatic tissues. PPAR- $\gamma$  agonists increase intravascular hydrolysis of TG-rich particles by increasing lipoprotein lipase (LPL) expression and activity in adipose tissue (3; 13; 14). This effect is mediated by the presence of a functional peroxisome proliferator response element (PPRE) in the promoter of LPL (15). Although some studies did not observe a reduction in hepatic very-low density lipoprotein (VLDL) secretion rate in response to PPAR- $\gamma$  agonists (12; 13; 16), others did so (2; 8; 17), suggesting that reduced hepatic secretion of TG-rich particles may contribute to the hypolipidemic effect of these molecules under certain conditions. The relative contribution of hydrolysis and secretion pathways to the hypotriglyceridemic effect of PPAR- $\gamma$  agonists has not been systematically evaluated to date.

Lipoprotein lipase knockout mice (L0) (18; 19) or mice lacking LPL in adipose tissue due to a mutation in the *cld* locus (20) do not survive to the suckling period and die from cyanosis between 18 and 24 hours after birth. However, basal expression of a human LPL transgene exclusively in cardiac muscle (L0-hLPL) rescues L0-mice from neonatal death (21). Compared to control mice (L2), L0-hLPL are hypertriglyceridemic during

suckling but show normal TG levels on a regular diet (rodent chow) after weaning. Mice lacking LPL in adipose tissue have a normal fat mass due to increased lipogenesis and HDL-derived lipid uptake (22; 23).

In order to test the importance of adipose LPL in the hypotriglyceridemic effect of PPAR- $\gamma$  agonism, mice expressing LPL only in the heart were treated with the non-TZD agonist COOH (30mg/kg/day), which was previously shown to robustly reduce circulating TG in the rat (3; 24). Contrary to its action on adipose tissue, PPARy agonism does not affect muscle or heart LPL (15; 25). In the L0-hLPL model, LPL-mediated TG clearance does occur, but neither in BAT nor in WAT, the major targets of PPARy agonism in terms of lipid clearance (12). The study shows that the hypertriglyceridemia observed in L0-hLPL mice fed a high fat diet was completely corrected by 3-4 weeks of treatment with COOH, demonstrating that the agonist does not require adipose LPL for its hypotriglyceridemic action. The reduction in plasma TG in COOH-treated L0-hLPL mice was associated with lower TG accumulation in the liver. The reduction in liver TG by COOH was not the result of major changes in hepatic expression of genes involved in VLDL assembly, fatty acid (FA) uptake, synthesis and esterification, but was linked to changes in hepatic lipase (HL) activity and circulating levels of adiponectin and nonesterified fatty acids (NEFA). Furthermore, increased expression of genes involved in FA retention in BAT and WAT of COOH-treated L0-hLPL mice suggests their contribution to lowering circulating NEFA and TG accretion in the liver, thus reducing the TG secretion potential and triglyceridemia.

#### RESEARCH DESIGN AND METHODS

Animals and treatment. The generation of the LPL transgenic mouse line used here as well as their detailed characterization was described previously (21). Genotypes were identified from tail tip DNA by PCR, as reported. All animals were maintained on a 14 h-10 h light-dark cycle and fed a standard laboratory diet until the beginning of the experiment. All animal experiments were performed in accordance with the standards established by the Austrian Federal Ministry of Education, Science and Culture, Division of Genetic Engineering and Animal Experiments (Vienna, Austria). Female L2 and L0-hLPL mice aged 12-24 weeks were fed a high-fat diet (ssniff® EF R/M according to TD88137 modified, product number E15721-34/10 mm pellets, purchased from sniff, Soest, Germany) for 3-4 weeks to maximize potential genotype and treatment effects. Half of the animals were given the non-TZD PPAR- $\gamma$  agonist COOH [2-(2-(-4-phenoxy-2propylphenoxy)ethyl)indole-5-acetic acid] as an adjunct to their diet at a dose of 30 mg•kg<sup>-1</sup>-day<sup>-1</sup>, previously shown to robustly lower triglyceridemia in the rat (3). At the end of the treatment, mice were killed either after a 6-h fast (fasting) or during their normal feeding period (ad libitum).

Serum and tissue sampling. Mice were killed by cervical dislocation. Blood was centrifuged ( $1500 \times g$ , 15 min, 4°C) and plasma was stored at -70°C until later biochemical measurements. Inguinal (iWAT) and retroperitoneal (rWAT) white adipose tissues, brown adipose tissue (BAT), liver and gastrocnemius (muscle) were collected, weighed, frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C until biochemical measurements.

Serum/plasma determinations. Plasma TG (Roche Diagnostics, Montreal, QC, Canada) and NEFA (NEFA C test kit, Wako Pure Chemical Industries, Richmond, VA) were measured enzymatically with commercial kits. Plasma total adiponectin levels were determined by radioimmunoassay (Adiponectin RIA kit mouse, Cederlane, Burlington, ON, Canada).

**Liver TG content.** Liver TG content was determined enzymatically as above in total lipid extracts prepared by the method of Folch (26).

HL activity. For the measurement of HL activity in the liver, a potential contributor to FA uptake derived from TG-rich lipoprotein remnants, 100 µl of thawed tissue homogenates were incubated under gentle agitation for 1 h at 28°C with 100 µl of a substrate mixture consisting of 0.2 mol/l Tris-HCl buffer, pH 8.6, which contained 10 MBq/l [*carboxyl*-<sup>14</sup>C]triolein (Amersham, Oakville, ON, Canada) and 2.52 mmol/l cold triolein emulsified in 50 g/l gum arabic, as well as 20 g/l fatty acid–free bovine serum albumin, in absence of the LPL activator apolipoprotein C-II and in presence of a 1 M final NaCl concentration to inhibit any LPL activity that could have been present in liver blood vessels. Free oleate released by HL was then separated from intact triolein and mixed with Universol (Du Pont-NEN, Montréal, Canada), and sample radioactivity was determined in a scintillation counter. HL activity was expressed as microunits (1  $\mu$ U = 1  $\mu$ mol NEFA released per hour of incubation at 28°C). Results for HL activity are presented per total liver to illustrate its global tissue availability in relation to lipid uptake.

**RNA isolation and analysis.** Total RNA was isolated from tissues using QIAzol and the RNeasy Tissue Kit (QIAGEN, Mississauga, ON, Canada). For cDNA synthesis, Expand Reverse Transcriptase (Roche Diagnostics, Montreal, QC, Canada) was used following manufacturer's instructions and cDNA was diluted in DNase-free water (1:25) before quantification by real-time quantitative PCR (qPCR). mRNA transcript levels were measured in duplicate samples using a Rotor Gene 3000 system (Montreal Biotech, Montreal, QC, Canada). The primers used for the PCR reactions are presented in Table 1. Chemical detection of the PCR products was achieved using SYBR Green Jump-Start Taq ReadyMix without Magnesium Chloride (Sigma, Oakville, ON, Canada). At the end of each run, melt curve analyses were performed and a few samples representative of each experimental group were run on agarose gel to verify specificity of the amplification. Data are expressed as the ratio between the expression of the target gene and the housekeeping gene β-actin.

Adipocyte morphology by light microscopy. WAT and BAT samples were fixed in 0.1 mM PBS (pH 7.3) containing 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Thin sections were mounted on glass slides and dyed with hematoxylin/eosin. At least five digital images of each tissue were captured using an Olympus BX60 microscope equipped with a Sony RT Slider Spot Camera (Camsen Group, Markham, ON, Canada) at a magnification of 40×. Quantification was achieved using Image Pro Plus 5.0 (MediaCybernetics, Silver Spring, MD, USA). Briefly, on blinded samples, the lipid surface of 5 different slides per depot was measured using the Measure-Count/Size tool, and an average was calculated for each rat.

Statistical analysis. Data are expressed as means  $\pm$  SEM. When appropriate, variables were first analyzed by factorial ANOVA to establish the individual and interactive effects of PPAR<sub>Y</sub> agonist treatment, with 2 levels (Control, COOH), and genotype, with 2 levels (L2 and L0-hLPL). Individual pairwise between-group comparisons were then made using Fisher's Protected Least Significant Difference test. Some data were log transformed before analysis to ensure homogeneity of variance. Significance was set at *P*<0.05.

#### RESULTS

The absence of LPL in adipose and skeletal muscle of L0-hLPL mice did not affect body weight but significantly reduced iWAT and rWAT mass relative to L2 control mice (36% and 42%, respectively, Table 2). No weight change was observed in BAT. Notably, L0-hLPL mice showed a 44% increase in liver size compared to their control littermates. Treatment with COOH did not affect body weight nor fat accretion in iWAT or rWAT, but significantly increased BAT weight (2.8- and 2.6-fold in L2 and L0-hLPL mice, respectively). Notably, a significant interaction between genotype and treatment on liver weight was observed, as COOH reduced liver weight only in L0-hLPL mice.

L0-hLPL mice fed the high-fat diet showed frank hypertriglyceridemia under both fasting and ad libitum conditions (Fig. 1A-B). Treatment of L0-hLPL mice with COOH strongly reduced plasma triglycerides (TG) to levels observed in L2 mice, in which the agonist remained without effect.

To confirm the absence of LPL in PPAR-γ responsive tissues of L0-hLPL mice and to assess its expression level in L2 mice, total LPL mRNA (mouse and human isoforms) were measured in iWAT, rWAT and BAT by quantitative RT-PCR. As expected, LPL mRNA was found only in adipose tissues isolated from L2 mice, LPL being barely detectable in L0-hLPL mice (Fig. 2). COOH did not affect LPL expression significantly in any adipose tissue.

The plasma concentration of TG is determined by the balance between the secretion of VLDL by the liver and of chylomicrons by the gut, and the hydrolysis of TG-rich particles, mainly in adipose tissue and skeletal and cardiac muscle. The reduction in circulating TG in COOH-treated L0-hLPL mice demonstrates its independence from adipose and skeletal muscle LPL. Considering that the liver plays a major role in TG homeostasis, we looked at some determinants of liver TG secretion to better understand the mechanisms underlying the hypotriglyceridemic effect of COOH in L0-hLPL mice. Liver TG stores represent the major source of lipid for VLDL assembly and directly affect TG secretion (27; 28). As depicted in Fig. 3, liver TG were increased 3.3-fold in L0-hLPL relative to their L2 counterparts (p<0.01). Notably, COOH significantly reduced TG accumulation in the liver of L0-hLPL mice (48%, p<0.01), thereby decreasing TG availability for secretion. A similar but nonsignificant trend was observed in L2 mice.

In order to characterize the mechanisms leading to the reduction in TG accumulation in the liver and to the consequent reduction in the VLDL secretion potential in COOH-treated L0-hLPL mice, major determinants of lipid metabolism in the liver were quantified. We first measured the level of expression of key genes involved in TG secretion, namely triacylglycerol hydrolase (TGH), diacylglycerol acyltransferase-2 (DGAT-2) and microsomal triacylglycerol transfer protein (MTP). No genotype or treatment effect was observed on the expression of these genes (Fig. 4A). The activity of HL and the mRNA levels of liver fatty acid binding protein (L-FABP), acyl-CoA synthase (ACS), acetyl-CoA carboxylase (ACC), stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD-1), fatty acid synthase (FAS) and diacylglycerol acyltransferase-1 (DGAT-1) were measured as markers of lipid uptake, synthesis, and storage. Hepatic lipase activity tended to be higher in the liver of L0-hLPL compared to L2 mice (36%, p=0.06) (Fig. 4B). Treatment with COOH reduced HL activity in L2 (-32% p=0.03) and in L0-hLPL mice (-33% p=0.02). The mRNA levels of L-FABP and ACS were next assessed to evaluate the liver potential to bind and activate FA. The expression of both genes was increased in the liver of L0-hLPL mice relative to control L2 mice (46%, p<0.05, and 65% p<0.01 for L-FABP and ACS, respectively) (Fig. 4B). COOH did not affect L-FABP and ACS mRNA levels. No difference was observed in the expression of genes involved in hepatic de novo FA and TG synthesis (ACC, FAS, SCD-1, DGAT-1) (Fig. 4B). To estimate the oxidative capacity of the liver, the expression of liver type carnitine palmitoyl transferase 1a (CPT-1a) and acylcoA oxidase (Acox) as well as circulating levels of adiponectin, a potent activator of hepatic FA oxidation, were assessed. CPT-1a expression was increased 2-fold (p < 0.01) in L0-hLPL mice relative to their L2 counterparts (Fig. 4C). However, no change was observed in response to COOH. No genotype or treatment effects were observed regarding liver expression of Acox. As expected, COOH strongly increased plasma adiponectin (4.2fold, p<0.0001), however, no difference was noted between L2 and L0-hLPL mice.

The above findings are in accordance with the higher deposition of TG in the liver of L0-hLPL relative to L2 mice. Excepted for HL, these results do not provide strong mechanism for the reduction in liver and circulating TG by COOH in L0-hLPL. Circulating NEFA are known to play a major role in VLDL secretion by serving as a major substrate for the synthesis of TG stores in hepatocytes (28). As depicted in Fig. 5A, COOH significantly reduced NEFA in L2 (1.7-fold, p<0,05) and in L0-hLPL mice (2.2-fold, p<0.01). Interestingly, a close correlation between circulating NEFA and liver TG content was observed, in support of the important role of NEFA in TG deposition in the liver (Fig. 5B). Because liver TG are known to directly influence VLDL secretion (29), a correlation between plasma and liver TG was calculated. A significant link was observed between these variables ( $r^2=0.70$ , p<0.01), indicating that the COOH-mediated reduction in TG accumulation in the liver of L0-hLPL is tightly associated with the improvement in triglyceridemia (Fig. 5C).

Recent studies performed in rats treated with rosiglitazone have shown that WAT but also BAT plays an important role in the hypolipidemic action of PPAR-γ agonism (12). As presented above, BAT weight was strongly increased by COOH in L2 and L0-hLPL mice (Table 2). The agonist clearly increased cell size and TG deposition in BAT but not in iWAT or rWAT (Fig. 6A,B). Notably, expression levels of genes involved in FA uptake, trapping and esterification were increased by COOH in BAT of both genotypes, as the agonist significantly increased fatty acid binding protein-4 (aP2), CD36 and glycerol kinase (GyK) mRNA expression (Table 3). A similar trend was observed for phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) expression. The absence of effect of COOH on FAS and ACC excluded de novo synthesis of lipid as a major contributor to fat accretion in BAT of COOH-treated animals (data not shown). Because no depot-specific effect on fat accretion was observed between iWAT and rWAT, mRNA expression was assessed in rWAT as representative of WAT. The expression of aP2, PEPCK and GyK was increased by COOH in WAT of both genotypes (Table 3). A similar but non-significant trend was observed for CD36 expression.

#### DISCUSSION

Using transgenic mice expressing LPL only in cardiac muscle, this study was designed to evaluate the hypotriglyceridemic potential of the PPAR- $\gamma$  agonist COOH in the absence of adipose (and skeletal muscle) LPL. The hypertriglyceridemia observed in L0-hLPL mice fed a high fat diet was completely corrected by 3 weeks of treatment with COOH, demonstrating that in this murine model the agonist does not require adipose LPL for its hypotriglyceridemic action. The reduction in plasma TG in COOH-treated L0-hLPL mice was associated with lower TG accumulation in the liver. The reduction in liver TG by COOH was not the result of major changes in the expression of genes involved in VLDL assembly, FA uptake, synthesis and esterification, however, it was linked to changes in HL activity and circulating levels of adiponectin and NEFA. Increased expression of genes involved in FA retention in BAT and WAT of COOH-treated L0-hLPL mice suggests the contribution of adipose tissues to the lowering of circulating NEFA and consequent reduction in TG accumulation in the liver, which in turn reduced its TG secretion potential.

The L0-hLPL mice are hypertriglyceridemic during the suckling period and the progressive increase in cardiac hLPL during development corrects TG to the levels observed in L2 mice (21). Here, feeding L0-hLPL mice a high-fat diet clearly caused hypertriglyceridemia, probably because the hydrolytic capacity of cardiac LPL is overcome by the high amount of dietary fat ingested. Fasting and ad libitum triglyceridemia was corrected by COOH in L0-hLPL mice, demonstrating that adipose and skeletal muscle LPL are not required for the hypotriglyceridemic action of the agonist. Likely because of low levels of PPARγ expression in these tissues, heart and skeletal muscle LPL is not affected by PPARγ agonists (15; 25). Therefore, the effect of COOH on circulating TG observed here could be achieved without any increase in the peripheral hydrolytic potential towards TG-rich particles. It has been recently reported that endothelial lipase (EL) is increased in WAT of many mice models lacking LPL, including the L0-hLPL mouse (23). The increase in EL activity and consequent HDL hydrolysis is considered as one probable mechanism by which WAT mass is preserved in L0-hLPL mice. Although increased EL action may be important for the maintenance of WAT mass, the very low TG lipase activity of EL (30;

31) and relatively low TG content of HDL relative to VLDL does not support the notion that this phospholipase is a relevant contributor to the hypotriglyceridemic effect of PPAR $\gamma$  agonism in the L0-hLPL model.

In the present study, COOH did not affect adipose LPL expression and plasma TG in control mice, nor did it influence WAT redistribution among subcutaneous and visceral depots as observed in the rat (3; 24). Differences between these studies can be related to the more malleable nature of rat lipid metabolism compared to mice. The faster induction of insulin resistance and hypertriglyceridemia in the high-fat fed rat compared to mice supports this notion. A longer treatment may have been necessary to obtain stronger effects in the mouse model (32). In the present study, the significant reduction in circulating TG observed only in L0-hLPL-treated mice is probably related to the frank hypertriglyceridemia present in this model. Indeed, raising triglyceridemia over a certain threshold above which normal TG-lowering mechanisms become overwhelmed may provide an environment in which efficiency of the agonist toward reducing TG is revealed.

Generally, PPAR- $\gamma$  agonists reduce liver TG in humans and in rodents (33-35). However, some studies using mice models of extreme obesity (*ob/ob* mice) or leanness (lipodystrophic A-ZIP/F1 mice) have shown that PPAR- $\gamma$  agonism may also increase hepatic TG (36; 37). These results should be interpreted in light of the fact that very high expression levels of PPAR- $\gamma$  are detected in the steatotic livers of these extreme mouse models, and that a direct connection between high hepatic PPAR- $\gamma$  levels and increased liver TG content in response to TZD has been clearly demonstrated in such models (38; 39). In the present study, L0-hLPL mice showed very high levels of liver TG compared to L2 mice (further discussed below), and the agonist significantly reduced hepatic TG content only in L0-hLPL mice. Liver TG represents an important source of lipid for VLDL secretion (28; 40); hepatic TG modulates the metabolic fate of apolipoprotein (apo) B, the protein upon which VLDL assembly takes place. A diminution in liver TG increases apoB degradation and decreases hepatic VLDL secretion (27). Hence, the reduction in hepatic TG content observed in L0-hLPL-treated mice represents a potential mechanism that likely contributed, through reduction of the VLDL secretion potential, to the improvement in triglyceridemia in this model. Such reduction in hepatic VLDL-TG secretion would also explain the improved handling of dietary TG by heart LPL in fed L0-hLPL mice.

Liver TG content is determined by the balance between FA uptake from circulating lipids and de novo lipogenesis on one hand, and VLDL-TG secretion and FA oxidation on the other hand (41). In the present study, PPARy agonism did not modulate the expression of MTP, the essential enzyme for VLDL assembly and secretion (42; 43). In addition, TGH and DGAT-1, which are involved in the provision of TG for VLDL assembly (44), were not affected by COOH. These results suggest that the machinery involved in VLDL assembly and secretion is not involved in the reduction in hepatic TG and in the amelioration of triglyceridemia in L0-hLPL mice treated with COOH. Similarly, the agonist did not modulate the expression of determinants of FA uptake by the liver (LFABP, ACS). As shown previously (45), HL activity was reduced by PPAR-agonism, indicating that the reduction in liver TG in COOH-treated L0-hLPL mice could be caused by a reduction in the liver ability to take up lipids from low and high density lipoproteins (LDL and HDL). Notably, determinants of FA uptake were all upregulated in the liver of L0hLPL compared with L2 mice, which agrees well with the hepatic steatosis found in the high-fat-fed L0-hLPL mice. An increase in lipid uptake by the liver may represent a mechanism taking place to counteract the inability of adipose tissue to adequately manage circulating TG. The development of fatty liver in several models of lipodystrophy supports this hypothesis (36; 46-48). Finally, in order to evaluate the effect of COOH on de novo synthesis of lipids in the liver, the expression of ACC, FAS, SCD-1, and DGAT-1 was assessed. The absence of change in the expression of these genes suggests that de novo lipogenesis did not strongly contribute to the modulation of hepatic lipid metabolism, further supporting the contribution of lipid uptake to steatosis.

Notably, hepatic CPT-1a was increased in L0-hLPL mice. This enzyme is strongly induced by peroxisome proliferators and fatty acids (49), and a peroxisome proliferator response element (PPRE) has been found in the promoter of the CPT-1a gene (50). The stimulation of CPT-1a expression may be a consequence of increased fat supply to the liver. This mechanism may take place as an attempt to limit liver lipid accretion. The net

increase in hepatic TG content in L0-hLPL shows that stimulation of the oxidative potential was clearly not sufficient to metabolize the excess fat delivered to the liver. In mice treated with COOH, circulating levels of adiponectin were, as expected, robustly elevated. Adiponectin activates  $\beta$ -oxidation in the liver by relieving CPT-1a inhibition via an AMP-activated protein kinase (AMPK)-dependent process (51). The increase in CPT-1a expression, in association with higher levels of circulating adiponectin, may have synergistically facilitated FA oxidation in the liver of L0-hLPL mice. This in turn might explain why COOH was more potent in reducing liver TG content in L0-hLPL compared to L2 mice.

PPAR- $\gamma$  agonism rapidly reduces circulating NEFA in rodents (5; 12). The improvement in insulin signaling, including insulin-mediated suppression of lipolysis, increase in FA recycling and uptake by adipose tissue are thought to be responsible for the TZD-induced reduction in circulating NEFA (4; 52-54). Here, COOH reduced NEFA in both L2 and L0-hLPL mice. Increased expression of genes coding for proteins involved in FA retention in WAT and BAT was observed in COOH-treated animals. Confirming recent findings in rats, the present data show that PPAR-y agonism leads to profound modifications of BAT physiology and metabolism (12). The acquisition of WAT features by BAT provides a new site for FA retention that contributes to the lowering of circulating NEFA by COOH. A close relationship exists between circulating NEFA and hepatic VLDL secretion (28; 55). Most exogenous FA must first be esterified to TG and enter a cytoplasmic pool before being available for VLDL secretion by the liver (28; 41). Accordingly, we observed a strong link between liver and circulating TG ( $r^2=0.63$ , p=0.01). Taken together, these results suggest that COOH-induced FA retention in adipose tissues may have helped prevent the development of hepatic steatosis in L0-hLPL mice, thus lowering the VLDL secretion potential and, consequently, circulating TG. Whether this effect of COOH on circulating NEFA and TG accretion in the liver functionally translate into a reduction of VLDL secretion is currently under investigation.

PPAR-γ agonists have been shown to reduce plasma TG in many rodent models by increasing LPL-mediated TG catabolism in adipose tissue (12; 13; 16). Although none of

these previous studies have reported a reduction in hepatic TG secretion rate, some studies did so, suggesting that PPAR-γ agonists reduce TG by affecting either or both hydrolysis and secretion of TG-rich particles (2; 8; 17). The use of different agonists, doses, and lengths of treatment in rodent models with different degrees of hypertriglyceridemia and of sensitivity to key mediators (e.g. adiponectin) may all be linked to such discrepancies. Without contradicting the role of LPL in the hypotriglyceridemic effects of PPARγ agonism in normal conditions, the present findings demonstrate that, in the setting of total lifelong gene invalidation in adipose tissue and skeletal muscle but functional cardiac enzyme activity, PPARγ agonism can correct hypertriglyceridemia without the contribution of adipose LPL.

#### AKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to acknowledge the most helpful contribution of Yves Gélinas for expert technical assistance.

#### GRANTS

This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to YD. ML was the recipient of a Studentship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, followed by a Studentship from the Fonds de la Recherché en Santé du Québec (FRSQ). GS was the recipient of a Summer Research Studentship from the Faculty of Medicine, Laval University. WTF was the recipient of a Postdocoral Fellowship from a CIHR Training In Obesity Program grant.

#### REFERENCES

- Picard F, Auwerx J: PPAR-gamma and glucose homeostasis. Annu Rev Nutr 22:167-197, 2002
- Oakes ND, Thalen PG, Jacinto SM, Ljung B: Thiazolidinediones increase plasmaadipose tissue FFA exchange capacity and enhance insulin-mediated control of systemic FFA availability. *Diabetes* 50:1158-1165, 2001
- Laplante M, Sell H, MacNaul KL, Richard D, Berger JP, Deshaies Y: PPAR-gamma Activation Mediates Adipose Depot-Specific Effects on Gene Expression and Lipoprotein Lipase Activity: Mechanisms for Modulation of Postprandial Lipemia and Differential Adipose Accretion. *Diabetes* 52:291-299, 2003
- Jiang G, Dallas-Yang Q, Li Z, Szalkowski D, Liu F, Shen X, Wu M, Zhou G, Doebber T, Berger J, Moller DE, Zhang BB: Potentiation of insulin signaling in tissues of Zucker obese rats after acute and long-term treatment with PPARgamma agonists. *Diabetes* 51:2412-2419, 2002
- Way JM, Harrington WW, Brown KK, Gottschalk WK, Sundseth SS, Mansfield TA, Ramachandran RK, Willson TM, Kliewer SA: Comprehensive messenger ribonucleic acid profiling reveals that peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation has coordinate effects on gene expression in multiple insulin-sensitive tissues. *Endocrinology* 142:1269-1277, 2001
- Aronoff S, Rosenblatt S, Braithwaite S, Egan JW, Mathisen AL, Schneider RL: Pioglitazone hydrochloride monotherapy improves glycemic control in the treatment of patients with type 2 diabetes: a 6-month randomized placebo-controlled dose-response study. The Pioglitazone 001 Study Group. *Diabetes Care* 23:1605-1611, 2000
- Fonseca VA, Valiquett TR, Huang SM, Ghazzi MN, Whitcomb RW: Troglitazone monotherapy improves glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized, controlled study. The Troglitazone Study Group. J Clin Endocrinol Metab 83:3169-3176, 1998
- Tan GD, Fielding BA, Currie JM, Humphreys SM, Desage M, Frayn KN, Laville M, Vidal H, Karpe F: The effects of rosiglitazone on fatty acid and triglyceride metabolism in type 2 diabetes. *Diabetologia* 48:83-95, 2005
- King AB: A comparison in a clinical setting of the efficacy and side effects of three thiazolidinediones. *Diabetes Care* 23:557, 2000
- Freed MI, Ratner R, Marcovina SM, Kreider MM, Biswas N, Cohen BR, Brunzell JD: Effects of rosiglitazone alone and in combination with atorvastatin on the metabolic abnormalities in type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 90:947-952, 2002

- Raskin P, Rappaport EB, Cole ST, Yan Y, Patwardhan R, Freed MI: Rosiglitazone short-term monotherapy lowers fasting and post-prandial glucose in patients with type II diabetes. *Diabetologia* 43:278-284, 2000
- Laplante M, Festuccia WT, Soucy G, Gelinas Y, Lalonde J, Deshaies Y: Involvement of adipose tissues in the early hypolipidemic action of PPAR-gamma agonism in the rat. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2006
- Lefebvre AM, Peinado-Onsurbe J, Leitersdorf I, Briggs MR, Paterniti JR, Fruchart JC, Fievet C, Auwerx J, Staels B: Regulation of lipoprotein metabolism by thiazolidinediones occurs through a distinct but complementary mechanism relative to fibrates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:1756-1764, 1997
- McTernan PG, Harte AL, Anderson LA, Green A, Smith SA, Holder JC, Barnett AH, Eggo MC, Kumar S: Insulin and rosiglitazone regulation of lipolysis and lipogenesis in human adipose tissue in vitro. *Diabetes* 51:1493-1498, 2002
- Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, Staels B, Auwerx J: PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissuespecific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *Embo J* 15:5336-5348, 1996
- 16. Kaumi T, Hirano T, Odaka H, Ebara T, Amano N, Hozumi T, Ishida Y, Yoshino G: VLDL triglyceride kinetics in Wistar fatty rats, an animal model of NIDDM: effects of dietary fructose alone or in combination with pioglitazone. *Diabetes* 45:806-811, 1996
- Carpentier A, Taghibiglou C, Leung N, Szeto L, Van Iderstine SC, Uffelman KD, Buckingham R, Adeli K, Lewis GF: Ameliorated hepatic insulin resistance is associated with normalization of microsomal triglyceride transfer protein expression and reduction in very low density lipoprotein assembly and secretion in the fructosefed hamster. *J Biol Chem* 277:28795-28802, 2002
- Weinstock PH, Bisgaier CL, Aalto-Setala K, Radner H, Ramakrishnan R, Levak-Frank S, Essenburg AD, Zechner R, Breslow JL: Severe hypertriglyceridemia, reduced high density lipoprotein, and neonatal death in lipoprotein lipase knockout mice. Mild hypertriglyceridemia with impaired very low density lipoprotein clearance in heterozygotes. J Clin Invest 96:2555-2568, 1995
- Coleman T, Seip RL, Gimble JM, Lee D, Maeda N, Semenkovich CF: COOH-terminal disruption of lipoprotein lipase in mice is lethal in homozygotes, but heterozygotes have elevated triglycerides and impaired enzyme activity. J Biol Chem 270:12518-12525, 1995
- Paterniti JR, Jr., Brown WV, Ginsberg HN, Artzt K: Combined lipase deficiency (cld): a lethal mutation on chromosome 17 of the mouse. Science 221:167-169, 1983

- 21. Levak-Frank S, Hofmann W, Weinstock PH, Radner H, Sattler W, Breslow JL, Zechner R: Induced mutant mouse lines that express lipoprotein lipase in cardiac muscle, but not in skeletal muscle and adipose tissue, have normal plasma triglyceride and high-density lipoprotein-cholesterol levels. *Proc Natl Acad Sci US A* 96:3165-3170, 1999
- 22. Wagner EM, Kratky D, Haemmerle G, Hrzenjak A, Kostner GM, Steyrer E, Zechner R: Defective uptake of triglyceride-associated fatty acids in adipose tissue causes the SREBP-1c-mediated induction of lipogenesis. J Lipid Res 45:356-365, 2004
- Kratky D, Zimmermann R, Wagner EM, Strauss JG, Jin W, Kostner GM, Haemmerle G, Rader DJ, Zechner R: Endothelial lipase provides an alternative pathway for FFA uptake in lipoprotein lipase-deficient mouse adipose tissue. J Clin Invest 115:161-167, 2005
- Laplante M, Festuccia WT, Soucy G, Gelinas Y, Lalonde J, Berger JP, Deshaies Y: Mechanisms of the Depot Specificity of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma Action on Adipose Tissue Metabolism. *Diabetes* 55:2771-2778, 2006
- Kageyama H, Hirano T, Okada K, Ebara T, Kageyama A, Murakami T, Shioda S, Adachi M: Lipoprotein lipase mRNA in white adipose tissue but not in skeletal muscle is increased by pioglitazone through PPAR-gamma. *Biochem Biophys Res Commun* 305:22-27, 2003
- Folch J, Lees M: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J Biol Chem 226:497-509, 1957
- Ginsberg HN, Zhang YL, Hernandez-Ono A: Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes. Arch Med Res 36:232-240, 2005
- Gibbons GF, Bartlett SM, Sparks CE, Sparks JD: Extracellular fatty acids are not utilized directly for the synthesis of very-low-density lipoprotein in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochem J* 287 (Pt 3):749-753, 1992
- Adiels M, Taskinen MR, Packard C, Caslake MJ, Soro-Paavonen A, Westerbacka J, Vehkavaara S, Hakkinen A, Olofsson SO, Yki-Jarvinen H, Boren J: Overproduction of large VLDL particles is driven by increased liver fat content in man. *Diabetologia* 49:755-765, 2006
- Jaye M, Lynch KJ, Krawiec J, Marchadier D, Maugeais C, Doan K, South V, Amin D, Perrone M, Rader DJ: A novel endothelial-derived lipase that modulates HDL metabolism. *Nat Genet* 21:424-428, 1999
- Hirata K, Dichek HL, Cioffi JA, Choi SY, Leeper NJ, Quintana L, Kronmal GS, Cooper AD, Quertermous T: Cloning of a unique lipase from endothelial cells extends the lipase gene family. *J Biol Chem* 274:14170-14175, 1999

- 32. Berger JP, Petro AE, Macnaul KL, Kelly LJ, Zhang BB, Richards K, Elbrecht A, Johnson BA, Zhou G, Doebber TW, Biswas C, Parikh M, Sharma N, Tanen MR, Thompson GM, Ventre J, Adams AD, Mosley R, Surwit RS, Moller DE: Distinct properties and advantages of a novel peroxisome proliferator-activated protein [gamma] selective modulator. *Mol Endocrinol* 17:662-676, 2003
- 33. Mayerson AB, Hundal RS, Dufour S, Lebon V, Befroy D, Cline GW, Enocksson S, Inzucchi SE, Shulman GI, Petersen KF: The effects of rosiglitazone on insulin sensitivity, lipolysis, and hepatic and skeletal muscle triglyceride content in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 51:797-802, 2002
- Tiikkainen M, Hakkinen AM, Korsheninnikova E, Nyman T, Makimattila S, Yki-Jarvinen H: Effects of rosiglitazone and metformin on liver fat content, hepatic insulin resistance, insulin clearance, and gene expression in adipose tissue in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 53:2169-2176, 2004
- Oakes ND, Kennedy CJ, Jenkins AB, Laybutt DR, Chisholm DJ, Kraegen EW: A new antidiabetic agent, BRL 49653, reduces lipid availability and improves insulin action and glucoregulation in the rat. *Diabetes* 43:1203-1210, 1994
- 36. Chao L, Marcus-Samuels B, Mason MM, Moitra J, Vinson C, Arioglu E, Gavrilova O, Reitman ML: Adipose tissue is required for the antidiabetic, but not for the hypolipidemic, effect of thiazolidinediones. J Clin Invest 106:1221-1228, 2000
- 37. Memon RA, Tecott LH, Nonogaki K, Beigneux A, Moser AH, Grunfeld C, Feingold KR: Up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR-alpha) and PPAR-gamma messenger ribonucleic acid expression in the liver in murine obesity: troglitazone induces expression of PPAR-gamma-responsive adipose tissue-specific genes in the liver of obese diabetic mice. *Endocrinology* 141:4021-4031, 2000
- Gavrilova O, Haluzik M, Matsusue K, Cutson JJ, Johnson L, Dietz KR, Nicol CJ, Vinson C, Gonzalez FJ, Reitman ML: Liver peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass. *J Biol Chem* 278:34268-34276, 2003
- Matsusue K, Haluzik M, Lambert G, Yim SH, Gavrilova O, Ward JM, Brewer B, Jr., Reitman ML, Gonzalez FJ: Liver-specific disruption of PPARgamma in leptindeficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes. J Clin Invest 111:737-747, 2003
- Julius U: Influence of plasma free fatty acids on lipoprotein synthesis and diabetic dyslipidemia. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 111:246-250, 2003
- Lewis GF: Fatty acid regulation of very low density lipoprotein production. Curr Opin Lipidol 8:146-153, 1997
- 42. Raabe M, Flynn LM, Zlot CH, Wong JS, Veniant MM, Hamilton RL, Young SG: Knockout of the abetalipoproteinemia gene in mice: reduced lipoprotein secretion in

heterozygotes and embryonic lethality in homozygotes. Proc Natl Acad Sci U S A 95:8686-8691, 1998

- Raabe M, Veniant MM, Sullivan MA, Zlot CH, Bjorkegren J, Nielsen LB, Wong JS, Hamilton RL, Young SG: Analysis of the role of microsomal triglyceride transfer protein in the liver of tissue-specific knockout mice. J Clin Invest 103:1287-1298, 1999
- 44. Gibbons GF, Wiggins D, Brown AM, Hebbachi AM: Synthesis and function of hepatic very-low-density lipoprotein. *Biochem Soc Trans* 32:59-64, 2004
- 45. Lewis GF, Murdoch S, Uffelman K, Naples M, Szeto L, Albers A, Adeli K, Brunzell JD: Hepatic lipase mRNA, protein, and plasma enzyme activity is increased in the insulin-resistant, fructose-fed Syrian golden hamster and is partially normalized by the insulin sensitizer rosiglitazone. *Diabetes* 53:2893-2900, 2004
- 46. Shimomura I, Hammer RE, Richardson JA, Ikemoto S, Bashmakov Y, Goldstein JL, Brown MS: Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: model for congenital generalized lipodystrophy. *Genes Dev* 12:3182-3194, 1998
- Tsuboyama-Kasaoka N, Takahashi M, Tanemura K, Kim HJ, Tange T, Okuyama H, Kasai M, Ikemoto S, Ezaki O: Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice. *Diabetes* 49:1534-1542, 2000
- 48. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T: The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med* 7:941-946, 2001
- 49. Louet JF, Le May C, Pegorier JP, Decaux JF, Girard J: Regulation of liver carnitine palmitoyltransferase I gene expression by hormones and fatty acids. *Biochem Soc Trans* 29:310-316, 2001
- Napal L, Marrero PF, Haro D: An intronic peroxisome proliferator-activated receptorbinding sequence mediates fatty acid induction of the human carnitine palmitoyltransferase 1A. J Mol Biol 354:751-759, 2005
- 51. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T: Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 8:1288-1295, 2002

- 52. Festuccia WT, Laplante M, Berthiaume M, Gelinas Y, Deshaies Y: PPARgamma agonism increases rat adipose tissue lipolysis, expression of glyceride lipases, and the response of lipolysis to hormonal control. *Diabetologia* 49:2427-2436, 2006
- Guan HP, Li Y, Jensen MV, Newgard CB, Steppan CM, Lazar MA: A futile metabolic cycle activated in adipocytes by antidiabetic agents. *Nat Med* 8:1122-1128, 2002
- Tordjman J, Chauvet G, Quette J, Beale EG, Forest C, Antoine B: Thiazolidinediones block Fatty Acid release by inducing glyceroneogenesis in fat cells. J Biol Chem 278:18785-18790, 2003
- 55. Lewis GF, Uffelman KD, Szeto LW, Weller B, Steiner G: Interaction between free fatty acids and insulin in the acute control of very low density lipoprotein production in humans. J Clin Invest 95:158-166, 1995
## TABLES

Gene	Accession #	5' primer (5'3')	3' primer (5'3')		
ACC	NM_133904	AACACACAGAGCATCGTGCA	CTGGCTCTGAGGGCAACCTT		
ACS	NM_007981	GCTGATCCAGAAGGGGTTCA	CCACCCCACACTTCTTGCCT		
Acox1	NM_015729	GCCTGAGCTTCATGCCCTCA	ACCAGAGTTGGCCAGACTGC		
aP2	NM_024406	GACGACAGGAAGGTGAAGAG	ACATTCCACCACCAGCTTGT		
ß-actin	NM_007393	CTCTAGACTTCGAGCAGGAG	AGAGTACTTGCGCTCAGGAG		
CD36	NM_007643	GTCCTGGCTGTGTTTGGAGG	GCTGCTACAGCCAGATTCAG		
CPT-1a	NM_013495	TGCCTCTATGTGGTGTCCAA	CATGGCTTGTCTCAAGTGCT		
DGAT-1	NM_010046	GGCCTGCCCCATGCGTGATTAT	CCCCACTGACCTTCTTCCCTGTAGA		
DGAT-2	NM_026384	GAAGCTGCCCGCAGCGAAAA	TCTTGGGCGTGTTCCAGTCAA		
FAS	NM_007988	CTGGCCCCGGAGTCGCTTGAGTATA	GGAGCCTCCGAAGCCAAATGA		
L-FABP	NM_017399	GCCCGAGGACCTCATCCAGAAA	CTCTCTTGTAGACAATGTCGCCCA		
LPL	NM_008509	GCACTTTCCAGCCAGGATGC	GGCCTGGTTGTGTTGCTTGC		
MTP	NM_008642	ATCCGTCGAGTTCTCAAGGA	AAACAGGATGGCTGACATGC		
PEPCK	NM_198780	TGGGTGATGACATTGCCTGG	ACCTTGCCCTTATGCTCTGCAG		
TGH	NM_053200	TCAGCTGTTATGGTTCATTG	CACTGGAATCATATTCTCAGAGATT		

Table 1. Primers used for mRNA quantification by real-time qPCR.

	L2		L0-hLPL		ANOVA		
-	CTRL	СООН	CTRL	СООН	genotype (g)	treatment (t)	g x t
Body weight (g)	27±1	31±1	28±1	27±1	N.S.	N.S.	N.S.
iWAT (mg)	605±120	674±141	405±77	418±55	0.04	N.S.	N.S.
rWAT (mg)	72±21	71±10	37±8	45±9	0.02	N.S.	N.S.
BAT (mg)	62±7	175±19	89±8	231±30	N.S.	0.0001	N.S.
Liver (g)	1.2±0.1	1.4±0.1	2.0±0.1	1.7±0.1	<0.0001	N.S.	0.006

 Table 2. Morphometric variables of L2 and L0-hLPL mice treated or not with COOH for 4 weeks.

Data are mean  $\pm$  SEM of 3-5 mice.

**Table 3.** mRNA expression of lipid uptake/retention genes in white adipose tissue and brown adipose tissue of L2 and L0-hLPL mice treated or not with COOH for 3 weeks.

	L2		L0-hLPL		ANOVA		
-	CTRL	COOH	CTRL	СООН	genotype (g) treatment (t)		g x t
aP2	75±16	249±133	44±11	146±31	N.S.	0.005	N.S.
CD36	215±70	307±75	142±28	255±58	N.S.	N.S. (0.08)	N.S.
PEPCK	4.3±2.7	7.7±2.5	1.2±0.2	8.1±1.5	N.S.	0.002	N.S.
GyK	8.9±4.3	131.0±63.3	10.5±5.1	52.2±19.1	N.S.	0.0004	N.S.

WAT

BAT								
	L2		L0-hLPL		ANOVA			
-	CTRL	COOH	CTRL	COOH	genotype (g) treatment (t)		g x t	
aP2	48±7	129±36	51±8	121±33	N.S.	0.01	N.S.	
CD36	29±6	52±10	29±6	39±6	N.S.	0.03	N.S.	
PEPCK	15±6	22±3	13±1	22±6	N.S.	N.S. (0.06)	N.S.	
GyK	14±7	24±4	11±2	32±13	N.S.	0.04	N.S.	

Data are mean ±SEM of 4-5 mice

#### FIGURE LEGENDS

Figure 1 – Fasting (A) and ad libitum-fed (B) plasma TG contentration in L2 and L0-hLPL mice treated or not with COOH for 3-4 weeks. Each column represents the mean  $\pm$  SEM of 3-5 mice. \* *P* < 0.05 vs. untreated mice of the same genotype; † *P* < 0.05 vs. L2 mice of the same treatment group.

Figure 2 – LPL mRNA levels in iWAT, rWAT and BAT of L2 and L0-HLPL mice treated or not with COOH for 3-4 weeks. Each column represents the mean  $\pm$  SEM of 3-5 mice. \* P < 0.05 vs. untreated mice of the same genotype ;  $\dagger P < 0.05$  vs. L2 mice of the same treatment group.

Figure 3 – Liver TG content in L2 and L0-HLPL mice treated or not with COOH for 3-4 weeks. Each column represents the mean  $\pm$  SEM of 3-5 mice. \* P < 0.05 vs. untreated mice of the same genotype ;  $\dagger P < 0.05$  vs. L2 mice of the same treatment group.

**Figure 4** – Expression, activity or circulating levels of determinants of VLDL assembly and secretion (A), FA uptake, synthesis and esterification (B), and lipid oxidation (C) in the liver of L2 and L0-hLPL mice treated or not with COOH for 3-4 weeks. Each column represents the mean  $\pm$  SEM of 3-5 mice. \* P < 0.05 vs. untreated mice of the same genotype ;  $\dagger P < 0.05$  vs. L2 mice of the same treatment group, # P < 0.05 vs. L2 mice.

**Figure 5** – Serum NEFA concentration (A) of L2 and L0-hLPL mice treated or not with COOH for 3-4 weeks. Each column represents the mean  $\pm$  SEM of 3-5 mice. \* P < 0.05 vs. untreated mice of the same genotype ;  $\dagger P < 0.05$  vs. L2 mice of the same treatment group. Simple regression analysis between liver TG and circulating NEFA (B) and between plasma TG and liver TG (C). Symbols : untreated L2 mice ( $\Box$ ); COOH-treated L2 mice ( $\Delta$ ); untreated L0-hLPL mice ( $\blacksquare$ ); COOH-treated L0-hLPL mice ( $\blacksquare$ ).

**Figure 6** – iWAT, rWAT, and BAT cell size (A) of L2 and L0-hLPL mice treated or not with COOH for 3-4 weeks. Each column represents the mean  $\pm$  SEM of 3-5 mice. \* *P* < 0.05 vs. untreated mice of the same genotype ; † *P* < 0.05 vs. L2 mice of the same treatment group, # *P* < 0.05 vs. L2 mice. Representative micrographs of BAT adipocytes (B) from L2 and L0-LPL mice treated or not with COOH for 3-4 weeks.

# FIGURES

Figure 1.







Figure 3.







## Figure 6.





L0-hLPL

соон



## CHAPITRE 5

## INVOLVEMENT OF ADIPOSE TISSUES IN THE EARLY HYPOLIPIDEMIC ACTION OF PPAR-γ AGONISM IN THE RAT

Mathieu LAPLANTE<sup>1</sup>, William T. FESTUCCIA<sup>1</sup>, Geneviève SOUCY, Yves GÉLINAS<sup>1</sup>, Josée LALONDE<sup>1</sup> and Yves DESHAIES<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laval Hospital Research Center, Department of Anatomy and Physiology, School of Medicine, Laval University, Québec, Qc, Canada, G1V 4G5

> Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 292: R1408–R1417, 2007. First published December 14, 2006; doi:10.1152/ajpregu.00761.2006. Used with the permission

> article publié dans Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol

#### AVANT-PROPOS

Ce travail, réalisé sous la direction du Dr. Yves Deshaies, a été rendu possible grâce à la collaboration du Dr. William T. Festuccia (stagiaire post-doctoral avec le Dr. Yves Deshaies), de Geneviève Soucy (stagiaire, étudiante en médecine à l'Université Laval), de Yves Gélinas (M.Sc., assistant de recherche) et de Josée Lalonde (M.Sc., assistante de recherche). Certaines chirurgies faites chez les animaux ont été réalisées par le Dr. William T. Festuccia. De plus, ce dernier a apporté une aide technique et conceptuelle précieuse lors de la réalisation des protocoles. Il en va de même pour Geneviève Soucy qui, en plus de s'occuper des animaux, a contribué étroitement à la récolte des échantillons et à la mesure de certains paramètres. Dans la première partie du protocole, Josée Lalonde a effectué les chirurgies chez les animaux. Finalement, Yves Gélinas a rendu possible cette étude par son soutien technique et sa collaboration lors de la mise au point des méthodes. Cette étude implique mon entière participation quant à la réalisation de l'ensemble des étapes menant à la publication de cet article, soit la planification, l'exécution du protocole, la mesure des variables plasmatiques et tissulaires et l'analyse statistique. Suite aux corrections du directeur, l'article a été révisé par l'ensemble des coauteurs et il a été soumis aux éditeurs de la revue American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative *Physiology.* Cet article a été accepté pour fin de publication en novembre 2006 et il a été publié en ligne en décembre 2006.

## RÉSUMÉ

Les agonistes des récepteurs activés par les proliférateurs des peroxysomes y (PPARy) sont des agents sensibilisateurs à l'insuline reconnus pour améliorer la lipémie chez les rongeurs. Cette étude visait à déterminer la contribution de la sécrétion et de la clairance des lipides de même que le rôle du tissu adipeux blanc (TAB) et du tissu adipeux brun (TABr) dans l'amélioration rapide de la triglycéridémie induite par l'agonisme de PPARy. Des rats Sprague-Dawley mâles ont été traités avec de la rosiglitazone (RSG, 15mg/kg/j) de 1 à 4 jours et les déterminants du métabolisme des lipides furent mesurés en phase postprandiale. Les triglycérides (TG) circulants ont été diminués (-54%) après 3 jours de traitement avec la RSG, un effet dû à une clairance accélérée des lipides. La sécrétion des TG n'a pas été affectée par le traitement. La captation des lipides fut fortement augmentée par la RSG dans le TAB et le TABr. La captation des acides gras dérivés de l'hydrolyse des TG a augmenté de 3 fois dans le TABr et de 60-90% dans le TAB. L'accélération de la clairance des TG a été associée avec l'activation de la lipase lipoprotéique (LPL) principalement dans le TABr. Les acides gras libres (AGL) ont été réduits (-20%) après un seul jour de traitement avec la RSG, un effet associé à l'augmentation de l'expression des gènes codant pour des protéines impliquées dans la captation (FABP-4), l'estérification (DGAT-1) et le recyclage (GyK, PEPCK) des lipides dans le TABr et le TAB. Après 4 jours de traitement avec la RSG, la captation des AGL a augmenté dans le TABr (2.5 fois) et dans le TAB (40%). Ces résultats démontrent que l'augmentation de l'efficacité de l'hydrolyse des TG par la LPL et de la captation des AGL par le TABr sont des facteurs importants dans l'effet hypolipidémiant des agonistes PPARγ chez le rat.

#### ABSTRACT

Agonists of the peroxisome proliferator-activated receptor y (PPARy) are insulin sensitizers that potently improve lipemia in rodents. This study aimed to determine the contribution of lipid secretion vs. clearance and the involvement of white (WAT) and brown adipose tissue (BAT) in the rapid hypolipidemic action of PPARy agonism. Male rats were treated with rosiglitazone (RSG, 15 mg/kg/d) for 1 to 4 days and determinants of lipid metabolism were assessed postprandially. Serum triglycerides (TG) were lowered (-54%) after 3 days of RSG treatment, due to accelerated clearance from blood without contribution of changes in secretion rates. Both BAT and WAT were the major sites of RSG action on TG clearance, the increase in TG-derived fatty acid (FA) uptake reaching 3fold in BAT and 60-90% in WAT depots. Accelerated TG clearance was associated with increased lipoprotein lipase (LPL) activity mostly in BAT. Serum nonesterified FA were lowered (-20%) by a single dose of RSG, an effect associated with increased expression levels of FA binding/transport (FABP-4), esterification (DGAT-1) and recycling (GyK, PEPCK) enzymes in BAT and WAT, suggesting FA trapping. After 4 days of RSG treatment, NEFA uptake was also stimulated in both BAT (2.5-fold) and WAT (40%). These findings demonstrate the causal involvement of increased efficiency of LPLmediated TG clearance and reveal the important contribution of TG-derived and albuminbound FA uptake by BAT in the rapid hypolipidemic action of PPARy agonism in the rat.

#### INTRODUCTION

Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) is a ligand-activated nuclear receptor that is highly expressed in white adipose tissue (WAT). PPAR $\gamma$  agonists of the thiazolidinedione (TZD) class are used clinically for the treatment of insulin resistance and type 2 diabetes. In addition to improving insulin sensitivity, TZDs tend to reduce circulating nonesterified fatty acids (NEFA) and, more modestly, triglycerides (TG) in humans, but do so very robustly and within a few days in rodents (19, 31, 48). The precise mechanisms whereby TZDs affect the metabolism of circulating lipids are not completely understood.

Plasma TG levels represent the balance between gut- and liver-derived TG-rich lipoprotein secretion and lipoprotein lipase (LPL)-mediated clearance in various extrahepatic tissues. The TZD rosiglitazone (RSG) given for 3 weeks to insulin-resistant hamsters was shown to reduce plasma TG by decreasing hepatic VLDL-TG secretion, without any apparent change in clearance (25), whereas a similar long-term treatment in obese Zucker rats reduced TG secretion but also increased their clearance (32). Thiazolidinediones strongly induce the expression of genes involved in lipid uptake, trafficking and esterification in WAT (2). Consequent lipid retention in WAT is thought to reduce ectopic fat storage and protect the liver and muscle from fatty acid-induced insulin resistance (32, 49). PPARγ-induced alterations in WAT metabolism could also influence circulating lipids through changes in adipokine production (e.g. adiponectin), provision of precursor NEFA to the liver for TG production/secretion, or uptake of lipoprotein TG-derived FA. The contribution of these various processes to the rapid hypolipidemic action of PPARγ agonism has not been addressed.

PPAR $\gamma$  agonism leads to a depot-specific increase in adiposity (10, 30). In rodents, brown adipose tissue (BAT) undergoes remarkable morphologic and metabolic changes, turning off its energy dissipating activity to become a lipid storage organ (3, 5, 23). As in some WAT depots, PPAR $\gamma$  agonism induces cell proliferation (4), differentiation (41), and lipid accretion in BAT (47). This occurs despite a robust increase in the thermogenic effector uncoupling protein-1 (UCP-1) (6). PPARγ agonism therefore renders BAT quite similar to its WAT counterpart, however its contribution to the modulation of plasma lipids by PPARγ agonists remains unknown.

The hypolipemic action of PPAR $\gamma$  agonism is much more marked and more rapidly established in rodents (days) than in humans (weeks). Brown adipose tissue is virtually absent in humans but constitutes a major target organ of PPAR $\gamma$  agonism in rodents in terms of fat accretion. This suggests the possibility of the involvement of adipose tissue in general, and of BAT in particular, in the action of PPAR $\gamma$  agonism on the metabolism of circulating lipids. The present study was carried out to determine the contribution of lipid secretion vs. clearance, as well as that of WAT and BAT, to the rapid and robust hypolipidemic effect of PPAR $\gamma$  agonism in the rat. These objectives were pursued by treating rats for 1 to 4 days with the PPAR $\gamma$  agonist rosiglitazone (RSG), and by assessing whole-body as well as BAT and WAT determinants of lipid metabolism in. Because long-term PPAR $\gamma$  agonism may exert depot-specific actions on lipid metabolism and fat accretion (22, 23), inguinal (iWAT) and epididymal WAT (eWAT) were studied as representative of subcutaneous and visceral WAT, respectively.

#### RESEARCH DESIGN AND METHODS

Animals and treatments. Male Sprague-Dawley rats (200-225g) were purchased from Charles River Laboratories (St. Constant, QC, Canada) and housed individually in stainless steel cages in a room kept at  $23 \pm 1^{\circ}$ C with a 12:12 h light-dark cycle (lights on at 1600 h). The animals were cared for and handled in conformance with the Canadian Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, and the protocols were approved by our institutional animal care committee. Upon arrival, rats had free access to tap water and a ground stock diet (Charles River Rodent Diet #5075; Ralston Products, Woodstock, ON, Canada; digestible energy content: 12.9 kJ/g). In each of the protocols described below, half of the rats were given rosiglitazone (RSG, [5-[[4][2- (methyl- 2- pyridinyl Amino) ethoxy] phenyl] methylene]- 2,4-thiazolidinedione], purchased as AVANDIA® at a local pharmacy) as an adjunct to the diet at a dose of 15 mg·kg<sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup>. Rats were treated for a period of 1 to 5 days as indicated in the individual protocols below. To maximize the impact of treatment on TG metabolism, rats were studied in the postprandial state (23), standardized as follows: The day before the end of treatment, after normal access to food during the dark period, food was removed at 1600 h and rats were given a dose of RSG (15 mg/kg) in 0.5% methylcellulose (vehicle alone to controls) by gavage to ensure exposure to RSG during the fasting period. At 0800 h on the next morning, food (with or without RSG) was reintroduced and rats were allowed to eat ad libitum for 6 h, after which time the various procedures described below were performed.

**Triglyceride appearance rate.** Eight control and 8 RSG-treated rats were used to assess the rate of appearance of TG into the circulation. Because rats were in the postprandial state, the procedure estimates the combined appearance of chylomicron- and VLDL-TG. Rats were treated with RSG for 5 days as described above. Triglyceride appearance rate was measured at day 5 to cover the whole treatment period so as to obtain a conservative estimate of the impact of short-term RSG treatment on TG appearance. Three days after the onset of treatment, rats were cannulated into the jugular vein under isoflurane anaesthesia. Two days later and following the refeeding procedure described above, rats were injected through the jugular catheter with 300 mg/kg of Triton WR-1339, a detergent

210

that prevents intravascular TG catabolism. Blood samples (0.15 ml) were taken with an EDTA-containing syringe before (time 0), 20, 40, and 60 min after Triton injection. The rate of TG appearance into the circulation was determined from regression analysis of TG accumulation in plasma vs. time, with correction for plasma volume calculated from body weight (34).

Triglyceride clearance rate and tissue uptake. Fourteen rats were cannulated into the jugular vein as described above. Two days after surgery, treatment with RSG was initiated in half of the animals and continued for 3 days. Triglyceride clearance rate and tissue uptake were assessed after 3 days of treatment, the time at which TG began to be significantly reduced by the agonist. At the end of the refeeding procedure, rats were injected through the jugular catheter with 0.15 ml/kg of 10% Intralipid containing <sup>3</sup>H-9,10labeled trioleoylglycerol (570 dpm/nmol FA) diluted 1:6 with 20% Intralipid (165 mg/kg of TG were injected). The labeled TG emulsion was kindly provided by Drs. Thomas and Gunilla Olivecrona (Umeå University, Sweden) and prepared as described previously (18). Blood samples (0.15 ml) were collected with an EDTA-containing syringe 1, 2, 3, 5, and 10 min after the injection. Rats were then killed by ketamine-xylazine injection and various tissues were collected. Measurement of radioactivity in blood and in tissues was performed as described (18). Clearance rate of TG from plasma was calculated from the slope of disappearance of label from plasma. A significant proportion of artificial TG emulsions are cleared from the circulation through LPL-independent pathways, with a large contribution from liver (18). Triglyceride-derived NEFA uptake by tissues was therefore expressed as % injected dose minus liver uptake. The latter was not affected by RSG treatment (not shown).

In vivo rates of FA synthesis. Rats treated for 7 days with RSG exactly as described above and in the fed state were injected i.p. with  ${}^{3}\text{H}_{2}\text{O}$  (3 mCi in 0.5 mL saline). One h later they were killed by decapitation, blood samples were collected for determination of serum water specific radioactivity, and eWAT and BAT were rapidly removed for measurement of label incorporation into triglycerides. Tissue lipid extraction, isolation of triglyceride-fatty acids, radioactivity counting, and plasma water specific

radioactivity determination were carried out exactly as previously described (21). Lipogenesis was expressed as nmol fatty acids/g tissue/min.

Serum and tissue sampling. Rats were killed by decapitation. Trunk blood was centrifuged ( $1500 \times g$ , 15 min, 4°C) and serum was stored at -70°C until later biochemical measurements. Adipose tissue samples destined for quantification of LPL activity were homogenized and processed exactly as described earlier (36) and stored at -70°C until assayed.

Serum/plasma determinations. Serum glucose concentrations were measured by the glucose oxidase method with the YSI 2300 STAT plus glucose analyser. Serum insulin was determined by radioimmunoassay (Linco Research, St. Charles, MO) with rat insulin as standard. Serum/plasma TG (Roche Diagnostics, Montreal, QC, Canada) and NEFA (NEFA C test kit, Wako Pure Chemical Industries, Richmond, VA) were measured enzymatically.

Adipose tissue lipoprotein lipase activity. Enzyme activity in adipose tissues was determined exactly as described (27). Briefly, tissue homogenates were incubated with a substrate mixture containing [carboxyl-<sup>14</sup>C] triolein, and NEFA released by LPL were separated and counted. LPL activity was expressed as microunits (1  $\mu$ U = 1  $\mu$ mol NEFA released per hour of incubation at 28°C). The interassay coefficient of variation was 11.2% and was determined using bovine skim milk as a standard source of LPL. Enzyme activity is expressed per total adipose depot to illustrate its global tissue availability in relation to lipid uptake.

Adipose tissue total TG content. Adipose TG content was determined enzymatically as above in total lipid extracts prepared by the method of Folch (14).

**Brown adipocyte morphology by light microscopy.** Brown adipose tissue samples from 6 control and 6 RSG-treated (4 days) rats were fixed in 0.1 mmol/l PBS (pH 7.3) containing 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Thin sections were

mounted on glass slides and dyed with hematoxylin/eosin. At least five digital images of each tissue were captured using an Olympus BX60 microscope equipped with a Sony RT Slider Spot Camera (Camsen Group, Markham, ON, Canada) at a magnification of 40×. Quantification was achieved using Image Pro Plus 5.0 (MediaCybernetics, Silver Spring, MD, USA). Briefly, on blinded samples, the lipid surface of 5 different slides per depot was measured using the Measure-Count/Size tool, and an average was calculated for each rat.

**Ex vivo NEFA uptake.** Fat pads from rats treated or not for 1 or 4 days with RSG were removed immediately after decapitation. Fat explants of epididymal and inguinal WAT (20-25 mg) and BAT (10-15mg) were weighed and pre-incubated for 10 min in 1 ml Krebs-Ringer bicarbonate (KRB) buffer of the following composition (in mM): 118 NaCl, 4.8 KCl, 1.25 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 MgSO<sub>4</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 5 glucose, supplemented with 2.5% fatty acid-free bovine serum albumin (Sigma, Oakville, Canada), pH 7.4. The tissue explants were then transferred into 24-well plates, each well containing 1 ml KRB supplemented with <sup>3</sup>H-oleic acid (0.8  $\mu$ Ci/well). Explants were exposed or not to insulin (375 pM, which approximates postprandial insulinemia), however insulin did not impact NEFA uptake, and data from non-exposed explants are presented herein. Fat explants were incubated for 2 h in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% O<sub>2</sub> at 37°C. At the end of the incubation, tissue pieces were washed twice in cold saline and extracted overnight at room temperature with 1 ml of heptane-isopropanol (2:3). The organic solvent was evaporated, total <sup>3</sup>H-lipids were dissolved in scintillation liquid and counted.

**RNA isolation and analysis.** Total RNA was isolated from adipose depots using QIAzol and the RNAeasy Lipid Tissue Kit (QIAGEN, Mississauga, ON, Canada). For cDNA synthesis, expand reverse transcriptase (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) was used following manufacturer's instructions and cDNA was diluted in DNase free water (1:25) before quantification by real-time quantitative PCR (qPCR). mRNA transcript levels were measured in duplicate samples using a Rotor Gene 3000 system (Montreal Biotech, Montreal, QC, Canada). The primers used for the PCR reactions are presented in Table 1. Chemical detection of the PCR products was achieved with SYBR Green I (Molecular Probes, Willamette Valley, OR). At the end of each run, melt curve analyses were

performed and a few samples representative of each experimental group were run on agarose gel to verify specificity of the amplification. Data are expressed as the ratio between the expression of the target gene and the housekeeping gene L27.

Statistical analysis. Data are expressed as means  $\pm$  SEM. When appropriate, variables were first analyzed by factorial ANOVA to establish the individual and interactive effects of PPAR $\gamma$  agonist treatment, with 2 levels (Control, RSG), and time of treatment, with 4 levels (1, 2, 3, or 4 days). Individual pairwise between-group comparisons were then made using Fisher's Protected Least Significant Difference test. Some data were log transformed before analysis to ensure homogeneity of variance. Significance was set at P < 0.05.

#### RESULTS

Treatment with RSG for 1 to 4 days did not affect body weight or food intake, nor did it alter postprandial serum levels of glucose and insulin (Table 2). The impact of RSG on postprandial serum TG and NEFA is depicted in Figure 1. Circulating TG were significantly higher in RSG-treated rats after the first day of treatment, however this effect disappeared on the following day (Fig. 1A). RSG strongly reduced circulating TG at days 3 and 4 (-54% and -59% relative to control, respectively). The agonist also rapidly lowered NEFA (Fig. 1B), the effect being significant after only one day of treatment (-20%) and maintained thereafter (-26 to -38% below control) until the end of the 4-day study.

Triglyceride clearance was quantified after 3 days of treatment, the time at which triglyceridemia became significantly reduced by the agonist (Fig. 1A). As shown in Fig. 2A, the rate of disappearance of plasma labeled TG was significantly accelerated by RSG. In contrast, the rate of appearance of TG into the circulation, measured in another rat cohort after 5 days of treatment with RSG, remained unaltered (Fig. 2B), indicating that the rapid RSG-induced lowering of triglyceridemia was entirely due to an amelioration of TG clearance. We next assessed which tissues were responsible for faster TG clearance in RSG-treated rats. The agonist significantly increased TG-derived NEFA uptake in all adipose tissues examined (Table 3). Of note is the fact that the relative magnitude (% over control) of such increase was much more pronounced in BAT than in iWAT and eWAT. In fact, whole tissue lipid uptake by BAT of RSG-treated rats reached the level of uptake seen in WAT of untreated rats. The agonist had no significant effect on TG-derived NEFA uptake by the non-adipose tissues examined.

Because RSG improved triglyceridemia by rapidly increasing adipose tissue TG clearance, the activity of LPL, the rate-limiting enzyme in intravascular TG hydrolysis, was assessed in BAT and WAT. The activity of LPL is expressed per total adipose depot to reflect the contribution of the whole tissue to the TG clearance potential. As depicted in Fig. 3A, the agonist progressively increased total LPL activity in BAT from day 2 to day 4, such increase reaching its peak at day 3 (234% over control). A more modest increase in

LPL activity was also observed in iWAT from day 3 of treatment, such increase reaching significance at day 4 (Fig. 3B). Rosiglitazone did not affect LPL activity in eWAT (Fig. 3C).

Treatment with PPAR $\gamma$  agonists decrease both serum TG and albumin-bound NEFA, as confirmed here. In order to determine the potential of adipose depots to take up albumin-bound NEFA, fat explants from rats treated during 1 or 4 days with RSG were incubated with <sup>3</sup>H-oleate. The agonist significantly increased <sup>3</sup>H-oleate uptake in BAT, iWAT and eWAT (Fig. 4). In BAT, FA uptake was not changed after the first day of treatment, but was robustly increased at day 4. As in the case of TG-derived NEFA, the level of oleate uptake by BAT at day 4 was similar to the uptake by iWAT and eWAT of untreated rats (BAT: 2.9±0.3, iWAT: 3.4±0.5, eWAT: 3.8±0.6). The RSG-induced relative increase in BAT oleate uptake (237%) was by far the largest observed among adipose tissues, the increase in iWAT and eWAT being 38% and 41% over control, respectively, at day 4. Of note, the stimulation of NEFA uptake in eWAT was observed after a single administration of RSG, suggesting that this depot may have contributed to the first-day effect of RSG on the reduction in circulating NEFA.

The impact of the RSG-induced increase in TG-derived and albumin-bound NEFA uptake by adipose tissues on tissue weight and TG content was next assessed. A single administration of RSG resulted in a 39% increase in BAT weight (Fig. 5A). This effect was maintained throughout the study and reached a maximum of 102% at day 3. As expected, the increase in BAT weight was associated with higher TG accretion (Fig. 5B,C). There was no effect of RSG on weight, TG content or cell morphology of WAT depots (not shown). To establish that the RSG-induced increase in BAT TG content was due to higher lipid uptake and esterification rather than de novo biosynthesis of lipids, the expression level of fatty acid synthase (FAS), an index of lipogenesis, was assessed. Treatment with RSG did not significantly increase the expression of FAS in BAT (Table 4). The 4-day treatment tended to increase FAS in BAT, and did so significantly in WAT. However, direct assessement of de novo lipogenesis in vivo performed in a separate study in which rats were treated for 7 days with RSG indicated that this process does not contribute at all

to TG deposition in BAT and WAT within this time frame (BAT: Ctrl,  $50 \pm 17$  nmol FA/g/min vs. RSG,  $46 \pm 5$ ; eWAT: Control,  $51 \pm 17$  vs. RSG,  $63 \pm 17$ ).

The reduction in circulating NEFA in RSG-treated rats depicted in Figure 1B was tightly associated with the increase in BAT weight. As shown in Fig. 6A, a strong correlation was observed between BAT weight and blood NEFA ( $r^2 = 0.53$ , P < 0.0001). This robust association was confirmed in a separate experiment (not shown). The link between circulating NEFA and the weight of iWAT (Fig. 6B,  $r^2 = 0.30$ , P < 0.0001) and eWAT (Fig. 6C,  $r^2 = 0.27$ , P < 0.0002) was significant but not as robust as that observed for BAT (Fig. 5B,C). Similar but weaker relationships were noted between triglyceridemia and adipose tissue weight (BAT:  $r^2 = 0.20$ , P < 0.002, n = 47; iWAT:  $r^2 = 0.20$ , P < 0.003, n = 43; eWAT:  $r^2 = 0.10$ , P < 0.04, n = 48).

Obesity-associated hyperlipidemia constitutes strong evidence that increased lipid uptake by adipose tissues is not necessarily sufficient in itself to lower plasma lipids. Hence PPARy agonism has been shown to impact several processes involved in adipose tissue lipid retention following their uptake from the circulation. To assess the tissue-specific contribution of these processes to the hypolipidemic action of RSG, genes coding for proteins involved in FA uptake/esterification and storage were assessed in BAT and WAT. Because no marked metabolic differences were noted between iWAT and eWAT, gene expression was measured only in eWAT as representative of WAT. To confirm the wellestablished impact of RSG on BAT gene expression, UCP1 mRNA levels were quantitated in this tissue and were found to be elevated from the first day of treatment (Table 4). Rosiglitazone increased the mRNA levels of CD36, a membrane-bound FA transporter that facilitates LPL-mediated TG clearance (15) (Table 4). The effect was observed earlier in BAT than in WAT. The expression of fatty acid transport protein-1 (FATP-1), which also favors FA uptake at the cell membrane, was induced only in WAT, and after 4 days of treatment. The PPARy agonist also increased the expression of adipocyte fatty acid binding protein 4 (FABP-4, or aP2, a major adipose PPARy target involved in adipogenesis, longchain FA uptake and retention) in BAT (3-fold) and in WAT (2-fold) from the first day of treatment. Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) and glycerol kinase (GyK)

contribute to FA trapping and TG synthesis by favoring glycerol-3-phosphate synthesis, to which FA are esterified to form TG. The agonist increased PEPCK expression 7- and 25fold in BAT and by 6- and 22-fold in WAT on days 1 and 4, respectively. The increase in GyK mRNA expression occurred from day 1 on and reached 3-fold in BAT and 14-fold in WAT on day 4 of treatment. The mRNA level of diacylglycerol acyltransferase-1 (DGAT-1), which catalyzes the committed step in TG synthesis (40), was also increased by a single administration of RSG (~2-fold), an effect that was slightly amplified at day 4. The expression of adipocyte differentiation related protein (ADRP), which is expressed early during adipocyte differentiation and which plays an important role in the maintenance of intracellular lipid droplets (26), was increased 2-fold in BAT and 3-4-fold in WAT from the first day until the end of the 4-day treatment.

#### DISCUSSION

This study was designed to assess the contribution of TG secretion and clearance as well as the role of BAT and WAT in the rapid and marked improvement in the serum lipid profile brought in the rat by PPARγ agonism. The findings show that, at a time when the rate of appearance of TG into the circulation was not altered, short-term RSG treatment increased intravascular LPL-mediated TG clearance, as well as NEFA uptake, retention, and lipid deposition in adipose tissues through increasing the activity/expression of key enzymes/genes involved in these processes. The acute effects of RSG on albumin-bound NEFA and TG-derived NEFA uptake were relatively stronger in BAT than in WAT. The study underlines the key role of adipose tissues and highlights the previously unrecognized contribution of BAT in the rapid hypolipidemic effect of PPARγ agonism.

The rapid reduction in circulating TG is in line with previous work in which obese rats treated with PPAR<sub>γ</sub> agonists showed lower circulating TG after only 2 days of treatment (19). PPAR<sub>γ</sub> agonists given for a longer period of time (weeks) have been shown to decrease hepatic VLDL-TG secretion in the obese Zucker rat (32) and fructose-fed hamster models (7), suggesting a role for this process in the reduction in lipemia. Such longer-term treatment with PPAR<sub>γ</sub> agonists is able to robustly decrease liver lipid content even in the lean, chow-fed rat model used here (M. Laplante, Y. Deshaies, unpublished observations). In the present study, RSG given for 5 days did not affect the rate of TG appearance into the circulation, suggesting that the impact of PPAR<sub>γ</sub> agonism on liver TG metabolism is delayed. Because of the low level of expression of PPAR<sub>γ</sub> in the liver, the action of its agonists on hepatic lipid metabolism is thought to be indirect, and may derive from modifications in WAT metabolism, including a reduced provision of NEFA as precursors for TG synthesis and an increase in adiponectin secretion.

The absence of a short-term effect of RSG on TG secretion implies that accelerated intravascular catabolism of TG represents the sole mechanism by which short-term PPARy agonism lowered triglyceridemia in the present model. The finding of a more rapid rate of disappearance of a labeled TG emulsion from blood in RSG-treated rats relative to controls

confirms this notion. It was further established that the major sites of the RSG-induced increase in TG clearance are BAT and WAT. These findings confirm our previous study (22) in establishing that PPAR $\gamma$  agonism stimulates the uptake by WAT not only of NEFA (9) but also of lipoprotein TG-derived FA as well. The study further extends these findings by identifying BAT as a site of the RSG-induced increase in TG-derived lipid uptake. Indeed, in control conditions, BAT took up 3-4 times less lipid than WAT, whereas after 3 days of RSG treatment BAT took up as much lipid as did control WAT. Hence RSG increased uptake 60-90% in WAT but nearly 3-fold in BAT. Such robust action on uptake, which extends to albumin-bound NEFA (see below), appears to explain most of the 2-fold increase in BAT TG content, given that short-term RSG did not affect de novo lipogenesis. The higher number of competent brown fat cells resulting from increased adipogenesis (4, 41) by PPAR $\gamma$  stimulation likely contributed to increase the ability of BAT to take up and store lipids.

Lipoprotein lipase, considered a key modulator of postprandial triglyceridemia (8), is increased by PPAR $\gamma$  agonists in adipose tissue of rodents and humans (23, 24, 44). In the present study, RSG increased LPL activity more rapidly and more strongly in BAT than in WAT. In fact, RSG had no effect on LPL activity in eWAT, confirming our previous observation that LPL of visceral fat is far less responsive to PPAR $\gamma$  agonism than that of subcutaneous fat (22, 23). Of note, the induction of LPL activity in BAT preceded the reduction in circulating TG, further supporting the involvement of BAT LPL in the short-term hypotriglyceridemic action of RSG. Although TG-derived NEFA uptake correlated well with LPL activity, discrepancies were noted. For instance, after 3 days of RSG treatment, TG-derived lipid uptake by eWAT was significantly increased in the absence of change in LPL. Uptake of TG-derived NEFA is not a completely efficient process (29, 33, 38, 43), and the stimulation of fatty acid uptake in eWAT observed here likely contributed to increase LPL efficiency by relieving product inhibition (1, 11).

Consistent with previous studies (19, 32), RSG rapidly reduced circulating albuminbound NEFA levels, which is considered as one important mechanism by which PPARy agonism improves peripheral insulin sensitivity (35). Long-term treatment with PPARy agonists reduces circulating NEFA by increasing the potential of WAT to take up, esterify, recycle, and store NEFA as TG (2, 9, 22), such processes also leading to a reduction in the output by WAT of the products of intracellular lipolysis (12, 32). The present study extends this notion several ways. Firstly, the involvement of BAT in NEFA trapping, in parallel with that of WAT, was established. Although at the functional level the RSG-induced stimulation of the uptake of albumin-bound NEFA appeared earlier in eWAT than in BAT, the latter displayed the largest relative increase over time. No systematic relationship was observed here between functional oleate uptake and expression levels of the major transport proteins CD36 and FATP-1. Uptake of NEFA through the cell membrane is a complex process involving passive diffusion and possibly several transporters (17, 20, 37), and further work is clearly needed to unravel the precise mechanisms of action of PPARy agonism thereupon. Secondly, the study showed that a single dose of RSG, which reduces serum NEFA, increased in both WAT and BAT the expression of genes involved in FA binding, esterification, and recycling, as previously shown for longer-term treatment with PPARy agonists (16, 22, 45, 46) Such trapping effect likely contributed to the increase in FA uptake (28). Thirdly, the study revealed a rapid induction of the expression of ADRP, which along with perilipin plays an important role in the stabilization of storage lipid droplets (26). Finally, it is noteworthy that a relationship was established between the reduction in circulating NEFA and the increase in BAT weight-and that of WAT to a lesser extent. In the absence of change in de novo lipogenesis, such relationship suggests that BAT is a site of albumin-bound NEFA uptake and retention, and a significant contributor, probably along with decreased NEFA release by WAT, to the rapid RSGinduced reduction in circulating NEFA. Similar relationships were also noted between serum TG and adipose tissue accretion, but these were weaker, likely because of the delay in the LPL-mediated TG response to RSG treatment.

Intriguingly, the rapid modification by PPARy agonism of the BAT phenotype from a thermogenic to a lipid storage organ, which is a component of the expansion of wholebody adiposity, occurs despite a marked increase in the expression of the thermogenic gene UCP-1 (6, 13, 39, 42), and there is no translation of such increased thermogenic potential into functional heat production (39). Therefore, the so-called thrifty nature of PPARy agonism clearly extends to a fundamental change in function of the major thermogenic organ in rodents, which becomes a significant lipid storage site.

In summary, the present study showed that acute treatment with RSG leads to profound modifications in BAT metabolism that contribute to the rapid improvement in lipemia in the rat. The reduction in triglyceridemia by RSG was synchronized with an increase in adipose LPL activity and TG-derived FA uptake that were particularly marked in BAT. Also, the expression of genes involved in FA retention, previously known to be increased in WAT and thought to mediate the effect of PPAR $\gamma$  agonism on circulating NEFA, were similarly increased in BAT. A strong link between the reduction in serum NEFA and the increase in BAT weight was observed, without alteration of de novo lipogenesis, suggesting the involvement of BAT in the reduction in circulating NEFA levels. Without underestimating the importance of WAT, the present findings highlight the previously unrecognized contribution of BAT in the early hypolipidemic effects of PPAR $\gamma$  agonists in the rat, and suggest one possible explanation for the species specificity of the magnitude and chronology of the hypolipidemic action of PPAR $\gamma$  agonism.

#### PERSPECTIVES

In the context of understanding the mechanisms of action of PPAR $\gamma$  agonism on lipid metabolism and insulin sensitivity, the present study lends strong support to the so-called "lipid steal" scenario, which suggests that lipid trapping by adipose tissue constitutes an important component of the metabolic actions of these compounds. The study extends this concept to BAT, which under PPAR $\gamma$  agonism turns from a relatively modest contributor to lipid clearance from the circulation to a significant site of uptake. Investigation of the mechanisms of action of PPAR $\gamma$  agonism on lipid metabolism in the context of whole body rodent physiology should therefore consider the contribution of BAT. Obviously, there is little or no BAT in humans, however PPAR $\gamma$  agonism does tend to promote the development of a brown adipocyte phenotype in human white adipose tissue, as evidenced by the appearance of UCP-1 and PGC1 $\alpha$  expression. The present findings may therefore apply to a subpopulation of adipocytes found in humans under

PPARγ agonist treatment. Finally, because brown adipocytes develop many characteristics of white adipocytes in response to PPARγ agonism, rodent BAT provides a relevant model for the study of adipocyte plasticity.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to acknowledge the most helpful contribution of Sébastien Poulin and Marie-Noëlle Cyr for their expert technical assistance in animal care and handling.

## GRANTS

This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to YD. ML was the recipient of a Studentship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, followed by a Studentship from the Fonds de la recherche en santé du Québec. WTF was the recipient of a Postdoctoral Fellowship from a CIHR Training In Obesity Program grant. GS was the recipient of a Summer Research Studentship from the Faculty of Medicine, Laval University.

## REFERENCES

- 1. Amri EZ, Teboul L, Vannier C, Grimaldi PA, and Ailhaud G. Fatty acids regulate the expression of lipoprotein lipase gene and activity in preadipose and adipose cells. *Biochem J* 314 (Pt 2): 541-546, 1996.
- Berger J and Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. Annu Rev Med 53: 409-435, 2002.
- Berthiaume M, Sell H, Lalonde J, Gelinas Y, Tchernof A, Richard D, and Deshaies Y. Actions of PPARgamma agonism on adipose tissue remodeling, insulin sensitivity, and lipemia in absence of glucocorticoids. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287: R1116-1123, 2004.
- 4. Breider MA, Gough AW, Haskins JR, Sobocinski G, and de la Iglesia FA. Troglitazone-induced heart and adipose tissue cell proliferation in mice. *Toxicol Pathol* 27: 545-552, 1999.
- Burkey BF, Dong M, Gagen K, Eckhardt M, Dragonas N, Chen W, Grosenstein P, Argentieri G, and de Souza CJ. Effects of pioglitazone on promoting energy storage, not expenditure, in brown adipose tissue of obese fa/fa Zucker rats: comparison to CL 316,243. *Metabolism* 49: 1301-1308, 2000.
- Cannon B and Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84: 277-359, 2004.
- Carpentier A, Taghibiglou C, Leung N, Szeto L, Van Iderstine SC, Uffelman KD, Buckingham R, Adeli K, and Lewis GF. Ameliorated hepatic insulin resistance is associated with normalization of microsomal triglyceride transfer protein expression and reduction in very low density lipoprotein assembly and secretion in the fructosefed hamster. *J Biol Chem* 277: 28795-28802, 2002.
- Cohen JC and Berger GM. Effects of glucose ingestion on postprandial lipemia and triglyceride clearance in humans. J Lipid Res 31: 597-602, 1990.
- Coort SL, Coumans WA, Bonen A, van der Vusse GJ, Glatz JF, and Luiken JJ. Divergent effects of rosiglitazone on protein-mediated fatty acid uptake in adipose and in muscle tissues of Zucker rats. *J Lipid Res* 46: 1295-1302, 2005.
- de Souza CJ, Eckhardt M, Gagen K, Dong M, Chen W, Laurent D, and Burkey BF. Effects of pioglitazone on adipose tissue remodeling within the setting of obesity and insulin resistance. *Diabetes* 50: 1863-1871, 2001.
- 11. Faraj M, Sniderman A, and Cianflone K. ASP enhances in situ lipoprotein lipase activity by increasing fatty acid trapping in adipocytes. *J Lipid Res*, 2004.

- Festuccia WT, Laplante M, Berthiaume M, Gelinas Y, and Deshaies Y. PPARgamma agonism increases rat adipose tissue lipolysis, expression of glyceride lipases, and the response of lipolysis to hormonal control. *Diabetologia* 49: 2427-2436, 2006.
- Foellmi-Adams LA, Wyse BM, Herron D, Nedergaard J, and Kletzien RF. Induction of uncoupling protein in brown adipose tissue. Synergy between norepinephrine and pioglitazone, an insulin-sensitizing agent. *Biochem Pharmacol* 52: 693-701, 1996.
- Folch J and Lees M. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J Biol Chem 226: 497-509, 1957.
- Goudriaan JR, den Boer MA, Rensen PC, Febbraio M, Kuipers F, Romijn JA, Havekes LM, and Voshol PJ. CD36 deficiency in mice impairs lipoprotein lipasemediated triglyceride clearance. *J Lipid Res* 46: 2175-2181, 2005.
- 16. Guan HP, Ishizuka T, Chui PC, Lehrke M, and Lazar MA. Corepressors selectively control the transcriptional activity of PPARgamma in adipocytes. *Genes Dev* 19: 453-461, 2005.
- Hamilton JA. Fast flip-flop of cholesterol and fatty acids in membranes: implications for membrane transport proteins. *Curr Opin Lipidol* 14: 263-271, 2003.
- Hultin M, Carneheim C, Rosenqvist K, and Olivecrona T. Intravenous lipid emulsions: removal mechanisms as compared to chylomicrons. *J Lipid Res* 36: 2174-2184, 1995.
- Jiang G, Dallas-Yang Q, Li Z, Szalkowski D, Liu F, Shen X, Wu M, Zhou G, Doebber T, Berger J, Moller DE, and Zhang BB. Potentiation of insulin signaling in tissues of Zucker obese rats after acute and long-term treatment with PPARgamma agonists. *Diabetes* 51: 2412-2419, 2002.
- Kamp F, Guo W, Souto R, Pilch PF, Corkey BE, and Hamilton JA. Rapid flip-flop of oleic acid across the plasma membrane of adipocytes. *J Biol Chem* 278: 7988-7995, 2003.
- Kawashita NH, Moura MA, Brito MN, Brito SM, Garofalo MA, Kettelhut IC, and Migliorini RH. Relative importance of sympathetic outflow and insulin in the reactivation of brown adipose tissue lipogenesis in rats adapted to a high-protein diet. *Metabolism* 51: 343-349, 2002.
- 22. Laplante M, Festuccia WT, Soucy G, Gelinas Y, Lalonde J, Berger JP, and Deshaies Y. Mechanisms of the depot-specificity of PPAR gamma action on adipose tissue metabolism. *Diabetes*: in press, 2006.

- Laplante M, Sell H, MacNaul KL, Richard D, Berger JP, and Deshaies Y. PPARgamma Activation Mediates Adipose Depot-Specific Effects on Gene Expression and Lipoprotein Lipase Activity: Mechanisms for Modulation of Postprandial Lipemia and Differential Adipose Accretion. *Diabetes* 52: 291-299, 2003.
- 24. Lefebvre AM, Peinado-Onsurbe J, Leitersdorf I, Briggs MR, Paterniti JR, Fruchart JC, Fievet C, Auwerx J, and Staels B. Regulation of lipoprotein metabolism by thiazolidinediones occurs through a distinct but complementary mechanism relative to fibrates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 1756-1764, 1997.
- Lewis GF, Uffelman K, Naples M, Szeto L, Haidari M, and Adeli K. Intestinal lipoprotein overproduction, a newly recognized component of insulin resistance, is ameliorated by the insulin sensitizer rosiglitazone: studies in the fructose-fed Syrian golden hamster. *Endocrinology* 146: 247-255, 2005.
- Londos C, Brasaemle DL, Schultz CJ, Segrest JP, and Kimmel AR. Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells. Semin Cell Dev Biol 10: 51-58, 1999.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, and Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193: 265-275, 1951.
- Mashek DG and Coleman RA. Cellular fatty acid uptake: the contribution of metabolism. *Curr Opin Lipidol* 17: 274-278, 2006.
- 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.
- Mori Y, Murakawa Y, Okada K, Horikoshi H, Yokoyama J, Tajima N, and Ikeda Y. Effect of troglitazone on body fat distribution in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 22: 908-912, 1999.
- Nagashima K, Lopez C, Donovan D, Ngai C, Fontanez N, Bensadoun A, Fruchart-Najib J, Holleran S, Cohn JS, Ramakrishnan R, and Ginsberg HN. Effects of the PPARgamma agonist pioglitazone on lipoprotein metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. J Clin Invest 115: 1323-1332, 2005.
- Oakes ND, Thalen PG, Jacinto SM, and Ljung B. Thiazolidinediones increase plasma-adipose tissue FFA exchange capacity and enhance insulin-mediated control of systemic FFA availability. *Diabetes* 50: 1158-1165, 2001.
- Olivecrona T. The metabolism of 1-C14-palmitic acid labeled chylomicrons in rats. Acta Physiol Scand 55: 170-176, 1962.

- Otway S and Robinson DS. The use of a non-ionic detergent (Triton WR 1339) to determine rates of triglyceride entry into the circulation of the rat under different physiological conditions. *J Physiol* 190: 321-332, 1967.
- 35. Picard F and Auwerx J. PPARgamma and glucose homeostasis. *Annu Rev Nutr* 22: 167-197, 2002.
- 36. Picard F, Naimi N, Richard D, and Deshaies Y. Response of adipose tissue lipoprotein lipase to the cephalic phase of insulin secretion. *Diabetes* 48: 452-459, 1999.
- Pohl J, Ring A, Ehehalt R, Herrmann T, and Stremmel W. New concepts of cellular fatty acid uptake: role of fatty acid transport proteins and of caveolae. *Proc Nutr Soc* 63: 259-262, 2004.
- Roust LR and Jensen MD. Postprandial free fatty acid kinetics are abnormal in upper body obesity. *Diabetes* 42: 1567-1573, 1993.
- Sell H, Berger JP, Samson P, Castriota G, Lalonde J, Deshaies Y, and Richard D. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonism increases the capacity for sympathetically mediated thermogenesis in lean and ob/ob mice. *Endocrinology* 145: 3925-3934, 2004.
- 40. Subauste A and Burant CF. DGAT: novel therapeutic target for obesity and type 2 diabetes mellitus. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 3: 263-270, 2003.
- 41. Tai TA, Jennermann C, Brown KK, Oliver BB, MacGinnitie MA, Wilkison WO, Brown HR, Lehmann JM, Kliewer SA, Morris DC, and Graves RA. Activation of the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes brown adipocyte differentiation. J Biol Chem 271: 29909-29914, 1996.
- 42. Teruel T, Hernandez R, Rial E, Martin-Hidalgo A, and Lorenzo M. Rosiglitazone up-regulates lipoprotein lipase, hormone-sensitive lipase and uncoupling protein-1, and down-regulates insulin-induced fatty acid synthase gene expression in brown adipocytes of Wistar rats. *Diabetologia* 48: 1180-1188, 2005.
- Teusink B, Voshol PJ, Dahlmans VE, Rensen PC, Pijl H, Romijn JA, and Havekes LM. Contribution of fatty acids released from lipolysis of plasma triglycerides to total plasma fatty acid flux and tissue-specific fatty acid uptake. *Diabetes* 52: 614-620, 2003.
- 44. Tiikkainen M, Hakkinen AM, Korsheninnikova E, Nyman T, Makimattila S, and Yki-Jarvinen H. Effects of rosiglitazone and metformin on liver fat content, hepatic insulin resistance, insulin clearance, and gene expression in adipose tissue in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 53: 2169-2176, 2004.
- 45. Tontonoz P, Graves RA, Budavari AI, Erdjument-Bromage H, Lui M, Hu E, Tempst P, and Spiegelman BM. Adipocyte-specific transcription factor ARF6 is a heterodimeric complex of two nuclear hormone receptors, PPAR gamma and RXR alpha. *Nucleic Acids Res* 22: 5628-5634, 1994.
- 46. Tontonoz P, Hu E, Devine J, Beale EG, and Spiegelman BM. PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol Cell Biol* 15: 351-357, 1995.
- Toseland CD, Campbell S, Francis I, Bugelski PJ, and Mehdi N. Comparison of adipose tissue changes following administration of rosiglitazone in the dog and rat. *Diabetes Obes Metab* 3: 163-170, 2001.
- 48. van Wijk JP, de Koning EJ, Castro Cabezas M, and Rabelink TJ. Rosiglitazone improves postprandial triglyceride and free fatty acid metabolism in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 28: 844-849, 2005.
- 49. Ye JM, Dzamko N, Cleasby ME, Hegarty BD, Furler SM, Cooney GJ, and Kraegen EW. Direct demonstration of lipid sequestration as a mechanism by which rosiglitazone prevents fatty-acid-induced insulin resistance in the rat: comparison with metformin. *Diabetologia* 47: 1306-1313, 2004.

## TABLES

Gene	Accession #	5' Primer (5'-3')	3' Primer (5'-3')
ADRP	NM_001007144	CGCCAGGAAGAATGTGCACA	GCGGGCCATAGACAGAGTATGTG
CD36	NM_031561	AGTAATCTCAAATAACTGTACGTCG	CTGCAAGCACAGTATGAAATCATAA
DGAT-1	NM_053437	TATTACTTCATCTTTGCTCC	AAAGTAGGTGACAGACTCAG
FABP-4	NM_053365	ATGTGTGATGCCTTTGTGGG	CCCAGTTTGAAGGAAATCTC
FAS	NM_017332	GAGTCCGAGTCTGTCTCCCGCTTGA	GCCGTGAGGTTGCTGTTGTCTGTAG
FATP-1	NM_053580	TCTGCGGCGCTTCGATGGCTAT	TTGTGGGGGGTCTGCAATGGC
GyK	NM_024381	CCTGTCCATTGAAATGTGTCATCC	GCCATGAAGCCATGACAATTAGTG
L27	NM_022514	CTGCTCGCTGTCGAAATG	CCTTGCGTTTCAGTGCTG
PEPCK	NM_198780	TGGGTGATGACATTGCCTGG	ACCTTGCCCTTATGCTCTGCAG
UCP-1	NM_012682	TGGTGAGTTCGACAACTTCC	GTGGGCTGCCCAATGAATAC

Table 1. Primers used for qPCR

	Control			RSG				
	day 1	day 2	day 3	day 4	Day 1	day 2	day 3	day 4
Initial BW (g)	250±7	260±3	252±4	265±5	255±5	262±8	255±2	257±5
Final BW (g)	260±5	266±6	282±3	291±6	266±6	270±4	282±3	283±9
Cumulative FI (g)	24±1	45±1	75±3	98±3	25±2	48±4	71±6	$100\pm6$
Glucose (mmol/L)	8.7±0.3	8.8±0.2	8.7±0.2	$8.9{\pm}0.1$	8.9±0.2	9.0±0.2	9.1±0.1	9.0±0.2
Insulin (pmol/L)	292±20	346±28	361±20	451±40	341±27	333±36	380±34	362±42

 Table 2. Body weight, food intake, serum glucose and insulin of control and rosiglitazone (RSG)-treated rats after 1,2,3 and 4 days of treatment

ANOVA	RSG	Duration	RSG x Duration
Initial BW	NS	NS	NS
Final BW	NS	0.0003	NS
Cumulative FI	NS	< 0.0001	NS
Glucose	NS	NS	NS
Insulin	NS	0.03	NS

Data are means ± SEM of 6 rats. BW, body weight; FI, food intake

	% of inje	ected dose		
Tissue	Control	RSG	% of change	P value
BAT	0.87±0.15	3.27±0.35*	+277	0.0001
eWAT	4.66±0.23	7.48±0.62*	+60	0.002
iWAT	3.08±0.57	5.90±0.70*	+92	0.01
Gastrocnemius	2.61±0.60	1.67±0.36	-	NS
Soleus	$0.12{\pm}0.02$	$0.09 \pm 0.01$	-	NS
Heart	1.14±0.13	1.29±0.14	-	NS
Pancreas	$1.20\pm0.44$	1.1±0.38	-	NS

 Table 3. Distribution of radiolabeled lipids following the injection of a <sup>3</sup>H-TG emulsion into rats treated or not with RSG for 3 days.

Data are mean  $\pm$  SEM of 6 rats. \* Different from control, P < 0.05.

	Day 1		Day 4		
Gene	Control	RSG	Control	RSG	
Brown adipos	se tissue				
FAS	2.9±0.8	$4.0{\pm}1.1$	3.3±0.8	8.2±3.6	
UCP1	4.7±0.8	12.6±0.5*	4.0±0.7	13.9±1.8*	
CD36	7.9±0.6	18.0±2.7*	8.0±2.0	11.1±2.0	
FATP-1	39±11	30±3	56±10	37±9	
FABP-4	198±41	509±31*	215±50	894±125*	
PEPCK	4±1	30±4*	4±1	110±7*	
GyK	2.6±1.8	6.5±0.6*	3.6±0.5	9.5±0.7*	
DGAT-1	2.5±0.5	4.8±0.5*	2.9±0.5	6.6±0.4*	
ADRP	20±2	45±3*	21±2	50±5*	
Epididymal w	white adipose ti	ssue			
FAS	2.1±0.9	4.5±1.0	3.3±1.0	15.6±7.3*	
CD36	8±2	10±2	4±1	16±6*	
FATP-1	3.4±1.1	5.1±0.6	3.0±0.9	16.3±4.6*	
FABP-4	11±3	23±3*	12±3	34±3*	
PEPCK	17±5	102±18*	8±2	177±26*	
GyK	$0.11 \pm 0.02$	0.33±0.02*	0.12±0.02	1.65±0.29*	
DGAT-1	7±2	17±2*	8±2	24±3*	
ADRP	9±2	27±2*	12±3	46±4*	

Table 4. mRNA expression in BAT and WAT after 1 and 4 days of treatment with RSG.

Data are expressed as arbitrary units mRNA relative to the housekeeping gene L27, and represent means  $\pm$  SEM of 6 rats. \* Different from control at same day, P < 0.05.

#### FIGURE LEGENDS

**Figure 1** – Serum TG (A) and NEFA (B) of rats treated or not with rosiglitazone for 1 to 4 days. Each column represents the mean  $\pm$  SEM of 6 rats. \* *P* < 0.05 vs. control at same day;  $\dagger P < 0.05$  vs. day 1 of same treatment group.

**Figure 2** – Clearance of a radiolabeled TG emulsion in rats treated or not with rosiglitazone for 3 days (A), and TG appearance rate (TGAR) following Triton WR-1339 in rats treated of not with rosiglitazone for 5 days (B). Each point represents the mean  $\pm$  SEM of 6 rats. Histogram insets in A and B represent the slope of corresponding curves. \* *P* < 0.05 vs. control.

**Figure 3** – Whole tissue lipoprotein lipase (LPL) activity in BAT (A), iWAT (B), and eWAT of rats treated or not with rosiglitazone for 1 to 4 days. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM of 6 rats. \* *P* < 0.05 vs. control at same day; † *P* < 0.05 vs. day 1 of same treatment group.

Figure 4 – *Ex vivo* oleate uptake by BAT (A), iWAT (B) and eWAT (C) explants from rats treated or not with rosiglitazone for 1 or 4 days. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM of 6 rats. \* *P* < 0.05 vs. control at same day.

**Figure 5** – Weight (A) and total TG content (B) of BAT isolated from rats treated or not with rosiglitazone for 1 to 4 days. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM of 6 rats. \* *P* < 0.05 vs. control at same day, † *P* < 0.05 vs. day 1 of same treatment group. (C) Representative micrographs of BAT adipocytes from rats treated or not with rosiglitazone for 4 days.

**Figure 6** – Correlation between serum NEFA concentration and the weight of BAT (A), iWAT (B), and eWAT (C) of rats treated (RSG) or not (CTRL) with rosiglitazone for 1 to 4 days. Each symbol represents one individual rat.

# FIGURES





Figure 2.





Figure 3.

# Figure 4.









ł

## **CHAPITRE 6**

## PPAR-γ AGONISM INCREASES RAT ADIPOSE TISSUE LIPOLYSIS, EXPRESSION OF ACYLGLYCEROL LIPASES, AND THE RESPONSE OF LIPOLYSIS TO HORMONAL CONTROL

Mathieu LAPLANTE<sup>1</sup>, William T. FESTUCCIA<sup>1</sup>, Magalie BERTHIAUME<sup>1</sup>, Yves GÉLINAS<sup>1</sup> and Yves DESHAIES<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laval Hospital Research Center, Department of Anatomy and Physiology, School of Medicine, Laval University, Québec, Qc, Canada, G1V 4G5

> "Copyright © 2006, Diabetologia, Springler From Diabetologia<sup>®</sup>, Vol. 49, 2006; 2427-2436 Reprinted with permission

article publié dans Diabetologia 49:2427-2436, 2006

#### AVANT-PROPOS

Ce travail, réalisé sous la direction du Dr. Yves Deshaies, a été rendu possible grâce à la collaboration du Dr. William T. Festuccia (stagiaire post-doctoral avec le Dr. Yves Deshaies), de Magalie Berthiaume (étudiante au doctorat avec le Dr. Yves Deshaies) et de Yves Gélinas (M.Sc., assistant de recherche). Le travail publié dans cet article a été réalisé conjointement avec le Dr. William T. Festuccia, avec qui je partage entièrement la position de premier auteur. Magalie Berthiaume et Yves Gélinas ont contribué au présent article en nous fournissant une aide précieuse lors des sacrifices et de la récolte des échantillons. Cette étude implique mon entière participation quant à la réalisation de l'ensemble des étapes menant à la publication de cet article, soit la planification, l'exécution du protocole, la mesure des variables plasmatiques et tissulaires et l'analyse statistique. Suite aux corrections du directeur, l'article a été révisé par l'ensemble des coauteurs et a été soumis aux éditeurs de la revue *Diabetologia*. Cet article a été accepté pour fin de publication en mai 2006 et il a été publié en octobre 2006.

## RÉSUMÉ

Objectifs/hypothèses : Ces travaux ont été réalisés dans le but d'investiguer les mécanismes par lesquels la stimulation de PPAR-γ affecte la lipolyse et le métabolisme des acides gras non-estérifiés (AGNE) dans le tissu adipeux blanc (TAB). Méthodes : Des rats ont été traités ou non durant 7 jours avec de la rosiglitazone (15mg.kg<sup>-1</sup>.jour<sup>-1</sup>). Après un jeûne de 6 heures, la lipolyse et les niveaux d'ARNm des lipases ont été mesurés dans des explants de tissu adipeux provenant de divers dépôts adipeux blancs. Résultats : La rosiglitazone a fortement augmenté la libération de glycérol et d'AGNE par les explants de TAB en condition basale et lors de la stimulation avec la noradrénaline. Parallèlement, l'agoniste a amplifié l'effet inhibiteur de l'insuline sur la libération de glycérol et d'AGNE par le TAB. Des adipocytes primaires isolés de rats traités avec un agoniste PPAR-y ont aussi démontré une réponse lipolytique plus forte en réponse à la noradrénaline. Ce résultat exclut la possibilité que l'effet stimulateur de la rosiglitazone sur la lipolyse soit causé par un changement dans le nombre d'adipocytes matures présents dans les explants de tissu. La rosiglitazone a augmenté l'expression de l'ARNm de la lipase des triglycérides du tissu adipeux (ATGL) et de la lipase du monoacylglycérol (MGL) dans le TAB sous-cutané et vicéral, et l'expression de la lipase hormono-sensible (HSL) seulement dans le TAB souscutané. L'expression de ces trois lipases a été aussi été augmentée dans des explants de TAB après 12 heures d'incubation avec de la rosiglitazone. Ce résultat suggère un effet direct de l'agoniste sur la transcription de ces gènes. Tel qu'attendu, l'administration chronique de rosiglitazone chez le rat a diminué les niveaux circulants d'AGNE, a augmenté le recyclage de glycérol et d'AGNE et a stimulé l'expression des gènes codants pour des protéines impliquées dans la captation et la rétention des AGNE dans le TAB. Ces contribué à diminuer la libération des effets ont AGNE par le TAB. Conclusions/interprétation : Ces travaux démontrent que, malgré la réduction des AGNE circulants, l'activation de PPAR-y augmente la lipolyse du TAB. Cet effet est toutefois contrebalancé par l'activation des voies métaboliques impliquées dans la rétention des lipides dans le TAB. Les travaux présentés suggèrent que la rosiglitazone stimule la lipolyse via l'augmentation de l'expression de l'ATGL et de la MGL dans le TAB.

#### ABSTRACT

Aims/hypothesis: This study investigated the impact and mechanisms of action of in vivo PPARy activation on white adipose tissue (WAT) lipolysis and nonesterified fatty acid (NEFA) metabolism. Methods: Rats were treated or not for 7 days with 15 mg.kg<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> rosiglitazone. After a 6-h fast, lipolysis and mRNA levels of lipases were assessed in explants from various adipose depots. Results: Rosiglitazone markedly increased basal and noradrenaline-stimulated glycerol and NEFA release from WAT explants, and amplified its inhibition by insulin. Primary adipocytes isolated form PPARy agonist-treated rats were also more responsive to noradrenaline stimulation expressed per cell, ruling out a contribution of an altered number of mature adipocytes in explants. Rosiglitazone concomitantly increased the mRNA levels of adipose triglyceride lipase (ATGL) and monoacylglycerol lipase (MGL) in subcutaneous and visceral WAT, and that of hormonesensitive lipase (HSL) in subcutaneous WAT. Lipase expression increased within 12 h of in vitro exposure of naïve explants to rosiglitazone, suggesting direct transcriptional activation. In parallel, chronic in vivo treatment with rosiglitazone lowered plasma NEFA and exerted in WAT its expected stimulatory action on glycerol and NEFA recycling, and on the expression of genes involved in NEFA uptake and retention by WAT, such processes counteracting net NEFA export. Conclusions/interpretation: These findings demonstrate that, in the face of its plasma NEFA-lowering action, PPARy agonism stimulates WAT lipolysis, an effect that is compensated by lipid-retaining pathways. The study further suggests that PPARy agonism stimulates lipolysis through increasing the lipolytic potential, including the expression levels of adipose triglyceride lipase and monoacylglycerol lipase.

#### INTRODUCTION

Thiazolidinediones are clinically used in the treatment of insulin-resistant states. The compounds exert their potent insulin-sensitizing action by interacting with and activating peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), a nuclear receptor that is mainly expressed in adipose tissue. Along with their impact on white adipose tissue (WAT) adipokine production and extra-adipose actions [1, 2], several lines of evidence suggest that one of the insulin-sensitizing mechanisms of thiazolidinediones is a reduction in circulating nonesterified fatty acids (NEFA), which protects non-adipose tissues against lipid overload and consequent insulin resistance (reviewed in [2]).

Plasma concentrations of NEFA represent the balance between their release from WAT and uptake by oxidative tissues, with contribution from adipose reuptake. All of these processes are affected by thiazolidinediones. Indeed, rosiglitazone was shown to reduce NEFA uptake by the liver and muscle [3], and to increase NEFA uptake, intracellular reesterification, and storage into triacylglycerols in WAT [4]. Because of its effect on plasma NEFA, PPAR $\gamma$  agonism might also be expected to reduce lipolysis, however previous studies that have addressed the issue do not reach a consensus. Whereas some studies have reported lower in vitro rates of glycerol and NEFA release from WAT [5, 6], others that include in vivo NEFA kinetic approaches [4, 7] suggest instead that PPAR $\gamma$  agonism stimulates lipolysis, an effect that would be counteracted by its concomitant action on NEFA reuptake and reesterification.

Until recently, the hydrolysis of triacylglycerols in WAT was thought to be catalyzed exclusively by the enzyme hormone-sensitive lipase (HSL). Lipolytic hormonestimulated, protein kinase A-mediated phosphorylation of both HSL and perilipin results in hydrolysis of triacylglycerol to NEFA and monoacylglycerol, which is further converted to NEFA and glycerol by monoacylglycerol lipase (MGL) [8]. Recent studies showing that adipocytes from *Hsl* knockout mice retain a marked basal and adrenergically-stimulated lipolysis and accumulate diacylglycerols after stimulation of lipolysis demonstrated that HSL is not the sole lipase involved in triacylglycerol catabolism [9-11]. Three independent groups discovered a protein, alternatively termed adipose triglyceride lipase (ATGL) [12], desnutrin [13], or calcium-independent phospholipase  $A_2$ /lipase  $\zeta$  (iPLA<sub>2</sub> $\zeta$ ) [14], which fulfills all the predicted characteristics of this new lipase: a preference for the hydrolysis of the first triacylglycerol ester bond, drastically reduced lipolysis following antibody or antisense ATGL inhibition, and enhanced basal and isoproterenol-stimulated lipolysis following *Atgl* overexpression [15]. ATGL therefore plays a particularly important role in the control of basal lipolysis, but also appears to participate in the lipolytic response to adrenergic stimulation [16].

The characterization of ATGL prompted us to consider the possibility that, if PPAR $\gamma$  agonism indeed enhances lipolysis, it may do so partly via altering lipase expression. The present study therefore tested the hypothesis that thiazolidinediones increase WAT lipolysis, through assessment of the impact of chronic rosiglitazone treatment of rats on NEFA and glycerol release by WAT explants. Because thiazolidinediones exert depot-specific actions [17] and their putative modulation of *Atgl* and *Mgl* expression has not yet been addressed, four white adipose depots representing visceral and subcutaneous fat were investigated. Noradrenaline (NA)-induced stimulation and insulin-induced inhibition of lipolysis to neuroendocrine/metabolic control. The depot-specific mRNA levels of *ATGL*, *HSL*, and *MGL* were determined to verify the second hypothesis that rosiglitazone-induced changes in lipolysis are associated with the expression levels of its obligate lipases.

#### RESEARCH DESIGN AND METHODS

*Animals and treatment.* Male Sprague-Dawley rats (200-225 g, Charles River Laboratories, St. Constant, Quebec, Canada) were housed individually in stainless steel cages ( $23 \pm 1^{\circ}$ C, 12 h/12 h light/dark cycle, lights on at 1200). The 'Principles of Laboratory Animal Care' (NIH publication no. 85-23, revised 1985) were followed, and animal care and handling were performed in accordance with the Canadian Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. All experimental procedures received prior approval by Laval University's animal protection committee. Rats were divided into a control group and a treated group that was given the PPAR $\gamma$  agonist rosiglitazone (purchased as Avandia® at a local pharmacy) at a daily dose of 15 mg/kg body weight as an admixture to the food (Charles River Rodent Diet #5075, Ralston Products, Woodstock, ON, Canada) for 1 week. This dose is slightly above that which elicits maximal response of glucose and lipid metabolism to rosiglitazone in rats, as determined in pilot studies. For all experimental procedures described below, food was removed at 0700, and rats were killed by decapitation after 6 h of fasting.

In vitro basal, NA-stimulated, and insulin-inhibited lipolysis. Adipose explants (20-25 mg) of inguinal (ING), retroperitoneal (RETRO), epididymal (EPI) and mesenteric (MES) WAT were incubated in 1 ml of Krebs-Ringer bicarbonate buffer of the following composition (in mmol/l): 118 NaCl, 4.8 KCl, 1.25 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 MgSO<sub>4</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 5 glucose, supplemented with 2.5% NEFA-free bovine serum albumin (Sigma, Oakville, ON, Canada), pH 7.4. Fat explants were incubated for 2 h in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% O<sub>2</sub> at 37°C. Insulin (100 and 500 pmol/l), noradrenaline (NA, 1 µmol/l) and dibutyryl cAMP (DBcAMP, 1 mmol/l) were added to the incubation buffer to inhibit or stimulate lipolysis. At the end of the incubation, WAT explants were removed and media were frozen until the measurement, using reagent kits, of NEFA (Wako Pure Chemical Industries, Richmond, VA, USA) and glycerol (Sigma). Data for NEFA and glycerol release are expressed as nmol.µg DNA<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> (DNeasy Tissue Kit, QIAGEN, Mississauga, ON, Canada) to correct for cell number. DNA content was determined using

the following manufacturer's instructions. Additional experimental details are provided in *Electronic Supplementary Material (ESM) 1*.

In vitro exposure of explants to rosiglitazone. Minced pieces (40 mg/well) of each of the 4 depots described above, obtained from 4 control, untreated fasted rats, were incubated in 1 ml of Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Invitrogen, Burlington, ON, Canada) supplemented with pure rosiglitazone (Cayman Chemical Co, Ann Arbor, MI, USA), final concentration of 10  $\mu$ mol/l) or carrier DMSO for 12 h. Treatments were performed in duplicate for each rat. Fat explants were then removed and frozen in liquid nitrogen until RNA isolation and analysis.

*Triacylglycerol/NEFA cycling, PEPCK and GyK activities.* These variables were quantified according to established methods, as detailed in *ESM 2*.

**RNA isolation and analysis.** RNA was isolated from adipose depots using QIAzol and the RNAeasy Lipid Tissue Kit (QIAGEN). For cDNA synthesis, expand reverse transcriptase (Invitrogen) was used following manufacturer's instructions and cDNA was diluted in DNase free water (1:25) before quantification by real-time PCR. The mRNA transcript levels were measured in duplicate samples through chemical detection of the PCR products with SYBR Green I (Molecular Probes, Willamette Valley, OR) using a Rotor Gene 3000 system (Montreal Biotech, Montreal, Quebec, Canada). Primers are indicated in *Suppl. Table 1*, and additional methodological details are presented in *ESM 3*.

*Serum determinations.* Serum glucose concentrations were measured by the glucose oxidase method with the YSI 2300 STAT Plus glucose analyzer (YSI, Yellow Springs, OH, USA). Insulin levels were determined by RIA (Linco Research, St. Charles, MO, USA) with rat insulin as standard. Serum triacylglycerol levels were measured by an enzymatic method (Roche Diagnostics, Montreal, QC, Canada), and serum NEFA and glycerol were determined enzymatically as described above.

*Statistical analysis.* Data are expressed as means  $\pm$  SEM. Simple effects of rosiglitazone treatment were analyzed by Student's unpaired *T* test. When appropriate, factorial ANOVA followed by Newman-Keuls's multiple range test were used to compare the effects of rosiglitazone in various adipose depots. *P*<0.05 was taken as the threshold of significance.

#### RESULTS

Final body weight and body weight gain were significantly increased (6% and 50%, respectively) after 7 days of rosiglitazone treatment (Table 1), higher body weight being associated with an increase in both food intake (18%) and food efficiency (23%), and in the weight of all WAT depots (30-35%) and interscapular BAT (116%). Rosiglitazone significantly reduced plasma levels of insulin (-35%), NEFA (-57%), and triacylglycerols (-55%), but did not alter serum glucose and glycerol levels. Rosiglitazone therefore exerted its expected metabolic actions on energy balance, WAT mass, indices of insulin sensitivity, and lipemia.

The effects of rosiglitazone on rates of basal and NA/DBcAMP-stimulated glycerol and NEFA release normalized per DNA are illustrated in Fig. 1. All three visceral depots behaved similarly on a qualitative basis, and only data for the RETRO depot are presented along with those of the ING (subcutaneous) depot. In control rats, with the exception of basal NEFA release, rates of glycerol and NEFA release were, as expected, lower in the ING (Fig. 1A) than in the RETRO (Fig. 1B) depot. NA and DBcAMP increased glycerol and NEFA release to the same extent in both adipose depots. Also in both depots, chronic rosiglitazone treatment markedly increased basal lipolysis, as demonstrated by the much larger release of glycerol (8-10-fold) and NEFA (5-fold) from explants of treated than untreated rats. Rosiglitazone retained its ability to stimulate the release of lipolytic products in the presence of NA and DBcAMP, such that the lipolytic response to combined adrenergic or DBcAMP stimulation and chronic rosiglitazone treatment were additive. The possible contribution of rosiglitazone-induced changes in the number of lipolytically competent cells was ruled out using isolated adipocytes, as discussed in *ESM 4* and illustrated in *Suppl. Fig. 1*.

Because PPARγ agonism affects adipose lipid metabolism largely via modulation of gene expression, we next sought to determine whether the rosiglitazone-induced stimulation of lipolysis was associated with changes in mRNA levels of the major intracellular acylglycerol lipases. In control rats, mRNA levels of *ATGL* (Fig. 2A), *HSL* 

(Fig. 2B), and *MGL* (Fig. 2C) were lower in ING than in all visceral depots, with the exception of *MGL* mRNA in MES. In concomitance with basal lipolysis, rosiglitazone increased the mRNA levels of both *ATGL* (Fig. 2A: ING, 6-fold; all visceral depots, 2-fold) and *MGL* (Fig. 2C: ING, 7-fold; all visceral depots, 3-4-fold). Rosiglitazone increased *HSL* mRNA levels (2.5-fold) only in the ING depot (Fig. 2B). With data of the four adipose depots pooled, rates of glycerol release correlated with mRNA levels of both *ATGL* (Fig. 3a) and *MGL* (Fig. 3c), but not with those of *HSL* (Fig. 3b). Similar correlation coefficients were found between lipase mRNAs and NEFA release (r = 0.59 and 0.77, P < 0.0001, for ATGL and MGL, respectively, and 0.07, NS, for HSL).

To address the question of whether rosiglitazone directly stimulates lipase expression, adipose tissue explants from untreated rats were exposed for 12 h to the agonist, and lipase mRNA levels were compared to that of adipose fatty acid binding protein (*aP2*), a direct, PPAR response element-containing target of PPAR $\gamma$  agonism. As depicted in Fig. 3, within 12 h, rosiglitazone increased the mRNA levels of all lipases to approximately the same extent as that of *aP2* in both ING and RETRO depots, without altering the mRNA level of the reference *L27* gene.

As rosiglitazone proved to increase key elements of the lipolytic machinery, we next sought to determine whether the agonist altered the response of WAT to the antilipolytic action of physiological amounts of insulin. In control ING explants, insulin failed to inhibit basal lipolysis, represented by absolute glycerol release (Fig. 5a) or % relative to basal (Fig. 5b), but did reduce NEFA release (Figs. 5c, d) by virtue of its stimulatory action on NEFA recycling. In ING explants of rosiglitazone-treated rats, insulin did inhibit the release of both glycerol and NEFA, and to a much greater extent than in control explants (Figs. 5a, b, c, d). In the RETRO depot, insulin reduced both glycerol (Figs. 5e, f) and NEFA release (Figs. 5g, h) regardless of treatment, and the magnitude of the inhibition was here again greater in explants from rosiglitazone-treated than control rats. Notably, despite the greater magnitude of the relative antilipolytic effect of insulin, fat explants of rosiglitazone-treated rats continued to release more absolute amounts of NEFA than control ING (Fig. 5c) and RETRO explants (Fig. 5g).

Quantification of major determinants of glycerol and NEFA reesterification (*GyK* and *PEPCK* activity and mRNA levels) and NEFA reuptake (*aP2* and *FATP* mRNA levels) indicated that lipolysis was stimulated by rosiglitazone despite large increases in these processes, which counteract the net release of lipolytic products, as further discussed in *ESM 5* and presented in *Suppl. Fig. 2*.

#### DISCUSSION

This study investigated the impact and mechanisms of action of the thiazolidinedione rosiglitazone on WAT lipolysis and NEFA metabolism. Chronic rosiglitazone markedly induced WAT lipolysis, both under basal and stimulated conditions, and amplified the antilipolytic action of insulin in basal conditions. The study further revealed that rosiglitazone increases the mRNA levels of *ATGL* and *MGL* in subcutaneous and visceral fat, and those of *HSL* in subcutaneous fat, suggesting that upregulation of lipase expression partakes in the mechanisms of PPARy action on adipose lipolysis.

The study confirmed the well-established actions of rosiglitazone on morphometric variables, indices of insulin sensitivity, and lipemia [18-21]. Several lines of evidence suggest that thiazolidinediones exert their beneficial effects on whole body insulin sensitivity partly by reducing circulating NEFA and consequent exposure of non-adipose tissues to the deleterious effects of NEFA metabolites on insulin signal transduction [2]. The present study demonstrates that, paradoxically to its effect on plasma NEFA, rosiglitazone markedly stimulates WAT lipolysis. Of note is the fact that the stimulatory action of rosiglitazone on lipolysis assessed in WAT explants and expressed on a DNA basis, thus correcting for cellularity, was maintained in isolated mature adipocytes. This rules out the possibility of the effect being due to the presence of a larger number of mature, lipolytically competent adipocytes having arisen through PPAR $\gamma$ -induced adipocyte differentiation [22]. Thiazolidinediones exert depot-specific effects on fat accretion in humans [17], which is why several depots were investigated in this study. The findings show that the lipolysis-stimulating action of rosiglitazone extends to both subcutaneous and visceral adipose depots.

Studies that have addressed the impact of PPARy agonism on adipose lipolysis have reported mixed results. Two studies found a reduction in the release of lipolytic products from rodent WAT explants and 3T3-L1 adipocytes [5, 6]. These were however designed to primarily examine NEFA reesterification, in conditions that may have favored the latter process. In contrast, studies specifically focused on in vivo NEFA kinetics in rats have

253

shown that, in the fasting state, PPAR $\gamma$  agonists increase the capacity of WAT to release NEFA [4, 7]. In addition, human adipocytes that were made to differentiate in the presence of rosiglitazone displayed increased basal and NA-stimulated lipolysis [23]. In humans, the impact of PPAR $\gamma$  agonism on lipemia is more modest than in rodent models. Although some human in vivo turnover studies did not report any effect of PPAR $\gamma$  agonism on the kinetics of lipolytic products [24, 25], a net transcapillary release of NEFA from subcutaneous WAT was recently demonstrated in fasted type 2 diabetic subjects treated with rosiglitazone [26]. Given the above and the present findings, it appears that PPAR $\gamma$  agonism does stimulate the lipolytic process in the presence of low insulin concentration.

Concomitant with lipolysis, rosiglitazone markedly increased WAT mRNA levels of the lipases ATGL and MGL in all WAT depots, and those of HSL in the ING depot. A fairly robust correlation was found between basal rates of release of lipolytic products and mRNA levels of ATGL. Such correlation obviously does not establish a cause and effect relationship, however the importance of the expression level of Atgl in WAT lipolysis is strongly emphasized by recent studies in which Atgl overexpression in 3T3-L1 adipocytes enhanced both fasting basal and isoproterenol-stimulated lipolysis, whereas the opposite effects were found with inhibition of ATGL through antisense technology [12, 16, 27]. The functional importance of lipase expression levels is further supported by the depot-specific behavior of ATGL mRNA levels and basal lipolysis in the present study: both were lower in ING than in visceral depots in control rats but tended to respond more robustly to rosiglitazone, in relative terms, in the former than in the latter. This suggests that upregulation of Atgl expression constitutes one mechanism by which PPARy agonism enhances WAT basal lipolysis.

The mRNA levels of *MGL* were also well correlated with the rosiglitazone-induced changes in lipolytic rates. Although recognized as an important enzyme for the complete hydrolysis of triacylglycerols in WAT [28], the modulation of *MGL* has not received much attention. The finding that rosiglitazone increases *MGL* mRNA levels in congruence with WAT basal lipolysis indicates that this enzyme may also be one of its regulated steps, as well as one additional level of action of PPARy agonism thereupon.

In regard to HSL, other studies have reported a strong PPAR $\gamma$ -induced increment in expression in human subcutaneous mature adipocytes [29] and in rodent brown adipocytes [30] incubated short-term with rosiglitazone. Also, Hsl was recently shown to be a transcriptional target of PPAR $\gamma$  in differentiating preadipocytes and other tissues, but not in visceral WAT in vivo [31]. The present study revealed a short-term (12 h) induction of Hsl expression in vitro by rosiglitazone in both ING and RETRO depots, which persisted after a 7-day in vivo treatment in the ING but not in the RETRO depot. Taken together, these findings suggest depot and time dependence of the impact of PPAR $\gamma$  agonism on Hsl expression. The fact that HSL mRNA levels did not correlate with lipolysis, as did the other lipases, and that the absolute PPAR $\gamma$ -mediated increase in lipolysis was quite similar in both basal and NA- or DBcAMP-stimulated conditions, leaves some uncertainty as to the contribution of HSL to the PPAR $\gamma$  effect on lipolysis. Clearly, additional studies are needed to clarify this issue.

In the present conditions, a direct action of rosiglitazone on expression of the lipases is supported by the observation that lipase mRNAs were increased within 12 h of in vitro exposure of naïve explants, as was the case for the PPRE response element-containing aP2gene. Such stimulation of the expression of intracellular lipases would efficiently complement the PPAR $\gamma$ -mediated upregulation of perilipin expression [32, 33], which facilitates lipid-lipase interactions and is a key player in the hormonal modulation of lipolysis. PPAR $\gamma$  agonism therefore appears to exert a multilevel, concerted action on the production of several key proteins that results in an increase in the lipolytic capacity of adipose tissue.

To gain further insight into the consequences of PPAR $\gamma$  agonism on the physiological modulation of lipolysis, the effects of rosiglitazone on the response to lipolytic and antilipolytic hormones were investigated. Noradrenaline released by sympathetic nerve terminals in WAT is a major positive modulator of WAT lipolysis [34]. Glycerol and NEFA release reached under NA and DBcAMP stimulation were much higher in explants from rosiglitazone-treated than control rats. That DBcAMP was roughly as efficient as NA in stimulating lipolysis excludes the possibility of increased  $\beta$ -adrenergic

receptor functionality and signal transduction as a mechanism of action of rosiglitazone on lipolysis. Such conclusion is further supported by the mild downregulatory action of PPAR $\gamma$  agonism on  $\beta_3$ -receptor expression [35]. Instead, it appears that rosiglitazone increases the lipolytic machinery (e.g. expression of lipases and other lipolysis-related proteins), which thus becomes able to respond more robustly to adrenergic stimulation. Such amplification of the lipolytic potential by PPAR $\gamma$  agonism strikingly resembles that of the thermogenic potential reported in our previous study [35].

Insulin constitutes another major modulator of WAT lipolysis. The present study confirmed that rosiglitazone increases the response of WAT lipolysis to the inhibitory action of insulin [4]. It is worth noting that the inhibitory effect of insulin was stronger upon NEFA than glycerol release, because of its additive effect on NEFA reesterification to triacylglycerols [36, 37]. Despite the stronger antilipolytic effect of insulin on WAT lipolysis, explants of rosiglitazone-treated rats exposed to insulin concentrations approximating those found in vivo under fasting and postprandial conditions maintained a higher rate of NEFA release than controls. The apparent contradiction between this observation and the lower in vivo serum NEFA levels can be explained by the fact that, while reducing liver and muscle NEFA uptake, thiazolidinediones augment the ability of WAT to clear systemic NEFA through stimulation of protein-mediated NEFA uptake [3, 38]. The rosiglitazone-induced increase in aP2 and FATP expression observed in the present study confirms previous studies [39, 40] and supports this notion. In vivo, the rosiglitazone-induced increase in WAT NEFA uptake and retention obviously overwhelmed that of net NEFA output, thus reducing plasma NEFA. Additional potential in vivo contributors to NEFA lowering include the prevailing levels of antagonistic lipolytic modulators, regional blood flow, and NEFA uptake by brown adipose tissue (Laplante M, Deshaies Y, unpublished data). It should be noted that the robust stimulation of lipolysis by rosiglitazone occurred in the face of a large increase in the recycling of lipolytic products. Such futile cycling between lipolysis and reesterification may have contributed to the enhanced response of lipolysis to hormonal modulation (see further discussion in ESM 6).

In conclusion, this study established that PPAR $\gamma$  activation increases basal lipolysis in WAT and amplifies its response to adrenergic stimulation and insulin inhibition. The study further revealed that PPAR $\gamma$  agonism increases mRNA levels of *ATGL* and *MGL* in subcutaneous and visceral WAT, and that of *HSL* in subcutaneous WAT, apparently via a direct action on gene expression. Given the importance of lipase expression levels on lipolytic activity, the findings suggest that, at least in the case of *ATGL* and *MGL*, increased expression contributes to the positive action of PPAR $\gamma$  agonism on adipose lipolysis. In the face of increased lipolysis, the net release of NEFA into the bloodstream is counteracted by increased reuptake and cycling. PPAR $\gamma$  agonism therefore reduces net NEFA release into the circulation while greatly increasing lipid substrate turnover, an action likely contributing to improve the hormonal fine tuning of adipose lipid metabolism.

### AKNOWLEGMENTS

This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to YD. WTF was the recipient of a Postdoctoral Fellowship from a CIHR Training in Obesity Program grant. ML was the recipient of a Studentship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. The authors are very grateful for the invaluable professional assistance of Josée Lalonde, Mélanie Alain, and Sébastien Poulin. They also thank Drs. Katherine Cianflone and Pascale Mauriège for their helpful review of the manuscript.

#### REFERENCES

- Fürnsinn C, Waldhäusl W (2002) Thiazolidinediones: metabolic actions in vitro. Diabetologia 45: 1211-1223
- Kintscher U, Law RE (2005) PPARγ-mediated insulin sensitization: the importance of fat versus muscle. Am J Physiol Endocrinol Metab 288: E287-91
- 3. Ye JM, Dzamko N, Cleasby ME, et al (2004) Direct demonstration of lipid sequestration as a mechanism by which rosiglitazone prevents fatty-acid-induced insulin resistance in the rat: comparison with metformin. Diabetologia 47: 1306-13
- Oakes ND, Thalen PG, Jacinto SM, Ljung B (2001) Thiazolidinediones increase plasma-adipose tissue FFA exchange capacity and enhance insulin-mediated control of systemic FFA availability. Diabetes 50: 1158-65
- Guan HP, Li Y, Jensen MV, Newgard CB, Steppan CM, Lazar MA (2002) A futile metabolic cycle activated in adipocytes by antidiabetic agents. Nat Med 8: 1122-8
- Tordjman J, Chauvet G, Quette J, Beale EG, Forest C, Antoine B (2003) Thiazolidinediones block fatty acid release by inducing glyceroneogenesis in fat cells. J Biol Chem 278: 18785-90
- Kalderon B, Mayorek N, Ben-Yaacov L, Bar-Tana J (2003) Adipose tissue sensitization to insulin induced by troglitazone and MEDICA 16 in obese Zucker rats in vivo. Am J Physiol Endocrinol Metab 284: E795-803
- Fredrikson G, Belfrage P (1983) Positional specificity of hormone-sensitive lipase from rat adipose tissue. J Biol Chem 258: 14253-6
- Fortier M, Wang SP, Mauriege P, et al (2004) Hormone-sensitive lipase-independent adipocyte lipolysis during beta-adrenergic stimulation, fasting, and dietary fat loading. Am J Physiol Endocrinol Metab 287: E282-8
- Haemmerle G, Zimmermann R, Hayn M, et al (2002) Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. J Biol Chem 277: 4806-15
- Okazaki H, Osuga J, Tamura Y, et al (2002) Lipolysis in the absence of hormonesensitive lipase: evidence for a common mechanism regulating distinct lipases. Diabetes 51: 3368-75
- Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, et al (2004) Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. Science 306: 1383-6

- Villena JA, Roy S, Sarkadi-Nagy E, Kim KH, Sul HS (2004) Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. J Biol Chem 279: 47066-75
- 14. Jenkins CM, Mancuso DJ, Yan W, Sims HF, Gibson B, Gross RW (2004) Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calciumindependent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. J Biol Chem 279: 48968-75
- 15. Zechner R, Strauss JG, Haemmerle G, Lass A, Zimmermann R (2005) Lipolysis: pathway under construction. Curr Opin Lipidol 16: 333-40
- Kershaw EE, Hamm JK, Verhagen LA, Peroni O, Katic M, Flier JS (2006) Adipose triglyceride lipase: function, regulation by insulin, and comparison with adiponutrin. Diabetes 55: 148-157
- Mori Y, Murakawa Y, Okada K, et al (1999) Effect of troglitazone on body fat distribution in type 2 diabetic patients. Diabetes Care 22: 908-912
- Picard F, Auwerx J (2002) PPAR(gamma) and glucose homeostasis. Annu Rev Nutr 22: 167-97
- Willson TM, Lambert MH, Kliewer SA (2001) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and metabolic disease. Annu Rev Biochem 70: 341-67
- 20. Laplante M, Sell H, MacNaul KL, Richard D, Berger JP, Deshaies Y (2003) PPARgamma activation mediates adipose depot-specific effects on gene expression and lipoprotein lipase activity: mechanisms for modulation of postprandial lipemia and differential adipose accretion. Diabetes 52: 291-9
- Berthiaume M, Sell H, Lalonde J, et al (2004) Actions of PPARgamma agonism on adipose tissue remodeling, insulin sensitivity, and lipemia in absence of glucocorticoids. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 287: R1116-23
- Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM (1994) Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. Cell 79: 1147-56
- 23. van Harmelen V, Dicker A, Ryden M, et al (2002) Increased lipolysis and decreased leptin production by human omental as compared with subcutaneous preadipocytes. Diabetes 51: 2029-36
- Mayerson AB, Hundal RS, Dufour S, et al (2002) The effects of rosiglitazone on insulin sensitivity, lipolysis, and hepatic and skeletal muscle triglyceride content in patients with type 2 diabetes. Diabetes 51: 797-802

- Racette SB, Davis AO, McGill JB, Klein S (2002) Thiazolidinediones enhance insulinmediated suppression of fatty acid flux in type 2 diabetes mellitus. Metabolism 51: 169-74
- Tan GD, Fielding BA, Currie JM, et al (2005) The effects of rosiglitazone on fatty acid and triglyceride metabolism in type 2 diabetes. Diabetologia 48: 83-95
- Lake AC, Sun Y, Li JL, et al (2005) Expression, regulation, and triglyceride hydrolase activity of Adiponutrin family members. J Lipid Res 46: 2477-87
- Fredrikson G, Tornqvist H, Belfrage P (1986) Hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte triacylglycerol. Biochim Biophys Acta 876: 288-93
- McTernan PG, Harte AL, Anderson LA, et al (2002) Insulin and rosiglitazone regulation of lipolysis and lipogenesis in human adipose tissue in vitro. Diabetes 51: 1493-8
- 30. Teruel T, Hernandez R, Rial E, Martin-Hidalgo A, Lorenzo M (2005) Rosiglitazone upregulates lipoprotein lipase, hormone-sensitive lipase and uncoupling protein-1, and down-regulates insulin-induced fatty acid synthase gene expression in brown adipocytes of Wistar rats. Diabetologia 48: 1180-1188
- Deng T, Shan S, Li P-P, et al (2005) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma transcriptionally up-regulates hormone-sensitive lipase via the involvement of Sp1 Endocrinology 147(2): 875-84
- 32. Dalen KT, Schoonjans K, Ulven SM, et al (2004) Adipose tissue expression of the lipid droplet-associating proteins S3-12 and perilipin is controlled by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. Diabetes 53: 1243-52
- Rosenbaum SE, Greenberg AS (1998) The short- and long-term effects of tumor necrosis factor-alpha and BRL 49653 on peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)gamma2 gene expression and other adipocyte genes. Mol Endocrinol 12: 1150-60
- Bartness TJ, Kay Song C, Shi H, Bowers RR, Foster MT (2005) Brain-adipose tissue cross talk. Proc Nutr Soc 64: 53-64
- 35. Sell H, Berger JP, Samson P, et al (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonism increases the capacity for sympathetically mediated thermogenesis in lean and ob/ob mice. Endocrinology 145: 3925-34
- Rosenstock M, Greenberg AS, Rudich A (2001) Distinct long-term regulation of glycerol and non-esterified fatty acid release by insulin and TNF-alpha in 3T3-L1 adipocytes. Diabetologia 44: 55-62

- 37. Reshef L, Olswang Y, Cassuto H, et al (2003) Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. J Biol Chem 278: 30413-6
- 38. Coort SL, Coumans WA, Bonen A, van der Vusse GJ, Glatz JF, Luiken JJ (2005) Divergent effects of rosiglitazone on protein-mediated fatty acid uptake in adipose and in muscle tissues of Zucker rats. J Lipid Res 46: 1295-302
- Frohnert BI, Hui TY, Bernlohr DA (1999) Identification of a functional peroxisome proliferator-responsive element in the murine fatty acid transport protein gene. J Biol Chem 274: 3970-7
- 40. Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM (1994) mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. Genes Dev 8: 1224-34

## TABLES

**Table 1.** Final body weight, cumulative food intake, food efficiency, mass of white (WAT)and brown (BAT) adipose tissues, and serum concentrations of insulin andmetabolites in rats treated or not with rosiglitazone for 7 days.

	Control	Rosiglitazone
Body weight (g)	330 ± 4	348 ± 3 *
Body weight gain (g)	47 ± 3	67 ± 3 *
Food Intake (g)	$164 \pm 3$	194 ± 4 *
Food efficiency (%) <sup>a</sup>	$28 \pm 1$	35 ± 1 *
Inguinal WAT (g)	$3.2 \pm 0.2$	4.3 ± 0.2 *
Retroperitoneal WAT (g)	$2.0 \pm 0.2$	2.7 ± 0.1 *
Epididymal WAT (g)	$2.7 \pm 0.2$	$3.5 \pm 0.2$ *
Mesenteric WAT (g)	$2.0\pm0.1$	$2.7 \pm 0.2$ *
BAT (g)	$0.31\pm0.01$	$0.67 \pm 0.02$ *
Insulin (pmol/l)	$186 \pm 22$	122 ± 18 *
Glucose (mmol/l)	$7.9 \pm 0.3$	$7.8 \pm 0.1$
NEFA (mmol/l)	$0.47\pm0.05$	$0.20 \pm 0.07$ *
Glycerol (mmol/l)	$0.128\pm0.011$	$0.121\pm0.003$
Triacylglycerols (mmol/l)	$2.0 \pm 0.2$	$1.1 \pm 0.1$ *

Data are means  $\pm$  SEM of 6-12 rats. \* Different from Control, P < 0.05 (Student's unpaired *T* test). <sup>a</sup> Calculated as g body weight gain / 100 g food ingested.

#### FIGURES LEGENDS

**Figure 1**. In vitro basal, NA- and DBcAMP-stimulated rates of glycerol and NEFA release by explants of inguinal (a) and retroperitoneal (b) adipose depots of control (open columns) and rosiglitazone-treated rats (full columns). Each column represents the mean  $\pm$  SEM of 6 rats. \* P < 0.05 vs. untreated control in same incubation condition;  $\dagger P < 0.05$  vs. basal unstimulated condition in same treatment group.

**Figure 2.** mRNA levels of *ATGL* (a), *HSL* (b) and *MGL* (c) in inguinal (ING), retroperitoneal (RETRO), epididymal (EPI) and mesenteric (MES) adipose depots of control (open columns) and rosiglitazone-treated rats (full columns). Each column represents the mean  $\pm$  SEM of 6 rats. \* *P* < 0.05 vs. control in same depot; † *P* < 0.05 vs. ING depot of control rats.

**Figure 3.** Correlations between glycerol release and mRNA levels of ATGL (n = 46), HSL (n = 45), and MGL (n = 46). The four adipose depots harvested from 6 control and 6 rosiglitazone-treated were included.

**Figure 4**. mRNA levels, expressed as % control, of *ATGL*, *HSL*, and *MGL* in inguinal (a) and retroperitoneal (b) explants from untreated rats incubated in vitro with or without (horizontal line) rosiglitazone for 12 h. *aP2* and *L27* mRNA served as positive and negative controls, respectively. Each column represents the mean  $\pm$  SEM of explants from 4 rats. \* *P* < 0.05 vs. control explants.

**Figure 5**. Antilipolytic effect of of insulin, expressed as absolute levels of glycerol and NEFA release (a, c, e, g) and % basal (without insulin, b, d, f, h), on basal (unstimulated) glycerol and NEFA release, by explants of inguinal (a-d) and retroperitoneal (e-h) adipose depots of control (open squares and columns) and rosiglitazone-treated rats (full squares and columns). Each symbol or column represents the mean  $\pm$  SEM of 6 rats. \* *P* < 0.05 vs. untreated control in same incubation condition; † *P* < 0.05 vs. without insulin in same
treatment group. # P < 0.05 between control and rosiglitazone for dose-response curve analyzed as a whole by ANOVA.

# FIGURES









Figure 3.



I







#### Electronic supplementary material (ESM) - TEXT 1 to 6

#### ESM – Text 1

In vitro basal, noradrenaline-stimulated, and insulin-inhibited lipolysis. For the in vitro studies, fat explants were chosen rather than isolated adipocytes to permit the longer incubation times required for some measurements (e.g. gene expression). Prolipolytic cytokine release occurs upon preparation of fat explants [1]; however, this is also true for adipocyte isolation [2]. This was not considered a confounding factor, because PPAR- $\gamma$  agonists reduce pro-lipolytic cytokine production, which would tend to counteract an positive effect of rosiglitazone on lipolysis. Fat pads were removed immediately after decapitation of the fasted rats, washed extensively, and pre-incubated for 10 min before performing the assays described below. It was determined in pilot studies that the addition of adenosine deaminase to the incubation medium did not affect the outcome of the lipolytic assay under these conditions. Insulin concentrations were chosen to approximate those to which WAT is exposed to in vivo in the fasting and postprandial states, whereas noradrenaline and DBcAMP were used at concentrations that elicit the maximal lipolytic response in control and rosiglitazone-treated rats, as determined in pilot studies.

#### ESM – Text 2

*Triglyceride/NEFA cycling, PEPCK and GYK activities.* Rates of triglyceride/NEFA cycling were estimated as previously described [3], using the following formula:

Cycling = 
$$(3 \times \text{rate of glycerol release}) - (\text{rate of NEFA release})$$

The rates of cycling measured by this method were shown to be very similar to those measured by a completely different radiochemical method [3]. PEPCK activity was assayed in supernatants obtained after homogenisation of ING, RETRO, EPI and MES adipose depots in a buffer (pH 7.5) containing 20 mmol/l triethanolamine, 0.25 mol/l

sucrose, 5 mmol/l mercaptoethanol and 1 mmol/l EDTA, and centrifugation of the homogenates at 100,000*g*. PEPCK activity was determined by the method of Chang and Lane [4], based on the incorporation of <sup>14</sup>Cbicarbonate (0.074 MBq) into acid-stable product. The composition of the assay mixture and processing of the samples were as described previously [5]. Total protein concentration in the homogenate was determined by the bicinchoninic acid method [6]. The activity of GYK was measured following the recommendations of Newsholme et al. [7], in supernatants obtained after homogenisation of the four adipose depots in ice cold 10 g/l KCl and l mmol/l EDTA, and centrifugation at 2,000*g*. The composition of the assay mixture, which contained [U-<sup>14</sup>C]glycerol, and the isolation of labelled glycerol-3-phosphate were as previously described [8]. The protein content of homogenates was determined by the method of Lowry et al. [9].

#### ESM – Text 3

*RNA isolation and analysis.* The primers used for the PCR reactions are presented in ESM Table 1. At the end of each run, melt curve analyses were performed and a few representative samples from each experimental group were run on an agarose gel to verify specificity of the amplification. Data are expressed as the ratio between the expression of the target gene and the housekeeping gene L27 (NM\_022514), which was selected because no significant variation in its expression was observed between control and rosiglitazone-treated rats.

#### ESM – Text 4

Confirmation of rosiglitazone effects on lipolysis in isolated adipocytes. Because the lipolysis data are expressed on a per DNA basis, and because PPAR- $\gamma$  agonism favours adipocyte differentiation, it could be argued that in control explants the contribution to total DNA of immature cells lacking lipolytic competence may have led to an overestimation of the impact of rosiglitazone on lipolysis. To rule out this possibility, adipocytes were isolated by the collagenase method [10], which retains only lipid-laden, fully differentiated adipocytes. In both ING- and RETRO-derived adipocytes, the maximal noradrenaline-

mediated stimulation of glycerol and NEFA release reached higher levels in cells from PPAR-γ agonist-treated rats than in cells from control rats (ESM Fig. 1).

## ESM – Text 5

Determinants of glycerol or NEFA reesterification and reuptake. The release of lipolytic products is counteracted by reesterification and reuptake, these pathways being direct targets of PPARγ agonism. To gain insight into the contribution of these processes on the net release of lipolytic products, *PEPCK* and *GYK* mRNA levels and protein activity (NEFA/glycerol re-esterification), and *FABP4* and *FATP* mRNA levels (NEFA uptake mediators) were quantified in WAT of control and rosiglitazone-treated rats (ESM Fig. 2). Here again, all three visceral depots behaved similarly, and only the RETRO depot is reported along with the subcutaneous ING depot. Rosiglitazone markedly increased *PEPCK* (ESM Fig. 2a, b) and *GYK* mRNA levels and the activity of the protein products (ESM Fig. 2c, d) in both ING and RETRO depots. In accordance with its effect on these re-esterification enzymes, rosiglitazone increased the rate of NEFA cycling in both depots (ESM Fig. 2e). Finally, and also in both depots, rosiglitazone increased the mRNA levels of FABP4 (ESM Fig. 2f) an FATP (ESM Fig. 2g).

#### ESM – Text 6

Impact of intracellular recycling of lipolytic products. The release of lipolytic products from WAT of thiazolidinedione-treated rats is counteracted not only by increased adipose NEFA reuptake, but also by intracellular substrate recycling. In WAT, glycerol is not normally recycled into triglyceride because of the virtual absence of GYK activity; however, as confirmed here, rosiglitazone markedly increases the expression of *GYK* and *PEPCK* and the activity of the protein products [11, 12]. These enzymes mediate the generation of glycerol 3-phosphate from glycerol and 3-carbon precursors, respectively, favouring glycerol and NEFA esterification into triglyceride. Rosiglitazone thereby enhances the recycling of both glycerol and NEFA released from lipolysis back into triglyceride, creating a so-called futile, energy-consuming substrate cycle. Rosiglitazone

favoured recycling of NEFA to a greater extent than that of glycerol, as evidenced by higher rates of triglyceride–NEFA cycling (calculated from net substrate release) relative to controls. Because rosiglitazone increases glycerol reesterification, the net release of glycerol into the incubation medium understimates the true lipolytic rate, and the robust residual effect on glycerol release observed here underscores the potency with which rosiglitazone positively influences WAT lipolysis. Finally, a role for the rosiglitazone-induced amplification of lipid substrate cycling in the sensitisation of adipose glucose metabolism to insulin has been suggested [13], and there is ample evidence that substrate cycling enhances the response of metabolic processes to hormonal modulation [3, 14–17]. It can therefore be suggested that increased cycling may have contributed to the PPAR- $\gamma$ -mediated amplification of the antilipolytic response to insulin. Likewise, stimulation of substrate cycling may conceivably act in concert with an increased lipolytic machinery to enhance the lipolytic response to adrenergic stimulation.

# Electronic supplementary material (ESM) - REFERENCES

- Fain JN, Bahouth SW, Madan AK (2004) TNFα release by the non fat cells of human adipose tissue. Int J Obes Relat Metab Disord 28:616-622
- Ruan H, Zarnowski MJ, Cushman SW, Lodish HF (2003) Standard isolation of primary adipose cells from mouse epididymal fat pads induces inflammatory mediators and down-regulates adipocyte genes. J Biol Chem 278:47585-47593
- Brooks B, Arch JR, Newsholme EA (1982) Effects of hormones on the rate of the triacylglycerol/fatty acid substrate cycle in adipocytes and epididymal fat pads. FEBS Lett 146:327-330
- Chang HC, Lane MD (1966) The enzymatic carboxylation of phosphoenolpyruvate. II. Purification and properties of liver mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase. J Biol Chem 241:2413-2420
- Festuccia WT, Kawashita NH, Garofalo MA et al (2003) Control of glyceroneogenic activity in rat brown adipose tissue. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 285: R177-R182
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT et al (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem 150:76-85
- 7. Newsholme EA, Robinson J, Taylor K (1967) A radiochemical enzymatic activity assay for glycerol kinase and hexokinase. Biochim Biophys Acta 132:338-346
- Kawashita NH, Festuccia WT, Brito MN et al (2002) Glycerokinase activity in brown adipose tissue: a sympathetic regulation? Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 282:R1185-R1190
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193: 265-75
- Rodbell M (1964) Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. J Biol Chem 239: 375-380
- Guan HP, Li Y, Jensen MV, Newgard CB, Steppan CM, Lazar MA (2002) A futile metabolic cycle activated in adipocytes by antidiabetic agents. Nat Med 8: 1122-8

- Tontonoz P, Hu E, Devine J, Beale EG, Spiegelman BM (1995) PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. Mol Cell Biol 15: 351-7
- Oakes ND, Thalen PG, Jacinto SM, Ljung B (2001) Thiazolidinediones increase plasma adipose tissue FFA exchange capacity and enhance insulin-mediated control of systemic FFA availability. Diabetes 50: 1158-65
- Newsholme EA (1980) Reflections on the mechanism of action of hormones. FEBS Lett 117 Suppl: K121-34
- Kalderon B, Mayorek N, Ben-Yaacov L, Bar-Tana J (2003) Adipose tissue sensitization to insulin induced by troglitazone and MEDICA 16 in obese Zucker rats in vivo. Am J Physiol Endocrinol Metab 284: E795-803
- Miyoshi H, Shulman GI, Peters EJ, Wolfe MH, Elahi D, Wolfe RR (1988) Hormonal control of substrate cycling in humans. J Clin Invest 81: 1545-1555
- Wolfe RR, Klein S, Carraro F, Weber JM (1990) Role of triglyceride-fatty acid cycle in controlling fat metabolism in humans during and after exercise. Am J Physiol 258: E382-E389

# Electronic supplementary material (ESM) - TABLES

Gene	Accession number	5' Primer (5'-3')	3' Primer (5'-3')
ATGL	XM_347183	CACTTTAGCTCCAAGGATGA	TGGTTCAGTAGGCCATTCCT
HSL	NM_012859	CCTGCTGACCATCAACCGAC	CCTCGATCTCCGTGATATTCCAGA
MGL	NM_138502	CTAATTTCACCTCTGATCCT	AGGACAGAGTTGGTCACTTC
L27	NM_022514	CTGCTCGCTGTCGAAATG	CCTTGCGTTTCAGTGCTG
PEPCK	NM_198780	TGGGTGATGACATTGCCTGG	ACCTTGCCCTTATGCTCTGCAG
GYK	NM_024381	CCTGTCCATTGAAATGTGTCATCC	GCCATGAAGCCATGACAATTAGTG
FABP4	NM_053365	ATGTGTGATGCCTTTGTGGG	CCCAGTTTGAAGGAAATCTC
FATP	NM_053580	TCTGCGGCGCTTCGATGGCTAT	TTGTGGGGGGTCTGCAATGGC

**ESM Table 1.** Primers used for the quantification of mRNA levels.

#### Electronic supplementary material (ESM) – FIGURE LEGENDS

**ESM Fig. 1.** In vitro noradrenaline-stimulated rates of glycerol and NEFA release by adipocytes isolated from ING (**a**) and RETRO (**b**) adipose depots of control (empty columns) and PPAR- $\gamma$  Agonisttreated rats (filled columns). Adipocytes were isolated by Rodbell's method [10] and were incubated for 2 h with 1 µmol/l of noradrenaline in a humidified atmosphere of 5% CO2, 95% O2 at 37°C. Each column represents the mean  $\pm$  SEM for six rats. \**p*<0.05 vs untreated control rats under the same incubation conditions.

**ESM Fig. 2.** Activity of PEPCK (**a**) and GYK (**c**), levels of *PEPCK* mRNA (**b**) and *GYK* mRNA (**d**), triacylglycerol/NEFA cycling rate (**e**), and levels of *FABP4* mRNA (**f**) and *FATP* mRNA (**g**) in ING and RETRO adipose depots of control (empty columns) and rosiglitazone-treated rats (filled columns). Each column represents the mean  $\pm$  SEM for six rats. \**p*<0.05 vs untreated control rats. TG, triglyceride



ESM Figure 1.



DISCUSSION GÉNÉRALE, PERSPECTIVES DE RECHERCHE ET CONCLUSION

#### Discussion générale

La découverte des mécanismes par lesquels les agonistes PPAR-y améliorent la sensibilité à l'insuline est importante afin de permettre l'amélioration des traitements actuels contre la résistance à l'insuline et le diabète de type 2 mais aussi afin de préciser notre compréhension globale du métabolisme. Ces dernières années, les connaissances relatives aux mécanismes d'action des agonistes PPAR-y se sont beaucoup précisées. Tel que discuté tout au long de l'introduction, beaucoup des effets de ces agonistes semblent être reliés à leur impact sur le tissu adipeux. Il a été observé chez l'homme que les TZD favorisent le remodelage du tissu adipeux blanc en stimulant l'accrétion des lipides dans le tissu adipeux sous-cutané et en réduisant leur accumulation dans le tissu adipeux viscéral (Tableau 2). Puisque l'accumulation de graisses viscérales est désormais considérée comme un déterminant central favorisant le développement de la résistance à l'insuline, des dyslipidémies, des maladies cardiovasculaires et du diabète de type 2, il est tentant de suggérer que la réduction de la masse adipeuse viscérale par les TZD puisse contribuer aux effets bénéfiques de ces molécules. Les mécanismes impliqués dans le remodelage des graisses par les agonistes PPAR-y ne sont pas connus. La contribution des différents tissus adipeux à l'amélioration de la lipémie observée lors de l'utilisation de ces agonistes n'a pas encore été déterminée. Les travaux de recherche effectués dans le cadre de la présente thèse avaient pour but de déterminer les mécanismes par lesquels la stimulation de PPAR-y favorise le remodelage du tissu adipeux blanc. Ces travaux ont aussi été réalisés afin de comprendre comment les modulations du métabolisme du tissu adipeux contribuent à l'amélioration de la lipémie lors de traitement avec des agonistes PPAR-y.

### Chapitre 1

Cette étude a été réalisée afin de déterminer si la redistribution du tissu adipeux observée chez les rats traités avec l'agoniste PPAR-y expérimental COOH est associée à des changements dans l'expression de la LPL ou d'autres gènes impliqués dans le métabolisme des lipides. Ces travaux ont aussi été réalisés afin de déterminer dans quelle

mesure les changements de l'activité de la LPL induits par la stimulation de PPAR-γ affectent la triglycéridémie.

Le COOH s'est montré efficace pour améliorer la sensibilité à l'insuline et pour réduire les TG et les AGL circulants en période postprandiale chez les animaux nourris avec une diète standard ou avec une diète riche en graisses et en sucres promouvant la résistance à l'insuline. Généralement, les effets du COOH sur les variables plasmatiques et physiologiques furent les mêmes, indépendamment de la diète utilisée. Le chapitre 1 montre que le COOH augmente l'accumulation des graisses dans le tissu adipeux souscutané (inguinal) et réduit, ou empêche, l'accumulation des graisses dans le tissu adipeux viscéral (rétropéritonéal). Ce type de redistribution du tissu adipeux blanc a été observé chez l'homme traité avec des TZD (Tableau 2). Cependant, pour des raisons qui sont encore inconnues, l'utilisation des TZD chez les rongeurs ne conduit généralement pas une forte réduction de la masse adipeuse viscérale (Okuno *et al.*, 1998; de Souza *et al.*, 2001). Des études préliminaires effectuées récemment dans nos laboratoires suggèrent que des doses plus élevées de rosiglitazone (30mg/kg/jour) pourraient induire les mêmes effets que le COOH sur la redistribution des graisses chez les rats.

Dans l'étude présentée au chapitre 1, nous avons mis à jour certains mécanismes pouvant contribuer à la redistribution du tissu adipeux induite par l'agonisme de PPAR- $\gamma$ . Nous avons premièrement observé que le COOH augmente fortement l'expression et l'activité de la LPL dans le tissu adipeux sous-cutané et n'a aucun effet sur ces paramètres dans le tissu adipeux viscéral. Ces résultats suggèrent que le COOH augmente l'hydrolyse des TG et la captation des AG spécifiquement dans le tissu adipeux sous-cutané, favorisant ainsi l'accrétion des lipides dans ce dépôt. L'activité de la LPL a aussi été fortement induite par le COOH dans le tissu adipeux brun, un tissu dont la masse a augmenté de façon spectaculaire lors du traitement. Compte tenu de l'important rôle de la LPL du tissu adipeux dans la clairance des TG en phase postprandiale (Coleman *et al.*, 1995; Weinstock *et al.*, 1995), il est raisonnable de croire que l'activation de la LPL par le COOH puisse contribuer à la réduction de la triglycéridémie observée chez les animaux traités avec l'agoniste. Toutefois, cette étude ne nous permet pas d'exclure la possibilité que la réduction de la triglycéridémie puisse aussi être causée par une diminution de la sécrétion hépatique des VLDL. En effet, les AGL circulants et l'accumulation des graisses dans le tissu adipeux viscéral, qui sont tous deux reconnus pour exacerber la production de VLDL par le foie (Lewis, 1997; Adeli *et al.*, 2001), ont été réduits par le COOH. Toutefois, puisque les TG circulants en phase postprandiale sont généralement contenus dans les chylomicrons, il est peu probable que la réduction de la sécrétion des VLDL puisse avoir joué un rôle de premier plan dans la diminution de la triglycéridémie postprandiale observée chez les animaux traités avec l'agoniste.

En plus des effets du COOH sur la LPL, des modulations spécifiques à chaque dépôt pouvant expliquer la redistribution du tissu adipeux blanc ont été observées relativement à l'expression de la 11\u03b3-hydroxystéroïde déshydrogénase de type 1 (11\u03b3-HSD-1) et d'UCP-1. Des études précédentes ont montré que la surexpression de la 11β-HSD-1, une enzyme impliquée dans la production locale de glucocorticoïdes, favorise l'accumulation des lipides dans le tissu adipeux viscéral (Masuzaki et al., 2001). Également, les patients souffrant d'hypercorticostéroïdisme accumulent préférentiellement des graisses dans le tissu adipeux viscéral (Rebuffé-Scrive et al., 1988; Mayo-Smith et al., 1989). Dans l'étude décrite au chapitre 1, le COOH a réduit l'expression de la 11β-HSD-1 uniquement dans le tissu adipeux viscéral, suggérant que la réduction de la déposition des graisses dans ce dépôt puisse être dépendante d'une réduction marquée de la production intra-tissulaire de glucocorticoïdes. L'expression d'UCP-1 a été fortement induite par le COOH dans les deux dépôts adipeux. Les niveaux d'expression étaient cependant beaucoup plus élevés dans le tissu adipeux viscéral, suggérant que la dissipation d'énergie a pu être stimulée préférentiellement dans ce tissu. Cet effet pourrait avoir contribué à réduire la déposition des lipides dans le tissu adipeux viscéral.

Ainsi, l'agoniste COOH a eu des effets différentiels puissants sur la redistribution et sur le métabolisme du tissu adipeux. Nous avons vu que la régulation différentielle de l'expression de la LPL, de la 11β-HSD-1 et d'UCP-1 pourrait être en cause dans ces effets. L'effet du COOH sur la LPL du tissu adipeux sous-cutané et du tissu adipeux brun semble jouer un rôle important dans l'hydrolyse de TG circulants et dans l'amélioration de la triglycéridémie.

#### Chapitre 2

L'étude décrite au chapitre 2 a été produite dans le but d'approfondir les connaissances des mécanismes par lesquels le COOH favorise la redistribution des graisses. Dans cette étude, nous avons mesuré l'expression de même que l'activité fonctionnelle de plusieurs déterminants impliqués dans la captation, l'estérification, l'entreposage, la libération et l'oxydation des lipides afin d'obtenir un portrait plus clair des sentiers métaboliques différentiellement affectés par le COOH ayant une influence sur le remodelage du tissu adipeux.

La présente étude a permis de montrer que le COOH stimule la prolifération et la différenciation des adipocytes plus efficacement dans le tissu adipeux sous-cutané que dans le tissu adipeux viscéral. Cet effet, qui a été rapporté par d'autres équipes (Adams et al., 1997a; Hutley et al., 2003), pourrait favoriser l'accumulation des graisses dans le tissu adipeux sous-cutané en augmentant le nombre de cellules disponibles pour emmagasiner les graisses. Dans cette étude, nous avons confirmé que le COOH augmente l'expression et l'activité de la LPL uniquement dans le tissu adipeux sous-cutané. Nous avons aussi découvert que l'expression d'aP2 et de DGAT-1, qui sont impliqués dans la captation et l'estérification des AG, n'a été induite par le COOH que dans le tissu adipeux sous-cutané. Afin de confirmer que ces effets sur l'expression génique se traduisent par l'activation des sentiers métaboliques en cause, nous avons injecté aux rats une émulsion de TG marqués et nous avons mesuré la partition des AG entre les tissus. Tel qu'attendu, nous avons vu que le COOH augmente la captation des AG dérivés de l'hydrolyse des TG de façon beaucoup plus marquée dans le tissu adipeux sous-cutané que dans le tissu adipeux viscéral. Ces résultats, qui supportent en tout point les observations de l'étude 1, indiquent que l'accumulation préférentielle des graisses dans le tissu adipeux sous-cutané est causée en partie par l'augmentation de la captation des lipides par ce tissu. L'augmentation de l'hydrolyse intravasculaire des TG en périphérie du tissu adipeux sous-cutané pourrait être responsable de la réduction des TG circulants observée chez les animaux traités au COOH. Bien qu'intéressants, les effets du COOH sur la lipolyse et la glycéronéogenèse n'ont pas fourni de pistes pouvant expliquer le remodelage des graisses. L'impact de l'agonisme de PPAR-γ sur la lipolyse est discuté en détail au chapitre 6 (voir plus bas).

Une des conclusions de l'étude décrite au chapitre 1 était que le COOH réduit l'accumulation des lipides dans le tissu adipeux viscéral en augmentant plus fortement la dissipation de l'énergie dans ce tissu. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons mesuré dans les tissus adipeux l'expression de nombreux transcrits codants pour des protéines impliquées dans l'oxydation des lipides (Acadl, CPT-1, PDK-2, PDK-4), la dissipation de l'énergie (UCP-1) et la biogenèse des mitochondries (PGC-1 $\alpha$ ). Tel que décrit dans de récentes études utilisant d'autres agonistes, la stimulation de PPAR-y par le COOH a induit l'expression de pratiquement tous ces gènes (Way et al., 2001b; Wilson-Fritch et al., 2004; Boden et al., 2005; Bogacka et al., 2005a; Bogacka et al., 2005b). Cette stimulation était toutefois beaucoup plus importante dans le tissu adipeux viscéral que dans le tissu adipeux sous-cutané. La mesure de la consommation d'oxygène et de la masse mitochondriale des adipocytes isolés a permis de confirmer ces observations au niveau fonctionnel. Lorsque rassemblés, ces résultats montrent que le COOH a pu réduire la masse adipeuse viscérale en augmentant très fortement la dissipation de ses réserves lipidiques. Dans le tissu adipeux sous-cutané, la balance entre la stimulation de la captation et de l'oxydation des lipides par le COOH a probablement favorisé l'apparition d'une balance énergétique positive favorisant l'accumulation nette des graisses. L'effet de l'agonisme de PPAR-y sur l'oxydation des lipides dans le tissu adipeux est percu comme un mécanisme pouvant contribuer à réduire les AGL circulants (Wilson-Fritch et al., 2003; Hondares et al., 2006). Les mécanismes impliqués dans la redistribution des graisses par le COOH de même que l'impact de ces modulations sur la lipémie sont résumés à la figure 5.



♦ AGL et TG circulants

# Figure 5. Résumé des mécanismes par lesquels l'agoniste PPAR-β COOH favorise la redistribution du tissu adipeux chez le rat.

L'augmentation de l'accumulation des graisses dans le tissu adipeux sous-cutané est liée à une forte différenciation cellulaire de même qu'à l'augmentation de l'expression/activité de la lipase lipoprotéique (LPL), de la protéine de liaison des acides gras (aP2) et de la diacylglycérol acyltransférase-1 (DGAT-1). Ces modulations ont contribué à augmenter l'hydrolyse des triglycérides (TG) de même que la captation et la déposition des acides gras (AG) dans le tissu adipeux sous-cutané. L'agonisme de PPAR-β a augmenté l'expression de la carnitine palmitoyltransférase-1 (CPT-1), de la protéine découplante-1 (UCP-1), du coactivateur 16 de PPAR-6 (PGC-16), de l'acyl-CoA déshydrogénase chaîne longue (Acadl), de la pyruvate déshydrogénase-2 (PDK-2) de même que la consommation d'oxygène et la masse mitochondriale dans le tissu adipeux sous-cutané. La balance entre les effets du COOH sur la rétention et l'oxydation des AG a favorisé la déposition des lipides dans ce tissu. Dans le tissu adipeux viscéral, la différenciation cellulaire de même que les déterminants moléculaires impliqués dans la captation des lipides n'ont généralement pas été augmentés par l'agoniste. Au contraire, l'expression de la 11-6 hydroxystéroïde déshydrogénase de type-1 (11-β-HSD-1), qui favorise en temps normal l'accumulation des graisses, a été réduite par le COOH dans le tissu adipeux viscéral. L'expression des gènes impliqués dans l'oxydation des lipides et la biogenèse des mitochondries a été induite beaucoup plus fortement dans le tissu adipeux viscéral que dans le tissu adipeux sous-cutané. La stimulation du potentiel oxydatif liée à l'absence d'effets marqués sur la captation des lipides a favorisé la réduction de la masse adipeuse viscérale. Au niveau systémique, l'augmentation de l'hydrolyse des TG et de l'oxydation des AG dans le tissu adipeux des animaux traités au COOH a pu permettre la réduction des TG et acides gras libres (AGL) circulants.

286

Des études suggèrent que l'acquisition des caractéristiques du tissu adipeux brun par le tissu adipeux blanc puisse être causée par le développement d'adipocytes bruns dans la masse adipeuse blanche. Il a été observé que des îlots de cellules adipeuses brunes se développent dans le tissu adipeux blanc de souris traitées avec le COOH (Sell et al., 2004). Pour le moment, le type cellulaire à partir duquel émergent ces adipocytes bruns n'est pas connu. En effet, on ne sait pas si ces cellules proviennent de pré-adipocytes blancs, de préadipocytes bruns, ou si elles sont issues de la transdifférenciation d'adipocytes blancs matures (Nedergaard et al., 2005). La stimulation de l'expression des gènes oxydatifs et des marqueurs de la biogenèse mitochondriale dans des adipocytes blancs en culture traités avec des TZD montre que l'acquisition des caractéristiques du tissu adipeux brun par le tissu adipeux blanc n'est pas uniquement causée par la prolifération d'adipocytes bruns dans le tissu adipeux blanc (Wilson-Fritch et al., 2003; Bogacka et al., 2005a). L'observation de gouttelettes de lipides multiloculaires autour du noyau de l'ensemble des cellules adipeuses blanches isolées du tissu adipeux des animaux traités au COOH supporte ces observations puisqu'un tel phénotype n'est normalement observé que dans les adipocytes bruns. Ces résultats suggèrent que l'agonisme de PPAR-y permet aux adipocytes blancs d'acquérir certaines fonctions normalement réservées aux adipocytes bruns. La convergence des adipocytes blancs vers un phénotype intermédiaire plutôt beige est aussi observée dans le adipocytes bruns. En effet, il est maintenant bien connu que les agonistes PPAR-y utilisés in vivo transforment les adipocytes bruns en cellules de stockage des lipides (Kelly et al., 1998; Breider et al., 1999; Burkey et al., 2000; Toseland et al., 2001; Aleo et al., 2003; Berthiaume et al., 2004; Sell et al., 2004). Les mécanismes moléculaires impliqués dans cette convergence phénotypique ne sont pas connus. Il est possible que la stimulation pharmacologique de l'activité de PPAR-y surstimule l'expression génique et dérègle les mécanismes de contrôle fins impliqués dans l'établissement des différences phénotypiques entre les adipocytes bruns et blancs. La surexpression simultanée de groupes de gènes liés à la biogenèse des mitochondries et au stockage des graisses pourrait favoriser l'émergence d'une classe d'adipocytes se retrouvant à mi-chemin entre les adipocytes blancs et les adipocytes bruns. Au-delà des mécanismes en cause, l'impact précis de ces nouveaux adipocytes sur les effets systémiques des agonistes PPAR-y n'est pas connu. Bien que la différenciation et la biogenèse des mitochondries soient induites par les agonistes

PPAR-γ, des résultats montrant une réduction de la stimulation adrénergique en réponse à ces agonistes soulève tout de même des questions relatives au degré d'activation des ces nouvelles cellules adipeuses (Thurlby *et al.*, 1987; Sell *et al.*, 2004).

#### Chapitre 3

L'étude décrite au chapitre 3 a été réalisée afin de mesurer la contribution des tissus à l'effet hypotriglycéridémiant du COOH. Dans cette étude, nous avons injecté à des rats traités au COOH une émulsion de TG marqués et nous avons mesuré dans plusieurs tissus la captation des lipides dérivés de l'hydrolyse des TG de même que l'activité de la LPL. Suite à l'injection de l'émulsion, nous avons récolté du sang, le tissu adipeux brun, le tissu adipeux blanc sous-cutané (inguinal), trois différents dépôts adipeux blancs viscéraux (rétropéritonéal, épididymaire, mésentérique), des muscles (soléus, diaphragme) et le foie.

La clairance de l'émulsion de TG a été fortement induite par le COOH autant durant le jeûne qu'en phase postprandiale. Ces résultats montrent que l'augmentation de l'hydrolyse intravasculaire des TG représente un mécanisme important par lequel l'agonisme de PPAR-y favorise la réduction de la triglycéridémie. Afin de vérifier la contribution des tissus et le rôle de la LPL dans l'amélioration de la clairance des TG, nous avons mesuré la captation des lipides marqués et l'activité de la LPL dans plusieurs tissus. Tel que décrit dans l'étude 1, l'activité de la LPL a été fortement induite dans le tissu adipeux sous-cutané et dans le tissu adipeux brun. Ces effets ont été associés à une augmentation spectaculaire de l'accrétion des lipides marqués dans ces tissus. L'activité de la LPL de même que la captation des lipides marqués n'ont généralement pas été induites dans le tissu adipeux viscéral rétropéritonéal. Ces résultats confirment ceux décrits dans les chapitres 1 et 2. Le tissu adipeux viscéral épididymaire a réagi exactement comme le rétropéritonéal tandis qu'une augmentation de l'activité de la LPL et de la captation des lipides marqués a été observée dans le tissu adipeux viscéral mésentérique. Ces observations sont très intéressantes car elles démontrent qu'une certaine variation de la réponse au COOH existe même à l'intérieur de la masse adipeuse viscérale. Ces variations pourront éventuellement être exploitées dans le but de comprendre les mécanismes

moléculaires précis par lesquels l'agonisme de PPAR-γ induit des réponses variées dans les différents dépôts adipeux. Tel que décrit dans la littérature, l'agonisme de PPAR-γ n'a pas affecté la LPL dans les muscles (Schoonjans *et al.*, 1996; Kageyama *et al.*, 2003).

Les résultats décrits au chapitre 3 montrent que le tissu adipeux sous-cutané et le tissu adipeux brun représentent des cibles importantes du COOH. La stimulation de l'activité de la LPL dans ces tissus, mais aussi dans le tissu adipeux viscéral mésentérique, augmente l'hydrolyse des TG et favorise la réduction de la triglycéridémie. Les effets des agonistes PPAR- $\gamma$  sur les TG circulants sont généralement beaucoup moins marqués chez l'humain (Aronoff *et al.*, 2000; King, 2000; Raskin *et al.*, 2000; Tan *et al.*, 2005b) que chez les rongeurs (Oakes *et al.*, 2001; Way *et al.*, 2001b; Jiang *et al.*, 2002). Cette différence pourrait être causée par le fait que l'homme adulte ne possède pas de tissu adipeux brun. Finalement, bien que nos résultats montrent que la clairance des TG est liée à l'augmentation de l'hydrolyse intravasculaire, nous ne pouvons exclure que l'amélioration de la triglycéridémie puisse être affectée par une réduction de la sécrétion des TG par le foie.

#### Chapitre 4

L'inactivation complète de la LPL chez la souris mène à la mort rapide des souriceaux suivant leur naissance (Coleman *et al.*, 1995; Weinstock *et al.*, 1995). Afin de contourner ce problème, des souris transgéniques exprimant la LPL humaine uniquement dans le cœur ont été développées (Levak-Frank *et al.*, 1999). Ces souris (L0-hLPL), qui se développent normalement comparativement aux souris sauvages (L2), n'expriment aucune LPL dans le tissu adipeux et dans les muscles. Dans l'étude décrite au chapitre 4, nous avons utilisé ce modèle transgénique afin d'évaluer la capacité de l'agoniste PPAR- $\gamma$  COOH à induire la redistribution du tissu adipeux et l'amélioration de la triglycéridémie en absence de LPL. En accord avec les études décrites aux chapitres 1, 2 et 3, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle l'inactivation de la LPL du tissu adipeux empêcherait la redistribution des graisses de même que l'effet hypotriglycéridémiant du COOH.

Le traitement des souris avec le COOH, à une dose et un temps de traitement

290

similaires à ceux que nous avions utilisés chez les rats, n'a malheureusement pas induit de changements dans le poids des tissus adipeux blancs. Il est connu que le métabolisme de la souris est moins malléable que celui du rat. Tout indique qu'un traitement plus long aurait été nécessaire afin d'optimiser les effets du COOH. Ces résultats ont fait en sorte que nous n'avons pu évaluer l'effet de l'inactivation de la LPL du tissu adipeux sur la redistribution des graisses. Toutefois, nous avons observé d'importants effets du COOH sur la triglycéridémie. Contrairement à ce que nous attendions, le COOH a complètement normalisé les TG dans les souris L0-hLPL, indiquant que la LPL du tissu adipeux n'est pas requise à l'effet hypotriglycéridémiant du COOH dans ce modèle. Ces résultats suggèrent que l'agoniste a pu réduire les TG circulants en réduisant la sécrétion des VLDL par le foie. La réduction de la triglycéridémie induite par le COOH a été associée à une forte baisse de l'accumulation des TG dans le foie des souris L0-hLPL. Il est bien connu que les TG accumulés au foie influencent directement la sécrétion des VLDL (Gibbons et al., 1992; Julius, 2003). Nous avons vu que le COOH contribue à réduire les lipides hépatiques et le potentiel de sécrétion des VLDL en réduisant l'activité de la HL et en augmentant les niveaux circulants d'adiponectine, une adipokine reconnue pour stimuler l'oxydation des lipides dans le foie (Long et Zierath, 2006). En plus de ces effets, le COOH a fortement réduit les AGL circulants, qui sont reconnus pour influencer l'accumulation des lipides dans le foie et la sécrétion des VLDL (Lewis, 1997). Cette diminution des AGL circulants a été associée à l'augmentation de la rétention des lipides dans le tissu adipeux blanc et brun. L'agoniste a augmenté très fortement le poids du tissu adipeux brun, ce qui démontre que ce tissu permet la rétention d'une importante quantité de lipides lors du traitement au COOH, et ce, même en absence de LPL. De tels résultats confirment le rôle important du tissu adipeux brun dans l'effet hypolipidémiant du COOH chez les rongeurs.

Lorsque rassemblés, ces résultats montrent que l'agonisme de PPAR-y peut mener à la réduction de la triglycéridémie par des mécanismes indépendants de l'activation de la LPL dans le tissu adipeux et de la stimulation de l'hydrolyse intravasculaire des TG. Ces conclusions, qui mettent à l'avant-scène le rôle de la sécrétion hépatique des VLDL dans la réduction des TG induite par le COOH, ne sont toutefois pas totalement contraditoires avec

les conclusions des études décrites aux chapitres 1, 2 et 3. En effet, ces nouvelles données montrent que l'effet hypotriglycéridémiant du COOH est dû à des mécanismes complexes faisant intervenir plusieurs déterminants du métabolisme des TG. La contribution précise de la sécrétion des VLDL versus l'hydrolyse intravasculaire des particules riches en TG dans l'effet hypotriglycéridémiant des agonistes PPAR-γ reste à établir.

#### Chapitre 5

L'étude décrite au chapitre 5 a été réalisée dans le but de déterminer la contribution de l'hydrolyse intravasculaire et de la sécrétion des TG à la diminution rapide de la triglycéridémie observée lors de traitement avec un agoniste PPAR- $\gamma$ . Cette étude avait aussi pour but de mesurer la contribution des tissus adipeux à la réduction des TG et des AGL circulants. Il a été démontré à quelques reprises que les effets des agonistes PPAR- $\gamma$  sur la triglycéridémie et les AGL plasmatiques sont très rapides chez les rongeurs (Way *et al.*, 2001b; Jiang *et al.*, 2002). Dans la présente étude, nous avons traité des rats avec de la rosiglitazone durant 1, 2, 3, 4 et 5 jours et nous avons mesuré les lipides sanguins de même que plusieurs paramètres impliqués dans le métabolisme des lipides afin de déterminer les mécanismes et la contribution des tissus à l'effet hypolipidémiant de cet agoniste.

La rosiglitazone a réduit les TG à partir du troisième jour de traitement, moment à partir duquel l'activité de la LPL était significativement augmentée dans le tissu adipeux brun. L'agoniste n'a pas affecté le taux de sécrétion des TG mais a fortement augmenté la clairance des TG lors de l'injection d'une émulsion de TG marqués. Ces résultats indiquent que la réduction primaire des TG chez les rats traités à la RSG est due à l'amélioration de l'hydrolyse intravasculaire et non à une réduction de la sécrétion des TG. La mesure de la captation des lipides marqués suite à l'injection de l'émulsion de TG radioactifs a permis de montrer que le tissu adipeux brun représente un site de captation majeur impliqué dans la clairance des TG lors du traitement avec la rosiglitazone. Sans sous-estimer l'importance du tissu adipeux blanc, ces résultats montrent que le tissu adipeux brun joue un rôle central dans l'effet hypotriglycéridémiant de la rosiglitazone chez les rats. Il est légitime de croire que la présence de ce dépôt adipeux chez les rongeurs, et son absence chez l'homme adulte,

puisse expliquer en partie pourquoi les agonistes PPAR-γ sont plus efficaces à réduire la triglycéridémie chez les rongeurs que chez l'humain.

Les AGL furent réduits dès le premier jour de traitement avec l'agoniste. Cet effet a été observé avant toute modification des niveaux de glucose ou d'insuline circulants, suggérant que la diminution des AGL est un facteur important favorisant l'amélioration de la sensibilité à l'insuline lors du traitement avec de tels agonistes. Tel qu'attendu, la réduction des AGL a été associée à l'augmentation rapide de l'expression des gènes impliqués dans la captation (FAT/CD36, FATP-1, aP2), l'estérification (GyK, PEPCK) et dans l'entreposage (ADRP, DGAT-1) des lipides dans le tissu adipeux blanc. Ces modulations ont aussi été observées dans le tissu adipeux brun. La diminution des AGL circulants a été fortement associée à l'augmentation du poids du tissu adipeux brun, ce qui suggère que ce tissu représente un important site de rétention des AGL. Cette conclusion est en accord avec les observations faites dans l'étude 5 et confirme du coup le rôle majeur du tissu adipeux brun dans l'effet hypolipidémiant des agonistes PPAR-y chez le rat.

#### Chapitre 6

Tel que décrit dans l'introduction, l'effet des agonistes PPAR-γ sur la lipolyse a conduit au fil des ans à la publication de plusieurs études contradictoires. L'étude décrite au chapitre 6 porte sur l'effet de l'agonisme de PPAR-γ sur la lipolyse des tissus adipeux. Cette étude, qui se détache légèrement des autres études, a été réalisée suite à l'observation d'une importante stimulation lipolytique induite par l'agoniste PPAR-γ COOH (voir chapitre 2).

Les agonistes PPAR- $\gamma$  sont reconnus pour diminuer rapidement les AGL circulants. Malgré cet effet, nous avons vu que la lipolyse basale ou stimulée à la norépinéphrine ou au dibutyryl AMPc est fortement stimulée dans des adipocytes isolés ou des explants de tissus prélevés d'animaux traités avec des agonistes PPAR- $\gamma$ . Cette stimulation lipolytique, observée dans tous les dépôts adipeux récoltés, a été associée à une forte augmentation de l'expression des lipases impliquées dans la dégradation des TG intracellulaires. La rosiglitazone a augmenté l'expression de l'ATGL et de la MGL dans tous les tissus et a stimulé l'expression de la HSL uniquement dans le tissu adipeux sous-cutané. Les fortes corrélations observées entre l'expression des lipases (ATGL, MGL) et la libération d'AGL par les explants de tissus suggèrent que l'augmentation de la lipolyse induite par l'agonisme de PPAR-y soit liée à l'expression de ces lipases. Comment l'augmentation du potentiel lipolytique induite par l'agonisme de PPAR-y peut-elle être liée à la réduction des AGL circulants observés in vivo lors de l'utilisation de ces agonistes ? Pour répondre à cette question, nous avons incubé des explants de tissu dans des conditions physiologiques d'insuline. Nous avons vu que le potentiel anti-lipolytique de l'insuline est fortement induit par le traitement à la rosiglitazone. Nous avons aussi vu que l'expression des gènes impliqués dans la captation (FATP-1, aP2) et l'estérification (GyK, PEPCK) des AG sont fortement induits par l'agoniste. Ainsi, l'augmentation du potentiel lipolytique induit par la rosiglitazone semble être contrebalancée par une augmentation concomitante du potentiel anti-lipolytique de l'insuline et de la capacité de rétention des AG par le tissu adipeux. La stimulation des sentiers métaboliques liés à la libération et à la captation des AG pourrait exacerber l'activité du cycle futile dans lequel les AG issus de la lipolyse sont rapidement ré-estérifiés sans jamais quitter l'adipocyte (Figure 6). Il est connu que l'augmentation de la vitesse d'un cycle futile améliore le contrôle hormonal du procédé métabolique touché par ce cycle (Newsholme, 1980; Brooks et al., 1982; Miyoshi et al., 1988; Wolfe et al., 1990; Kalderon et al., 2003). Nous pouvons ainsi émettre l'hypothèse selon laquelle la mise en place de ce cycle futile a pu potentialiser l'effet anti-lipolytique de l'insuline et à exacerber l'effet lipolytique de la norépinéphrine (Figure 6). Cette hypothèse est en parfait accord avec les résultats d'une étude montrant que les agonistes PPAR-γ augmentent chez le rat l'effet anti-lipolytique de l'insuline tout en augmentant la capacité nette du tissu adipeux de libérér des AGL lors du jeûne (Oakes et al., 2001). L'amélioration rapide de la signalisation de l'insuline induite par les agonistes PPAR-y contribue probablement aussi aux effets observés (Jiang et al., 2002). Lorsque rassemblées, ces observations complexes pourraient expliquer pourquoi des données contradictoires ont été publiées jusqu'ici relativement aux effets des agonistes PPAR- $\gamma$  sur la lipolyse. En effet, puisque la stimulation de PPAR- $\gamma$  a des effets pro- et anti-lipolytiques, l'utilisation de différents modèles favorisant l'un ou l'autre de ces effets a pu favoriser l'hétérogénéité des observations.



Figure 5. Résumé des effets de la rosiglitazone sur la lipolyse.

La lipolyse est affectée de diverses manières par l'agonisme de PPAR- $\gamma$ . (A) En condition basale, la rosiglitazone augmente l'expression de la lipase des triglycérides du tissu adipeux (ATGL), de la lipase hormono-sensible (HSL), de la lipase du monoacylglycérol (MGL), de la glycérol kinase (GyK), de la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK), de la protéine de liaison aux acides gras (aP2) et de la protéine de transport des acides gras-1 (FATP-1) dans les adipocytes. Cet effet favorise l'activité d'un cycle futile dans lequel les acides gras (AG) sont rapidement ré-estérifiés suite à la lipolyse des triglycérides (TG) intracellulaires. Ces modulations pro- et anti-lipolytiques résultent en une stimulation nette de la lipolyse en condition basale (B). La surexpression des lipases exacerbe la réponse lipolytique lors de la stimulation à la norépinéphrine. Cet effet augmente la libération d'acides gras libres (AGL) par les adipocytes. (C) D'un autre côté, l'augmentation de la capacité de captation et de rétention des AG induit par la rosiglitzone réduit fortement la libération d'AGL par les adipocytes lors de l'incubation avec l'insuline. La potentialisation de la signalisation de l'insuline par la rosiglitazone pourrait aussi contribuer à réduire la libération des AGL lors de l'incubation avec l'insuline.

Lorsque rassemblés, ces résultats montrent que l'agonisme de PPAR- $\gamma$  augmente la flexibilité métabolique du tissu adipeux en lui permettant de libérer plus d'AGL en période de jeûne et moins d'AGL en période d'abondance. Le meilleur contrôle de la libération des AGL par le tissu adipeux représente un mécanisme probable par lequel l'agonisme de PPAR- $\gamma$  contribue à l'amélioration de la sensibilité à l'insuline. D'autres études sont cependant requises afin de mieux comprendre les mécanismes par lesquels l'agonisme de PPAR- $\gamma$  affecte la lipolyse. Par exemple, il sera intéressant d'évaluer in vivo dans quelle mesure les modulations de l'activité adrénergique et thyroïdienne observées lors de l'utilisation de ces agonistes (Thurlby *et al.*, 1987; Sell *et al.*, 2004; Festuccia et al., observations non publiées) affectent la lipolyse du tissu adipeux et les niveaux d'AGL en circulation.

#### Perspectives de recherche

Les dépôts adipeux sous-cutanés et viscéraux sont reconnus pour partager d'importants traits communs quant à leur fonction et à leur métabolisme de base. Or, ces tissus sont aussi reconnus pour avoir une identité métabolique qui leur est propre affectant leur impact sur la sensibilité à l'insuline systémique. Les travaux décrits dans cette thèse montrent que les tissus adipeux isolés de différents sites anatomiques répondent de façon variée à l'agonisme de PPAR-γ. Nous avons vu que la stimulation de PPAR-γ induit le remodelage du tissu adipeux en affectant différemment dans chaque tissu le métabolisme des lipides. Ces modulations de la captation, de l'estérification, du stockage et de l'oxydation des AG dans les tissus adipeux se sont révélées être importantes dans l'amélioration de la lipémie.

Au cours des prochaines années, il serait intéressant d'approfondir les connaissances relatives aux mécanismes impliqués dans les effets des agonistes de PPAR- $\gamma$  sur la redistribution des graisses et l'amélioration de la lipémie. Par exemple, il serait intéressant d'évaluer le rôle de l'adiponectine dans ces effets des agonistes PPAR- $\gamma$ . L'observation d'un étroit parallèle entre la surexpression de l'adiponectine et le traitement avec les agonistes PPAR- $\gamma$  laisse présager que l'activation de la LPL, la réduction de la

triglycéridémie et la redistribution du tissu adipeux induites par la stimulation de PPAR-γ, puissent être causées en partie par l'augmentation des niveaux circulants d'adiponectine (Combs *et al.*, 2004). Le traitement de souris déficientes en adiponectine avec l'agoniste COOH nous permettrait de vérifier cette hypothèse.

Dans un autre ordre d'idées, il serait intéressant d'évaluer dans quelle mesure la stimulation de la biogenèse des mitochondries induite par l'agonisme de PPAR- $\gamma$  influence le métabolisme des substrats énergétiques dans le tissu adipeux. La mesure de la consommation d'oxygène par des adipocytes isolés à partir de tissus d'animaux contrôles ou traités au COOH, incubés en présence d'une dose croissante d'un agoniste  $\beta_3$ -adrénergique ou d'insuline, pourrait nous permettre de vérifier la fonctionnalité de ces cellules. Ces résultats, associés aux mesures in vivo de l'activité sympathique et thyroïdienne dans les tissus adipeux, pourraient nous permettre de mieux saisir l'impact de l'augmentation du potentiel oxydatif du tissu adipeux sur la redistribution des graisses et sur l'homéostasie énergétique.

Finalement, bien que les travaux présentés dans cette thèse montrent que l'agonisme de PPAR-γ favorise le remodelage du tissu adipeux en affectant différentiellement divers aspects du métabolisme des lipides dans les tissus adipeux, il reste que les mécanismes moléculaires précis à la base de ces effets ne sont pas connus. Plusieurs mécanismes pourraient être responsables de la spécificité d'action des agonistes PPAR-γ et mériteraient qu'on s'y attarde au cours des prochaines années. Tel que décrit dans l'introduction du présent ouvrage, il serait important d'identifier les cofacteurs nucléaires recrutés par PPAR-γ dans les tissus adipeux et d'évaluer dans quelle mesure ces cofacteurs sont impliqués dans la modulation différentielle de l'expression génique induite par les agonistes PPAR-γ. La mesure des niveaux de phosphorylation et de SUMOylation de PPAR-γ entre les tissus serait aussi intéressante puisque ces modifications post-traductionnelles représentent des éléments pouvant affecter le recrutement des cofacteurs nucléaires et l'activité de ce récepteur. L'identification de tels mécanismes moléculaires menant à l'activation différentielle de PPAR-γ sera utile afin de développer des modulateurs sélectifs de PPAR-γ (sPPARm, *selective PPAR modulator*) ayant le pouvoir de potentialiser les effets positifs et

de réduire les effets secondaires liés à l'agonisme de PPAR- $\gamma$ . Au-delà de toutes considérations pharmacologiques, ces travaux fourniront des informations cruciales nous permettant de mieux comprendre le métabolisme des diverses masses adipeuses et les mécanismes de base par lesquels ces tissus affectent différemment l'homéostasie métabolique.

## Conclusion

Les travaux décrits dans le présent ouvrage ont permis de mettre en lumière la spécificité d'action des agonistes PPAR-y sur le métabolime des différentes masses adipeuses. Les études décrites dans cette thèse ont permis d'identifier plusieurs déterminants du métabolisme des lipides impliqués dans la redistribution du tissu adipeux lors de l'utilisation d'un agoniste PPAR-y chez le rongeur. Ces études ont de plus permis de constater que les modulations du métabolisme du tissu adipeux induites par l'agonisme de PPAR-y sont intimement liées à l'amélioration de la triglycéridémie et des AGL circulants. Nous avons remarqué que l'augmentation de l'hydrolyse des TG liée à l'augmentation de l'activité de la LPL dans le tissu adipeux est très importante, mais non essentielle, à l'effet hypotriglycéridémiant de ces agonistes. Aussi, nous avons vu que, chez les rongeurs, le tissu adipeux brun représente une cible majeure des agonistes PPAR-y. Les profondes modifications du métabolisme de ce tissu menant à l'augmentation de la rétention des lipides pourraient expliquer en partie pourquoi ces agonistes sont plus efficaces à réduire la lipémie chez les rongeurs que chez les humains. Finalement, l'analyse des effets d'un agoniste PPAR-y sur la lipolyse du tissu adipeux ont permis de mieux comprendre par quels mécanismes ces agonistes réduisent les AGL circulants.

RÉFÉRENCES

Adams, M., Montague, C.T., Prins, J.B., Holder, J.C., Smith, S.A., Sanders, L., Digby, J.E., Sewter, C.P., Lazar, M.A., Chatterjee, V.K., *et al.* (1997a). Activators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma have depot-specific effects on human preadipocyte differentiation. J Clin Invest *100*, 3149-3153.

Adams, M., Reginato, M.J., Shao, D., Lazar, M.A., and Chatterjee, V.K. (1997b). Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated protein kinase site. J Biol Chem 272, 5128-5132.

Adeli, K., Taghibiglou, C., Van Iderstine, S.C., and Lewis, G.F. (2001). Mechanisms of hepatic very low-density lipoprotein overproduction in insulin resistance. Trends Cardiovasc Med 11, 170-176.

Adiels, M., Taskinen, M.R., Packard, C., Caslake, M.J., Soro-Paavonen, A., Westerbacka, J., Vehkavaara, S., Hakkinen, A., Olofsson, S.O., Yki-Jarvinen, H., *et al.* (2006). Overproduction of large VLDL particles is driven by increased liver fat content in man. Diabetologia 49, 755-765.

**Agarwal, A.K., and Garg, A. (2002)**. A novel heterozygous mutation in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene in a patient with familial partial lipodystrophy. J Clin Endocrinol Metab *87*, 408-411.

Akazawa, S., Sun, F., Ito, M., Kawasaki, E., and Eguchi, K. (2000). Efficacy of troglitazone on body fat distribution in type 2 diabetes. Diabetes Care 23, 1067-1071.

Al-Khalili, L., Forsgren, M., Kannisto, K., Zierath, J.R., Lonnqvist, F., and Krook, A. (2005). Enhanced insulin-stimulated glycogen synthesis in response to insulin, metformin or rosiglitazone is associated with increased mRNA expression of GLUT4 and peroxisomal proliferator activator receptor gamma co-activator 1. Diabetologia *48*, 1173-1179.

Aleo, M.D., Lundeen, G.R., Blackwell, D.K., Smith, W.M., Coleman, G.L., Stadnicki, S.W., and Kluwe, W.M. (2003). Mechanism and implications of brown adipose tissue proliferation in rats and monkeys treated with the thiazolidinedione darglitazone, a potent peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics *305*, 1173-1182.

Arimura, N., Horiba, T., Imagawa, M., Shimizu, M., and Sato, R. (2004). The peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates expression of the perilipin gene in adipocytes. J Biol Chem 279, 10070-10076.
Arioglu, E., Duncan-Morin, J., Sebring, N., Rother, K.I., Gottlieb, N., Lieberman, J., Herion, D., Kleiner, D.E., Reynolds, J., Premkumar, A., *et al.* (2000). Efficacy and safety of troglitazone in the treatment of lipodystrophy syndromes. Annals of internal medicine *133*, 263-274.

Arner, P. (2005). Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role. Best practice & research 19, 471-482.

Aronoff, S., Rosenblatt, S., Braithwaite, S., Egan, J.W., Mathisen, A.L., and Schneider, R.L. (2000). Pioglitazone hydrochloride monotherapy improves glycemic control in the treatment of patients with type 2 diabetes: a 6-month randomized placebocontrolled dose-response study. The Pioglitazone 001 Study Group. Diabetes Care 23, 1605-1611.

Assimacopoulos-Jeannet, F. (2004). Fat storage in pancreas and in insulin-sensitive tissues in pathogenesis of type 2 diabetes. Int J Obes Relat Metab Disord *28 Suppl 4*, S53-57.

Auboeuf, D., Rieusset, J., Fajas, L., Vallier, P., Frering, V., Riou, J.P., Staels, B., Auwerx, J., Laville, M., and Vidal, H. (1997). Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. Diabetes *46*, 1319-1327.

Auwerx, J. (1999). PPARgamma, the ultimate thrifty gene. Diabetologia 42, 1033-1049.

Bajaj, M., Suraamornkul, S., Piper, P., Hardies, L.J., Glass, L., Cersosimo, E., Pratipanawatr, T., Miyazaki, Y., and DeFronzo, R.A. (2004). Decreased plasma adiponectin concentrations are closely related to hepatic fat content and hepatic insulin resistance in pioglitazone-treated type 2 diabetic patients. J Clin Endocrinol Metab *89*, 200-206.

Bakopanos, E., and Silva, J.E. (2000). Thiazolidinediones inhibit the expression of beta3adrenergic receptors at a transcriptional level. Diabetes 49, 2108-2115.

**Bandyopadhyay, G.K., Yu, J.G., Ofrecio, J., and Olefsky, J.M. (2006)**. Increased malonyl-CoA levels in muscle from obese and type 2 diabetic subjects lead to decreased fatty acid oxidation and increased lipogenesis; thiazolidinedione treatment reverses these defects. Diabetes *55*, 2277-2285.

Banerjee, R.R., and Lazar, M.A. (2003). Resistin: molecular history and prognosis. J Mol Med 81, 218-226.

Barak, Y., Nelson, M.C., Ong, E.S., Jones, Y.Z., Ruiz-Lozano, P., Chien, K.R., Koder, A., and Evans, R.M. (1999). PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. Mol Cell *4*, 585-595.

Basu, A., Jensen, M.D., McCann, F., Mukhopadhyay, D., Joyner, M.J., and Rizza, R.A. (2006). Effects of pioglitazone versus glipizide on body fat distribution, body water content, and hemodynamics in type 2 diabetes. Diabetes Care 29, 510-514.

Beeson, M., Sajan, M.P., Dizon, M., Grebenev, D., Gomez-Daspet, J., Miura, A., Kanoh, Y., Powe, J., Bandyopadhyay, G., Standaert, M.L., *et al.* (2003). Activation of protein kinase C-zeta by insulin and phosphatidylinositol-3,4,5-(PO4)3 is defective in muscle in type 2 diabetes and impaired glucose tolerance: amelioration by rosiglitazone and exercise. Diabetes *52*, 1926-1934.

Belfort, R., Harrison, S.A., Brown, K., Darland, C., Finch, J., Hardies, J., Balas, B., Gastaldelli, A., Tio, F., Pulcini, J., *et al.* (2006). A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. N Engl J Med *355*, 2297-2307.

Berg, A.H., Combs, T.P., Du, X., Brownlee, M., and Scherer, P.E. (2001). The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. Nat Med 7, 947-953.

Berger, J., and Moller, D.E. (2002). The mechanisms of action of PPARs. Annu Rev Med 53, 409-435.

Bergo, M., Olivecrona, G., and Olivecrona, T. (1996). Forms of lipoprotein lipase in rat tissues: in adipose tissue the proportion of inactive lipase increases on fasting. Biochem J 313 (*Pt 3*), 893-898.

Bergo, M., Wu, G., Ruge, T., and Olivecrona, T. (2002). Down-regulation of adipose tissue lipoprotein lipase during fasting requires that a gene, separate from the lipase gene, is switched on. J Biol Chem 277, 11927-11932.

Berthiaume, M., Sell, H., Lalonde, J., Gelinas, Y., Tchernof, A., Richard, D., and Deshaies, Y. (2004). Actions of PPARgamma agonism on adipose tissue remodeling, insulin sensitivity, and lipemia in absence of glucocorticoids. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 287, R1116-1123.

Boden, G., Homko, C., Mozzoli, M., Showe, L.C., Nichols, C., and Cheung, P. (2005). Thiazolidinediones upregulate Fatty Acid uptake and oxidation in adipose tissue of diabetic patients. Diabetes 54, 880-885.

Bodles, A.M., Varma, V., Yao-Borengasser, A., Phanavanh, B., Peterson, C.A., McGehee, R.E., Jr., Rasouli, N., Wabitsch, M., and Kern, P.A. (2006). Pioglitazone induces apoptosis of macrophages in human adipose tissue. J Lipid Res 47, 2080-2088.

**Bogacka, I., Ukropcova, B., McNeil, M., Gimble, J.M., and Smith, S.R. (2005a)**. Structural and functional consequences of mitochondrial biogenesis in human adipocytes in vitro. J Clin Endocrinol Metab *90*, 6650-6656.

Bogacka, I., Xie, H., Bray, G.A., and Smith, S.R. (2004). The effect of pioglitazone on peroxisome proliferator-activated receptor-gamma target genes related to lipid storage in vivo. Diabetes Care 27, 1660-1667.

Bogacka, I., Xie, H., Bray, G.A., and Smith, S.R. (2005b). Pioglitazone induces mitochondrial biogenesis in human subcutaneous adipose tissue in vivo. Diabetes 54, 1392-1399.

Brasaemle, D.L., Rubin, B., Harten, I.A., Gruia-Gray, J., Kimmel, A.R., and Londos, C. (2000). Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis. J Biol Chem 275, 38486-38493.

**Breider, M.A., Gough, A.W., Haskins, J.R., Sobocinski, G., and de la Iglesia, F.A.** (1999). Troglitazone-induced heart and adipose tissue cell proliferation in mice. Toxicologic pathology *27*, 545-552.

Brooks, B., Arch, J.R., and Newsholme, E.A. (1982). Effects of hormones on the rate of the triacylglycerol/fatty acid substrate cycle in adipocytes and epididymal fat pads. FEBS Lett *146*, 327-330.

Buchanan, T.A., Xiang, A.H., Peters, R.K., Kjos, S.L., Marroquin, A., Goico, J., Ochoa, C., Tan, S., Berkowitz, K., Hodis, H.N., *et al.* (2002). Preservation of pancreatic beta-cell function and prevention of type 2 diabetes by pharmacological treatment of insulin resistance in high-risk hispanic women. Diabetes *51*, 2796-2803.

Burant, C.F., Sreenan, S., Hirano, K., Tai, T.A., Lohmiller, J., Lukens, J., Davidson, N.O., Ross, S., and Graves, R.A. (1997). Troglitazone action is independent of adipose tissue. J Clin Invest *100*, 2900-2908.

Burkey, B.F., Dong, M., Gagen, K., Eckhardt, M., Dragonas, N., Chen, W., Grosenstein, P., Argentieri, G., and de Souza, C.J. (2000). Effects of pioglitazone on promoting energy storage, not expenditure, in brown adipose tissue of obese fa/fa Zucker rats: comparison to CL 316,243. Metabolism 49, 1301-1308.

Cadoudal, T., Leroyer, S., Reis, A.F., Tordjman, J., Durant, S., Fouque, F., Collinet, M., Quette, J., Chauvet, G., Beale, E., *et al.* (2005). Proposed involvement of adipocyte glyceroneogenesis and phosphoenolpyruvate carboxykinase in the metabolic syndrome. Biochimie *87*, 27-32.

Camp, H.S., Li, O., Wise, S.C., Hong, Y.H., Frankowski, C.L., Shen, X., Vanbogelen, R., and Leff, T. (2000). Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma by troglitazone and rosiglitazone. Diabetes *49*, 539-547.

Cancello, R., Tordjman, J., Poitou, C., Guilhem, G., Bouillot, J.L., Hugol, D., Coussieu, C., Basdevant, A., Hen, A.B., Bedossa, P., *et al.* (2006). Increased infiltration of macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity. Diabetes 55, 1554-1561.

Cannon, B., and Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. Physiol Rev 84, 277-359.

Carey, D.G., Cowin, G.J., Galloway, G.J., Jones, N.P., Richards, J.C., Biswas, N., and Doddrell, D.M. (2002). Effect of rosiglitazone on insulin sensitivity and body composition in type 2 diabetic patients [corrected]. Obes Res *10*, 1008-1015.

Carpentier, A., Taghibiglou, C., Leung, N., Szeto, L., Van Iderstine, S.C., Uffelman, K.D., Buckingham, R., Adeli, K., and Lewis, G.F. (2002). Ameliorated hepatic insulin resistance is associated with normalization of microsomal triglyceride transfer protein expression and reduction in very low density lipoprotein assembly and secretion in the fructose-fed hamster. J Biol Chem 277, 28795-28802.

Carvalho-Filho, M.A., Ueno, M., Hirabara, S.M., Seabra, A.B., Carvalheira, J.B., de Oliveira, M.G., Velloso, L.A., Curi, R., and Saad, M.J. (2005). S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt: a novel mechanism of insulin resistance. Diabetes *54*, 959-967.

Castelein, H., Gulick, T., Declercq, P.E., Mannaerts, G.P., Moore, D.D., and Baes, M.I. (1994). The peroxisome proliferator activated receptor regulates malic enzyme gene expression. J Biol Chem *269*, 26754-26758.

Cavaghan, M.K., Ehrmann, D.A., Byrne, M.M., and Polonsky, K.S. (1997). Treatment with the oral antidiabetic agent troglitazone improves beta cell responses to glucose in subjects with impaired glucose tolerance. J Clin Invest *100*, 530-537.

Cha, B.S., Ciaraldi, T.P., Carter, L., Nikoulina, S.E., Mudaliar, S., Mukherjee, R., Paterniti, J.R., Jr., and Henry, R.R. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma and retinoid X receptor (RXR) agonists have complementary effects on glucose and lipid metabolism in human skeletal muscle. Diabetologia *44*, 444-452.

Chao, L., Marcus-Samuels, B., Mason, M.M., Moitra, J., Vinson, C., Arioglu, E., Gavrilova, O., and Reitman, M.L. (2000). Adipose tissue is required for the antidiabetic, but not for the hypolipidemic, effect of thiazolidinediones. J Clin Invest *106*, 1221-1228.

Chen, J.L., Peacock, E., Samady, W., Turner, S.M., Neese, R.A., Hellerstein, M.K., and Murphy, E.J. (2005). Physiologic and pharmacologic factors influencing glyceroneogenic contribution to triacylglyceride glycerol measured by mass isotopomer distribution analysis. J Biol Chem 280, 25396-25402.

Chicco, A., Basabe, J.C., Karabatas, L., Ferraris, N., Fortino, A., and Lombardo, Y.B. (2000). Troglitazone (CS-045) normalizes hypertriglyceridemia and restores the altered patterns of glucose-stimulated insulin secretion in dyslipidemic rats. Metabolism 49, 1346-1351.

Chinetti, G., Griglio, S., Antonucci, M., Torra, I.P., Delerive, P., Majd, Z., Fruchart, J.C., Chapman, J., Najib, J., and Staels, B. (1998). Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. J Biol Chem 273, 25573-25580.

Choo, H.J., Kim, J.H., Kwon, O.B., Lee, C.S., Mun, J.Y., Han, S.S., Yoon, Y.S., Yoon, G., Choi, K.M., and Ko, Y.G. (2006). Mitochondria are impaired in the adipocytes of type 2 diabetic mice. Diabetologia 49, 784-791.

Ciaraldi, T.P., Kong, A.P., Chu, N.V., Kim, D.D., Baxi, S., Loviscach, M., Plodkowski, R., Reitz, R., Caulfield, M., Mudaliar, S., *et al.* (2002). Regulation of glucose transport and insulin signaling by troglitazone or metformin in adipose tissue of type 2 diabetic subjects. Diabetes *51*, 30-36.

**Cnop, M., Hannaert, J.C., and Pipeleers, D.G. (2002)**. Troglitazone does not protect rat pancreatic beta cells against free fatty acid-induced cytotoxicity. Biochem Pharmacol *63*, 1281-1285.

**Coleman, T., Seip, R.L., Gimble, J.M., Lee, D., Maeda, N., and Semenkovich, C.F.** (1995). COOH-terminal disruption of lipoprotein lipase in mice is lethal in homozygotes, but heterozygotes have elevated triglycerides and impaired enzyme activity. J Biol Chem 270, 12518-12525.

**Combs, T.P., Berg, A.H., Obici, S., Scherer, P.E., and Rossetti, L. (2001)**. Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. J Clin Invest *108*, 1875-1881.

Combs, T.P., Pajvani, U.B., Berg, A.H., Lin, Y., Jelicks, L.A., Laplante, M., Nawrocki, A.R., Rajala, M.W., Parlow, A.F., Cheeseboro, L., *et al.* (2004). A transgenic mouse with a deletion in the collagenous domain of adiponectin displays elevated circulating adiponectin and improved insulin sensitivity. Endocrinology 145, 367-383.

Combs, T.P., Wagner, J.A., Berger, J., Doebber, T., Wang, W.J., Zhang, B.B., Tanen, M., Berg, A.H., O'Rahilly, S., Savage, D.B., *et al.* (2002). Induction of adipocyte complement-related protein of 30 kilodaltons by PPARgamma agonists: a potential mechanism of insulin sensitization. Endocrinology *143*, 998-1007.

Cooney, G.J., Thompson, A.L., Furler, S.M., Ye, J., and Kraegen, E.W. (2002). Muscle Long-Chain Acyl CoA Esters and Insulin Resistance. Ann N Y Acad Sci 967, 196-207.

Coort, S.L., Coumans, W.A., Bonen, A., van der Vusse, G.J., Glatz, J.F., and Luiken, J.J. (2005). Divergent effects of rosiglitazone on protein-mediated fatty acid uptake in adipose and in muscle tissues of Zucker rats. J Lipid Res 46, 1295-1302.

**Dalen, K.T., Schoonjans, K., Ulven, S.M., Weedon-Fekjaer, M.S., Bentzen, T.G., Koutnikova, H., Auwerx, J., and Nebb, H.I. (2004)**. Adipose Tissue Expression of the Lipid Droplet-Associating Proteins S3-12 and Perilipin Is Controlled by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma. Diabetes *53*, 1243-1252.

**Davies, G.F., Khandelwal, R.L., and Roesler, W.J. (1999)**. Troglitazone inhibits expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene by an insulin-independent mechanism. Biochim Biophys Acta *1451*, 122-131.

De Coppi, P., Milan, G., Scarda, A., Boldrin, L., Centobene, C., Piccoli, M., Pozzobon, M., Pilon, C., Pagano, C., Gamba, P., *et al.* (2006). Rosiglitazone modifies the adipogenic potential of human muscle satellite cells. Diabetologia *49*, 1962-1973.

de Souza, C.J., Eckhardt, M., Gagen, K., Dong, M., Chen, W., Laurent, D., and Burkey, B.F. (2001). Effects of pioglitazone on adipose tissue remodeling within the setting of obesity and insulin resistance. Diabetes *50*, 1863-1871.

de Souza, C.J., Yu, J.H., Robinson, D.D., Ulrich, R.G., and Meglasson, M.D. (1995). Insulin secretory defect in Zucker fa/fa rats is improved by ameliorating insulin resistance. Diabetes 44, 984-991.

De Vos, P., Lefebvre, A.M., Miller, S.G., Guerre-Millo, M., Wong, K., Saladin, R., Hamann, L.G., Staels, B., Briggs, M.R., and Auwerx, J. (1996). Thiazolidinediones repress ob gene expression in rodents via activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. J Clin Invest *98*, 1004-1009.

**Deng, T., Shan, S., Li, P.P., Shen, Z.F., Lu, X.P., Cheng, J., and Ning, Z.Q. (2006)**. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma transcriptionally up-regulates hormonesensitive lipase via the involvement of specificity protein-1. Endocrinology *147*, 875-884.

Després, J.P., and Lemieux, I. (2006). Abdominal obesity and metabolic syndrome. Nature 444, 881-887.

Després, J.P., Lemieux, I., and Prud'homme, D. (2001). Treatment of obesity: need to focus on high risk abdominally obese patients. Bmj 322, 716-720.

**Desvergne, B., and Wahli, W. (1999)**. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. Endocr Rev 20, 649-688.

**Di Gregorio, G.B., Yao-Borengasser, A., Rasouli, N., Varma, V., Lu, T., Miles, L.M., Ranganathan, G., Peterson, C.A., McGehee, R.E., and Kern, P.A. (2005).** Expression of CD68 and macrophage chemoattractant protein-1 genes in human adipose and muscle tissues: association with cytokine expression, insulin resistance, and reduction by pioglitazone. Diabetes *54*, 2305-2313.

**Diani, A.R., Sawada, G., Wyse, B., Murray, F.T., and Khan, M. (2004)**. Pioglitazone preserves pancreatic islet structure and insulin secretory function in three murine models of type 2 diabetes. Am J Physiol Endocrinol Metab *286*, E116-122.

**Diradourian, C., Girard, J., and Pegorier, J.P. (2005)**. Phosphorylation of PPARs: from molecular characterization to physiological relevance. Biochimie *87*, 33-38.

**Doolittle, M.H., Ben-Zeev, O., Elovson, J., Martin, D., and Kirchgessner, T.G. (1990)**. The response of lipoprotein lipase to feeding and fasting. Evidence for posttranslational regulation. J Biol Chem *265*, 4570-4577.

**Dressel, U., Allen, T.L., Pippal, J.B., Rohde, P.R., Lau, P., and Muscat, G.E. (2003)**. The peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta agonist, GW501516, regulates the expression of genes involved in lipid catabolism and energy uncoupling in skeletal muscle cells. Mol Endocrinol *17*, 2477-2493.

**Dubois, M., Pattou, F., Kerr-Conte, J., Gmyr, V., Vandewalle, B., Desreumaux, P., Auwerx, J., Schoonjans, K., and Lefebvre, J. (2000)**. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in normal human pancreatic islet cells. Diabetologia *43*, 1165-1169.

**Duplus, E., Benelli, C., Reis, A.F., Fouque, F., Velho, G., and Forest, C. (2003)**. Expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in human adipose tissue: induction by rosiglitazone and genetic analyses of the adipocyte-specific region of the promoter in type 2 diabetes. Biochimie *85*, 1257-1264.

el-Kebbi, I.M., Roser, S., and Pollet, R.J. (1994). Regulation of glucose transport by pioglitazone in cultured muscle cells. Metabolism 43, 953-958.

Elchebly, M., Payette, P., Michaliszyn, E., Cromlish, W., Collins, S., Loy, A.L., Normandin, D., Cheng, A., Himms-Hagen, J., Chan, C.C., *et al.* (1999). Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. Science 283, 1544-1548.

Escher, P., Braissant, O., Basu-Modak, S., Michalik, L., Wahli, W., and Desvergne, B. (2001). Rat PPARs: quantitative analysis in adult rat tissues and regulation in fasting and refeeding. Endocrinology *142*, 4195-4202.

Evans, R.M., Barish, G.D., and Wang, Y.X. (2004). PPARs and the complex journey to obesity. Nat Med 10, 355-361.

Fajas, L., Auboeuf, D., Raspe, E., Schoonjans, K., Lefebvre, A.M., Saladin, R., Najib, J., Laville, M., Fruchart, J.C., Deeb, S., *et al.* (1997). The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. J Biol Chem *272*, 18779-18789.

Fajas, L., Debril, M.B., and Auwerx, J. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma: from adipogenesis to carcinogenesis. Journal of molecular endocrinology 27, 1-9.

Fajas, L., Fruchart, J.C., and Auwerx, J. (1998). PPARgamma3 mRNA: a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter. FEBS Lett 438, 55-60.

Feldt, T., Oette, M., Kroidl, A., Goebels, K., Fritzen, R., Kambergs, J., Kappert, G., Vogt, C., Wettstein, M., and Haussinger, D. (2006). Evaluation of Safety and Efficacy of Rosiglitazone in the Treatment of HIV-Associated Lipodystrophy Syndrome. Infection *34*, 55-61.

Finegood, D.T., McArthur, M.D., Kojwang, D., Thomas, M.J., Topp, B.G., Leonard, T., and Buckingham, R.E. (2001). Beta-cell mass dynamics in Zucker diabetic fatty rats. Rosiglitazone prevents the rise in net cell death. Diabetes *50*, 1021-1029.

Floyd, Z.E., and Stephens, J.M. (2004). Control of peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 stability and activity by SUMOylation. Obes Res 12, 921-928.

Foellmi-Adams, L.A., Wyse, B.M., Herron, D., Nedergaard, J., and Kletzien, R.F. (1996). Induction of uncoupling protein in brown adipose tissue. Synergy between norepinephrine and pioglitazone, an insulin-sensitizing agent. Biochem Pharmacol 52, 693-701.

**Fonseca, V.A., Valiquett, T.R., Huang, S.M., Ghazzi, M.N., and Whitcomb, R.W.** (1998). Troglitazone monotherapy improves glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized, controlled study. The Troglitazone Study Group. J Clin Endocrinol Metab *83*, 3169-3176.

Franckhauser, S., Munoz, S., Pujol, A., Casellas, A., Riu, E., Otaegui, P., Su, B., and Bosch, F. (2002). Increased fatty acid re-esterification by PEPCK overexpression in adipose tissue leads to obesity without insulin resistance. Diabetes *51*, 624-630.

Freedman, B.D., Lee, E.J., Park, Y., and Jameson, J.L. (2005). A dominant negative peroxisome proliferator-activated receptor-gamma knock-in mouse exhibits features of the metabolic syndrome. J Biol Chem 280, 17118-17125.

**Frohnert, B.I., Hui, T.Y., and Bernlohr, D.A. (1999)**. Identification of a functional peroxisome proliferator-responsive element in the murine fatty acid transport protein gene. J Biol Chem *274*, 3970-3977.

**Fryer, L.G., Parbu-Patel, A., and Carling, D. (2002)**. The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. J Biol Chem *277*, 25226-25232.

Gasic, S., Tian, B., and Green, A. (1999). Tumor necrosis factor alpha stimulates lipolysis in adipocytes by decreasing Gi protein concentrations. J Biol Chem 274, 6770-6775.

Gastaldelli, A., Miyazaki, Y., Mahankali, A., Berria, R., Pettiti, M., Buzzigoli, E., Ferrannini, E., and DeFronzo, R.A. (2006a). The effect of pioglitazone on the liver: role of adiponectin. Diabetes Care 29, 2275-2281.

Gastaldelli, A., Miyazaki, Y., Pettiti, M., Santini, E., Ciociaro, D., Defronzo, R.A., and Ferrannini, E. (2006b). The effect of rosiglitazone on the liver: decreased gluconeogenesis in patients with type 2 diabetes. J Clin Endocrinol Metab *91*, 806-812.

Gavrilova, O., Haluzik, M., Matsusue, K., Cutson, J.J., Johnson, L., Dietz, K.R., Nicol, C.J., Vinson, C., Gonzalez, F.J., and Reitman, M.L. (2003). Liver peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass. J Biol Chem 278, 34268-34276.

Gelato, M.C., Mynarcik, D.C., Quick, J.L., Steigbigel, R.T., Fuhrer, J., Brathwaite, C.E., Brebbia, J.S., Wax, M.R., and McNurlan, M.A. (2002). Improved insulin sensitivity and body fat distribution in HIV-infected patients treated with rosiglitazone: a pilot study. J Acquir Immune Defic Syndr *31*, 163-170.

Genest, J. (2003). Lipoprotein disorders and cardiovascular risk. Journal of inherited metabolic disease 26, 267-287.

Germack, R., Starzec, A.B., Vassy, R., and Perret, G.Y. (1997). Beta-adrenoceptor subtype expression and function in rat white adipocytes. British journal of pharmacology *120*, 201-210.

Gibbons, G.F., Bartlett, S.M., Sparks, C.E., and Sparks, J.D. (1992). Extracellular fatty acids are not utilized directly for the synthesis of very-low-density lipoprotein in primary cultures of rat hepatocytes. Biochem J 287 (*Pt 3*), 749-753.

Gibbons, G.F., Wiggins, D., Brown, A.M., and Hebbachi, A.M. (2004). Synthesis and function of hepatic very-low-density lipoprotein. Biochem Soc Trans 32, 59-64.

Ginsberg, H.N., Zhang, Y.L., and Hernandez-Ono, A. (2005). Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes. Archives of medical research *36*, 232-240.

Girard, J. (2001). [Mechanisms of action of thiazolidinediones]. Diabetes Metab 27, 271-278.

Giusti, V., Verdumo, C., Suter, M., Gaillard, R.C., Burckhardt, P., and Pralong, F. (2003). Expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma1 and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 in visceral and subcutaneous adipose tissue of obese women. Diabetes *52*, 1673-1676.

Goldberg, I.J., and Merkel, M. (2001). Lipoprotein lipase: physiology, biochemistry, and molecular biology. Front Biosci 6, D388-405.

Goto, T., Onuma, T., Takebe, K., and Kral, J.G. (1995). The influence of fatty liver on insulin clearance and insulin resistance in non-diabetic Japanese subjects. Int J Obes Relat Metab Disord *19*, 841-845.

Gray, S.L., Dalla Nora, E., and Vidal-Puig, A.J. (2005). Mouse models of PPAR-gamma deficiency: dissecting PPAR-gamma's role in metabolic homoeostasis. Biochem Soc Trans *33*, 1053-1058.

Green, A., Dobias, S.B., Walters, D.J., and Brasier, A.R. (1994). Tumor necrosis factor increases the rate of lipolysis in primary cultures of adipocytes without altering levels of hormone-sensitive lipase. Endocrinology 134, 2581-2588.

Greenwood, M.R. (1985). The relationship of enzyme activity to feeding behavior in rats: lipoprotein lipase as the metabolic gatekeeper. Int J Obes *9 Suppl 1*, 67-70.

Grohmann, M., Sabin, M., Holly, J., Shield, J., Crowne, E., and Stewart, C. (2005). Characterization of differentiated subcutaneous and visceral adipose tissue from children: the influences of TNF-alpha and IGF-I. J Lipid Res *46*, 93-103. Guan, H.P., Ishizuka, T., Chui, P.C., Lehrke, M., and Lazar, M.A. (2005). Corepressors selectively control the transcriptional activity of PPARgamma in adipocytes. Genes Dev 19, 453-461.

Guan, H.P., Li, Y., Jensen, M.V., Newgard, C.B., Steppan, C.M., and Lazar, M.A. (2002). A futile metabolic cycle activated in adipocytes by antidiabetic agents. Nat Med 8, 1122-1128.

Hallakou, S., Doare, L., Foufelle, F., Kergoat, M., Guerre-Millo, M., Berthault, M.F., Dugail, I., Morin, J., Auwerx, J., and Ferre, P. (1997). Pioglitazone induces in vivo adipocyte differentiation in the obese Zucker fa/fa rat. Diabetes *46*, 1393-1399.

Hallsten, K., Virtanen, K.A., Lonnqvist, F., Sipila, H., Oksanen, A., Viljanen, T., Ronnemaa, T., Viikari, J., Knuuti, J., and Nuutila, P. (2002). Rosiglitazone but not metformin enhances insulin- and exercise-stimulated skeletal muscle glucose uptake in patients with newly diagnosed type 2 diabetes. Diabetes *51*, 3479-3485.

Hayakawa, T., Shiraki, T., Morimoto, T., Shii, K., and Ikeda, H. (1996). Pioglitazone improves insulin signaling defects in skeletal muscle from Wistar fatty (fa/fa) rats. Biochem Biophys Res Commun 223, 439-444.

He, W., Barak, Y., Hevener, A., Olson, P., Liao, D., Le, J., Nelson, M., Ong, E., Olefsky, J.M., and Evans, R.M. (2003). Adipose-specific peroxisome proliferatoractivated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 15712-15717.

Helledie, T., Grontved, L., Jensen, S.S., Kiilerich, P., Rietveld, L., Albrektsen, T., Boysen, M.S., Nohr, J., Larsen, L.K., Fleckner, J., *et al.* (2002). The gene encoding the Acyl-CoA-binding protein is activated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma through an intronic response element functionally conserved between humans and rodents. J Biol Chem 277, 26821-26830.

Hernandez, R., Teruel, T., de Alvaro, C., and Lorenzo, M. (2004). Rosiglitazone ameliorates insulin resistance in brown adipocytes of Wistar rats by impairing TNF-alpha induction of p38 and p42/p44 mitogen-activated protein kinases. Diabetologia 47, 1615-1624.

Hernandez, R., Teruel, T., and Lorenzo, M. (2003). Rosiglitazone produces insulin sensitisation by increasing expression of the insulin receptor and its tyrosine kinase activity in brown adipocytes. Diabetologia 46, 1618-1628.

Hevener, A.L., He, W., Barak, Y., Le, J., Bandyopadhyay, G., Olson, P., Wilkes, J., Evans, R.M., and Olefsky, J. (2003). Muscle-specific Pparg deletion causes insulin resistance. Nat Med 9, 1491-1497.

Hevener, A.L., Reichart, D., Janez, A., and Olefsky, J. (2001). Thiazolidinedione treatment prevents free fatty acid-induced insulin resistance in male wistar rats. Diabetes *50*, 2316-2322.

Hirose, H., Kawai, T., Yamamoto, Y., Taniyama, M., Tomita, M., Matsubara, K., Okazaki, Y., Ishii, T., Oguma, Y., Takei, I., *et al.* (2002). Effects of pioglitazone on metabolic parameters, body fat distribution, and serum adiponectin levels in Japanese male patients with type 2 diabetes. Metabolism *51*, 314-317.

Hockings, P.D., Changani, K.K., Saeed, N., Reid, D.G., Birmingham, J., O'Brien, P., Osborne, J., Toseland, C.N., and Buckingham, R.E. (2003). Rapid reversal of hepatic steatosis, and reduction of muscle triglyceride, by rosiglitazone: MRI/S studies in Zucker fatty rats. Diabetes Obes Metab 5, 234-243.

Hofmann, C., Lorenz, K., Braithwaite, S.S., Colca, J.R., Palazuk, B.J., Hotamisligil, G.S., and Spiegelman, B.M. (1994). Altered gene expression for tumor necrosis factoralpha and its receptors during drug and dietary modulation of insulin resistance. Endocrinology 134, 264-270.

Hokanson, J.E., and Austin, M.A. (1996). Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies. Journal of cardiovascular risk *3*, 213-219.

Holm, C., Osterlund, T., Laurell, H., and Contreras, J.A. (2000). Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. Annu Rev Nutr 20, 365-393.

Hondares, E., Mora, O., Yubero, P., Rodriguez de la Concepcion, M., Iglesias, R., Giralt, M., and Villarroya, F. (2006). Thiazolidinediones and rexinoids induce peroxisome proliferator-activated receptor-coactivator (PGC)-1alpha gene transcription: an autoregulatory loop controls PGC-1alpha expression in adipocytes via peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivation. Endocrinology *147*, 2829-2838.

Honnor, R.C., Dhillon, G.S., and Londos, C. (1985). cAMP-dependent protein kinase and lipolysis in rat adipocytes. II. Definition of steady-state relationship with lipolytic and antilipolytic modulators. J Biol Chem *260*, 15130-15138.

Hotamisligil, G.S. (2003). The irresistible biology of resistin. J Clin Invest 111, 173-174.

Hotamisligil, G.S., Murray, D.L., Choy, L.N., and Spiegelman, B.M. (1994). Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. Proc Natl Acad Sci U S A *91*, 4854-4858.

Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S., and Spiegelman, B.M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. Science 259, 87-91.

Hu, E., Kim, J.B., Sarraf, P., and Spiegelman, B.M. (1996). Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPARgamma. Science 274, 2100-2103.

**Hussain, M.M. (2000)**. A proposed model for the assembly of chylomicrons. Atherosclerosis *148*, 1-15.

Hussain, M.M., Kancha, R.K., Zhou, Z., Luchoomun, J., Zu, H., and Bakillah, A. (1996). Chylomicron assembly and catabolism: role of apolipoproteins and receptors. Biochim Biophys Acta 1300, 151-170.

Hutley, L.J., Newell, F.M., Joyner, J.M., Suchting, S.J., Herington, A.C., Cameron, D.P., and Prins, J.B. (2003). Effects of rosiglitazone and linoleic acid on human preadipocyte differentiation. Eur J Clin Invest *33*, 574-581.

**Iijima, K., Yoshizumi, M., Ako, J., Eto, M., Kim, S., Hashimoto, M., Sugimoto, N., Liang, Y.Q., Sudoh, N., Toba, K.,** *et al.* **(1998). Expression of peroxisome proliferatoractivated receptor gamma (PPARgamma) in rat aortic smooth muscle cells. Biochem Biophys Res Commun 247, 353-356.** 

Imai, T., Takakuwa, R., Marchand, S., Dentz, E., Bornert, J.M., Messaddeq, N., Wendling, O., Mark, M., Desvergne, B., Wahli, W., *et al.* (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is required in mature white and brown adipocytes for their survival in the mouse. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 4543-4547.

**Inoue, I., Takahashi, K., Katayama, S., Harada, Y., Negishi, K., Itabashi, A., and Ishii, J. (1995)**. Effect of troglitazone (CS-045) and bezafibrate on glucose tolerance, liver glycogen synthase activity, and beta-oxidation in fructose-fed rats. Metabolism *44*, 1626-1630.

**Iozzo, P., Hallsten, K., Oikonen, V., Virtanen, K.A., Parkkola, R., Kemppainen, J., Solin, O., Lonnqvist, F., Ferrannini, E., Knuuti, J., et al. (2003).** Effects of metformin and rosiglitazone monotherapy on insulin-mediated hepatic glucose uptake and their relation to visceral fat in type 2 diabetes. Diabetes Care 26, 2069-2074.

James, P.T. (2004). Obesity: the worldwide epidemic. Clin Dermatol 22, 276-280.

Jiang, G., Dallas-Yang, Q., Li, Z., Szalkowski, D., Liu, F., Shen, X., Wu, M., Zhou, G., Doebber, T., Berger, J., *et al.* (2002). Potentiation of insulin signaling in tissues of Zucker obese rats after acute and long-term treatment with PPARgamma agonists. Diabetes *51*, 2412-2419.

**Jitrapakdee, S., Slawik, M., Medina-Gomez, G., Campbell, M., Wallace, J.C., Sethi, J.K., O'Rahilly, S., and Vidal-Puig, A.J. (2005)**. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma regulates murine pyruvate carboxylase gene expression in vivo and in vitro. J Biol Chem *280*, 27466-27476.

Jones, J.R., Barrick, C., Kim, K.A., Lindner, J., Blondeau, B., Fujimoto, Y., Shiota, M., Kesterson, R.A., Kahn, B.B., and Magnuson, M.A. (2005). Deletion of PPARgamma in adipose tissues of mice protects against high fat diet-induced obesity and insulin resistance. Proc Natl Acad Sci U S A *102*, 6207-6212.

Jucker, B.M., Schaeffer, T.R., Haimbach, R.E., Mayer, M.E., Ohlstein, D.H., Smith, S.A., Cobitz, A.R., and Sarkar, S.K. (2003). Reduction of intramyocellular lipid following short-term rosiglitazone treatment in Zucker fatty rats: an in vivo nuclear magnetic resonance study. Metabolism *52*, 218-225.

Jucker, B.M., Schaeffer, T.R., Haimbach, R.E., McIntosh, T.S., Chun, D., Mayer, M., Ohlstein, D.H., Davis, H.M., Smith, S.A., Cobitz, A.R., *et al.* (2002). Normalization of skeletal muscle glycogen synthesis and glycolysis in rosiglitazone-treated Zucker fatty rats: an in vivo nuclear magnetic resonance study. Diabetes *51*, 2066-2073.

Julius, U. (2003). Influence of plasma free fatty acids on lipoprotein synthesis and diabetic dyslipidemia. Exp Clin Endocrinol Diabetes 111, 246-250.

Kageyama, H., Hirano, T., Okada, K., Ebara, T., Kageyama, A., Murakami, T., Shioda, S., and Adachi, M. (2003). Lipoprotein lipase mRNA in white adipose tissue but not in skeletal muscle is increased by pioglitazone through PPAR-gamma. Biochem Biophys Res Commun 305, 22-27.

**Kahn, S.E. (2003)**. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. Diabetologia *46*, 3-19.

Kalderon, B., Mayorek, N., Ben-Yaacov, L., and Bar-Tana, J. (2003). Adipose tissue sensitization to insulin induced by troglitazone and MEDICA 16 in obese Zucker rats in vivo. Am J Physiol Endocrinol Metab 284, E795-803.

Kallen, C.B., and Lazar, M.A. (1996). Antidiabetic thiazolidinediones inhibit leptin (ob) gene expression in 3T3-L1 adipocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 93, 5793-5796.

Kanda, H., Tateya, S., Tamori, Y., Kotani, K., Hiasa, K., Kitazawa, R., Kitazawa, S., Miyachi, H., Maeda, S., Egashira, K., *et al.* (2006). MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. J Clin Invest *116*, 1494-1505.

Kannel, W.B., Cupples, L.A., Ramaswami, R., Stokes, J., 3rd, Kreger, B.E., and Higgins, M. (1991). Regional obesity and risk of cardiovascular disease; the Framingham Study. Journal of clinical epidemiology 44, 183-190.

Kanoh, Y., Bandyopadhyay, G., Sajan, M.P., Standaert, M.L., and Farese, R.V. (2000). Thiazolidinedione treatment enhances insulin effects on protein kinase C-zeta /lambda activation and glucose transport in adipocytes of nondiabetic and Goto-Kakizaki type II diabetic rats. J Biol Chem 275, 16690-16696.

Karlsson, H.K., Hallsten, K., Bjornholm, M., Tsuchida, H., Chibalin, A.V., Virtanen, K.A., Heinonen, O.J., Lonnqvist, F., Nuutila, P., and Zierath, J.R. (2005). Effects of metformin and rosiglitazone treatment on insulin signaling and glucose uptake in patients with newly diagnosed type 2 diabetes: a randomized controlled study. Diabetes 54, 1459-1467.

Kaumi, T., Hirano, T., Odaka, H., Ebara, T., Amano, N., Hozumi, T., Ishida, Y., and Yoshino, G. (1996). VLDL triglyceride kinetics in Wistar fatty rats, an animal model of NIDDM: effects of dietary fructose alone or in combination with pioglitazone. Diabetes 45, 806-811.

Kawai, T., Takei, I., Oguma, Y., Ohashi, N., Tokui, M., Oguchi, S., Katsukawa, F., Hirose, H., Shimada, A., Watanabe, K., *et al.* (1999). Effects of troglitazone on fat distribution in the treatment of male type 2 diabetes. Metabolism *48*, 1102-1107.

Kelly, I.E., Han, T.S., Walsh, K., and Lean, M.E. (1999). Effects of a thiazolidinedione compound on body fat and fat distribution of patients with type 2 diabetes. Diabetes Care 22, 288-293.

Kelly, L.J., Vicario, P.P., Thompson, G.M., Candelore, M.R., Doebber, T.W., Ventre, J., Wu, M.S., Meurer, R., Forrest, M.J., Conner, M.W., *et al.* (1998). Peroxisome proliferator-activated receptors gamma and alpha mediate in vivo regulation of uncoupling protein (UCP-1, UCP-2, UCP-3) gene expression. Endocrinology *139*, 4920-4927.

Kershaw, E.E., and Flier, J.S. (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. J Clin Endocrinol Metab 89, 2548-2556.

Kershaw, E.E., Hamm, J.K., Verhagen, L.A., Peroni, O., Katic, M., and Flier, J.S. (2006). Adipose triglyceride lipase: function, regulation by insulin, and comparison with adiponutrin. Diabetes 55, 148-157.

Kersten, S., Seydoux, J., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., Desvergne, B., and Wahli, W. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. J Clin Invest *103*, 1489-1498.

Kim, H.I., and Ahn, Y.H. (2004). Role of peroxisome proliferator-activated receptorgamma in the glucose-sensing apparatus of liver and beta-cells. Diabetes *53 Suppl 1*, S60-65.

Kim, H.I., Cha, J.Y., Kim, S.Y., Kim, J.W., Roh, K.J., Seong, J.K., Lee, N.T., Choi, K.Y., Kim, K.S., and Ahn, Y.H. (2002a). Peroxisomal proliferator-activated receptorgamma upregulates glucokinase gene expression in beta-cells. Diabetes *51*, 676-685.

Kim, H.I., Kim, J.W., Kim, S.H., Cha, J.Y., Kim, K.S., and Ahn, Y.H. (2000). Identification and functional characterization of the peroxisomal proliferator response element in rat GLUT2 promoter. Diabetes *49*, 1517-1524.

**Kim, J.Y., Tillison, K., Lee, J.H., Rearick, D.A., and Smas, C.M. (2006)**. The adipose tissue triglyceride lipase ATGL/PNPLA2 is downregulated by insulin and TNF-alpha in 3T3-L1 adipocytes and is a target for transactivation by PPARgamma. Am J Physiol Endocrinol Metab *291*, E115-127.

Kim, S.Y., Kim, H.I., Park, S.K., Im, S.S., Li, T., Cheon, H.G., and Ahn, Y.H. (2004). Liver glucokinase can be activated by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. Diabetes *53 Suppl 1*, S66-70.

Kim, Y.B., Ciaraldi, T.P., Kong, A., Kim, D., Chu, N., Mohideen, P., Mudaliar, S., Henry, R.R., and Kahn, B.B. (2002b). Troglitazone but not metformin restores insulinstimulated phosphoinositide 3-kinase activity and increases p110beta protein levels in skeletal muscle of type 2 diabetic subjects. Diabetes *51*, 443-448.

**King, A.B. (2000)**. A comparison in a clinical setting of the efficacy and side effects of three thiazolidinediones. Diabetes Care 23, 557.

Kintscher, U., and Law, R.E. (2005). PPARgamma-mediated insulin sensitization: the importance of fat versus muscle. Am J Physiol Endocrinol Metab 288, E287-291.

Kissebah, A.H., Vydelingum, N., Murray, R., Evans, D.J., Hartz, A.J., Kalkhoff, R.K., and Adams, P.W. (1982). Relation of body fat distribution to metabolic complications of obesity. J Clin Endocrinol Metab 54, 254-260.

Klingenspor, M. (2003). Cold-induced recruitment of brown adipose tissue thermogenesis. Experimental physiology 88, 141-148.

Kobayashi, M., Iwanishi, M., Egawa, K., and Shigeta, Y. (1992). Pioglitazone increases insulin sensitivity by activating insulin receptor kinase. Diabetes *41*, 476-483.

Konrad, D., Rudich, A., Bilan, P.J., Patel, N., Richardson, C., Witters, L.A., and Klip, A. (2005). Troglitazone causes acute mitochondrial membrane depolarisation and an AMPK-mediated increase in glucose phosphorylation in muscle cells. Diabetologia 48, 954-966.

Kook, S.H., Choi, K.C., Son, Y.O., Lee, K.Y., Hwang, I.H., Lee, H.J., Chang, J.S., Choi, I.H., and Lee, J.C. (2006). Satellite cells isolated from adult Hanwoo muscle can proliferate and differentiate into myoblasts and adipose-like cells. Molecules and cells 22, 239-245.

Koster, A., Chao, Y.B., Mosior, M., Ford, A., Gonzalez-DeWhitt, P.A., Hale, J.E., Li, D., Qiu, Y., Fraser, C.C., Yang, D.D., *et al.* (2005). Transgenic angiopoietin-like (angptl)4 overexpression and targeted disruption of angptl4 and angptl3: regulation of triglyceride metabolism. Endocrinology *146*, 4943-4950.

Koutnikova, H., Cock, T.A., Watanabe, M., Houten, S.M., Champy, M.F., Dierich, A., and Auwerx, J. (2003). Compensation by the muscle limits the metabolic consequences of lipodystrophy in PPAR gamma hypomorphic mice. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 14457-14462.

Kratky, D., Zimmermann, R., Wagner, E.M., Strauss, J.G., Jin, W., Kostner, G.M., Haemmerle, G., Rader, D.J., and Zechner, R. (2005). Endothelial lipase provides an alternative pathway for FFA uptake in lipoprotein lipase-deficient mouse adipose tissue. J Clin Invest *115*, 161-167.

Krogsdam, A.M., Nielsen, C.A., Neve, S., Holst, D., Helledie, T., Thomsen, B., Bendixen, C., Mandrup, S., and Kristiansen, K. (2002). Nuclear receptor corepressordependent repression of peroxisome-proliferator-activated receptor delta-mediated transactivation. Biochem J 363, 157-165.

Krotkiewski, M., Bjorntorp, P., Sjostrom, L., and Smith, U. (1983). Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution. J Clin Invest 72, 1150-1162.

**Kubo, K. (2002)**. Effect of pioglitazone on blood proinsulin levels in patients with type 2 diabetes mellitus. Endocrine journal *49*, 323-328.

Kubota, N., Terauchi, Y., Kubota, T., Kumagai, H., Itoh, S., Satoh, H., Yano, W., Ogata, H., Tokuyama, K., Takamoto, I., *et al.* (2006). Pioglitazone ameliorates insulin resistance and diabetes by both adiponectin-dependent and -independent pathways. J Biol Chem 281, 8748-8755.

Kuhlmann, J., Neumann-Haefelin, C., Belz, U., Kalisch, J., Juretschke, H.P., Stein, M., Kleinschmidt, E., Kramer, W., and Herling, A.W. (2003). Intramyocellular lipid and insulin resistance: a longitudinal in vivo 1H-spectroscopic study in Zucker diabetic fatty rats. Diabetes *52*, 138-144.

Kumar, N., and Dey, C.S. (2003). Development of insulin resistance and reversal by thiazolidinediones in C2C12 skeletal muscle cells. Biochem Pharmacol 65, 249-257.

Lass, A., Zimmermann, R., Haemmerle, G., Riederer, M., Schoiswohl, G., Schweiger, M., Kienesberger, P., Strauss, J.G., Gorkiewicz, G., and Zechner, R. (2006). Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. Cell Metab *3*, 309-319.

LeBrasseur, N.K., Kelly, M., Tsao, T.S., Farmer, S.R., Saha, A.K., Ruderman, N.B., and Tomas, E. (2006). Thiazolidinediones can rapidly activate AMP-activated protein kinase in mammalian tissues. Am J Physiol Endocrinol Metab 291, E175-181.

Lee, J.J., Smith, P.J., and Fried, S.K. (1998). Mechanisms of decreased lipoprotein lipase activity in adipocytes of starved rats depend on duration of starvation. J Nutr 128, 940-946.

Lefebvre, A.M., Laville, M., Vega, N., Riou, J.P., van Gaal, L., Auwerx, J., and Vidal, H. (1998). Depot-specific differences in adipose tissue gene expression in lean and obese subjects. Diabetes 47, 98-103.

Lefebvre, A.M., Peinado-Onsurbe, J., Leitersdorf, I., Briggs, M.R., Paterniti, J.R., Fruchart, J.C., Fievet, C., Auwerx, J., and Staels, B. (1997). Regulation of lipoprotein metabolism by thiazolidinediones occurs through a distinct but complementary mechanism relative to fibrates. Arterioscler Thromb Vasc Biol 17, 1756-1764.

Leroyer, S.N., Tordjman, J., Chauvet, G., Quette, J., Chapron, C., Forest, C., and Antoine, B. (2006). Rosiglitazone controls fatty acid cycling in human adipose tissue by means of glyceroneogenesis and glycerol phosphorylation. J Biol Chem 281, 13141-13149.

Lessard, S.J., Chen, Z.P., Watt, M.J., Hashem, M., Reid, J.J., Febbraio, M.A., Kemp, B.E., and Hawley, J.A. (2006). Chronic rosiglitazone treatment restores AMPKalpha2 activity in insulin-resistant rat skeletal muscle. Am J Physiol Endocrinol Metab 290, E251-257.

Lessard, S.J., Lo Giudice, S.L., Lau, W., Reid, J.J., Turner, N., Febbraio, M.A., Hawley, J.A., and Watt, M.J. (2004). Rosiglitazone enhances glucose tolerance by mechanisms other than reduction of fatty acid accumulation within skeletal muscle. Endocrinology 145, 5665-5670.

Levak-Frank, S., Hofmann, W., Weinstock, P.H., Radner, H., Sattler, W., Breslow, J.L., and Zechner, R. (1999). Induced mutant mouse lines that express lipoprotein lipase in cardiac muscle, but not in skeletal muscle and adipose tissue, have normal plasma triglyceride and high-density lipoprotein-cholesterol levels. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 3165-3170.

Lewis, G.F. (1997). Fatty acid regulation of very low density lipoprotein production. Curr Opin Lipidol 8, 146-153.

Lewis, G.F., Carpentier, A., Adeli, K., and Giacca, A. (2002). Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. Endocr Rev 23, 201-229.

Li, C. (2006). Genetics and regulation of angiopoietin-like proteins 3 and 4. Curr Opin Lipidol 17, 152-156.

Li, X., Hansen, P.A., Xi, L., Chandraratna, R.A., and Burant, C.F. (2005). Distinct mechanisms of glucose lowering by specific agonists for peroxisomal proliferator activated receptor gamma and retinoic acid X receptors. J Biol Chem 280, 38317-38327.

Lin, C.Y., Gurlo, T., Haataja, L., Hsueh, W.A., and Butler, P.C. (2005a). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma by rosiglitazone protects human islet cells against human islet amyloid polypeptide toxicity by a phosphatidylinositol 3'-kinase-dependent pathway. J Clin Endocrinol Metab *90*, 6678-6686.

Lin, J., Handschin, C., and Spiegelman, B.M. (2005b). Metabolic control through the PGC-1 family transcription coactivators. Cell Metabolism 1, 361-370.

Long, Y.C., and Zierath, J.R. (2006). AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. J Clin Invest 116, 1776-1783.

Loviscach, M., Rehman, N., Carter, L., Mudaliar, S., Mohadeen, P., Ciaraldi, T.P., Veerkamp, J.H., and Henry, R.R. (2000). Distribution of peroxisome proliferatoractivated receptors (PPARs) in human skeletal muscle and adipose tissue: relation to insulin action. Diabetologia 43, 304-311.

Lumeng, C.N., Bodzin, J.L., and Saltiel, A.R. (2007a). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. J Clin Invest 117, 175-184.

Lumeng, C.N., Deyoung, S.M., and Saltiel, A.R. (2007b). Macrophages block insulin action in adipocytes by altering expression of signaling and glucose transport proteins. Am J Physiol Endocrinol Metab 292, E166-174.

Lyon, C.J., Law, R.E., and Hsueh, W.A. (2003). Minireview: adiposity, inflammation, and atherogenesis. Endocrinology 144, 2195-2200.

Maeda, N., Takahashi, M., Funahashi, T., Kihara, S., Nishizawa, H., Kishida, K., Nagaretani, H., Matsuda, M., Komuro, R., Ouchi, N., *et al.* (2001). PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. Diabetes *50*, 2094-2099.

Marette, A. (2002). Mediators of cytokine-induced insulin resistance in obesity and other inflammatory settings. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 5, 377-383.

Martin, G., Schoonjans, K., Lefebvre, A.M., Staels, B., and Auwerx, J. (1997). Coordinate regulation of the expression of the fatty acid transport protein and acyl-CoA synthetase genes by PPARalpha and PPARgamma activators. J Biol Chem 272, 28210-28217.

Martinez-Botas, J., Anderson, J.B., Tessier, D., Lapillonne, A., Chang, B.H., Quast, M.J., Gorenstein, D., Chen, K.H., and Chan, L. (2000). Absence of perilipin results in leanness and reverses obesity in Lepr(db/db) mice. Nat Genet 26, 474-479.

Masuzaki, H., Paterson, J., Shinyama, H., Morton, N.M., Mullins, J.J., Seckl, J.R., and Flier, J.S. (2001). A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. Science 294, 2166-2170.

Mathieu-Costello, O., Kong, A., Ciaraldi, T.P., Cui, L., Ju, Y., Chu, N., Kim, D., Mudaliar, S., and Henry, R.R. (2003). Regulation of skeletal muscle morphology in type 2 diabetic subjects by troglitazone and metformin: relationship to glucose disposal. Metabolism *52*, 540-546.

Matsuda, J., Hosoda, K., Itoh, H., Son, C., Doi, K., Hanaoka, I., Inoue, G., Nishimura, H., Yoshimasa, Y., Yamori, Y., *et al.* (1998). Increased adipose expression of the uncoupling protein-3 gene by thiazolidinediones in Wistar fatty rats and in cultured adipocytes. Diabetes 47, 1809-1814.

Matsusue, K., Haluzik, M., Lambert, G., Yim, S.H., Gavrilova, O., Ward, J.M., Brewer, B., Jr., Reitman, M.L., and Gonzalez, F.J. (2003). Liver-specific disruption of PPARgamma in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes. J Clin Invest 111, 737-747.

Mayerson, A.B., Hundal, R.S., Dufour, S., Lebon, V., Befroy, D., Cline, G.W., Enocksson, S., Inzucchi, S.E., Shulman, G.I., and Petersen, K.F. (2002). The effects of rosiglitazone on insulin sensitivity, lipolysis, and hepatic and skeletal muscle triglyceride content in patients with type 2 diabetes. Diabetes *51*, 797-802. Mayo-Smith, W., Hayes, C.W., Biller, B.M., Klibanski, A., Rosenthal, H., and Rosenthal, D.I. (1989). Body fat distribution measured with CT: correlations in healthy subjects, patients with anorexia nervosa, and patients with Cushing syndrome. Radiology *170*, 515-518.

McTernan, P.G., Harte, A.L., Anderson, L.A., Green, A., Smith, S.A., Holder, J.C., Barnett, A.H., Eggo, M.C., and Kumar, S. (2002). Insulin and rosiglitazone regulation of lipolysis and lipogenesis in human adipose tissue in vitro. Diabetes *51*, 1493-1498.

Mead, J.R., Irvine, S.A., and Ramji, D.P. (2002). Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. J Mol Med 80, 753-769.

Memon, R.A., Tecott, L.H., Nonogaki, K., Beigneux, A., Moser, A.H., Grunfeld, C., and Feingold, K.R. (2000). Up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR-alpha) and PPAR-gamma messenger ribonucleic acid expression in the liver in murine obesity: troglitazone induces expression of PPAR-gamma-responsive adipose tissue-specific genes in the liver of obese diabetic mice. Endocrinology *141*, 4021-4031.

Miles, P.D., Romeo, O.M., Higo, K., Cohen, A., Rafaat, K., and Olefsky, J.M. (1997). TNF-alpha-induced insulin resistance in vivo and its prevention by troglitazone. Diabetes *46*, 1678-1683.

Miller, C.W., and Ntambi, J.M. (1996). Peroxisome proliferators induce mouse liver stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression. Proc Natl Acad Sci U S A 93, 9443-9448.

Miyazaki, Y., He, H., Mandarino, L.J., and DeFronzo, R.A. (2003). Rosiglitazone improves downstream insulin receptor signaling in type 2 diabetic patients. Diabetes *52*, 1943-1950.

Miyazaki, Y., Mahankali, A., Matsuda, M., Mahankali, S., Hardies, J., Cusi, K., Mandarino, L.J., and DeFronzo, R.A. (2002a). Effect of pioglitazone on abdominal fat distribution and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. J Clin Endocrinol Metab 87, 2784-2791.

Miyazaki, Y., Matsuda, M., and DeFronzo, R.A. (2002b). Dose-response effect of pioglitazone on insulin sensitivity and insulin secretion in type 2 diabetes. Diabetes Care 25, 517-523.

Miyoshi, H., Shulman, G.I., Peters, E.J., Wolfe, M.H., Elahi, D., and Wolfe, R.R. (1988). Hormonal control of substrate cycling in humans. J Clin Invest 81, 1545-1555.

Moitra, J., Mason, M.M., Olive, M., Krylov, D., Gavrilova, O., Marcus-Samuels, B., Feigenbaum, L., Lee, E., Aoyama, T., Eckhaus, M., et al. (1998). Life without white fat: a transgenic mouse. Genes Dev 12, 3168-3181.

**Montague, C.T. (2002)**. Adipose depot-specific effects of PPAR gamma agonists: a consequence of differential expression of PPAR gamma in adipose tissue depots? Diabetes Obes Metab *4*, 356-361.

Montague, C.T., Prins, J.B., Sanders, L., Zhang, J., Sewter, C.P., Digby, J., Byrne, C.D., and O'Rahilly, S. (1998). Depot-related gene expression in human subcutaneous and omental adipocytes. Diabetes 47, 1384-1391.

Mori, Y., Murakawa, Y., Okada, K., Horikoshi, H., Yokoyama, J., Tajima, N., and Ikeda, Y. (1999). Effect of troglitazone on body fat distribution in type 2 diabetic patients. Diabetes Care 22, 908-912.

Motojima, K., Passilly, P., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., and Latruffe, N. (1998). Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma activators in a tissue- and inducer-specific manner. J Biol Chem 273, 16710-16714.

Muurling, M., Mensink, R.P., Pijl, H., Romijn, J.A., Havekes, L.M., and Voshol, P.J. (2003). Rosiglitazone improves muscle insulin sensitivity, irrespective of increased triglyceride content, in ob/ob mice. Metabolism *52*, 1078-1083.

Nagai, S., Shimizu, C., Umetsu, M., Taniguchi, S., Endo, M., Miyoshi, H., Yoshioka, N., Kubo, M., and Koike, T. (2004). Identification of a functional peroxisome proliferator-activated receptor responsive element within the murine perilipin gene. Endocrinology *145*, 2346-2356.

Nagashima, K., Lopez, C., Donovan, D., Ngai, C., Fontanez, N., Bensadoun, A., Fruchart-Najib, J., Holleran, S., Cohn, J.S., Ramakrishnan, R., *et al.* (2005). Effects of the PPARgamma agonist pioglitazone on lipoprotein metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. J Clin Invest *115*, 1323-1332.

Nakamura, T., Funahashi, T., Yamashita, S., Nishida, M., Nishida, Y., Takahashi, M., Hotta, K., Kuriyama, H., Kihara, S., Ohuchi, N., *et al.* (2001). Thiazolidinedione derivative improves fat distribution and multiple risk factors in subjects with visceral fat accumulation--double-blind placebo-controlled trial. Diabetes Res Clin Pract 54, 181-190.

**Natali, A., and Ferrannini, E. (2006)**. Effects of metformin and thiazolidinediones on suppression of hepatic glucose production and stimulation of glucose uptake in type 2 diabetes: a systematic review. Diabetologia *49*, 434-441.

Nawrocki, A.R., Rajala, M.W., Tomas, E., Pajvani, U.B., Saha, A.K., Trumbauer, M.E., Pang, Z., Chen, A.S., Ruderman, N.B., Chen, H., *et al.* (2006). Mice lacking adiponectin show decreased hepatic insulin sensitivity and reduced responsiveness to peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. J Biol Chem 281, 2654-2660.

Nedergaard, J., Petrovic, N., Lindgren, E.M., Jacobsson, A., and Cannon, B. (2005). PPARgamma in the control of brown adipocyte differentiation. Biochim Biophys Acta 1740, 293-304.

Neels, J.G., and Olefsky, J.M. (2006). Inflamed fat: what starts the fire? J Clin Invest 116, 33-35.

Newsholme, E.A. (1980). Reflections on the mechanism of action of hormones. FEBS Lett *117 Suppl*, K121-134.

Nolan, J.J., Ludvik, B., Beerdsen, P., Joyce, M., and Olefsky, J. (1994). Improvement in glucose tolerance and insulin resistance in obese subjects treated with troglitazone. N Engl J Med 331, 1188-1193.

Norris, A.W., Chen, L., Fisher, S.J., Szanto, I., Ristow, M., Jozsi, A.C., Hirshman, M.F., Rosen, E.D., Goodyear, L.J., Gonzalez, F.J., *et al.* (2003). Muscle-specific PPARgamma-deficient mice develop increased adiposity and insulin resistance but respond to thiazolidinediones. J Clin Invest *112*, 608-618.

**Oakes, N.D., Camilleri, S., Furler, S.M., Chisholm, D.J., and Kraegen, E.W. (1997)**. The insulin sensitizer, BRL 49653, reduces systemic fatty acid supply and utilization and tissue lipid availability in the rat. Metabolism *46*, 935-942.

Oakes, N.D., Kennedy, C.J., Jenkins, A.B., Laybutt, D.R., Chisholm, D.J., and Kraegen, E.W. (1994). A new antidiabetic agent, BRL 49653, reduces lipid availability and improves insulin action and glucoregulation in the rat. Diabetes *43*, 1203-1210.

Oakes, N.D., Thalen, P.G., Jacinto, S.M., and Ljung, B. (2001). Thiazolidinediones increase plasma-adipose tissue FFA exchange capacity and enhance insulin-mediated control of systemic FFA availability. Diabetes 50, 1158-1165.

**Ohshima, T., Koga, H., and Shimotohno, K. (2004)**. Transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is modulated by SUMO-1 modification. J Biol Chem *279*, 29551-29557.

Okuno, A., Tamemoto, H., Tobe, K., Ueki, K., Mori, Y., Iwamoto, K., Umesono, K., Akanuma, Y., Fujiwara, T., Horikoshi, H., *et al.* (1998). Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. J Clin Invest *101*, 1354-1361.

Olswang, Y., Cohen, H., Papo, O., Cassuto, H., Croniger, C.M., Hakimi, P., Tilghman, S.M., Hanson, R.W., and Reshef, L. (2002). A mutation in the peroxisome proliferatoractivated receptor gamma-binding site in the gene for the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase reduces adipose tissue size and fat content in mice. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 625-630.

**Oshida**, Y., Kako, M., Nakai, N., Shimomura, Y., Li, L., Sato, J., Ohsawa, I., and Sato, Y. (1999). Troglitazone improves insulin-stimulated glucose utilization associated with an increased muscle glycogen content in obese Zucker rats. Endocrine journal *46*, 723-730.

Pajvani, U.B., Hawkins, M., Combs, T.P., Rajala, M.W., Doebber, T., Berger, J.P., Wagner, J.A., Wu, M., Knopps, A., Xiang, A.H., *et al.* (2004). Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. J Biol Chem 279, 12152-12162.

Park, K.S., Ciaraldi, T.P., Abrams-Carter, L., Mudaliar, S., Nikoulina, S.E., and Henry, R.R. (1998). Troglitazone regulation of glucose metabolism in human skeletal muscle cultures from obese type II diabetic subjects. J Clin Endocrinol Metab *83*, 1636-1643.

**Pascual, G., Fong, A.L., Ogawa, S., Gamliel, A., Li, A.C., Perissi, V., Rose, D.W., Willson, T.M., Rosenfeld, M.G., and Glass, C.K. (2005)**. A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. Nature *437*, 759-763.

**Patel, J., Anderson, R.J., and Rappaport, E.B. (1999)**. Rosiglitazone monotherapy improves glycaemic control in patients with type 2 diabetes: a twelve-week, randomized, placebo-controlled study. Diabetes Obes Metab *1*, 165-172.

Pearson, S.L., Cawthorne, M.A., Clapham, J.C., Dunmore, S.J., Holmes, S.D., Moore, G.B., Smith, S.A., and Tadayyon, M. (1996). The thiazolidinedione insulin sensitiser, BRL 49653, increases the expression of PPAR-gamma and aP2 in adipose tissue of high-fat-fed rats. Biochem Biophys Res Commun 229, 752-757.

**Perreault, M., and Marette, A. (2001)**. Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. Nat Med 7, 1138-1143.

Petersen, K.F., and Shulman, G.I. (2002). Pathogenesis of skeletal muscle insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. Am J Cardiol 90, 11G-18G.

Picard, F., and Auwerx, J. (2002). PPAR{gamma} and glucose homeostasis. Annu Rev Nutr 22, 167-197.

**Picard, F., Boivin, A., Lalonde, J., and Deshaies, Y. (2002a)**. Resistance of adipose tissue lipoprotein lipase to insulin action in rats fed an obesity-promoting diet. Am J Physiol Endocrinol Metab 282, E412-418.

Picard, F., Gehin, M., Annicotte, J., Rocchi, S., Champy, M.F., O'Malley, B.W., Chambon, P., and Auwerx, J. (2002b). SRC-1 and TIF2 control energy balance between white and brown adipose tissues. Cell *111*, 931-941.

Picard, F., Naimi, N., Richard, D., and Deshaies, Y. (1999). Response of adipose tissue lipoprotein lipase to the cephalic phase of insulin secretion. Diabetes 48, 452-459.

Pilon, G., Dallaire, P., and Marette, A. (2004). Inhibition of inducible nitric-oxide synthase by activators of AMP-activated protein kinase: a new mechanism of action of insulin-sensitizing drugs. J Biol Chem 279, 20767-20774.

Planavila, A., Alegret, M., Sanchez, R.M., Rodriguez-Calvo, R., Laguna, J.C., and Vazquez-Carrera, M. (2005). Increased Akt protein expression is associated with decreased ceramide content in skeletal muscle of troglitazone-treated mice. Biochem Pharmacol *69*, 1195-1204.

**Prasithsirikul, W., and Bunnag, P. (2004)**. Improvement of fat redistribution, insulin resistance and hepatic fatty infiltration in HIV-associated lipodystrophy syndrome by pioglitazone: a case report. J Med Assoc Thai 87, 166-172.

**Prigeon, R.L., Kahn, S.E., and Porte, D., Jr. (1998)**. Effect of troglitazone on B cell function, insulin sensitivity, and glycemic control in subjects with type 2 diabetes mellitus. J Clin Endocrinol Metab *83*, 819-823.

**Puigserver, P., and Spiegelman, B.M. (2003)**. Peroxisome proliferator-activated receptorgamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. Endocr Rev *24*, 78-90.

**Puigserver, P., Wu, Z., Park, C.W., Graves, R., Wright, M., and Spiegelman, B.M.** (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. Cell *92*, 829-839.

Quinkler, M., Bujalska, I.J., Tomlinson, J.W., Smith, D.M., and Stewart, P.M. (2006). Depot-specific prostaglandin synthesis in human adipose tissue: a novel possible mechanism of adipogenesis. Gene *380*, 137-143.

Racette, S.B., Davis, A.O., McGill, J.B., and Klein, S. (2002). Thiazolidinediones enhance insulin-mediated suppression of fatty acid flux in type 2 diabetes mellitus. Metabolism *51*, 169-174.

Raman, P., and Judd, R.L. (2000). Role of glucose and insulin in thiazolidinedioneinduced alterations in hepatic gluconeogenesis. European journal of pharmacology 409, 19-29.

Ranganathan, G., Unal, R., Pokrovskaya, I., Yao-Borengasser, A., Phanavanh, B., Lecka-Czernik, B., Rasouli, N., and Kern, P.A. (2006). The lipogenic enzymes DGAT1, FAS, and LPL in adipose tissue: effects of obesity, insulin resistance, and TZD treatment. J Lipid Res 47, 2444-2450.

Rangwala, S.M., Rhoades, B., Shapiro, J.S., Rich, A.S., Kim, J.K., Shulman, G.I., Kaestner, K.H., and Lazar, M.A. (2003). Genetic modulation of PPARgamma phosphorylation regulates insulin sensitivity. Dev Cell *5*, 657-663.

Raskin, P., Rappaport, E.B., Cole, S.T., Yan, Y., Patwardhan, R., and Freed, M.I. (2000). Rosiglitazone short-term monotherapy lowers fasting and post-prandial glucose in patients with type II diabetes. Diabetologia 43, 278-284.

Rasouli, N., Raue, U., Miles, L.M., Lu, T., Di Gregorio, G.B., Elbein, S.C., and Kern, P.A. (2005). Pioglitazone improves insulin sensitivity through a reduction in muscle lipid and a redistribution of lipid into adipose tissue. Am J Physiol Endocrinol Metab.

**Rebuffé-Scrive, M., Krotkiewski, M., Elfverson, J., and Bjorntorp, P. (1988)**. Muscle and adipose tissue morphology and metabolism in Cushing's syndrome. J Clin Endocrinol Metab 67, 1122-1128.

Redgrave, T.G. (2004). Chylomicron metabolism. Biochem Soc Trans 32, 79-82.

Reshef, L., Olswang, Y., Cassuto, H., Blum, B., Croniger, C.M., Kalhan, S.C., Tilghman, S.M., and Hanson, R.W. (2003). Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. J Biol Chem 278, 30413-30416.

**Ribon, V., Johnson, J.H., Camp, H.S., and Saltiel, A.R. (1998)**. Thiazolidinediones and insulin resistance: peroxisome proliferatoractivated receptor gamma activation stimulates expression of the CAP gene. Proc Natl Acad Sci U S A *95*, 14751-14756.

Rieusset, J., Chambrier, C., Bouzakri, K., Dusserre, E., Auwerx, J., Riou, J.P., Laville, M., and Vidal, H. (2001). The expression of the p85alpha subunit of phosphatidylinositol 3-kinase is induced by activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human adipocytes. Diabetologia *44*, 544-554.

**Ristow, M., Muller-Wieland, D., Pfeiffer, A., Krone, W., and Kahn, C.R. (1998)**. Obesity associated with a mutation in a genetic regulator of adipocyte differentiation. N Engl J Med *339*, 953-959. Rocchi, S., Picard, F., Vamecq, J., Gelman, L., Potier, N., Zeyer, D., Dubuquoy, L., Bac, P., Champy, M.F., Plunket, K.D., *et al.* (2001). A unique PPARgamma ligand with potent insulin-sensitizing yet weak adipogenic activity. Mol Cell *8*, 737-747.

Rosen, E.D., Sarraf, P., Troy, A.E., Bradwin, G., Moore, K., Milstone, D.S., Spiegelman, B.M., and Mortensen, R.M. (1999). PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. Mol Cell *4*, 611-617.

Rosen, E.D., and Spiegelman, B.M. (2001). PPARgamma : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. J Biol Chem 276, 37731-37734.

Rosen, E.D., Walkey, C.J., Puigserver, P., and Spiegelman, B.M. (2000). Transcriptional regulation of adipogenesis. Genes Dev 14, 1293-1307.

Ryden, M., Jocken, J., van Harmelen, V., Dicker, A., Hoffstedt, J., Wiren, M., Blomqvist, L., Mairal, A., Langin, D., Blaak, E.E., *et al.* (2007). Comparative Studies of the Role of Hormone Sensitive Lipase and Adipose Triglyceride Lipase in Human Fat Cell Lipolysis. Am J Physiol Endocrinol Metab.

Saha, A.K., Kurowski, T.G., Colca, J.R., and Ruderman, N.B. (1994). Lipid abnormalities in tissues of the KKAy mouse: effects of pioglitazone on malonyl-CoA and diacylglycerol. Am J Physiol 267, E95-101.

Sandouk, T., Reda, D., and Hofmann, C. (1993). Antidiabetic agent pioglitazone enhances adipocyte differentiation of 3T3-F442A cells. Am J Physiol *264*, C1600-1608.

Sato, O., Kuriki, C., Fukui, Y., and Motojima, K. (2002). Dual promoter structure of mouse and human fatty acid translocase/CD36 genes and unique transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma ligands. J Biol Chem 277, 15703-15711.

Sauma, L., Franck, N., Paulsson, J.F., Westermark, G.T., Kjolhede, P., Stralfors, P., Soderstrom, M., and Nystrom, F.H. (2006). Peroxisome proliferator activated receptor gamma activity is low in mature primary human visceral adipocytes. Diabetologia.

Savage, D.B., Tan, G.D., Acerini, C.L., Jebb, S.A., Agostini, M., Gurnell, M., Williams, R.L., Umpleby, A.M., Thomas, E.L., Bell, J.D., *et al.* (2003). Human metabolic syndrome resulting from dominant-negative mutations in the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. Diabetes *52*, 910-917.

Schaffer, J.E. (2003). Lipotoxicity: when tissues overeat. Curr Opin Lipidol 14, 281-287.

Scheen, A.J. (2001). Thiazolidinediones and liver toxicity. Diabetes Metab 27, 305-313.

Schoonjans, K., Peinado-Onsurbe, J., Lefebvre, A.M., Heyman, R.A., Briggs, M., Deeb, S., Staels, B., and Auwerx, J. (1996). PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. Embo J 15, 5336-5348.

Schoonjans, K., Watanabe, M., Suzuki, H., Mahfoudi, A., Krey, G., Wahli, W., Grimaldi, P., Staels, B., Yamamoto, T., and Auwerx, J. (1995). Induction of the acylcoenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter. J Biol Chem 270, 19269-19276.

Schweiger, M., Schreiber, R., Haemmerle, G., Lass, A., Fledelius, C., Jacobsen, P., Tornqvist, H., Zechner, R., and Zimmermann, R. (2006). Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism. J Biol Chem 281, 40236-40241.

Sears, I.B., MacGinnitie, M.A., Kovacs, L.G., and Graves, R.A. (1996). Differentiationdependent expression of the brown adipocyte uncoupling protein gene: regulation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. Mol Cell Biol *16*, 3410-3419.

Seeler, J.S., and Dejean, A. (2003). Nuclear and unclear functions of SUMO. Nat Rev Mol Cell Biol 4, 690-699.

Sell, H., Berger, J.P., Samson, P., Castriota, G., Lalonde, J., Deshaies, Y., and Richard, D. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonism increases the capacity for sympathetically mediated thermogenesis in lean and ob/ob mice. Endocrinology *145*, 3925-3934.

Shadid, S., and Jensen, M.D. (2003). Effects of pioglitazone versus diet and exercise on metabolic health and fat distribution in upper body obesity. Diabetes Care 26, 3148-3152.

Shao, D., Rangwala, S.M., Bailey, S.T., Krakow, S.L., Reginato, M.J., and Lazar, M.A. (1998). Interdomain communication regulating ligand binding by PPAR-gamma. Nature *396*, 377-380.

Shelness, G.S., and Sellers, J.A. (2001). Very-low-density lipoprotein assembly and secretion. Curr Opin Lipidol 12, 151-157.

Shen, H., Howles, P., and Tso, P. (2001). From interaction of lipidic vehicles with intestinal epithelial cell membranes to the formation and secretion of chylomicrons. Advanced drug delivery reviews 50 Suppl 1, S103-125.

Shimabukuro, M., Koyama, K., Lee, Y., and Unger, R.H. (1997). Leptin- or troglitazone-induced lipopenia protects islets from interleukin 1beta cytotoxicity. J Clin Invest *100*, 1750-1754.

Shimabukuro, M., Zhou, Y.T., Levi, M., and Unger, R.H. (1998). Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. Proc Natl Acad Sci U S A 95, 2498-2502.

Shintani, M., Nishimura, H., Yonemitsu, S., Ogawa, Y., Hayashi, T., Hosoda, K., Inoue, G., and Nakao, K. (2001). Troglitazone not only increases GLUT4 but also induces its translocation in rat adipocytes. Diabetes *50*, 2296-2300.

Shulman, G.I. (2000). Cellular mechanisms of insulin resistance. J Clin Invest 106, 171-176.

Smith, S.R., De Jonge, L., Volaufova, J., Li, Y., Xie, H., and Bray, G.A. (2005). Effect of pioglitazone on body composition and energy expenditure: a randomized controlled trial. Metabolism 54, 24-32.

Smith, U., Gogg, S., Johansson, A., Olausson, T., Rotter, V., and Svalstedt, B. (2001). Thiazolidinediones (PPARgamma agonists) but not PPARalpha agonists increase IRS-2 gene expression in 3T3-L1 and human adipocytes. Faseb J *15*, 215-220.

Sreenan, S., Keck, S., Fuller, T., Cockburn, B., and Burant, C.F. (1999). Effects of troglitazone on substrate storage and utilization in insulin-resistant rats. Am J Physiol 276, E1119-1129.

Standaert, M.L., Kanoh, Y., Sajan, M.P., Bandyopadhyay, G., and Farese, R.V. (2002). Cbl, IRS-1, and IRS-2 mediate effects of rosiglitazone on PI3K, PKC-lambda, and glucose transport in 3T3/L1 adipocytes. Endocrinology *143*, 1705-1716.

Stanley, T.B., Leesnitzer, L.M., Montana, V.G., Galardi, C.M., Lambert, M.H., Holt, J.A., Xu, H.E., Moore, L.B., Blanchard, S.G., and Stimmel, J.B. (2003). Subtype specific effects of peroxisome proliferator-activated receptor ligands on corepressor affinity. Biochemistry *42*, 9278-9287.

Statistique Canada (2004). Enquête sur la santé des collectivités canadiennes.

Steppan, C.M., Bailey, S.T., Bhat, S., Brown, E.J., Banerjee, R.R., Wright, C.M., Patel, H.R., Ahima, R.S., and Lazar, M.A. (2001). The hormone resistin links obesity to diabetes. Nature 409, 307-312.

Storch, J., and Thumser, A.E. (2000). The fatty acid transport function of fatty acidbinding proteins. Biochim Biophys Acta 1486, 28-44. Subramanian, V., Rothenberg, A., Gomez, C., Cohen, A.W., Garcia, A., Bhattacharyya, S., Shapiro, L., Dolios, G., Wang, R., Lisanti, M.P., *et al.* (2004). Perilipin A mediates the reversible binding of CGI-58 to lipid droplets in 3T3-L1 adipocytes. J Biol Chem *279*, 42062-42071.

Sugden, M.C., and Holness, M.J. (2003). Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs. Am J Physiol Endocrinol Metab 284, E855-862.

Sukonina, V., Lookene, A., Olivecrona, T., and Olivecrona, G. (2006). Angiopoietinlike protein 4 converts lipoprotein lipase to inactive monomers and modulates lipase activity in adipose tissue. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 17450-17455.

Suter, S.L., Nolan, J.J., Wallace, P., Gumbiner, B., and Olefsky, J.M. (1992). Metabolic effects of new oral hypoglycemic agent CS-045 in NIDDM subjects. Diabetes Care 15, 193-203.

Sztalryd, C., Xu, G., Dorward, H., Tansey, J.T., Contreras, J.A., Kimmel, A.R., and Londos, C. (2003). Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation. J Cell Biol *161*, 1093-1103.

Tai, T.A., Jennermann, C., Brown, K.K., Oliver, B.B., MacGinnitie, M.A., Wilkison, W.O., Brown, H.R., Lehmann, J.M., Kliewer, S.A., Morris, D.C., *et al.* (1996). Activation of the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes brown adipocyte differentiation. J Biol Chem 271, 29909-29914.

Tan, G.D., Debard, C., Funahashi, T., Humphreys, S.M., Matsuzawa, Y., Frayn, K.N., Karpe, F., and Vidal, H. (2005a). Changes in adiponectin receptor expression in muscle and adipose tissue of type 2 diabetic patients during rosiglitazone therapy. Diabetologia 48, 1585-1589.

Tan, G.D., Fielding, B.A., Currie, J.M., Humphreys, S.M., Desage, M., Frayn, K.N., Laville, M., Vidal, H., and Karpe, F. (2005b). The effects of rosiglitazone on fatty acid and triglyceride metabolism in type 2 diabetes. Diabetologia 48, 83-95.

**Tang, Y., Osawa, H., Onuma, H., Nishimiya, T., Ochi, M., and Makino, H. (1999)**. Improvement in insulin resistance and the restoration of reduced phosphodiesterase 3B gene expression by pioglitazone in adipose tissue of obese diabetic KKAy mice. Diabetes *48*, 1830-1835.

Tansey, J.T., Sztalryd, C., Gruia-Gray, J., Roush, D.L., Zee, J.V., Gavrilova, O., Reitman, M.L., Deng, C.X., Li, C., Kimmel, A.R., *et al.* (2001). Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity. Proc Natl Acad Sci U S A *98*, 6494-6499.

**Teruel, T., Hernandez, R., Rial, E., Martin-Hidalgo, A., and Lorenzo, M. (2005)**. Rosiglitazone up-regulates lipoprotein lipase, hormone-sensitive lipase and uncoupling protein-1, and down-regulates insulin-induced fatty acid synthase gene expression in brown adipocytes of Wistar rats. Diabetologia *48*, 1180-1188.

Thurlby, P.L., Wilson, S., and Arch, J.R. (1987). Ciglitazone is not itself thermogenic but increases the potential for thermogenesis in lean mice. Bioscience reports 7, 573-577.

**Tiikkainen, M., Hakkinen, A.M., Korsheninnikova, E., Nyman, T., Makimattila, S., and Yki-Jarvinen, H. (2004)**. Effects of rosiglitazone and metformin on liver fat content, hepatic insulin resistance, insulin clearance, and gene expression in adipose tissue in patients with type 2 diabetes. Diabetes *53*, 2169-2176.

Tiraby, C., Tavernier, G., Lefort, C., Larrouy, D., Bouillaud, F., Ricquier, D., and Langin, D. (2003). Acquirement of brown fat cell features by human white adipocytes. J Biol Chem 278, 33370-33376.

**Todd, M.K., Watt, M.J., Le, J., Hevener, A.L., and Turcotte, L.P. (2006)**. Thiazolidinediones Enhance Skeletal Muscle Triacylglycerol Synthesis While Protecting Against Fatty Acid -Induced Inflammation and Insulin Resistance. Am J Physiol Endocrinol Metab.

Tontonoz, P., Hu, E., Devine, J., Beale, E.G., and Spiegelman, B.M. (1995). PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. Mol Cell Biol *15*, 351-357.

Tontonoz, P., Hu, E., Graves, R.A., Budavari, A.I., and Spiegelman, B.M. (1994a). mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. Genes Dev 8, 1224-1234.

Tontonoz, P., Hu, E., and Spiegelman, B.M. (1994b). Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. Cell 79, 1147-1156.

Tordjman, J., Chauvet, G., Quette, J., Beale, E.G., Forest, C., and Antoine, B. (2003). Thiazolidinediones block Fatty Acid release by inducing glyceroneogenesis in fat cells. J Biol Chem 278, 18785-18790.

**Toseland, C.D., Campbell, S., Francis, I., Bugelski, P.J., and Mehdi, N. (2001)**. Comparison of adipose tissue changes following administration of rosiglitazone in the dog and rat. Diabetes Obes Metab *3*, 163-170.

Trujillo, M.E., and Scherer, P.E. (2006). Adipose Tissue-Derived Factors: Impact on Health and Disease. Endocr Rev.

Tushuizen, M.E., Diamant, M., and Heine, R.J. (2005). Postprandial dysmetabolism and cardiovascular disease in type 2 diabetes. Postgraduate medical journal 81, 1-6.

Uldry, M., Yang, W., St-Pierre, J., Lin, J., Seale, P., and Spiegelman, B.M. (2006). Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. Cell Metab *3*, 333-341.

Unger, R.H. (2002). Lipotoxic diseases. Annu Rev Med 53, 319-336.

**Unger, R.H. (2003)**. Minireview: weapons of lean body mass destruction: the role of ectopic lipids in the metabolic syndrome. Endocrinology *144*, 5159-5165.

Unger, R.H., and Zhou, Y.T. (2001). Lipotoxicity of beta-cells in obesity and in other causes of fatty acid spillover. Diabetes 50 Suppl 1, S118-121.

US Department of Health and Human Services (2001). The surgeon General's Call to Action to Prevent and Decrease Overweight and Obesity. US Department of Health and Human Services, Public Health Service: Rockville, MD, 1-39.

Van Gaal, L.F., Mertens, I.L., and De Block, C.E. (2006). Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. Nature 444, 875-880.

van Harmelen, V., Dicker, A., Ryden, M., Hauner, H., Lonnqvist, F., Naslund, E., and Arner, P. (2002). Increased lipolysis and decreased leptin production by human omental as compared with subcutaneous preadipocytes. Diabetes *51*, 2029-2036.

van Wijk, J.P., de Koning, E.J., Cabezas, M.C., op't Roodt, J., Joven, J., Rabelink, T.J., and Hoepelman, A.I. (2005). Comparison of rosiglitazone and metformin for treating HIV lipodystrophy: a randomized trial. Annals of internal medicine *143*, 337-346.

Vidal-Puig, A.J., Considine, R.V., Jimenez-Linan, M., Werman, A., Pories, W.J., Caro, J.F., and Flier, J.S. (1997). Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. J Clin Invest *99*, 2416-2422.

Virtanen, K.A., Hallsten, K., Parkkola, R., Janatuinen, T., Lonnqvist, F., Viljanen, T., Ronnemaa, T., Knuuti, J., Huupponen, R., Lonnroth, P., *et al.* (2003). Differential effects of rosiglitazone and metformin on adipose tissue distribution and glucose uptake in type 2 diabetic subjects. Diabetes *52*, 283-290.

Wagner, E.M., Kratky, D., Haemmerle, G., Hrzenjak, A., Kostner, G.M., Steyrer, E., and Zechner, R. (2004). Defective uptake of triglyceride-associated fatty acids in adipose tissue causes the SREBP-1c-mediated induction of lipogenesis. J Lipid Res 45, 356-365.

Walli, R., Michl, G.M., Muhlbayer, D., Brinkmann, L., and Goebel, F.D. (2000). Effects of troglitazone on insulin sensitivity in HIV-infected patients with protease inhibitor-associated diabetes mellitus. Res Exp Med (Berl) *199*, 253-262.

Wang, Y.X., Lee, C.H., Tiep, S., Yu, R.T., Ham, J., Kang, H., and Evans, R.M. (2003). Peroxisome-Proliferator-Activated Receptor delta Activates Fat Metabolism to Prevent Obesity. Cell *113*, 159-170.

Warram, J.H., Martin, B.C., Krolewski, A.S., Soeldner, J.S., and Kahn, C.R. (1990). Slow glucose removal rate and hyperinsulinemia precede the development of type II diabetes in the offspring of diabetic parents. Annals of internal medicine *113*, 909-915.

Way, J.M., Gorgun, C.Z., Tong, Q., Uysal, K.T., Brown, K.K., Harrington, W.W., Oliver, W.R., Jr., Willson, T.M., Kliewer, S.A., and Hotamisligil, G.S. (2001a). Adipose tissue resistin expression is severely suppressed in obesity and stimulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. J Biol Chem 276, 25651-25653.

Way, J.M., Harrington, W.W., Brown, K.K., Gottschalk, W.K., Sundseth, S.S., Mansfield, T.A., Ramachandran, R.K., Willson, T.M., and Kliewer, S.A. (2001b). Comprehensive messenger ribonucleic acid profiling reveals that peroxisome proliferatoractivated receptor gamma activation has coordinate effects on gene expression in multiple insulin-sensitive tissues. Endocrinology *142*, 1269-1277.

Weinstock, P.H., Bisgaier, C.L., Aalto-Setala, K., Radner, H., Ramakrishnan, R., Levak-Frank, S., Essenburg, A.D., Zechner, R., and Breslow, J.L. (1995). Severe hypertriglyceridemia, reduced high density lipoprotein, and neonatal death in lipoprotein lipase knockout mice. Mild hypertriglyceridemia with impaired very low density lipoprotein clearance in heterozygotes. J Clin Invest *96*, 2555-2568.

Weisberg, S.P., Hunter, D., Huber, R., Lemieux, J., Slaymaker, S., Vaddi, K., Charo, I., Leibel, R.L., and Ferrante, A.W., Jr. (2006). CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. J Clin Invest *116*, 115-124.

Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., and Ferrante, A.W., Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. J Clin Invest *112*, 1796-1808.

Wellen, K.E., and Hotamisligil, G.S. (2003). Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. J Clin Invest 112, 1785-1788.

Weyer, C., Funahashi, T., Tanaka, S., Hotta, K., Matsuzawa, Y., Pratley, R.E., and Tataranni, P.A. (2001). Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. J Clin Endocrinol Metab *86*, 1930-1935.

Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., and King, H. (2004). Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes Care 27, 1047-1053.

Wilmsen, H.M., Ciaraldi, T.P., Carter, L., Reehman, N., Mudaliar, S.R., and Henry, R.R. (2003). Thiazolidinediones upregulate impaired fatty acid uptake in skeletal muscle of type 2 diabetic subjects. Am J Physiol Endocrinol Metab 285, E354-362.

Wilson-Fritch, L., Burkart, A., Bell, G., Mendelson, K., Leszyk, J., Nicoloro, S., Czech, M., and Corvera, S. (2003). Mitochondrial biogenesis and remodeling during adipogenesis and in response to the insulin sensitizer rosiglitazone. Mol Cell Biol 23, 1085-1094.

Wilson-Fritch, L., Nicoloro, S., Chouinard, M., Lazar, M.A., Chui, P.C., Leszyk, J., Straubhaar, J., Czech, M.P., and Corvera, S. (2004). Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone. J Clin Invest *114*, 1281-1289.

Wolfe, R.R., Klein, S., Carraro, F., and Weber, J.M. (1990). Role of triglyceride-fatty acid cycle in controlling fat metabolism in humans during and after exercise. Am J Physiol *258*, E382-389.

Wu, G., Olivecrona, G., and Olivecrona, T. (2003). The distribution of lipoprotein lipase in rat adipose tissue. Changes with nutritional state engage the extracellular enzyme. J Biol Chem 278, 11925-11930.

Wu, Y., Ouyang, J.P., Wu, K., Wang, S.S., Wen, C.Y., and Xia, Z.Y. (2005). Rosiglitazone ameliorates abnormal expression and activity of protein tyrosine phosphatase 1B in the skeletal muscle of fat-fed, streptozotocin-treated diabetic rats. British journal of pharmacology *146*, 234-243.

Xu, A., Wang, Y., Keshaw, H., Xu, L.Y., Lam, K.S., and Cooper, G.J. (2003a). The fatderived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. J Clin Invest *112*, 91-100.

Xu, H., Barnes, G.T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C.J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J.S., Tartaglia, L.A., *et al.* (2003b). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. J Clin Invest *112*, 1821-1830.

Yamaguchi, T., Omatsu, N., Matsushita, S., and Osumi, T. (2004). CGI-58 interacts with perilipin and is localized to lipid droplets. Possible involvement of CGI-58 mislocalization in Chanarin-Dorfman syndrome. J Biol Chem *279*, 30490-30497.

Yamashita, D., Yamaguchi, T., Shimizu, M., Nakata, N., Hirose, F., and Osumi, T. (2004). The transactivating function of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is negatively regulated by SUMO conjugation in the amino-terminal domain. Genes Cells *9*, 1017-1029.

Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y., Ito, Y., Waki, H., Uchida, S., Yamashita, S., Noda, M., Kita, S., Ueki, K., *et al.* (2002). Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. Nat Med *8*, 1288-1295.

Yanase, T., Yashiro, T., Takitani, K., Kato, S., Taniguchi, S., Takayanagi, R., and Nawata, H. (1997). Differential expression of PPAR gamma1 and gamma2 isoforms in human adipose tissue. Biochem Biophys Res Commun 233, 320-324.

Yang, Q., Graham, T.E., Mody, N., Preitner, F., Peroni, O.D., Zabolotny, J.M., Kotani, K., Quadro, L., and Kahn, B.B. (2005). Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. Nature 436, 356-362.

Ye, J.M., Dzamko, N., Cleasby, M.E., Hegarty, B.D., Furler, S.M., Cooney, G.J., and Kraegen, E.W. (2004). Direct demonstration of lipid sequestration as a mechanism by which rosiglitazone prevents fatty-acid-induced insulin resistance in the rat: comparison with metformin. Diabetologia 47, 1306-1313.

Ye, J.M., Dzamko, N., Hoy, A.J., Iglesias, M.A., Kemp, B., and Kraegen, E. (2006). Rosiglitazone treatment enhances acute AMP-activated protein kinase-mediated muscle and adipose tissue glucose uptake in high-fat-fed rats. Diabetes 55, 2797-2804.

Yen, C.L., and Farese, R.V., Jr. (2006). Fat breakdown: a function for CGI-58 (ABHD5) provides a new piece of the puzzle. Cell Metab *3*, 305-307.

**Yki-Jarvinen, H., Sutinen, J., Silveira, A., Korsheninnikova, E., Fisher, R.M., Kannisto, K., Ehrenborg, E., Eriksson, P., and Hamsten, A. (2003)**. Regulation of plasma PAI-1 concentrations in HAART-associated lipodystrophy during rosiglitazone therapy. Arterioscler Thromb Vasc Biol *23*, 688-694.

Yonemitsu, S., Nishimura, H., Shintani, M., Inoue, R., Yamamoto, Y., Masuzaki, H., Ogawa, Y., Hosoda, K., Inoue, G., Hayashi, T., et al. (2001). Troglitazone induces GLUT4 translocation in L6 myotubes. Diabetes 50, 1093-1101.

**Yoshida, K., Shimizugawa, T., Ono, M., and Furukawa, H. (2002)**. Angiopoietin-like protein 4 is a potent hyperlipidemia-inducing factor in mice and inhibitor of lipoprotein lipase. J Lipid Res *43*, 1770-1772.

Young, P.W., Cawthorne, M.A., Coyle, P.J., Holder, J.C., Holman, G.D., Kozka, I.J., Kirkham, D.M., Lister, C.A., and Smith, S.A. (1995). Repeat treatment of obese mice with BRL 49653, a new potent insulin sensitizer, enhances insulin action in white adipocytes. Association with increased insulin binding and cell-surface GLUT4 as measured by photoaffinity labeling. Diabetes 44, 1087-1092.

Yu, C., Markan, K., Temple, K.A., Deplewski, D., Brady, M.J., and Cohen, R.N. (2005). The nuclear receptor corepressors NCoR and SMRT decrease peroxisome proliferator-activated receptor gamma transcriptional activity and repress 3T3-L1 adipogenesis. J Biol Chem *280*, 13600-13605.

Yu, S., Matsusue, K., Kashireddy, P., Cao, W.Q., Yeldandi, V., Yeldandi, A.V., Rao, M.S., Gonzalez, F.J., and Reddy, J.K. (2003). Adipocyte-specific gene expression and adipogenic steatosis in the mouse liver due to peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 (PPARgamma1) overexpression. J Biol Chem 278, 498-505.

Zeender, E., Maedler, K., Bosco, D., Berney, T., Donath, M.Y., and Halban, P.A. (2004). Pioglitazone and sodium salicylate protect human beta-cells against apoptosis and impaired function induced by glucose and interleukin-1beta. J Clin Endocrinol Metab *89*, 5059-5066.

Zhang, B., Szalkowski, D., Diaz, E., Hayes, N., Smith, R., and Berger, J. (1994). Potentiation of insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase by thiazolidinedionederived antidiabetic agents in Chinese hamster ovary cells expressing human insulin receptors and L6 myotubes. J Biol Chem 269, 25735-25741.

Zierath, J.R., Ryder, J.W., Doebber, T., Woods, J., Wu, M., Ventre, J., Li, Z., McCrary, C., Berger, J., Zhang, B., *et al.* (1998). Role of skeletal muscle in thiazolidinedione insulin sensitizer (PPARgamma agonist) action. Endocrinology *139*, 5034-5041.

Zimmermann, R., Strauss, J.G., Haemmerle, G., Schoiswohl, G., Birner-Gruenberger, R., Riederer, M., Lass, A., Neuberger, G., Eisenhaber, F., Hermetter, A., *et al.* (2004). Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. Science *306*, 1383-1386.

Zinman, B., Hanley, A.J., Harris, S.B., Kwan, J., and Fantus, I.G. (1999). Circulating tumor necrosis factor-alpha concentrations in a native Canadian population with high rates of type 2 diabetes mellitus. J Clin Endocrinol Metab *84*, 272-278.