



**HAL**  
open science

# Régulation originale de la balance énergétique du rat Lou/C : un modèle d'hyperactivité et de résistance à l'obésité

Maud Belouze

► **To cite this version:**

Maud Belouze. Régulation originale de la balance énergétique du rat Lou/C : un modèle d'hyperactivité et de résistance à l'obésité. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2009. Français. NNT : 2009LYO10351 . tel-00658554

**HAL Id: tel-00658554**

**<https://theses.hal.science/tel-00658554>**

Submitted on 10 Jan 2012

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON**

Délivrée par

**L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON I**

**ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES SANTE**

**DIPLOME DE DOCTORAT**

(Arrêté du 7 août 2006)

Discipline : Physiologie

Soutenue publiquement le 17 décembre 2009 par

***Maud Belouze***

***Régulation originale de la balance énergétique du rat Lou/C :  
un modèle d'hyperactivité et de résistance à l'obésité.***

Sous la direction des Dr. *Brigitte SIBILLE* et Pr. *Claude DUCHAMP*

**JURY**

M. <i>Jean-Louis SAUMET</i> , PUPH, Université Claude Bernard, LYON 1	Président
M. <i>Francesc VILLARROYA</i> , Professeur de l'Université de BARCELONE	Rapporteur
M. <i>Yves HANDRICH</i> , CR1 CNRS, Université de STRASBOURG	Rapporteur
M. <i>Dominique BAUCHART</i> , DR INRA, THEIX	Rapporteur
Mme <i>Brigitte SIBILLE</i> , MCU de l'Université Claude Bernard, LYON 1	Directeur
M. <i>Claude DUCHAMP</i> , Professeur de l'Université Claude Bernard, LYON 1	Directeur



# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## **Président de l'Université**

Vice-président du Conseil Scientifique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Secrétaire Général

**M. le Professeur L. Collet**

M. le Professeur J-F. Mornex

M. le Professeur G. Annat

M. le Professeur D. Simon

M. G. Gay

## ***COMPOSANTES SANTE***

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine Lyon Sud – Charles Mérieux

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Directeur : M. le Professeur P. Farge

## ***COMPOSANTES SCIENCES ET TECHNOLOGIE***

Faculté des Sciences et Technologies

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire de Lyon

Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon

Institut Universitaire de Technologie A

Institut Universitaire de Technologie B

Institut de Science Financière et d'Assurance

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. Le Professeur F. Gieres

Directeur : M. C. Collignon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Directeur : M. le Professeur J. Lieto

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Directeur : M. le Professeur R. Lamartine

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Directeur : M R. Bernard



***« Je ne sais qu'une chose, c'est que je ne sais rien »***

**Socrate (Σωκράτης), V<sup>e</sup> siècle av. JC**



# Remerciements

Les travaux de recherche exposés dans ce manuscrit sont nés au sein du laboratoire de l'UMR 5123 « *Physiologie Intégrative, Cellulaire et Moléculaire* », et plus particulièrement dans l'équipe « *Thermorégulation, Energétique et Adaptations Métaboliques* ». Il est désormais nécessaire pour moi de clore ce chapitre de ma vie par des remerciements sincères à toutes les personnes sans qui ce travail n'aurait vu le jour.

Je tiens tout d'abord à remercier le **Pr. Jean-Louis Saumet** de m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse. Son professionnalisme et ses qualités de synthèse ont donné tout son symbolisme à cette soutenance.

Je suis également très reconnaissante aux **Dr. Dominique Bauchart**, **Yves Handrich** ainsi qu'au **Pr. Francesc Villarroya** d'avoir accepté la lourde tâche de rapporteurs. Leur analyse très fine et pertinente du fond, comme de la forme de mon manuscrit m'a permis de remettre en questions un certain nombre de points jusqu'à quelques heures avant la soutenance. De plus, j'ai apprécié la grande qualité de leur réflexion qui a conduit à un débat extrêmement intéressant et formateur. Ce manuscrit, bien qu'encore largement perfectible, est teinté de votre expérience et de vos conseils avisés.

C'est en cours de physiologie, et particulièrement dans l'UE « *Régulations et Adaptations Métaboliques* » que j'ai découvert la balance énergétique et le tissu adipeux brun, c'est donc tout naturellement que je me suis adressée au **Pr. Claude Duchamp** pour mon premier stage. Je ne le remercierai jamais assez de m'avoir donné l'opportunité d'aborder le monde de la recherche avec un sujet aussi passionnant que celui du rat Lou/C. Tes qualités d'orateur et rédactionnelles resteront pour moi une source permanente d'inspiration.

Je tiens particulièrement à remercier le **Dr. Brigitte Sibille** d'avoir accepté de co-encadrer cette thèse, de manière constante et efficace, et ce, malgré l'éloignement géographique. Ton sens de la pédagogie, découvert également dans cette fameuse UE « *RAM* », ainsi que tes explications passionnées sur le métabolisme et la bioénergétique mitochondriale ont permis la concrétisation de ce travail. Je suis très fière d'avoir été ton étudiante, et espère m'en être montrée digne.

J'adresse ici un grand merci au **Pr. Jean-Marc Péquignot**, précédent directeur du M2 « *Physiologie Intégrative en Conditions Extrêmes* », probablement l'une des personnes les plus humaines que je connaisse, brillant chercheur et enseignant, qui a permis à de nombreuses générations d'étudiants, comme moi, de réaliser leur rêve.



Je souhaite également remercier tous les membres de l'équipe pédagogique physio et de la « *TEAM* » et plus particulièrement :

Les **Dr. Harry Koubi**, **Jean-Louis Rouanet** et **Guy Dallevet**, unanimement connus sous le pseudonyme « dream team » : vos discussions enflammées, pas nécessairement scientifiques par ailleurs, ont particulièrement égayé les journées passées au laboratoire.

**Marie-Thérèse Boillon** (la maman-poule), le **Dr. Stéphane Servais** (le premier à m'avoir ouvert la fameuse porte du « bureau des étudiants »), le **Dr. Dominique Desplanches** (toujours disponible et de très bon conseil), le **Dr. Dominique Letexier** (le breton toujours accueillant), le **Dr. Damien Roussel** (à qui aucune plume, ni aucun poil ne résiste à son potter), le **Pr. Yann Voituron** (qui sait rendre la BOA attrayante, et ce n'est pas peu dire !), le **Dr. Sahra Borges** (qui a souffert autant que moi dans cette dernière ligne pas si droite que ça), **Karine Sallin** (« manipeuse acharnée » dont les célèbres tee-shirts égaient nos discussions), le **Dr. Delphine Baetz** (qui m'a tolérée dans son bureau, brillante dans bien des domaines, parfois même les plus inattendus...). Merci à tous d'avoir été présents, et d'avoir partagé avec moi des coins de paillasses aux soirées improvisées.

Les **Dr. Benjamin Rey** et **Caroline Romestaing** : vous m'avez initiée à la plupart des techniques, vous m'avez aidée à répondre à pas mal de questions et à m'en poser d'autres, vous m'avez emmenée à Moscou pour mon premier congrès, vous m'avez permis de dîner à la table des plus Grands (enfin, « dîner » n'est pas le terme le plus approprié), vous avez toujours répondu présents dans les meilleurs moments, mais aussi lorsque les jours étaient plus ternes. Je vous souhaite une vie épanouie, et une brillante carrière, à votre image.

J'aimerais aussi remercier **Loïc Teulier**, qui de « jeune padawan » assigné au fastidieux nettoyage des cages de rats est devenu un de mes « co-thésards » : son soutien inconditionnel, même sur un caillou aux antipodes, m'a aidée à tracer une voie, notre voie. Je n'oublie pas **Geneviève** et **Yasmina**, rencontrées sur les bancs de la fac, et avec qui j'ai partagé de belles aventures. Ils sont la famille que j'ai choisie.

Et puis, il y a la famille que l'on ne choisit pas, mais dont on ne voudrait changer pour rien au monde. Je ne remercierai jamais assez mes **grands-parents**, **parents** et **Laura** pour cette voie qu'ils m'ont laissée choisir, malgré les détours, me permettant d'avancer sur le sentier tortueux de la science. Enfin, je voudrais que **Théo** et **Nicolas** réalisent à leur tour leur(s) rêve(s)...

# Résumé

## Régulation originale de la balance énergétique du rat Lou/C : un modèle d'hyperactivité et de résistance à l'obésité.

Le rat Lou/C, issu de la souche Wistar, reste maigre tout au long de sa vie. Le but de ce travail était de caractériser la balance énergétique du rat Lou/C et d'établir quel(s) étai(en)t le(s) tissu(s) thermogène(s) impliqué(s) dans la dissipation de l'énergie alimentaire ingérée en excès.

Si la quantité d'énergie ingérée, rapportée par unité de masse corporelle, n'était pas différente entre les deux souches de rats, la dépense énergétique du Lou/C était supérieure au repos, suite à un repas et lors de l'exercice physique. Le rat Lou/C montrait également une hyperactivité locomotrice spontanée volontaire bien supérieure à celle du Wistar.

De façon inattendue, le tissu adipeux brun (BAT) des Lou/C était peu actif, comme l'ont montré des approches fonctionnelles *in vivo*, biochimiques *in vitro* ou moléculaires. L'absence d'activation du BAT du rat Lou/C n'était pas liée à une déficience du tissu puisqu'il était aisément activable par une exposition prolongée au froid.

La forte activité physique spontanée du Lou/C ne s'accompagnait pas de l'activation de processus thermogènes particuliers des mitochondries isolées de BAT ou de muscle squelettique. En revanche, nous avons mis en évidence un mécanisme potentiel de découplage des oxydations phosphorylantes mitochondriales dans le foie des Lou/C. Contre toute attente, le rat Lou/C disposait de capacités de synthèse des acides gras équivalentes à celles du Wistar dans le foie et supérieures dans le tissu adipeux blanc avec de fortes capacités d'oxydation de ces substrats dans ces tissus, suggérant un possible cycle futile entre la synthèse des acides gras et leur oxydation dans le foie et le tissu adipeux blanc.

Le rat Lou/C représente donc un modèle original de régulation de la balance énergétique qui n'est pas basé sur l'activité thermogène du BAT. Le muscle squelettique, le foie et le tissu adipeux blanc du Lou/C pourraient participer à un métabolisme actif des lipides et contribuer à la dissipation accrue de l'énergie ingérée en excès.

**Mots clés :** *rat Lou/C, thermogenèse, tissu adipeux brun, exposition au froid, activité physique spontanée, métabolisme lipidique, mitochondries.*

**Discipline :** *Physiologie.*



# Abstract

## **Original regulation of energy balance in lean Lou/C rats: a model of hyperactivity and resistance to obesity.**

Lou/C rat, an inbred strain of Wistar origin, remains lean throughout life. Our study aimed to characterize the energy balance of Lou/C rats and determine the tissue(s) that could be implicated in the dissipation of excess energy intake.

Food intake, expressed per unit body mass, was not different between the two strains of rats but resting metabolic rate, diet-induced thermogenesis and exercise-associated energy expenditure were higher in the Lou/C strain. Moreover, the spontaneous activity of Lou/C rats was amazingly higher than that of Wistar rats.

Unexpectedly, the thermogenic brown adipose tissue (BAT) of Lou/C rats was not over-stimulated as demonstrated by functional *in vivo*, biochemical *in vitro* or molecular approaches. Nevertheless, Lou/C BAT was not deficient as it could easily be stimulated by prolonged cold exposure.

The high spontaneous activity of Lou/C rats was not correlated with an activation of specific thermogenic processes in isolated mitochondria of BAT or skeletal muscle. However, oxidation and phosphorylation were partly uncoupled in liver mitochondria of Lou/C rats. Unexpectedly, Lou/C rats displayed similar capacities for fatty acid synthesis in liver but higher capacities in white adipose tissue than Wistar rats, in association with high capacities for oxidation of these substrates in these tissues. These results suggested a possible mechanism of futile cycling between fatty acid synthesis and oxidation in liver and white adipose tissue.

Lou/C rats therefore represent an original model of regulation of energy balance that is not based on the thermogenic activity of BAT. Skeletal muscle, liver and white adipose tissue of Lou/C rats could contribute to a higher lipid metabolism and the dissipation of excess energy intake.

**Key words** : *Lou/C rat, thermogenesis, brown adipose tissue, cold exposure, spontaneous activity, lipid metabolism, mitochondria.*

**Laboratoire de Physiologie Intégrative, Cellulaire et Moléculaire  
UMR 5123 CNRS, Université Lyon I  
Bâtiment Raphaël Dubois, 43 bd du 11 novembre 1918  
F-69622 Villeurbanne cedex, France**



# Abréviations

Acétyl-coA	acétyl-coenzyme A
ACO1	Acyl-CoA oxydase 1
ADP	adénosine-5'-diphosphate
AGNE	Acides gras non estérifiés
AgRP	agouti related protein
AMPc	adénosine-5'-monophosphate cyclique
AMPK	adénosine-5'-monophosphate protéine kinase
ANT	adenine nucléotide translocase
AOA	american obesity association
APS	persulfate d'ammonium
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adénosine-5'-triphosphate
ATPase	ATP synthase
BAT	brown adipose tissue
BMI	body mass index
BSA	albumine de sérum bovin
CART	cocain and amphetamin-regulated transcript
COx	cytochrome C oxydase
CPT	carnitine-palmitoyl transférase
Cr	créatine
CREB	cAMP response element-binding
DHAP	dihydroxyacétone phosphate
DIT	diet-induced thermogenesis
EDTA	acide éthylène diamine tétra-acétique
EGTA	acide éthylène glycol-bis ( $\beta$ -aminoethyl ether) tétra-acétique
EPOC	excess post-exercise O <sub>2</sub> consumption
FABP	fatty acid binding protein
FADH <sub>2</sub>	flavine adénine dinucléotide réduite
FAS	Fatty acid synthase
FECO <sub>2</sub>	fraction de dioxygène expirée
FEO <sub>2</sub>	fraction d'oxygène expirée
FICO <sub>2</sub>	fraction de dioxygène inspirée
FIO <sub>2</sub>	fraction d'oxygène inspirée
G3P	glycérol-3-phosphate
GDP	guanidine-5'-diphosphate
GLUT4	glucose transporter 4
GTP	guanidine-5'-triphosphate
H <sup>+</sup>	ion hydrogène
HAD	3-hydroxyacétyl-CoA déshydrogénase
HDL	high density lipoprotein
HDMCP	HCC down regulated mitochondrial carrier protein
H-FABP	heart fatty acid binding protein
HRP	horseradish peroxidase
iBAT	interscapular brown adipose tissue

IGF1	insulin growth factor 1
IMC	indice de masse corporelle
INS	institut national de la santé
INSERM	institut national de la santé et de la recherche médicale
Je-	flux d'électrons
JH+	flux de protons
K+	ion potassium
kcal	kilocalories
KCl	chlorure de potassium
kJ	kilojoules
LDL	low density lipoprotein
LHS	lipase hormono-sensible
MC4R	récepteur à la mélanocortine
NA	noradrénaline
Na+	ion sodium
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	bisulfite de sodium
NAD+	nicotinamide adénine dinucléotide
NADH	nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NEAT	non exercise activity thermogenesis
NST	non shivering thermogenesis
PCr	phosphocréatine
PCR	polymerase chain reaction
Pi	phosphate inorganique
PKA	protéine kinase A
POMC	proopiomélanocortine
Rapport P/O	rapport phosphate/oxygène
RCR	rapport de control respiratoire
RMR	resting metabolic rate
ROS	radical oxygen species
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
STPD	standard temperature pressure dry
T <sub>3</sub>	3,5,3'-tri-iodo-thyronine
TG	triglycérides
TN	thermoneutralité
TNZ	thermoneutral zone
UCP1	uncoupling protein 1
UCP2	uncoupling protein 2
UCP3	uncoupling protein 3
ΔP	force protonmotrice
ΔpH	différence de pH de part et d'autre de la membrane mitochondriale interne
Δψ	potentiel électrique de la membrane mitochondriale

# Liste des tableaux et figures

## **CHAPITRE A : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES**

Figure 1 : Prévalence de l'obésité en France ( <i>tirée de ObEpi 2006</i> ) .....	9
Figure 2 : Evolution de la masse corporelle de rats Wistar et Lou/C ( <i>tirée de Perrin D., 2003</i> ) .....	13
Figure 3 : Localisation des dépôts de tissu adipeux brun chez le rat ( <i>tirée de Portet, 1983</i> ) .....	18
Figure 4 : Thermorégulation en réponse aux variations de température externe ( <i>tirée de Cannon B., 2004</i> ) .....	22
Figure 5 : Réponses métaboliques à une exposition aiguë et chronique au froid ( <i>tirée de Cannon B., 2004</i> ) .....	23
Figure 6 : Voies de signalisation et $\beta_3$ - et $\alpha_2$ -adrénergiques dans l'adipocyte brun mature de rat ( <i>tirée de Cannon B., 2004</i> ) .....	27
Figure 7 : Contrôle de la prise alimentaire et régulation de l'AMPK hypothalamique .....	29
Figure 8 : L'oxydation phosphorylante .....	31
Figure 9 : La chaîne respiratoire .....	33
Figure 10 : Respiration mitochondriale .....	34
Figure 11 : Perméabilité membranaire («leak») .....	35
Figure 12 : Stimulation de la thermogenèse par la noradrénaline dans les adipocytes bruns ( <i>tirée de Cannon B., 2004</i> ) .....	38
Figure 13 : Hypothèses concernant le rôle des acides gras dans l'activation d'UCP1 ( <i>tirée de Cannon B., 2004</i> ) .....	39
Figure 14 : Relation entre la force protonmotrice et les pertes de protons .....	41
Figure 15 : Patinage («slip» ou «slipping») de la chaîne respiratoire .....	42
Tableau 1 : Forces influençant le patinage des pompes membranaires .....	43
Figure 16 : Navette malate / aspartate .....	45
Figure 17 : Navette glycérol-3-phosphate (G3P) .....	46
Figure 18 : Dépense énergétique des rats Wistar et Lou/C ( <i>tirée de Perrin D., 2003</i> ) .....	47
Figure 19 : Activité physique des rats Wistar et Lou/C dans leur cage ( <i>tirée de Garait B., 2005</i> ) .....	49

## **CHAPITRE B : ETUDE EXPERIMENTALE**

### **I. ETUDE DE LA BALANCE ENERGETIQUE DU RAT LOU/C**

Figure I.1 : Conditions expérimentales protocole A .....	64
Figure I.2 : Schéma du circuit ouvert utilisé pour la mesure de la consommation d'oxygène et de la production de dioxyde de carbone .....	67
Figure I.3 : Energie ingérée par les rats Wistar et Lou/C .....	69
Tableau I.1 : Energie ingérée par les rats Wistar et Lou/C en fonction de leur masse corporelle ou de leur masse maigre .....	70
Figure I.4 : Energie dépensée pendant 24 heures par les rats Wistar et Lou/C .....	71
Figure I.5 : Activité physique spontanée de rats Wistar et Lou/C .....	72
Figure I.6 : Dépense énergétique liée à un exercice imposé .....	73
Figure I.7 : Dépense énergétique des rats Wistar et Lou/C en cycle inversé et effet thermique des aliments .....	75
Figure I.8 : Représentation schématique des balances énergétiques des rats Wistar et Lou/C .....	82

### **II. ETUDE DE L'ACTIVITE DU BAT DU RAT LOU/C**

Tableau II.1 : Séquences des amorces utilisées pour la RT-PCR .....	92
Figure II.1 : Effet thermogène de la NA sur des rats Wistar et Lou/C .....	93
Figure II.2 : Respiration des mitochondries isolées de BAT de rats Wistar et Lou/C .....	95
Figure II.3 : Effet de la souche sur l'abondance relative en protéine découplante dans le BAT de rats Wistar et Lou/C .....	96



Figure II.4 : Effet de la souche sur l'expression de gènes impliqués dans l'utilisation de substrats lipidiques par le BAT .....	98
Figure II.5 : Effet de la souche sur l'expression du gène CPT I au niveau du BAT .....	99
Figure II.6 : Effet de la souche sur l'expression de la protéine FAT/CD36 au niveau du BAT .....	96
Figure II.7 : Effet de la souche sur l'expression de gène impliqué dans le captage de substrats glucidiques par le BAT .....	100
Figure II.8 : Effet de la souche sur l'expression de gènes impliqués dans la régulation du métabolisme lipidique de BAT .....	101
Figure II.9 : Effet de la souche sur l'expression de PGC1 $\alpha$ , impliqué dans la biogénèse mitochondriale de BAT .....	102

### III. ETUDE DE LA CAPACITE D'ACTIVATION DU BAT DE RAT LOU/C

Figure III.1 : Conditions expérimentales .....	118
Tableau III.1 : Séquences des amorces utilisées pour la RT-PCR .....	121
Figure III.2 : Effet de la souche sur la prise alimentaire de rats Wistar et Lou/C exposés au froid ....	122
Tableau III.2 : Masses corporelles et tissulaires de rats Wistar et Lou/C en fonction de la température d'élevage .....	123
Figure III.3 : Effet du froid sur l'activité physique spontanée de rats Wistar et Lou/C.....	126
Tableau III.3 : Effet de l'exposition au froid sur la respiration mitochondriale de BAT en présence de succinate/roténone ou palmitoyl-carnitine/malate + BSA.....	127
Figure III.4 : Respiration GDP-sensible des mitochondries isolées de BAT de rats Wistar et Lou/C acclimatés au froid.....	129
Figure III.5 : Effet de l'exposition au froid sur l'abondance relative en protéine découplante dans le BAT de rats Wistar et Lou/C.....	130
Figure III.6 : Effet de l'exposition au froid sur l'expression de gènes impliqués dans l'utilisation de substrats lipidiques par le BAT .....	132
Figure III.7 : Effet de l'exposition au froid sur l'abondance des transcrits de la protéine CPT I au niveau du BAT .....	133
Figure III.8 : Effet de l'exposition au froid sur l'abondance relative de la protéine FAT/CD36 dans le BAT des rats Wistar ou Lou/C .....	134
Figure III.9 : Effet de l'exposition au froid sur l'expression de gènes impliqués dans le captage de substrats glucidiques par le BAT .....	135
Figure III.10 : Effet de l'exposition au froid sur l'expression de gènes impliqués dans la régulation du métabolisme lipidique de BAT .....	136
Figure III.11 : Effet de l'exposition au froid sur l'expression de PGC-1 $\alpha$ , impliqué dans la biogénèse mitochondriale de BAT .....	137

### IV. QUELS TISSUS POURRAIENT ETRE IMPLIQUES DANS LA DEPENSE ENERGETIQUE SUPERIEURE DU RAT LOU/C ? INFLUENCE DE L'ACTIVITE PHYSIQUE SPONTANEE ET DE CYCLES FUTILES

Figure IV.1 : Conditions expérimentales .....	149
Tableau IV.1 : Séquences des amorces utilisées pour la RT-PCR.....	157
Figure IV.2 : Activité physique spontanée de rats Wistar et Lou/C .....	158
Figure IV.3 : Energie ingérée par les rats Wistar et Lou/C en fonction de leur activité.....	159
Tableau IV.2 : Masses corporelles et tissulaires de rats Wistar et Lou/C en fonction de l'activité. ....	160
Tableau IV.3 : Effet de l'activité physique sur la respiration mitochondriale de BAT en présence de succinate/roténone ou palmitoyl-carnitine/malate + BSA.....	162
Figure IV.4 : Effet de l'activité physique sur l'abondance relative en protéine découplante dans le BAT de rats Wistar et Lou/C.....	163
Figure IV.5 : Effet de l'activité physique sur l'expression de gènes impliqués dans l'utilisation de substrats lipidiques par le BAT .....	164
Figure IV.6 : Effet de l'activité physique sur l'abondance relative de CPT1 au niveau du BAT .....	165
Figure IV.7 : Effet de l'activité physique sur l'expression de FAT/CD36 au niveau du BAT .....	166
Figure IV.8 : Effet de l'activité physique sur l'expression de gène impliqué dans le captage de substrats glucidiques par le BAT .....	167
Tableau IV.4 : Effet de la souche et de l'activité sur la respiration mitochondriale de muscle en présence de succinate/roténone ou palmitoyl-carnitine/malate $\pm$ BSA .....	168
Figure IV.9 : effet de la souche et de l'activité sur la quantité de mitochondries estimée dans le quadriceps .....	169

Tableau IV.5 : Effet de la souche et de l'activité sur la respiration mitochondriale de foie en présence de succinate/roténone ou palmitoyl-carnitine/malate  $\pm$  BSA..... 170  
Figure IV.10 : Effet de la souche sur les concentrations circulantes de substrats énergétiques..... 171  
Figure IV.11 : Effet de la souche de rats sur les activités hépatiques de synthèse et d'oxydation des acides gras ..... 172  
Figure IV.12 : Effet de la souche de rats sur les activités de synthèse et d'oxydation des acides gras du tissu adipeux blanc ..... 173

**ANNEXES METHODOLOGIQUES**

Solutions et volumes utilisés pour préparer les gels de polyacrylamide ..... 189

**CHAPITRE C : SYNTHESE ET PERSPECTIVES**

Organes impliqués dans la dissipation de l'énergie ingérée en excès, en conditions standard, dans les souches Wistar et Lou/C ..... 202

**CHAPITRE D : BIBLIOGRAPHIE**



# Sommaire

AVANT-PROPOS.....	1
<b>CHAPITRE A : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>3</b>
<b>1. L'obésité.....</b>	<b>5</b>
1.1 Définition clinique de l'obésité.....	5
1.2 Complications médicales de l'obésité.....	5
1.2.1 Contraintes mécaniques.....	6
1.2.2 Diabète non insulino dépendant (type 2).....	6
1.2.3 Pathologies coronariennes.....	6
1.2.4 Cancers.....	7
1.3 Facteurs favorisant le développement de l'obésité.....	8
1.4 Prévalence et évolution de la pandémie d'obésité dans le monde.....	9
<b>2. Modèles animaux utilisés pour étudier l'obésité.....</b>	<b>10</b>
2.1 Exemples de modèles d'obésité.....	10
2.1.1 Modèles induits par une déficience du système leptinergique.....	10
2.1.2 Autres mutations conduisant à l'obésité.....	10
2.1.3 Autres modèles d'obésité.....	11
2.2 Exemples de modèles de résistance à l'obésité.....	11
2.2.1 Les souris SWR/J et A/J1.....	11
2.2.2 Le rat S 5B/P1.....	12
2.2.3 Le rat Lou/C.....	12
2.2.3.1 Origine de cette souche.....	12
2.2.3.2 Caractéristiques phénotypiques du rat Lou/C.....	13
<b>3. La balance énergétique (BE).....</b>	<b>14</b>
3.1 Définition.....	14
3.2 Le métabolisme basal.....	15
3.2.1 Définition.....	15
3.2.2 Facteurs de variation.....	15
3.2.3 Régulation hormonale.....	16
3.3 Effet thermique des aliments ou Diet Induced Thermogenesis (DIT).....	17
3.3.1 Définition.....	17
3.3.2 DIT et tissu adipeux brun (BAT).....	17
3.3.3 DIT extra BAT.....	18
3.4 Dépense énergétique liée au travail musculaire.....	19
3.4.1 Définition.....	19
3.4.2 Dépense énergétique non liée à l'exercice physique.....	19
3.4.3 Dépense énergétique et exercice physique.....	20
3.5 Thermorégulation.....	21
3.5.1 Définition.....	21
3.5.2 Frisson thermique.....	21
3.5.3 Thermogenèse sans frisson.....	22
3.5.4 NST et tissu adipeux brun.....	23
3.5.5 NST et muscle squelettique.....	24
3.5.6 NST et foie.....	25
3.5.7 Régulation hormonale de la NST.....	26
3.5.7.1 Rôle des catécholamines.....	26
3.5.7.2 Rôle des hormones thyroïdiennes.....	27
3.5.7.3 Rôle du glucagon.....	28
3.6 Régulation de la balance énergétique.....	29
<b>4. Production et dissipation de l'énergie.....</b>	<b>30</b>
4.1 Production d'ATP.....	30
4.1.1 La glycolyse.....	30
4.1.2 Le cycle de Krebs.....	30

4.1.3 L'oxydation phosphorylante .....	31
4.2 Régulation de l'oxydation phosphorylante et pertes énergétiques .....	32
4.2.1 Par la nature des équivalents réduits .....	33
4.2.2 Par la perméabilité membranaire.....	35
4.2.2.1 <i>Les protéines découplantes UCPs</i> .....	36
4.2.2.2 <i>Protéine découplante UCP1</i> .....	37
4.2.3 Par le patinage des pompes («slip») .....	40
4.2.4 Par les transporteurs.....	44
<b>5. Pertinence du modèle Lou/Cet objectifs du travail expérimental .....</b>	<b>46</b>
5.1 Caractéristiques phénotypiques anti-obèses du rat Lou/C .....	46
5.1.1 Masses corporelle et adipeuse .....	46
5.1.2 Activité physique spontanée du rat Lou/C .....	47
5.1.3 Balance énergétique du rat Lou/C .....	48
5.1.3.1 <i>Prise alimentaire du rat Lou/C</i> .....	48
5.1.3.2 <i>Dépense énergétique du rat Lou/C</i> .....	48
5.1 Caractéristiques métaboliques du rat Lou/C .....	50
5.2.1 Métabolisme des lipides et des glucides .....	50
5.2.1 Caractéristiques hormonales .....	50
5.3 Intérêt du modèle Lou/C.....	53
<b>CHAPITRE B : ETUDE EXPERIMENTALE .....</b>	<b>57</b>
<b>I. ETUDE DE LA REGULATION DE LA BALANCE ENERGETIQUE DU RAT LOU/C.....</b>	<b>59</b>
<b>RESUME .....</b>	<b>61</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>62</b>
<b>MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>63</b>
<b>1. Les animaux.....</b>	<b>63</b>
1.1 Protocole A : rats sédentaires et actifs.....	63
1.2 Protocole B : animaux soumis à un exercice imposé .....	64
1.3 Protocole C : animaux en cycle inversé .....	64
<b>2. Activité, prise alimentaire et masse des animaux (protocole A) .....</b>	<b>65</b>
<b>3. Dépense énergétique .....</b>	<b>65</b>
3.1 Dépense énergétique globale (protocole A) .....	67
3.2 Dépense énergétique liée à l'exercice imposé (protocole B).....	68
3.3 Dépense énergétique post-prandiale (protocole C) .....	68
<b>4. Analyse statistique.....</b>	<b>68</b>
<b>RESULTATS .....</b>	<b>69</b>
<b>1. Prise alimentaire.....</b>	<b>69</b>
<b>2. Dépense énergétique .....</b>	<b>70</b>
2.1 Dépense énergétique globale .....	70
2.2 Dépense énergétique liée à l'exercice physique.....	72
2.2.1 Activité physique spontanée .....	72
2.2.2 Exercice imposé.....	73
2.3 Dépense énergétique liée au repas .....	74
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>75</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>81</b>
<b>II. ETUDE DE L'ACTIVITE DU BAT DE RAT LOU/C .....</b>	<b>83</b>
<b>RESUME .....</b>	<b>85</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>86</b>
<b>MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>89</b>
<b>1. Les animaux.....</b>	<b>89</b>
<b>2. Test fonctionnel à la NA.....</b>	<b>89</b>
<b>3. Respiration de mitochondries isolées de BAT et activité d'UCP1 .....</b>	<b>89</b>
3.1 Principe de la mesure de consommation d'oxygène .....	90
3.2 Procédure.....	91
<b>4. Quantification mitochondriale des protéines UCP1 et FAT/CD36.....</b>	<b>92</b>
<b>5. Expression de gènes du métabolisme énergétique par RT-PCR .....</b>	<b>92</b>

<b>6. Statistiques .....</b>	<b>93</b>
<b>RESULTATS .....</b>	<b>93</b>
<b>1. Réponse <i>in vivo</i> à la noradrénaline .....</b>	<b>93</b>
<b>2. Etude fonctionnelle de mitochondries isolées de tissu adipeux brun .....</b>	<b>94</b>
2.1 Protéine découplante UCP1 .....	94
2.1.1 Activité de la protéine UCP1 .....	94
2.1.2 Abondance relative de la protéine UCP1 .....	95
2.2 Apports en substrats au tissu adipeux brun .....	97
2.2.1 Apports en substrats lipidiques .....	97
2.2.1.1 <i>Captage et transport des acides gras à chaîne longue</i> .....	97
2.2.1.2 <i>Entrée des acides gras à longue chaîne dans la mitochondrie</i> .....	98
2.2.2 Apports en substrats glucidiques .....	100
2.2.3 Régulation du métabolisme lipidique .....	101
2.2.3.1 « <i>Peroxisome proliferator-activated receptors</i> » <i>alpha et gamma</i> .....	101
2.2.3.2 « <i>Peroxisome proliferator-activated receptors-γ coactivator 1alpha</i> » .....	102
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>103</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>111</b>
<b>III. ETUDE DE LA CAPACITE D'ACTIVATION DU BAT DE RAT LOU/C .....</b>	<b>113</b>
<b>RESUME .....</b>	<b>115</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>116</b>
<b>MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>118</b>
<b>1. Les animaux.....</b>	<b>118</b>
<b>2. Activité, prise alimentaire et masse des animaux .....</b>	<b>119</b>
<b>3. Prélèvements tissulaires .....</b>	<b>119</b>
<b>4. Respiration de mitochondries isolées de BAT et activité d'UCP1 .....</b>	<b>119</b>
<b>5. Quantification mitochondriale des protéines UCP1 et FAT/CD36.....</b>	<b>120</b>
<b>6. Expression de gènes du métabolisme énergétique par RT-PCR .....</b>	<b>120</b>
<b>7. Statistiques .....</b>	<b>121</b>
<b>RESULTATS .....</b>	<b>122</b>
<b>1. Effet de l'exposition prolongée au froid sur l'animal entier.....</b>	<b>122</b>
1.1 Effet du froid sur la prise alimentaire des animaux .....	122
1.2 Effet du froid sur la masse des animaux et des tissus .....	123
1.3 Effet du froid sur l'activité physique spontanée des animaux .....	125
<b>2. Effet de l'exposition prolongée au froid sur la fonction mitochondriale du BAT .....</b>	<b>127</b>
2.1 Respiration mitochondriale de BAT et activité de l'UCP1 .....	127
2.2 Abondance relative de la protéine UCP1 .....	130
<b>3. Effet de l'exposition prolongée au froid sur l'apport en substrats au tissu adipeux brun....</b>	<b>131</b>
3.1 Apport en substrats lipidiques au tissu adipeux brun.....	131
3.1.1 Effet du froid sur le captage et le transport des acides gras à chaîne longue .....	131
3.1.2 Effet du froid sur l'entrée des acides gras à chaîne longue dans la mitochondrie .....	132
3.2 Apport en substrats glucidiques au tissu adipeux brun.....	134
3.3 Régulation du métabolisme lipidique dans le tissu adipeux brun .....	135
3.3.1 « <i>Peroxisome proliferator-activated receptors</i> » <i>alpha et gamma</i> .....	136
3.3.2 « <i>Peroxisome proliferator-activated receptors-γ coactivator 1alpha</i> » .....	136
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>137</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>144</b>
<b>IV. QUELS TISSUS POURRAIENT ETRE IMPLIQUES DANS LA DEPENSE ENERGETIQUE SUPERIEURE DU RAT LOU/C ? INFLUENCE DE L'ACTIVITE PHYSIQUE SPONTANEE ET DE CYCLES FUTILES .....</b>	<b>145</b>
<b>RESUME .....</b>	<b>147</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>148</b>
<b>MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>149</b>
<b>1. Les animaux.....</b>	<b>149</b>
<b>2. Activité, prise alimentaire et masse des animaux .....</b>	<b>151</b>
<b>3. Prélèvements tissulaires et sanguins .....</b>	<b>151</b>
3.1 Le glucose plasmatique .....	151
3.2 Les acides gras non estérifiés (AGNE) plasmatiques.....	152

3.3 Les triglycérides (TG) plasmatiques.....	152
<b>4. Isolement des mitochondries.....</b>	<b>153</b>
4.1 Mitochondries hépatiques .....	153
4.2 Mitochondries musculaires.....	154
4.3 Mesure de la respiration mitochondriale .....	154
4.4 Mesure de l'activité Cox et du rendement d'extraction des mitochondries .....	154
<b>5. Quantification mitochondriale des protéines UCP1 et FAT/CD36.....</b>	<b>155</b>
<b>6. Dosage de l'activité de synthèse et d'oxydation des AG dans le foie et le WAT .....</b>	<b>155</b>
6.1 Dosage de l'activité de la fatty acid synthase (FAS).....	155
6.2 Dosage de l'activité de la 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (HAD).....	156
<b>7. Expression de gènes du métabolisme énergétique par RT-PCR .....</b>	<b>157</b>
<b>8. Statistiques .....</b>	<b>157</b>
<b>RESULTATS .....</b>	<b>158</b>
<b>1. Influence de l'activité physique spontanée sur l'animal entier .....</b>	<b>158</b>
1.1 Activité physique spontanée des rats Wistar et Lou/C.....	159
1.2 Influence de l'activité physique spontanée sur la prise alimentaire .....	159
1.3 Influence de l'activité physique spontanée sur la masse des animaux et des organes .....	160
<b>2. Influence de l'activité physique spontanée sur l'activité des mitochondries de BAT .....</b>	<b>161</b>
2.1 Effet de l'activité physique sur la fonctionnalité des mitochondries de BAT .....	161
2.1.1 Respiration de mitochondries isolées de BAT .....	161
2.1.2 Abondance relative de la protéine UCP1.....	162
2.2 Effet de l'activité physique sur l'apport en substrats au BAT .....	163
2.2.1 Effet de l'activité physique sur les apports en substrats lipidiques.....	163
2.2.1.1 Captage et transport des acides gras à chaîne longue.....	164
2.2.1.2 Entrée des acides gras à longue chaîne dans la mitochondrie.....	165
2.2.2 Effet de l'activité sur le captage de substrats glucidiques par le BAT .....	166
<b>3. Influence de la souche et de l'activité physique spontanée sur l'activité des mitochondries de muscle squelettique.....</b>	<b>167</b>
<b>4. Influence de la souche et de l'activité physique spontanée sur l'activité des mitochondries de foie .....</b>	<b>170</b>
<b>5. Existence d'un cycle futile entre synthèse et oxydation des acides gras impliquant le foie et le tissu adipeux ? .....</b>	<b>171</b>
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>174</b>
7.1 L'activité physique volontaire des rats Lou/C affecte sa prise alimentaire et sa composition corporelle .....	174
7.2 Le BAT n'est pas inactivé par l'activité locomotrice spontanée .....	175
7.3 Le muscle squelettique de rat Lou/C montre peu de modifications fonctionnelles de ses mitochondries mais est plus riche en mitochondries.....	176
7.4 Le foie pourrait être impliqué dans la dépense énergétique accrue des rats Lou/C .....	178
7.5 Existence d'un cycle futile entre synthèse et oxydation des acides gras entre le foie et le tissu adipeux blanc .....	180
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>181</b>
<b>ANNEXE METHODOLOGIQUE.....</b>	<b>183</b>
<b>1. Technique d'isolement des mitochondries .....</b>	<b>185</b>
1.1 Mitochondries hépatiques .....	185
1.2 Mitochondries musculaires.....	185
1.3 Mitochondries de BAT .....	186
1.4 Détermination de la quantité de protéines .....	186
<b>2. Mesure de la consommation d'oxygène des mitochondries isolées.....</b>	<b>186</b>
2.1 Principe .....	186
2.2 Procédure .....	187
2.3 Calcul des paramètres respiratoires .....	188
<b>3. Technique de Western blot.....</b>	<b>189</b>
3.1 Electrophorèse sur gel SDS-PAGE.....	189
3.2 Transfert sur membrane PVDF .....	190
3.3 Blocage .....	190
3.4 Couplage avec l'anticorps primaire .....	190
3.5 Couplage avec l'anticorps secondaire .....	190
3.6 Révélation .....	191

<b>4. Technique de RT-PCR semi-quantitative .....</b>	<b>191</b>
4.1 Extraction et dosage des ARN totaux .....	191
4.2 La Reverse Transcription .....	191
4.3 Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR) .....	192
4.4 Analyse des produits PCR .....	192
<b><u>CHAPITRE C : SYNTHÈSE ET PERSPECTIVES.....</u></b>	<b>193</b>
<b><u>CHAPITRE D : BIBLIOGRAPHIE .....</u></b>	<b>203</b>





# Avant-propos

L'obésité est une pathologie caractérisée par un large excès de masse grasse. Source de rejet social, mais également d'inconfort physique et de dépression, l'obésité est corrélée avec de nombreuses pathologies, qu'elles soient d'ordre mécanique, métabolique, endocrine ou cardiovasculaire. Ceci se traduit par une diminution de l'espérance de vie des patients obèses. Le plus dramatique reste le nombre de sujets atteints : on parle désormais d'épidémie d'obésité. Non seulement aux Etats-Unis, mais dans de nombreux pays industrialisés, y compris en France, l'obésité gagne du terrain, et ne semble pas céder son avance à l'en juger par le nombre sans cesse croissant d'enfants et d'adolescents en surpoids (Flegal et al., 1998; Mokdad et al., 2001). L'obésité s'affiche donc comme un problème majeur de santé publique.

En cause, le mode de vie de plus en plus urbain qui incite les hommes comme les femmes à consommer une nourriture plus riche en glucides simples et en lipides, tout en diminuant leurs activités physiques quotidiennes. La balance énergétique des individus, qui est composée, d'une part, des apports, et d'autre part, des dépenses énergétiques tend à être de plus en plus déséquilibrée en faveur des entrées, induisant un stockage excessif sous forme de graisse dans le tissu adipeux blanc. Le développement fulgurant de l'obésité dans le monde, associé à un coût économique important, a conduit de nombreux chercheurs à étudier les causes comme les conséquences de cette pathologie.

Nombre d'études ont donc porté sur des modèles d'animaux génétiquement obèses ou rendus obèses par des régimes, mais relativement peu d'entre elles ont été consacrées à des modèles présentant une résistance à l'obésité. Le rat Lou/C, quant à lui, ne développe pas d'obésité avec l'âge, contrairement à la souche Wistar dont il est issu. Ce rat maigre, longévif, représente un modèle de choix pour étudier des mécanismes visiblement efficaces de gestion énergétique pour limiter l'accumulation excessive de graisse.

Le but de ces quatre années de thèse fut d'étudier et de caractériser les différentes composantes de la balance énergétique du rat Lou/C, et de proposer un mécanisme énergétique responsable des capacités anti-obèses de ce modèle. Différentes approches ont

été utilisées de l'animal entier jusqu'à l'expression des gènes en conservant des approches fonctionnelles *in vivo* et *in vitro*.

**D**ans une première étude, nous avons déterminé les composantes de la balance énergétique du rat Lou/C par comparaison avec la souche Wistar dont il est issu, en mesurant d'une part l'énergie ingérée et, d'autre part, les différents postes de dépense d'énergie, tels que la dépense énergétique globale, la dépense liée à un repas et la dépense liée à l'exercice physique. Le but de cette étude était de déterminer quelles étaient les composantes de la balance énergétique du rat Lou/C qui pourraient contribuer au faible stockage adipeux.

**L**ors d'une seconde partie, nous avons recherché la contribution du tissu adipeux brun, le tissu thermogène principal responsable de la dissipation de l'énergie superflue chez le rongeur, à la maigreur du rat Lou/C. Déficiant chez le rat génétiquement obèse « Zucker », nous anticipions une hyperactivité thermogène de ce tissu chez une souche de rat maigre.

**C**ontre toute attente, le tissu adipeux brun du Lou/C n'était pas hyperactif chez le rat Lou/C nous poussant dans une troisième étude à vérifier si ce tissu pouvait néanmoins répondre à une stimulation classique comme l'exposition prolongée des rats au froid. Le but de cette étude était de vérifier si un défaut génétique empêchait l'activation du tissu adipeux brun dans la souche Lou/C ou s'il était simplement moins stimulé en conditions basales.

**D**ans une quatrième et dernière étude, nous avons recherché quel(s) pourrai(en)t être le (ou les) tissu(s) impliqué(s) dans la dissipation énergétique accrue du rat Lou/C.

# Chapître A :

# Rappels

# bibliographiques



## 1. L'obésité

### *1.1 Définition clinique de l'obésité*

L'obésité est caractérisée par un excès de poids lié à une augmentation très nette des réserves énergétiques, sous forme de graisse en excès. Diagnostiquer précisément l'obésité chez l'homme exige de connaître la masse grasse de l'individu, nécessitant ainsi des techniques non disponibles en routine : mesure de densité corporelle, absorptiométrie, tomодensitométrie, résonance magnétique... En pratique clinique comme en épidémiologie, l'obésité est définie à partir de l'Indice de Masse Corporelle (IMC, traduction de Body Mass Index ou BMI). L'IMC est calculé par le rapport de la masse (en kg) sur la taille élevée au carré (en m<sup>2</sup>). Lorsque l'IMC se situe entre 25 et 30 on parle de surpoids, lorsqu'il excède 30, on diagnostique une obésité, qualifiée de morbide si cet indice dépasse 35 kg/m<sup>2</sup>.

Le tissu adipeux représente 20 à 25 % de la masse totale chez la femme, tandis que chez l'homme elle varie de 15 à 20 % seulement. Le développement excessif de la masse adipeuse observé au cours de l'obésité fait à la fois intervenir une hypertrophie et une hyperplasie cellulaires. L'hypertrophie est l'augmentation de la taille des adipocytes (cellules adipeuses), conséquence de l'accumulation de grandes quantités de lipides dans la cellule. L'hyperplasie est la conséquence du recrutement de précurseurs et de leur différenciation en adipocytes matures. Selon sa localisation, le tissu adipeux se développe de façon plus ou moins excessive et les différents dépôts ne sont pas impliqués de manière équivalente dans l'installation de pathologies associées à l'obésité. Généralement, l'obésité androïde, accumulation de graisse au niveau de l'abdomen, est associée à un risque accru de développer des pathologies telles que le diabète de type II, l'hypertension, les maladies cardiovasculaires et thromboemboliques, le syndrome des ovaires poly kystiques, des atteintes hépatiques (stéatose) et de certains cancers (Lawrence and Kopelman, 2004) ; par comparaison à l'obésité gynoïde caractérisée par une accumulation de tissu adipeux au niveau glutéo-fémoral.

### *1.2 Complications médicales de l'obésité*

Non seulement source de rejet social, d'inconfort physique et de dépression, l'obésité est également associée à un grand nombre de pathologies variées. Ceci se traduit par une diminution de l'espérance de vie chez les sujets obèses (Thompson et al., 1999) ; 300000 morts par an sont attribuées à l'obésité aux Etats-Unis (Allison et al., 1999).

L'obésité engendre des pathologies ayant pour origine des problèmes mécaniques, métaboliques, endocrines ou cardiovasculaires.

### *1.2.1 Contraintes mécaniques*

La surcharge pondérale montre un effet direct, mécanique, d'une part sur la ventilation avec une réduction de certains volumes pulmonaires du fait de la quantité importante de tissu adipeux abdominal. L'excès de graisse au niveau thoracique entraîne des diminutions de la compliance thoracique et pulmonaire, se traduisant par des insuffisances respiratoires et le syndrome d'apnée du sommeil qui concerne 20 à 30% des obèses (Koenig, 2001; Laaban et al., 1996). Les contraintes mécaniques développées chez le sujet obèse peuvent conduire, d'autre part, à des atteintes rhumatologiques où une augmentation de l'évolutivité de l'arthrose, notamment au niveau de l'articulation de la hanche et du genou est observée.

### *1.2.2 Diabète non insulino dépendant (type 2)*

Le diabète de type 2 ou diabète non insulino dépendant est la conséquence d'une résistance à l'insuline en premier lieu, et secondairement d'une altération de la sécrétion d'insuline par le pancréas. La résistance à l'insuline dans le diabète de type 2 se manifeste par une diminution de la stimulation par l'insuline du transport et du métabolisme du glucose dans les adipocytes et les muscles squelettiques, ainsi qu'une altération de la suppression par l'insuline de la libération de glucose par le foie (Kahn and Flier, 2000).

Il est possible que la résistance à l'insuline chez l'obèse soit induite par un nombre insuffisant de transporteurs du glucose sensibles à l'insuline (glucose transporters 4, GLUT4), et/ou à l'incapacité de recruter ces transporteurs vers la membrane plasmique. Il a en effet été montré que chez la femme obèse, une importante masse de graisse abdominale est corrélée avec une moindre expression de GLUT4 au sein des différents dépôts de tissus adipeux blancs étudiés (Marette et al., 1997).

La corrélation entre obésité et développement d'un diabète de type 2 est clairement établie, et l'on estime que 60 à 90% des patients présentant un diabète de type 2 sont ou ont été obèses : le diabète de type 2 pouvant être la conséquence d'une surcharge pondérale. Cependant, il est à noter que tous les obèses ne développent pas nécessairement de diabète de type 2, le facteur génétique ainsi que l'hygiène de vie, notamment si le sujet conserve une activité physique régulière, doivent donc être pris en compte (Felber and Golay, 2002).

### *1.2.3 Pathologies coronariennes*

L'obésité accroît également le risque de souffrir d'hypertension (Stamler et al., 1978). Dans la population américaine, ce risque est multiplié par 3 ou 4 chez les patients obèses

(Thompson et al., 1999). Une activation du système nerveux sympathique serait en partie à l'origine du développement de cette pathologie. L'activation sympathique, induite par la leptine, hormone sécrétée par les adipocytes (Haynes, 2000), ainsi que l'activation inappropriée du système rénine-angiotensine, provoquent une vasoconstriction périphérique et une augmentation de la pression artérielle favorisant donc l'apparition d'hypertension chez le sujet obèse ou en surpoids (Schunkert, 2002). En effet, une prise de masse corporelle de 5% augmenterait de 30% le risque d'hypertension artérielle sur une période de cinq ans.

L'hyperlipidémie, en particulier l'hypercholestérolémie, est un autre facteur intervenant dans le développement de l'hypertension chez l'obèse. Chez le patient obèse, on observe un accroissement du taux de low density lipoprotein (LDL), et en contrepartie une chute du taux de high density lipoprotein (HDL). Ce déséquilibre engendre une augmentation du cholestérol circulant conduisant à une accumulation de dépôts lipidiques au niveau des vaisseaux sanguins, et à terme, par la formation d'une plaque d'athérome. L'athérosclérose et la viscosité importante du sang chez les individus obèses génèrent de fortes résistances à l'origine de l'hypertension qui peut être observée (Schunkert, 2002).

L'augmentation de la masse grasse, ainsi que l'hypertension artérielle provoquent au niveau cardiaque, par augmentation des contraintes mécaniques, une hypertrophie ventriculaire ainsi que des insuffisances coronaires et cardiaques gauches qui, associées à des altérations vasculaires, peuvent conduire à des accidents vasculaires cardiaques ou cérébraux.

### *1.2.4 Cancers*

Des études épidémiologiques ont montré que l'obésité était associée à un accroissement des risques d'apparition de 40% des cancers de l'endomètre, 25% des cancers rénaux, et 10% des cancers du côlon et du sein en Europe (Bianchini et al., 2002). L'excès de poids, et plus spécifiquement l'accumulation d'adiposité abdominale, seraient à l'origine d'une altération du métabolisme des hormones stéroïdes (androgènes, oestrogènes, progestérone), de l'insuline et de l'insulin growth factor 1 (IGF1). Les hormones stéroïdes sont connues pour réguler la balance différenciation, prolifération et apoptose, tandis que l'insuline et l'IGF1 stimulent la prolifération cellulaire et inhibent l'apoptose. La production anarchique de ces hormones serait la cause de l'incidence élevée d'un certain nombre de cancers chez les personnes obèses.

Ces risques de diabète de type 2 et de pathologies cardiovasculaires pourraient être réduits suite à une perte de 5 à 10% de masse chez les individus obèses (Kopelman, 2000; Williamson et al., 1999). De même, 30 à 60 minutes d'activité physique quotidienne réduiraient de 20 à 40% le risque de cancers du côlon, poumon, endomètre ou prostate.



De part l'incidence du nombre de cas d'obésité et des pathologies associées, lutter contre l'obésité devient une priorité, et pour ce faire, en connaître les causes apparaît comme fondamental.

### ***1.3 Facteurs favorisant le développement de l'obésité***

Un déséquilibre de la balance énergétique en faveur des entrées d'énergie engendre la survenue de l'obésité. Ce sont essentiellement des problèmes comportementaux et environnementaux qui s'associent pour désavouer les systèmes neuroendocriniens de contrôle de la balance énergétique, et aboutir à une mise en réserve excessive de lipides.

Le mode de vie de plus en plus urbain contribue à ce que certains qualifient d' « environnement obésogène » générateur de comportements qui accroissent le risque d'obésité. Ces dernières décennies, les habitudes alimentaires ont considérablement évolué. Globalement, la quantité d'aliments disponibles a augmenté. Une femme devrait en moyenne consommer 2000 kcal par jour pour couvrir ses dépenses sans modifier sa masse corporelle, et un homme environ 2500 kcal. En 1961, le nombre de calories disponibles par personne et par jour était de 2300 ; en 1998 ce chiffre avoisinait les 2800 et en 2015 il aura probablement dépassé les 3000 (Kopelman, 2000). En cause, le prix des céréales, du sucre et des graisses qui a chuté, mais surtout la consommation impressionnante de sucre. En effet, au vingtième siècle, moins de 5 kg de glucides simples et complexes étaient consommés par an et par individu ; en Europe, aujourd'hui, ce chiffre atteint 40 à 60 kg ! Les personnes mangent de plus grandes quantités, d'une alimentation plus riche, mais n'augmentent pas leurs dépenses pour autant. En Europe occidentale, deux tiers des adultes ne pratiquent pas une activité physique régulière suffisante.

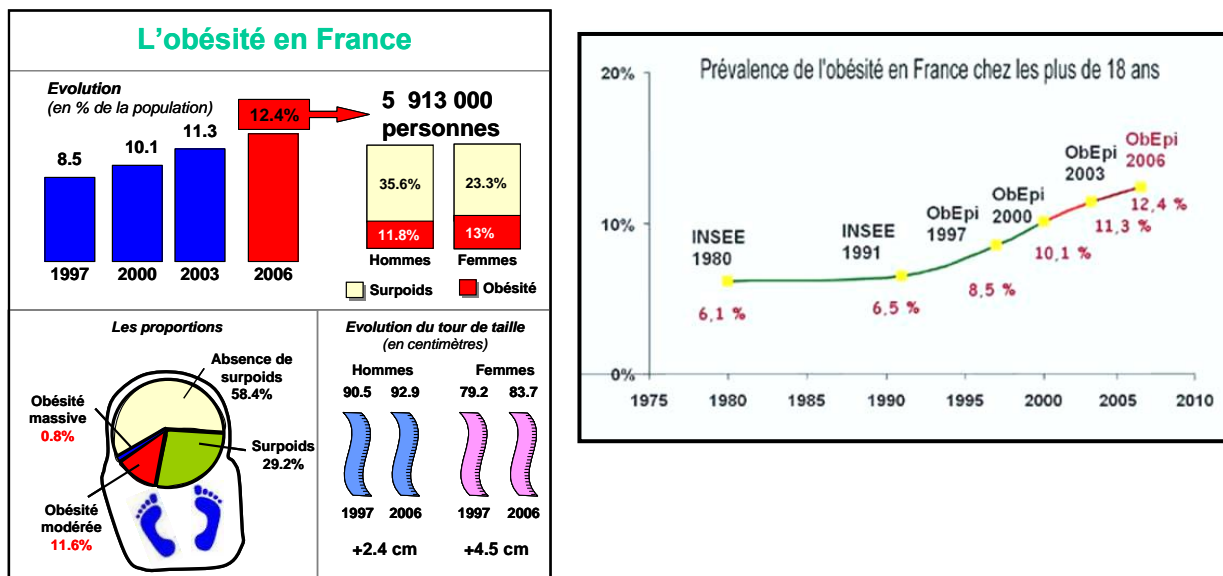
Des études ont mis en exergue, outre ces problèmes de comportements alimentaires, qu'un enfant dont les deux parents sont obèses aurait un risque d'obésité 3 fois supérieur à celui d'un enfant issu de parents minces. Ce déterminisme génétique serait lié à une meilleure « efficacité » générale de l'organisme pour stocker des lipides à partir d'aliments ingérés. Dans certaines obésités, des facteurs génétiques précis ont été mis en cause, notamment liés à une altération de la production de leptine (hormone sécrétée par les adipocytes en proportion de leur nombre, et qui diminue la prise alimentaire et augmente la dépense énergétique par son action centrale) ou de son récepteur. Chez certains patients obèses, il a été également recensé des mutations du gène codant pour la pré-pro-opiomélanocortine (POMC), un peptide impliqué au niveau du système nerveux central dans la limitation de la prise alimentaire (Krude et al., 1998).

Quelles qu'en soient les causes, actuellement dans le monde, le nombre de personnes en surpoids ne cesse de croître ainsi que les dépenses de santé qui lui sont associées. L'obésité est donc un problème majeur de santé publique.

### 1.4 Prévalence et évolution de la pandémie d'obésité dans le monde

Au cours du XX<sup>ème</sup> siècle, de nombreux pays industrialisés ont dû faire face à une véritable épidémie : l'obésité. De nombreux instituts et associations telles l'AOA (American Obesity Association), l'INSERM et l'INS (Institut National de la santé) ont lancé un cri d'alerte contre la stupéfiante progression d'obésité dans le monde. Aux Etats-Unis, l'augmentation du nombre d'obèses était de 75% entre 1980 et 1994 (Flegal et al., 1998), de 61% entre 1991 et 2000 (Mokdad et al., 2001). Aujourd'hui aux Etats-Unis, plus de 60% des adultes, 15% des adolescents de 12 à 19 ans et 13% des enfants de 6 à 11 ans sont en surpoids ou obèses (Flegal et al., 2002). L'obésité gagne du terrain depuis 20 ans, quels que soient le sexe, la classe d'âge ou le groupe ethnique des individus. L'augmentation la plus dramatique a été observée chez les adolescents pour lesquels le taux d'obésité a triplé en 20 ans.

Figure 1 : Prévalence de l'obésité en France (ObEpi 2006)



En France, d'après la dernière étude ObEpi (2006), le nombre de personnes obèses a été multiplié par deux au cours des 25 dernières années (figure 1). Cela concerne aussi bien les adultes que les enfants, dont les cas d'obésité ont doublé depuis 1980. Aujourd'hui en France, on estime qu'il y aurait entre 10 et 12% d'enfants atteints d'obésité.

L'obésité n'est pas seulement un fléau qui touche les Etats-Unis et la France, elle touche tous les pays « riches » et se répand comme une épidémie dans tous les pays en voie de développement à moyen ou faible revenu. L'obésité a donc un coût social énorme, mais également un coût économique important.

Concernant les dépenses de santé, la prise en charge des pathologies associées à l'obésité doublerait les dépenses de santé chez les personnes de 45 à 54 ans. Le coût économique

de l'obésité représente 2 à 5,5% des dépenses de santé dans les pays développés, soit 2,6 milliards d'euros en France, en 2000 (Detournay et al., 2000).

## **2. Modèles animaux utilisés pour étudier l'obésité**

### ***2.1 Exemples de modèles d'obésité***

Afin de mieux appréhender les mécanismes sous-tendant le développement de l'obésité et des maladies métaboliques associées, différents modèles animaux ont été étudiés. Depuis plus de 35 ans, différents modèles de rongeurs génétiquement obèses ou rendus obèses par des régimes sont utilisés.

#### *2.1.1 Modèles induits par une déficience du système leptinergique*

La leptine est une hormone sécrétée par les adipocytes en proportion de leur nombre et de leur taille. Cette hormone agit au niveau des noyaux hypothalamiques pour diminuer la prise alimentaire et augmenter la dépense énergétique.

Mutation *fa* : les rats de la souche Zucker, comportant une mutation faux sens au niveau du gène codant le récepteur à la leptine, développent très tôt une obésité. L'implication de la mutation *fa* dans la transmission du signal leptinique chez le rat Zucker a été montrée en 1996 (Phillips et al., 1996). Entre temps, de nombreuses études physiologiques ont permis de caractériser cette souche et de déterminer les mécanismes d'installation de l'obésité et l'implication du système nerveux central.

Mutation *ob* : le gène *ob* codant la leptine a été cloné en 1994 (Zhang et al., 1994). Les souris *ob/ob*, déficientes pour ce gène, sont étudiées depuis les années 70 pour leur obésité.

Mutation *db* : les souris homozygotes pour le gène récessif *db* (*diabetes*) sont diabétiques et obèses. Le gène *db* code pour le récepteur à la leptine.

On retrouve également une mutation non sens d'un gène codant le récepteur à la leptine chez le rat *Koletsky*, un autre modèle présentant une obésité (Wu-Peng et al., 1997).

#### *2.1.2 Autres mutations conduisant à l'obésité*

Le produit du gène *agouti* est un antagoniste du récepteur à la mélanocortine (MC4-R) impliqué dans le contrôle de la balance énergétique. Les souris *yellow agouti* expriment ce peptide au niveau central, ce qui empêche l'action de la mélanocortine et provoque une augmentation de la prise alimentaire et l'installation d'une obésité (Miller et al., 1993).

De nombreux modèles de souris obèses sont obtenus par manipulation génétique. Par exemple des souris knock-out pour des molécules d'adhésion intercellulaire développent une obésité en vieillissant (Levine and Billington, 1998), d'autres souris obèses sont obtenues par surexpression des transporteurs du glucose (GLUT-4) (Shepherd et al., 1993).

Le rat *Fischer 344 Brown Norway* est un modèle d'étude de l'obésité couramment utilisé car il présente une augmentation progressive de sa masse adipeuse avec l'âge (Li et al., 1997). Cependant, à notre connaissance, aucune mutation monogénique n'a été découverte chez cette souche de rats.

### *2.1.3 Autres modèles d'obésité*

Le rat *Wistar*, souche utilisée comme référence dans de nombreuses études, nourri *ad libitum* et dans les conditions standard d'élevage, tend à présenter en vieillissant les caractéristiques des rats obèses notamment en terme de quantité de masse grasse (Newby et al., 1990). Une alimentation hyperlipidique, c'est-à-dire constituée de plus de 20% de lipides, contre seulement 4 à 5% dans un régime standard, peut également conduire à l'installation d'une obésité chez les rats (Barzilai and Rossetti, 1995; Schemmel et al., 1970).

## **2.2 Exemples de modèles de résistance à l'obésité**

Beaucoup d'études concernant la régulation de la prise alimentaire et l'obésité se focalisent sur des sujets déjà obèses ou montrant une prédisposition à cette pathologie. Cependant, afin de comprendre ce phénomène et lutter contre l'obésité, les modèles de résistance à l'obésité peuvent apporter des données capitales.

### *2.2.1 Les souris SWR/J et A/J*

Il s'agit de souris qui présentent une masse corporelle 10 à 35% inférieure à celle de souris témoins, en partie expliquée par un pourcentage de masse grasse nettement plus faible. Ces souris absorbent significativement plus d'énergie, et lorsqu'on leur laisse le choix de leur alimentation, elles montrent une nette préférence pour les lipides.

Elles semblent particulièrement adaptées pour résister aux effets d'un régime hyperlipidique, puisque leur concentration d'insuline circulante ainsi que le transport de glucose dans le tissu adipeux blanc sous la dépendance de l'insuline sont plus faibles. Des dosages d'activités enzymatiques dans le muscle squelettique montrent que les capacités oxydatives de celui-ci sont stimulées, limitant ainsi le stockage excessif de graisse (Leibowitz et al., 2005).

### 2.2.2 Le rat S 5B/P1

Le pourcentage de tissu adipeux de ce rat est 30 à 65% inférieur à celui des rats *Wistar* ou *Sprague-Dawley*. Un régime hyperlipidique, composé de 60% de lipides, accentue d'autant plus ces différences. En effet, lorsqu'il est soumis à ce type de régime, ce rat augmente de 12% seulement sa masse corporelle, quand d'autres souches de rats prennent 25 à 50% de masse en plus (Schemmel et al., 1970). Les rats *S 5B/P1* sont des croisements entre *Sprague-Dawley* et *NIH Black rats*, deux souches de rats qui répondent à un régime hyperlipidique par une augmentation importante de leur pourcentage de masse grasse. Cette propension à stocker moins de graisse du rat *S 5B/P1* pourrait être expliquée par l'homozygotie de ses parents pour différentes paires de gènes qui interviennent dans le métabolisme ou le stockage de graisse.

Une étude montre que la concentration de noradrénaline (NA), ainsi que son turnover sont supérieurs dans le tissu adipeux brun des rats *S 5B/P1* à jeun par rapport aux rats Osborne-Mendel qui montrent une prédisposition à l'obésité avec l'âge et les régimes riches en lipides. Cette caractéristique est accentuée après un régime hyperlipidique, ce qui tendrait à expliquer le caractère anti-obèse des rats *S 5B/P1* (Fisler et al., 1984).

### 2.2.3 Le rat Lou/C

#### 2.2.3.1 Origine de cette souche

La souche de rats *Lou/C* dérive probablement du rat *Louvain*, sélectionné à partir de rats *Wistar* par Bazin et Backers et importé à l'université de Louvain, en Belgique, sous la forme d'un unique couple, dans les années 40. Cependant, l'origine exacte de cette souche s'est perdue (Alliot et al., 2002).

Le rat *Lou/C* a été étudié pendant de nombreuses années en radiologie et cancérologie pour sa capacité élevée à développer des tumeurs spontanées ou induites. Dans les années 50, les professeurs Maisin et Maldague découvrent dans la région iléocœcale de ces rats des tumeurs sécrétant des immunoglobulines. Puis, dans les années 1970, le professeur Bazin a obtenu à partir de ces rats 28 lignées différentes et distinctes. La lignée présentant la plus forte prédisposition aux tumeurs iléocœcales fut nommée *Lou/C* (Beckers and Bazin, 1978). Chez ce rat, les immunocytomes malins et les tumeurs sécrétant des immunoglobulines apparaissent spontanément dans la région iléocaecale lorsque les animaux sont âgés de 8 mois environ avec une incidence de 34% chez les mâles et 17% chez les femelles. Le pourcentage est maximal entre 12 et 15 mois puis diminue progressivement (Bazin et al., 1986; Bazin et al., 1980). Ces tumeurs apparaissent dans la cavité péritonéale et sont détectables à la palpation. Elles grossissent rapidement puis entraînent la mort de l'animal dans le mois suivant la détection. Aucune métastase n'est

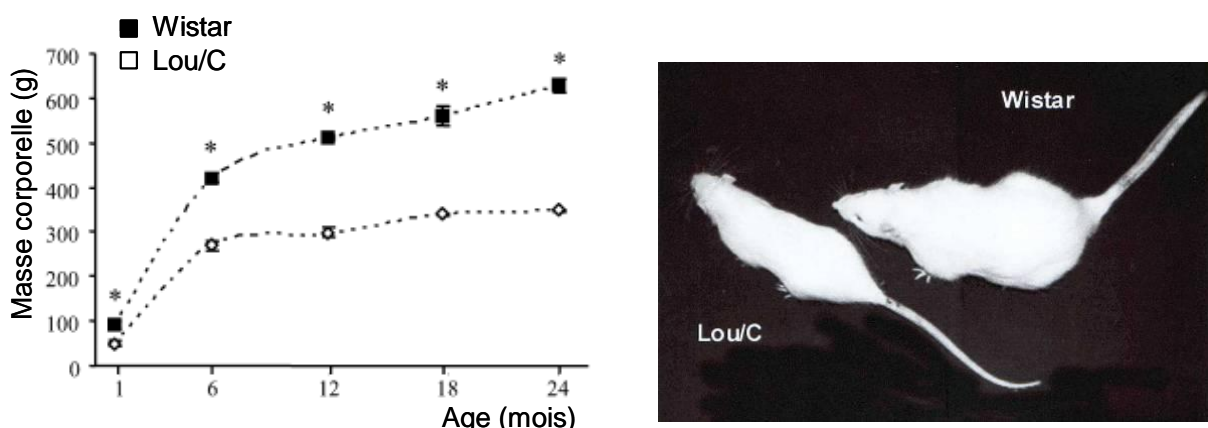
présente par ailleurs ; cette souche a donc été beaucoup utilisée pour la production de protéines monoclonales et a servi de modèle pour l'étude des propriétés physicochimiques et biologiques des immunoglobulines (Bazin et al., 1988).

Malgré cette forte incidence de tumeurs, caractéristique de la souche, il a été reporté un taux de survie de 49% à l'âge de 30 mois dans certaines colonies (Gaumet et al., 1996) ainsi qu'une augmentation générale de la longévité par rapport à ce qui est connu des souches plus communes telles que le rat Wistar (Dodane et al., 1991 ; Veyrat-Durebex and Alliot, 1997). Dans ces études, les premiers décès interviendraient à l'âge de 24 mois avec une espérance de vie plus longue pour les femelles : 67,5% de survie à 32 mois contre 60,5% pour les mâles. Ces données ont fait du rat Lou/C un modèle de vieillissement sain (Alliot et al., 2002). Il semblerait que le faible taux d'IGF1 (« insulin growth factor 1 ») circulant chez le rat Lou/C pourrait expliquer, au moins en partie, leur retard de vieillissement (Veyrat-Durebex et al., 2005), car il a été montré qu'IGF1 régule la durée de vie chez la souris et induit un phénotype proche de celui du rat Lou/C (Holzenberger et al., 2003).

### 2.2.3.2 Caractéristiques phénotypiques du rat Lou/C

C'est l'étude comportementale de cette souche qui a permis de mettre en évidence l'absence de développement d'une obésité avec l'âge, phénomène classiquement observé dans la souche Wistar, dont il est issu (Newby et al., 1990). Ce rat présente donc un phénotype particulier dont la principale caractéristique est une masse corporelle plus faible, se stabilisant aux alentours de 300 g (figure 2) (Alliot et al., 2002 ; Boghossian and Alliot, 2000 ; Couturier et al., 2002 ; Perrin et al., 2003b ; Soulage C, 2008).

Figure 2 : Evolution de la masse corporelle de rats Wistar et Lou/C (Perrin et al., 2003b)



La stabilité de leur masse corporelle est directement liée à une plus faible masse de tissu adipeux blanc, représentant environ 10 à 11% de leur masse corporelle tout au long de leur vie (Boghossian et al., 2000), alors que la masse grasse équivaut à 11% de la masse corporelle du rat Wistar à 3 mois pour atteindre 27% à l'âge de 19 mois (Alliot et al., 2002).

Les rats Lou/C sont également plus petits puisque la longueur naso-anale, mesurée par Perrin D. en 2003, est inférieure à celle du rat Wistar à 6, 24 et 31 mois. L'index de Lee permet cependant d'obtenir un indice d'adiposité supplémentaire et est calculé en divisant la racine cubique de la masse de l'animal par sa longueur naso-anale. Les rats Lou/C présentent un index de Lee inférieur à celui des rats Wistar, ce qui montre que la différence de masse corporelle observée est, certes liée à un retard de croissance, mais surtout le reflet d'une moindre masse grasse (Perrin et al., 2003b). Cette caractéristique phénotypique confère au rat Lou/C le rôle de modèle d'anti-obésité. La résistance à l'obésité, ou au contraire, la prédisposition à l'obésité, proviennent d'un dérèglement ou d'un meilleur ajustement entre les entrées d'énergie, et les dépenses d'énergie, conduisant ou non à un stockage sous forme de graisse.

### **3. La balance énergétique (BE)**

#### ***3.1 Définition***

L'homéostasie énergétique résulte de l'équilibre entre les apports d'énergie contenue dans les aliments et les mécanismes dissipateurs d'énergie. La résultante de ces deux composantes est appelée balance énergétique. De multiples régulations physiologiques sont impliquées dans l'optimisation de la prise alimentaire, du stockage, de la mobilisation des réserves énergétiques en réponse aux besoins de l'organisme.

De façon générale, dans toute situation où les apports ne compensent pas les dépenses d'énergie, un déséquilibre de la balance énergétique est observé, conduisant à un amaigrissement, ou à un ralentissement de la croissance des jeunes organismes ; c'est, par exemple, ce qui pourra être observé suite à une exposition prolongée au froid. A l'inverse, un excédent d'apport par comparaison à la dépense aboutira à un stockage excessif de graisse, d'où une surcharge pondérale qui pourrait aller jusqu'à une obésité. Un ajustement très fin des entrées et des sorties d'énergie est donc indispensable pour le maintien de la masse corporelle.

L'organisme parvient à réguler cette balance énergétique en jouant sur la prise alimentaire, mais également au niveau de différents postes de dépense d'énergie que sont : le métabolisme de base, la dépense énergétique liée à la prise alimentaire, la dépense énergétique liée à l'activité musculaire et la dépense énergétique associée à la thermorégulation.

## **3.2 Le métabolisme basal**

### *3.2.1 Définition*

Classiquement, chez l'homme, il s'agit de la dépense énergétique mesurée le matin, au repos, en position allongée, dans une ambiance thermique neutre, 12 à 14 heures après le dernier repas, et au calme psychique, c'est-à-dire sans activité intellectuelle importante qui stimulerait la dépense énergétique. Ce métabolisme de base correspond à la dépense énergétique nécessaire à la vie des cellules, au maintien des gradients électrochimiques, au fonctionnement des grandes fonctions physiologiques (circulation, respiration, excrétion, tonus musculaire) et à la stabilité de la température corporelle. La valeur de ce métabolisme de base est estimée à 1300 kcal (soit environ 5434 kJ) chez la femme et 1650 kcal (soit environ 6897 kJ) chez l'homme sur 24 heures.

En dehors de ces conditions de détermination du métabolisme basal, on privilégie la dénomination de métabolisme de repos surtout chez l'animal. La dépense énergétique quotidienne (ou globale, comme nous la nommerons dans nos études), quant à elle, comprend la dépense énergétique de repos et les dépenses associées à la prise alimentaire et à l'activité physique.

### *3.2.2 Facteurs de variation*

Il est important de noter que le métabolisme de base représente 60% des dépenses énergétiques totales d'un homme (sous réserve qu'il ait une activité physique moyenne), contre seulement 32% chez le rongeur (Black et al., 1996). Une grande proportion (60%) de ce métabolisme de base est reliée à la dépense énergétique d'organes tels que le foie, le cœur, les reins, les muscles et le cerveau. Le tissu adipeux, l'os et la peau n'interviennent que très peu dans le métabolisme basal. Ainsi, la composition corporelle influence le métabolisme basal qui dépend essentiellement de la masse maigre (Speakman and Selman, 2003). Par exemple, un individu ayant une masse musculaire importante montrera un métabolisme basal supérieur à un individu ayant une plus forte masse adipeuse. Ceci explique donc les différences de métabolisme observées en fonction du sexe : un homme présente un métabolisme basal 5 à 8 % plus élevé que celui d'une femme de même masse, de taille, et d'âge égaux. En effet, la femme possède une moindre proportion de masse maigre. Il en est de même pour l'effet de l'âge : le vieillissement induit une fonte musculaire, provoquant en conséquence une diminution du métabolisme basal. Une diminution de 2 à 3% du métabolisme de base est observée par décennie à partir de l'âge adulte, d'où la propension des individus à stocker plus de graisse s'ils ne diminuent pas leur prise alimentaire. Une étude reprenant un très grand nombre de données métaboliques obtenues



chez différentes espèces de mammifères a montré que le métabolisme basal était proportionnel à la masse corporelle élevée à la puissance  $2/3$  (White and Seymour, 2003).

La sous-alimentation engendre une diminution, jusqu'à 40%, du métabolisme basal (Shibata and Bukowiecki, 1987). Au cours de la phase de croissance, une plus forte dépense énergétique est observée, toute proportion gardée, par rapport à la masse et à la taille de l'individu. Ce coût énergétique est lié à la valeur énergétique des tissus gagnés, et à la synthèse des constituants de ces tissus. Par exemple, synthétiser une liaison peptidique nécessite un apport énergétique de 3 kcal soit 12,54 kJ.

### 3.2.3 Régulation hormonale

Certaines hormones stimulent le métabolisme basal, parmi elles, les hormones thyroïdiennes et la noradrénaline sont les principaux régulateurs du métabolisme. L'hypothyroïdie induit une diminution de 30 à 50% du métabolisme basal, quand l'hyperthyroïdie l'amplifie. Ce phénomène serait dû à l'influence des hormones thyroïdiennes sur la respiration mitochondriale couplée et découplée (Lombardi et al., 2007). En effet, l'hormone 3,5-diiodo-L-thyronine ( $T_2$ ) induit une stimulation de l'oxydation des substrats, donc de la respiration mitochondriale, ainsi qu'une augmentation des fuites de protons au sein de la membrane mitochondriale interne, donc de la respiration découplée. Il a par ailleurs été montré que les fuites de protons (« leak ») seraient responsables de 25% du métabolisme de base chez le rongeur (Rolfe and Brand, 1996), et que l'on pourrait leur attribuer 52% de la consommation d'oxygène du muscle de rat au repos (Rolfe et al., 1994). Affecter les fuites de protons dans le muscle squelettique de rat induirait donc bien des variations du métabolisme de base. L'effet des hormones thyroïdiennes est trop rapide pour être imputé uniquement à un mécanisme de transduction, transcription et traduction qui conduirait à une synthèse *de novo* de protéines. Cependant, l'adénine nucléotide translocase (ANT) et l'« uncoupling protein 3 » (UCP3), protéines de la membrane mitochondriale interne, connues pour augmenter la conductance aux protons, seraient impliquées dans l'effet découplant sur les mitochondries de muscle induit par les hormones thyroïdiennes (Brand and Esteves, 2005; Skulachev, 1991). La leptine, sécrétée principalement par les adipocytes, exerce une stimulation de la dépense énergétique en affectant notamment le statut thyroïdien (Ahima et al., 1996).

Le stress affecte également le métabolisme basal en stimulant le système nerveux sympathique : on observe alors une libération d'adrénaline qui stimule le métabolisme basal. L'action de la noradrénaline s'effectue à plusieurs niveaux : à court terme, elle permet notamment d'augmenter la fourniture en substrats à différents tissus (stimulation de la lipolyse, augmentation de l'activité cardiaque...), ainsi que l'activité de protéines impliquées

dans le métabolisme ; et à long terme, elle stimule indirectement la transcription de protéines impliquées dans l'augmentation de la dépense énergétique.

### **3.3 Effet thermique des aliments ou Diet Induced Thermogenesis (DIT)**

#### *3.3.1 Définition*

Toute prise alimentaire induit une thermogénèse. Cet effet spécifique et dynamique des aliments est appelé thermogénèse alimentaire (« diet-induced thermogenesis », DIT) ou thermogénèse post-prandiale. Elle est le résultat de 2 composantes : l'une dite *obligatoire*, et l'autre *facultative*.

La thermogénèse postprandiale « obligatoire » correspond à la dépense énergétique liée aux processus de digestion et de stockage des nutriments, elle dépend des voies métaboliques impliquées dans la mise en réserve des nutriments. La composante obligatoire varie avec la composition de l'aliment et est liée au coût de stockage de chaque nutriment. La thermogénèse liée à l'absorption et au stockage des glucides soit sous forme de glycogène ou de triglycérides représente respectivement 12 et 30% de l'énergie ingérée, la DIT induite par la consommation et la mise en réserve de lipides et protéines représente respectivement 7% et 40% de l'énergie totale ingérée.

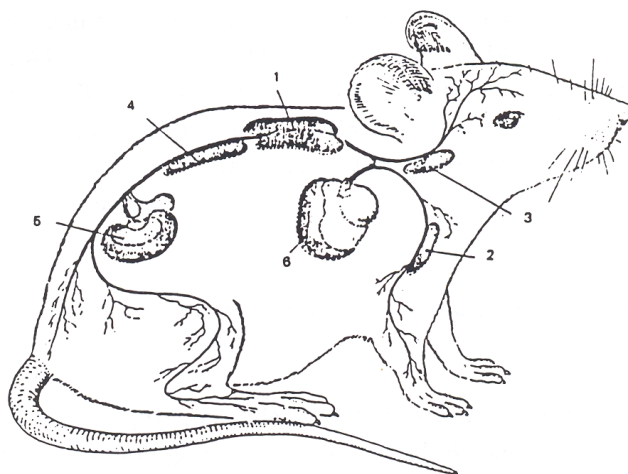
La thermogénèse postprandiale « facultative » entraîne une dépense d'énergie supplémentaire et correspond à la stimulation sympathique de la dépense énergétique pour dissiper, sous forme de chaleur, l'apport excessif d'énergie.

L'effet thermique des repas représente environ 10% des dépenses énergétiques quotidiennes (Jequier et al., 1987). Il varie selon la taille, la composition du repas et la palatabilité de l'aliment. Un régime équilibré induit une faible DIT par comparaison à un régime déséquilibré, hyperlipidique par exemple (Rothwell and Stock, 1979).

#### *3.3.2 DIT et tissu adipeux brun (BAT)*

Le tissu adipeux brun (« brown adipose tissue », BAT) est un tissu spécialisé dans la production de chaleur. L'activité thermogène du BAT, et par conséquent sa contribution au métabolisme total de l'organisme, dépend de la quantité de tissu, de son niveau d'activation par le système nerveux sympathique (Cannon and Nedergaard, 2004), de l'espèce, de l'âge, et de l'état physiologique de l'animal. On trouve du BAT chez la plupart des mammifères nouveaux-nés, des rongeurs jusqu'à l'homme. Les dépôts de BAT sont en général plus importants chez les rongeurs acclimatés au froid, ainsi que chez les hibernants. Les dépôts sont situés au niveau inter-scapulaire, dans la région supra-cardiaque, et dans la zone péri-rénale (figure 3). Très vascularisé, ce tissu est caractérisé par sa richesse en mitochondries.

**Figure 3 : Localisation des dépôts de tissu adipeux brun chez le rat**



1) masse bilobée interscapulaire ; 2) dépôts sous les aisselles au contact des veines brachiales et sous-clavière ; 3) dans le cou, le long des veines jugulaires et des carotides ; 4) le long de l'aorte ; 5) dans la région rénale, au contact des glandes surrénales, de la veine rénale et de la veine cave ; 6) autour du coeur (d'après Portet, 1983).

La thermogénèse alimentaire met essentiellement en jeu des mécanismes développés dans le BAT (Rothwell and Stock, 1997). La thermogénèse dans le BAT est le résultat de la transformation de l'énergie chimique, contenue dans les aliments ingérés, en chaleur, sans stockage sous d'autres formes chimiques. Ce mécanisme provient d'une altération de la fonction des mitochondries, notamment liée à la présence d'une protéine découplante nommée UCP1 (« uncoupling protein 1 ») et dont la fonction sera explicitée dans le paragraphe 4.2.2.2.

L'ampleur de la DIT semble corrélée en partie à la capacité de dissipation de l'énergie superflue sous forme de chaleur du BAT : en effet, la DIT sera supérieure chez des animaux acclimatés au froid, ayant donc développé des capacités de thermogénèse importantes au niveau de leur tissu adipeux brun (Allard and Leblanc, 1988 ; Cannon and Nedergaard, 2004). A l'inverse, une diminution de l'activité du tissu adipeux brun, et par conséquent une plus faible DIT induirait une obésité (Rothwell et al., 1981).

### 3.3.3 DIT extra BAT

Bien que les mécanismes thermogènes mis en jeu dans le BAT soient très efficaces, le foie peut participer à la dissipation d'énergie consécutive à un repas chez le rat (Ma et al., 1987). En effet, une hépatectomie de 2/3 diminue davantage (1,3 fois) le métabolisme de base de rats nourris avec un régime cafétéria et développant une DIT que celui de rats nourris normalement. Chez les oiseaux, l'absence de BAT permet de suggérer la participation du foie à la DIT (Gabarrou et al., 1997b) et les hormones thyroïdiennes associées à l'action de catécholamines semblent jouer un rôle important (Gabarrou et al., 1997a). En effet, la contribution hépatique du foie à la DIT a été suggérée dans une lignée

de coqs hyperphagiques (R+). Le métabolisme de base, estimé par la production de chaleur chez les animaux à jeûn, n'est pas différent de la lignée de coqs témoins (R-). En revanche, lorsque les animaux sont nourris, les coqs R+ compensent leur excédent énergétique alimentaire (+ 40%) par une stimulation de leur DIT (+ 29%) (Gabarrou et al., 1997b). Cette production de chaleur facultative est inhibée par l'ingestion de propranolol (5 mg / kg). Chez le rat hyperphagique, l'augmentation de la thermogénèse serait principalement induite par une stimulation  $\beta$ -adrénergique et thyroïdienne du BAT (Rothwell and Stock, 1979), ainsi que de l'activité mitochondriale du foie. Chez la souris, dont le BAT est rendu déficient, aucune étude n'a mis en évidence de DIT minorée, il semblerait donc que la DIT ne soit pas exclusivement dépendante du BAT (Cannon and Nedergaard, 2004).

### ***3.4 Dépense énergétique liée au travail musculaire***

#### *3.4.1 Définition*

L'activité physique spontanée représente 8 à 20% de la dépense énergétique totale chez une personne sédentaire (Ravussin et al., 1986), mais cette part est très variable et peut atteindre jusqu'à 60% de la dépense énergétique totale lors d'efforts prolongés. Le rendement du travail musculaire est de l'ordre de 20 à 25%, le reste de l'énergie est « gaspillé » sous forme de chaleur.

Il convient en fait de distinguer 2 composantes de la dépense énergétique associée au travail musculaire: d'une part l'énergie dépensée dévolue à une activité physique qui n'est pas de l'exercice (non exercise activity thermogenesis, NEAT), et d'autre part l'énergie dépensée associée à l'exercice.

#### *3.4.2 Dépense énergétique non liée à l'exercice physique*

La NEAT concerne au sens strict du terme uniquement les mouvements involontaires tels que la contraction spontanée des muscles et le maintien de la posture. Le frisson thermique, ainsi que la contraction cardiaque entraînent une NEAT. Usuellement, de nombreuses études associent les activités de la vie courante à la NEAT, excluant seulement l'exercice physique programmé (Levine et al., 2005). Ce terme d'exercice programmé définit une pratique sportive volontaire : telle que la course d'endurance chez l'homme ou l'activité physique spontanée en roue d'activité chez le rongeur.

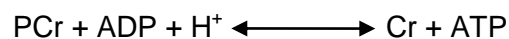
Une étude montre que, chez l'homme, une NEAT plus élevée induit une résistance au stockage des graisses par dissipation accrue de l'énergie superflue (Levine et al., 1999). Il a été également observé que des rats résistants à l'obésité (OR) sont, comme les rats prédisposés à l'obésité (OP), actifs essentiellement au cours de la phase nocturne. En

revanche, les rats OR présentent des épisodes ambulatoires plus fréquents, et plus longs. Les rats OR dépensent alors plus d'énergie liée à cette NEAT, et restent maigres, alors même qu'ils ingèrent plus de nourriture que les rats OP (Kotz et al., 2008). Un réseau de médiateurs très complexe (ghréline, AgRP, orexine, ...) semble être en cause dans la régulation de la NEAT (Kotz et al., 2008). Bien que les mécanismes neurobiologiques exacts sous-tendant la stimulation de la NEAT ne soient pas encore clairement élucidés, ils apparaissent comme une voie d'étude prometteuse dans la compréhension des phénomènes de résistance à l'obésité.

### 3.4.3 Dépense énergétique et exercice physique

L'exercice physique induit également une dépense énergétique liée à un travail musculaire. Cette dépense est proportionnelle à la masse musculaire mise en jeu, à l'intensité et à la durée du travail musculaire effectué.

Il faut distinguer la dépense énergétique liée à l'exercice lui-même, donc à l'activité mécanique des muscles, et la dépense énergétique liée à la récupération post-exercice (excess post-exercise O<sub>2</sub> consumption, EPOC). La dépense énergétique liée à l'EPOC correspond à trois besoins principaux. Tout d'abord il convient de reconstituer les stocks d'hémoglobine oxygénée dans le sang et de myoglobine oxygénée dans les muscles. Il s'agit également de resynthétiser de l'ATP, par une réaction catalysée par la créatine kinase, où la phosphocréatine (PCr) réagit avec l'adénosine-diphosphate (ADP) et l'hydrogène (H<sup>+</sup>) pour former ATP et créatine (Cr) :



La navette créatine kinase – phosphocréatine permet aux groupements phosphates à haute énergie de passer d'une molécule de créatine kinase à la suivante. Seul le phosphate bouge de la mitochondrie à l'unité contractile de la fibre musculaire tandis que le nucléotide de l'ATP ou ADP reste relativement statique. L'énergie dépensée post-exercice est aussi due à une oxydation préférentielle des lipides et à une régulation par les catécholamines (Borsheim et al., 1998b).

Pour un exercice long, mais de faible intensité, la dépense énergétique liée à l'EPOC est inférieure à la dépense générée par l'exercice lui-même. Cependant, lorsque l'exercice est de courte durée, mais intense, l'énergie dépensée lors de la récupération représente 80 à 90% de la totalité de l'énergie dépensée pour cet exercice (Baker and Gleeson, 1999), et est en partie sous la dépendance du système β–adrénergique (Borsheim et al., 1998a).

L'entraînement physique d'endurance augmente généralement les capacités oxydatives musculaires et améliore l'oxydation des substrats lipidiques. L'activité physique semblerait également induire un couplage plus efficace des mitochondries musculaires (Horowitz and Klein, 2000). L'entraînement physique endurant semblerait également

diminuer l'activation du BAT (Sullo et al., 2004). Un meilleur couplage mitochondrial, donc moins de pertes énergétiques sous forme de chaleur, et une moindre activité du BAT nous conduisent à penser que l'adaptation à l'exercice s'opposerait en partie à l'adaptation au froid. Cependant, l'activité musculaire étant fortement thermogène, elle n'est pas forcément défavorable à l'organisme lors d'une exposition au froid.

### **3.5 Thermorégulation**

#### *3.5.1 Définition*

Contrairement aux ectothermes, dont la température corporelle dépend étroitement de la température extérieure, les endothermes, et notamment les mammifères, maintiennent leur température interne à un niveau élevé et constant, malgré les variations, dans certaines limites, de la température ambiante. La constance de la température centrale, ou homéothermie, est possible, grâce à la régulation active d'un équilibre entre la production de chaleur de l'animal, ou thermogénèse, et les pertes de chaleur imposées par l'environnement ou thermolyse.

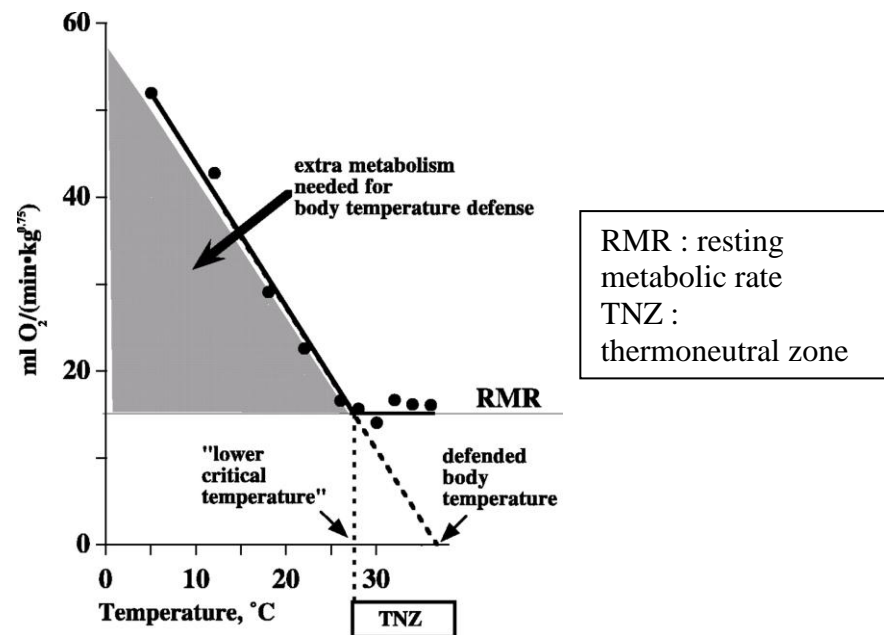
#### *3.5.2 Frisson thermique*

Lorsque l'animal se trouve dans une ambiance thermique neutre, définie comme la zone de neutralité thermique ou TNZ (figure 4), le maintien de la température corporelle est assuré par l'équilibre entre les pertes thermiques par conduction, convection et radiation et la production de chaleur par le métabolisme de repos.

Lors d'une exposition aiguë au froid, les pertes de chaleurs augmentent. Afin d'éviter l'hypothermie, des mécanismes de limitation des pertes de chaleur, que l'on pourrait qualifier d'« économiques » d'un point de vue énergétique (comportement, isolation, réponses vasomotrices), sont mis en jeu dans un premier temps. Si ces processus sont insuffisants pour limiter les pertes thermiques avec l'environnement, l'animal est contraint d'augmenter sa production de chaleur afin d'équilibrer son budget thermique : il s'agit de la thermogénèse de régulation.

Chez tous les endothermes, la thermogénèse de régulation repose principalement sur le frisson thermique. Les contractions asynchrones des muscles squelettiques antagonistes ne génèrent pas de mouvements volontaires mais stimulent les processus oxydatifs, entraînant une consommation ainsi qu'une resynthèse accrue d'ATP, mécanismes générateurs de chaleur. De fait, la thermogénèse de frisson est relativement invalidante et tend à s'estomper progressivement lors d'une exposition prolongée au froid pour être remplacée par une thermogénèse en l'absence de frisson.

Figure 4 : Thermorégulation en réponse aux variations de température externe (Cannon and Nedergaard, 2004).

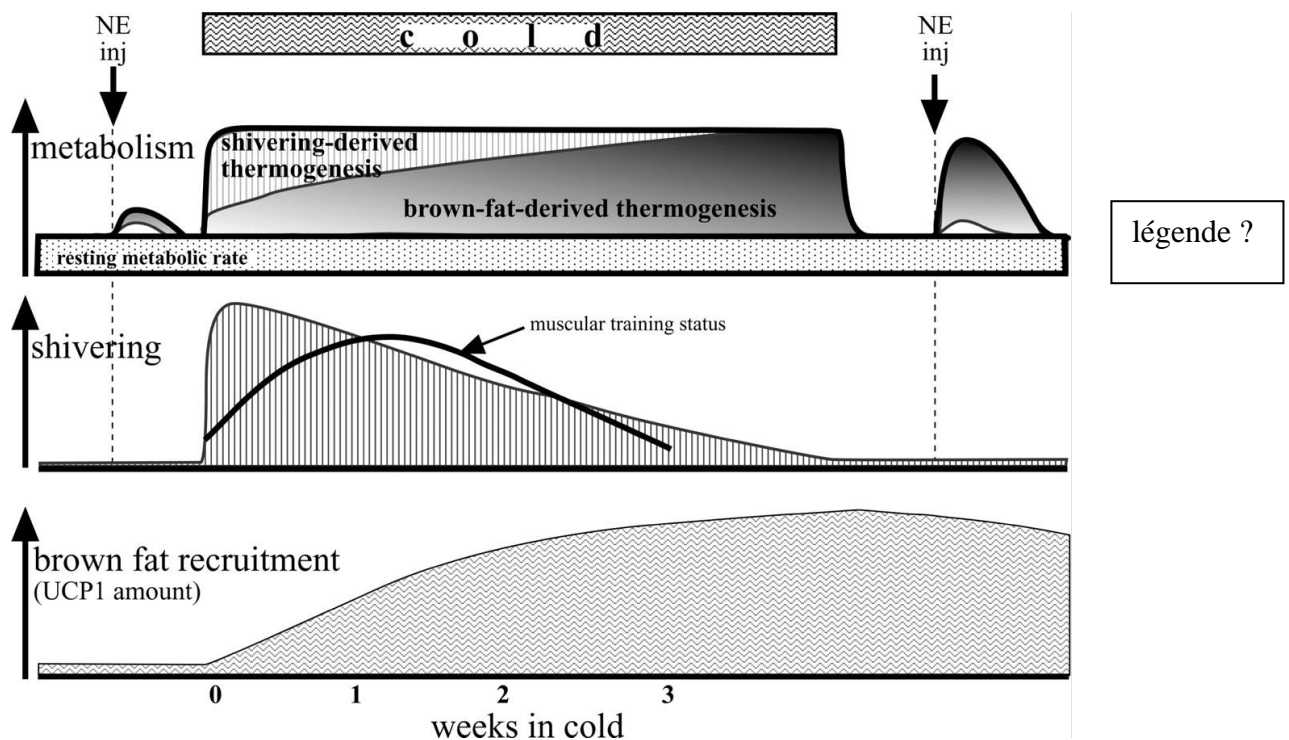


### 3.5.3 Thermogénèse sans frisson

Si l'exposition au froid se prolonge, une thermogénèse sans frisson (nonshivering thermogenesis, NST), caractéristique de l'adaptation au froid, se développe et se substitue progressivement au frisson thermique (Griggio, 1982) (figure 1.5). Après quelques semaines d'exposition prolongée au froid, la NST est le principal mécanisme thermogène utilisé à la température d'acclimatation en liaison, chez les petits mammifères, avec l'activation thermogène du BAT que l'on peut tester classiquement par une injection-test de noradrénaline (figure 5) (Jansky, 1973).

La NST consiste en des modifications durables du métabolisme, permettant des modifications thermorégulatrices immédiates plus puissantes ou de nature différente de celles mises en œuvre chez l'animal non acclimaté au froid.

Figure 5 : Réponses métaboliques à une exposition aiguë et chronique au froid (Cannon and Nedergaard, 2004)



La capacité à survivre au froid dépend donc du passé thermique de l'animal. Ainsi, un animal habitué uniquement à vivre à des températures avoisinant les 20°C utilisera ses capacités de frisson thermique et de NST lors d'une exposition courte au froid, et compensera ses pertes thermiques par une production accrue de chaleur. Si le froid se prolonge, ses capacités pulmonaires, cardiaques et musculaires ne seront plus assez développées, il s'ensuivra une chute de sa température interne. Un animal préalablement exposé à des températures inférieures à 20°C montrera des capacités de NST suffisantes pour maintenir sa température interne. Beaucoup de petits mammifères, tels que la souris, choisissent donc la torpeur en réponse au froid. Leur température corporelle s'abaisse donc de façon contrôlée, afin de conserver l'énergie nécessaire aux fonctions vitales de l'organisme. Cependant, si le tissu adipeux brun, siège principal de la NST, a déjà été activé suite à une précédente exposition au froid, ou à un régime hypercalorique, alors la NST sera le principal mécanisme de production de chaleur, même s'il s'agit d'une exposition aiguë au froid (Cannon and Nedergaard, 2004).

#### 3.5.4 NST et tissu adipeux brun

Il est désormais bien établi qu'une exposition prolongée au froid conduit au recrutement du BAT. La capacité de NST du BAT est fortement corrélée avec la masse de



ce tissu, son nombre de cellules et de mitochondries, la quantité d'enzymes mitochondriales, et d'enzymes d'oxydation des acides gras. Il a également été mis en évidence que la quantité totale de protéine découplante UCP1 (*cf.* paragraphe 4.2.2.2) peut être multipliée jusqu'à 10 fois en réponse à une exposition prolongée au froid (Jacobsson et al., 1994; Milner and Trayhurn, 1989). Les capacités oxydatives de ce tissu en font le site majeur de NST, responsable d'au moins 60% de la NST chez les rongeurs (Foster and Frydman, 1979). Cependant, des animaux totalement dépourvus d'UCP1 et ayant perdu la capacité de développer une thermogénèse sans frisson peuvent survivre plusieurs mois à 5°C, à condition d'avoir préalablement subi de petites expositions à des intensités de froid croissantes. Il semblerait alors qu'ils développent des capacités musculaires d'endurance, leur permettant de supporter un frisson thermique intense (Cannon and Nedergaard, 2004).

### *3.5.5 NST et muscle squelettique*

Le muscle squelettique pourrait jouer un rôle significatif dans la NST. Une étude a montré que la consommation d'oxygène de muscles perfusés de la patte chez le rat (en présence de curare) doublait en réponse à une exposition au froid, ou à une injection de noradrénaline (Jansky and Hart, 1963). Il a été proposé que l'apport accru en oxygène dans le muscle serait utilisé pour le travail musculaire, afin de suppléer le BAT pour les processus thermogéniques (Foster and Frydman, 1979). L'importance du muscle dans la NST fut alors soulignée de part la masse importante que représentent les muscles dans l'organisme, et leur haute capacité métabolique (Block, 1994 ; Lowell and Spiegelman, 2000). Il a alors été estimé que la musculature participerait de 12 à 25% à la NST, et pourrait même devenir plus importante chez les mammifères ne possédant pas de BAT comme le porc, ou un BAT peu actif, comme l'homme.

Les mécanismes musculaires de NST sont moins bien caractérisés que dans le BAT. Certaines études suggèrent qu'il existerait un découplage partiel des oxydations et des phosphorylations dans le muscle squelettique de rat. L'expression de protéines découplantes homologues à l'UCP1 de BAT a été mise en évidence dans différents tissus, et notamment dans les muscles squelettiques chez les rongeurs. Il s'agit des protéines UCP2 et UCP3, bien que le rôle de ces protéines soit encore discuté, leur surexpression dans des bactéries et des cellules de mammifères est responsable du découplage des oxydations et phosphorylations mitochondriales, ainsi que de l'augmentation de l'utilisation des acides gras par la cellule musculaire (Garcia-Martinez et al., 2001; Nedergaard et al., 1999 ; Ricquier and Bouillaud, 2000 ).

D'autres mécanismes potentiellement thermogènes comme des cycles futiles consommateurs d'ATP pourraient également être à l'origine d'une NST musculaire. La pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> a été largement étudiée et serait responsable de 5 à 10 % du métabolisme

énergétique musculaire. La mise en évidence d'un coût énergétique lié au transport du calcium indique qu'il induirait 20 à 45 % de la chaleur produite par le muscle squelettique au repos. Le cycle de relargage – repompage du calcium par le réticulum sarcoplasmique pourrait être à l'origine d'une NST musculaire (Dumonteil et al., 1994).

Cependant, une expérience menée sur des souris n'exprimant pas la protéine UCP1 au sein de leur BAT montre que leur comportement, lors d'une exposition au froid, est radicalement différent de celui des souris sauvages. En effet, les souris KO-UCP1 continuent de frissonner avec la même intensité qu'au début de l'exposition, et ce, même après plusieurs mois d'exposition au froid (Golozoubova et al., 2001). Cela suggérerait que le métabolisme basal, fortement dépendant des muscles squelettiques, ne peut être adapté en fonction de la température à laquelle est exposé l'animal, et ainsi réduire la nécessité de frissonner. Pourtant, certaines études montrent qu'une NST peut se mettre en place, et ce, même chez des animaux dépourvus de BAT. C'est le cas des oiseaux : il ne fait aucun doute que la NST existe chez les oiseaux, bien que dépourvus de BAT (Barre et al., 1985). D'autres organes que le BAT, tels que le foie, ont alors été proposés comme sites potentiels de NST (Jansky, 1973).

### 3.5.6 NST et foie

Le foie représente seulement 2% de la masse corporelle d'un organisme de mammifère, néanmoins, il s'agit d'un organe indispensable dans la régulation de la glycémie et du métabolisme énergétique en général, et sa participation au métabolisme de repos de l'animal entier n'est pas négligeable (29% environ). Ainsi, le déséquilibre de la balance énergétique induit par l'exposition au froid pourrait modifier le fonctionnement hépatique. Un certain nombre de travaux suggèrent donc la participation du foie dans la thermogénèse de régulation. Stoner, en 1973, a observé chez le rat, que le gradient de température entre le foie et le sang efférent augmentait lorsque la température ambiante diminuait, suggérant une production hépatique de chaleur (Stoner, 1973). Cette affirmation est renforcée par les travaux de Foster et Frydman montrant, chez le rat exposé de façon aiguë au froid, une redistribution du volume sanguin en faveur des tissus participant à la NST, comme le BAT, les muscles squelettiques, mais également le foie (Foster and Frydman, 1978).

D'autres arguments physiologiques et biochimiques sont en faveur d'une participation du foie dans l'augmentation de la dépense énergétique lors d'une exposition prolongée au froid. Chez le rat acclimaté au froid (21 à 30 jours, 3-4°C), la synthèse protéique mitochondriale, estimée grâce à l'utilisation d'acides aminés marqués radioactivement, est fortement accrue dans le foie (Petrovic et al., 1978). Parallèlement l'activité spécifique des protéines de la fraction soluble mitochondriale et l'activité de la cytochrome c oxydase (COx) sont augmentées dans le foie. Ces résultats sont confortés par l'augmentation de la masse

protéique mitochondriale chez des rats exposés (10 jours, 4°C) et adaptés au froid (30 à 40 jours, 4°C) (Iossa et al., 1994; Liverini et al., 1992).

Si l'exposition au froid est prolongée, il a été montré, dans certains cas, une diminution du couplage des mitochondries hépatiques (Goglia et al., 1988). Ces observations suggèrent que l'exposition chronique au froid pourrait accroître les fuites de protons à travers la membrane interne de la mitochondrie. En l'absence supposée d'UCP dans les hépatocytes, ce phénomène pourrait être expliqué, dans certaines conditions, par l'activité du translocateur des nucléotides adényliques (ANT), permettant la sortie d'ATP en échange de l'entrée d'ADP dans la mitochondrie. Plus récemment, toutefois, il a été décrit qu'une protéine apparentée aux UCPs était exprimée dans des lignées hépatiques (HDMCP). Le rôle de cette protéine reste discuté.

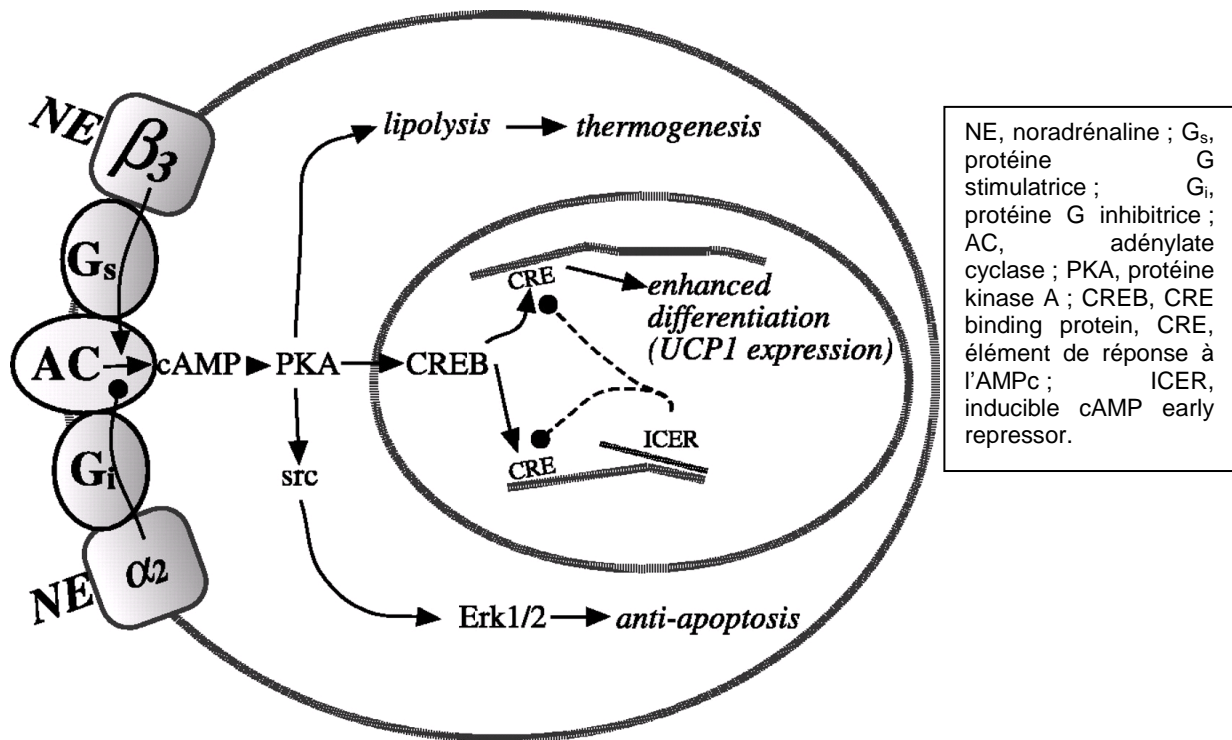
### *3.5.7 Régulation hormonale de la NST*

#### 3.5.7.1 Rôle des catécholamines

Beaucoup de substances sont thermogènes lorsqu'on les injecte à un animal. Les catécholamines jouent désormais un rôle bien établi dans la régulation de la NST chez les mammifères. Un traitement chronique avec de la noradrénaline (NA), chez des rongeurs élevés à thermoneutralité, induit le développement d'une NST, reproduisant partiellement les effets d'une acclimatation au froid (Leblanc and Pouliot, 1964). Chez un animal ayant été préalablement acclimaté au froid, une injection unique de NA conduit à une réponse thermogène de type NST amplifiée par rapport à celle développée suite à l'exposition au froid (figure 5) (Cannon and Nedergaard, 2004).

La NA libérée par les terminaisons sympathiques se fixe sur des récepteurs spécifiques,  $\beta_3$ -adrénergiques, situés, notamment, à la surface des adipocytes bruns (figure 6). Une protéine  $G_s$  est alors activée, provoquant la stimulation d'une adénylate cyclase, induisant ainsi l'augmentation de la concentration intracellulaire en AMPc. La lipolyse sera alors activée, ce qui implique la libération d'acides gras agissant à deux niveaux distincts : comme inducteurs du découplage mitochondrial (activateurs de protéines découplantes), et comme substrats thermogènes principalement sollicités lors d'une exposition au froid. L'AMPc sera également responsable de l'activation d'une protéine kinase A (PKA) qui phosphorylera le facteur de transcription CREB, responsable en partie de l'activation de l'expression de nombreux gènes, dont celui de la protéine UCP1.

Figure 6 : Voies de signalisation et  $\beta_3$ - et  $\alpha_2$ -adrénergiques dans l'adipocyte brun mature de rat (Cannon and Nedergaard, 2004).



La réponse à la NA est généralement associée à la capacité de NST de l'animal (Jansky, 1973) ; un test fonctionnel à la NA est donc classiquement utilisé pour apprécier les capacités de NST d'un organisme. L'amplitude de la réponse à la NA sera amplifiée chez les animaux acclimatés au froid. La majeure partie de la thermogénèse induite par la NA émanerait du BAT chez les animaux acclimatés au froid (Foster and Frydman, 1978). D'autres hormones pourraient avoir également un effet thermogène.

### 3.5.7.2 Rôle des hormones thyroïdiennes

Les hormones thyroïdiennes sont connues pour affecter le métabolisme énergétique des cellules et pour leur implication dans l'acclimatation au froid (Himms-Hagen, 1983); une augmentation de leur concentration plasmatique est observée au cours d'une exposition au froid. Elles agissent de façon significative sur le métabolisme et le développement des muscles squelettiques, en affectant un certain nombre d'enzymes clés du métabolisme, ainsi qu'en stimulant à la fois les voies glycolytiques et lipolytiques. Les hormones thyroïdiennes stimuleraient directement l'expression de  $Ca^{2+}$ -ATPase, à la fois *in vivo* (Simonides et al., 1990), et *in vitro* (Muller et al., 1991).

Les hormones thyroïdiennes seraient également requises pour le développement et la différenciation du BAT, le site majeur de NST chez les petits mammifères. A long terme, les hormones thyroïdiennes permettraient l'augmentation des populations mitochondriales en contrôlant la biogénèse et les capacités fonctionnelles des mitochondries chez les

mammifères (Triandafillou et al., 1982). Des études réalisées *in vitro* et *in vivo* montrent que la T<sub>3</sub>, la forme active de l'hormone, permettrait et amplifierait l'expression des protéines découplantes (Ribeiro et al., 2001). Si les hormones thyroïdiennes sont essentielles dans la régulation de la thermogénèse sans frisson, leur rôle est probablement lié à leur effet à long terme sur la différenciation et le développement des capacités oxydatives de nombreux tissus. En effet, la production de chaleur produite par le BAT, lors de l'acclimatation au froid, est associée avec une stimulation de l'activité de la thyroïde, une concentration circulante en T<sub>3</sub> augmentée, ainsi qu'une élévation de la production de T<sub>3</sub> (Hefco et al., 1975 ; Silvestri et al., 2005). Cependant lorsque l'on injecte à un rat des doses d'hormone thyroïdienne toutes les six heures pendant 3 jours, afin de reproduire la dose circulante de T<sub>3</sub> mesurée lors d'une exposition au froid, celle-ci n'induit pas d'augmentation de la dépense énergétique (Dauncey, 1990 ; Whitaker et al., 1990). Il existe une coopération entre le système nerveux sympathique, notamment la noradrénaline, ainsi que les hormones thyroïdiennes dans l'induction de la thermogénèse dans le BAT (Silva and Rabelo, 1997).

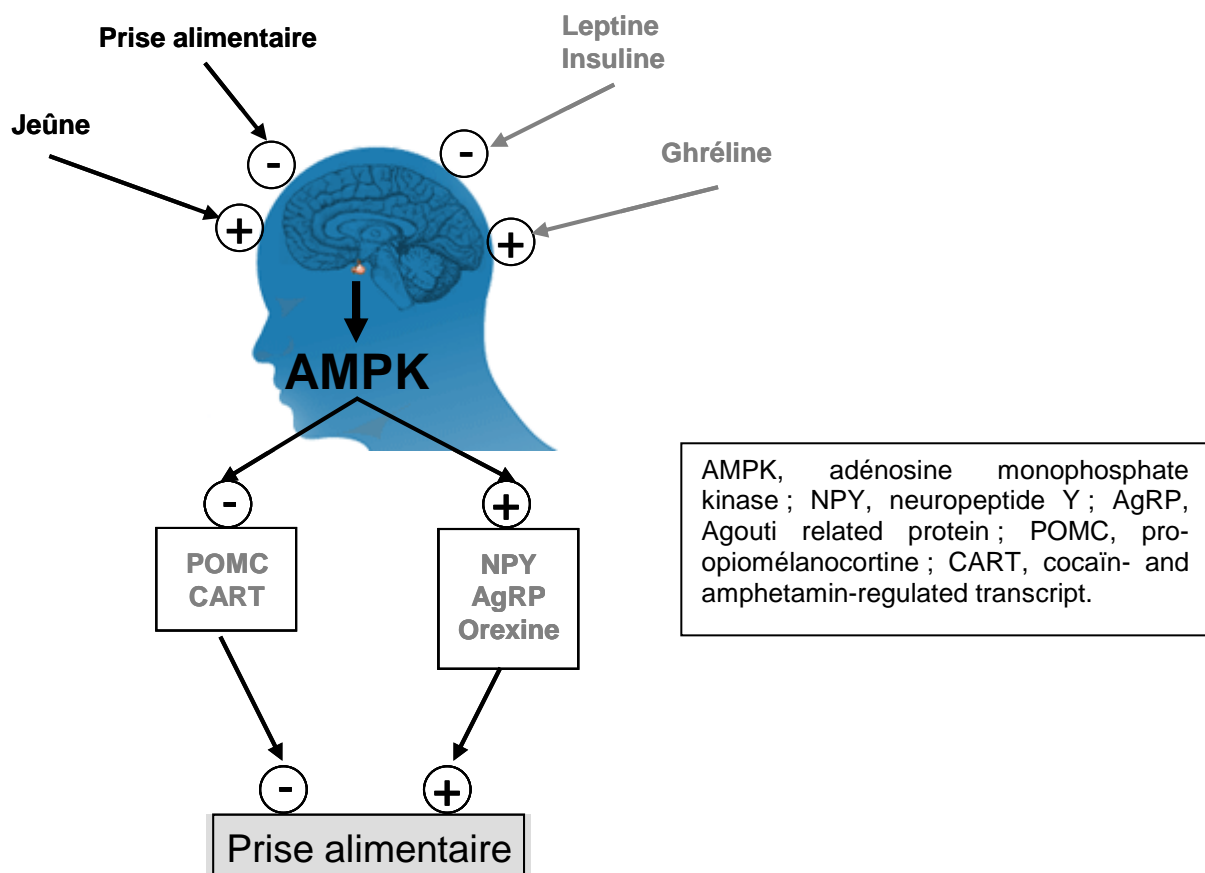
#### 3.5.7.3 Rôle du glucagon

Chez les mammifères, le glucagon, hormone pancréatique a un effet thermogène plus faible que celui de la noradrénaline. Les effets métaboliques du glucagon sont bien connus : par des mécanismes d'activations intracellulaires AMPc dépendants, il induit la glycogénolyse, la néoglucogénèse hépatique, et faiblement la lipolyse du tissu adipeux blanc. De plus, chez le rat, le glucagon active la mobilisation intracellulaire de Ca<sup>2+</sup> dans l'hépatocyte isolé, par un mécanisme d'action indépendant de l'AMPc (Mine et al., 1988). Le glucagon pourrait donc intervenir dans la NST en favorisant l'apport en substrats énergétiques aux tissus thermogènes et en stimulant les oxydations. En effet, les concentrations plasmatiques de glucagon augmentent chez le rat et l'homme exposé au froid. L'administration de glucagon peut induire une augmentation transitoire de la dépense énergétique chez le rat et la souris, l'amplitude de la réponse thermogène est alors plus importante chez les rongeurs acclimatés au froid (Doi and Kuroshima, 1982a; Doi and Kuroshima, 1982b ). Ce résultat pourrait suggérer que cette réponse est le reflet d'un type de NST différent de la NST classique initiée par l'activité sympathique au froid. Des doutes subsistent néanmoins quant à une véritable NST induite par le glucagon chez le rongeur. En effet, les doses de glucagon utilisées pour induire une réponse thermogène sont des doses supra physiologiques sur des adipocytes isolés de souris et de rats. A ce jour, les premières observations sur animal entier n'ont jamais été confirmées (Cannon and Nedergaard, 2004).

### 3.6 Régulation de la balance énergétique

Comme il a été décrit précédemment la dépense énergétique est contrôlée, qu'elle soit liée au métabolisme basal de l'organisme, à la prise d'un repas, à l'activité physique ou à la thermorégulation. Mais la prise alimentaire est également régulée. L'hypothalamus joue un rôle prépondérant dans la régulation centrale de la prise alimentaire, induisant ainsi une sensation de faim ou de satiété (figure 7).

Figure 7 : Contrôle de la prise alimentaire et régulation de l'AMPK hypothalamique



L'hypothalamus produit un certain nombre de neuropeptides qui stimulent la prise alimentaire, tels que le neuropeptide Y (NPY), l'Agouti-related protein (AgRP) ou l'orexine, et qui inhibent la prise alimentaire tels que la pro-opiomélanocortine (POMC) ou la « cocaïn- and amphetamin-regulated transcript » (CART). Au niveau périphérique, la sécrétion d'insuline par le pancréas et de leptine par les adipocytes influence négativement la prise alimentaire au niveau central. A l'inverse, la ghréline, produite par l'estomac, le pancréas et l'hypothalamus, est une hormone orexigène, c'est-à-dire accroissant la prise alimentaire.

L'adénosine monophosphate kinase (AMPK) hypothalamique joue un rôle clé dans le contrôle de la prise alimentaire. En effet, son activité varie avec le statut nutritionnel, si le jeûne active l'AMPK, la prise alimentaire l'inhibe. L'AMPK serait un régulateur potentiel de

l'expression des neuropeptides fortement impliqués dans la régulation de la prise alimentaire. L'AMPK constitue également une voie de signalisation commune à de nombreux facteurs affectant le comportement alimentaire.

#### **4. Production et dissipation de l'énergie**

Les processus de la vie étant thermodynamiquement défavorables, les organismes vivants ont besoin d'une source d'énergie. Cette dernière provient, chez les animaux, du catabolisme des aliments, aboutissant à la synthèse d'adénosine 5' triphosphate (ATP). L'ATP est une molécule possédant des liaisons riches en énergie au nombre de deux, mais ne constituant pas une forme de stockage. En effet, la quantité totale d'ATP d'un individu est consommée en 2 à 3 minutes, ce qui implique un taux de renouvellement extrêmement important afin de maintenir un équilibre entre production et consommation d'énergie. Les cellules utilisent des voies métaboliques différentes mais interconnectées pour transférer l'énergie provenant du catabolisme des molécules pourvoyeuses d'énergie à l'ATP.

##### ***4.1 Production d'ATP***

###### *4.1.1 La glycolyse*

La glycolyse, littéralement « dégradation de sucre », est une voie qui utilise des hydrates de carbone partiellement catabolisés, essentiellement du glucose. Elle consiste en dix réactions enzymatiques qui convertissent une molécule de glucose à six carbones en deux molécules de pyruvate à trois carbones. Le gain net au cours de ces réactions est de deux molécules d'ATP et de 2 NADH. Ces dix réactions, dont aucune n'utilise l'oxygène, ont lieu dans le cytosol. Le produit terminal de la glycolyse, le pyruvate, peut alors prendre deux directions en fonction de la présence ou non d'oxygène. En conditions aérobies, le pyruvate peut être utilisé par le cycle de Krebs après conversion en acétyl-CoA et être dégradé en dioxyde de carbone. A l'inverse, en conditions anaérobies, le pyruvate est converti en lactate. Dans la plupart des cellules, la quantité d'ATP produite par glycolyse à partir d'une molécule de glucose est bien moindre que celle obtenue en conditions aérobies par les deux autres voies génératrices d'ATP qui suivent.

###### *4.1.2 Le cycle de Krebs*

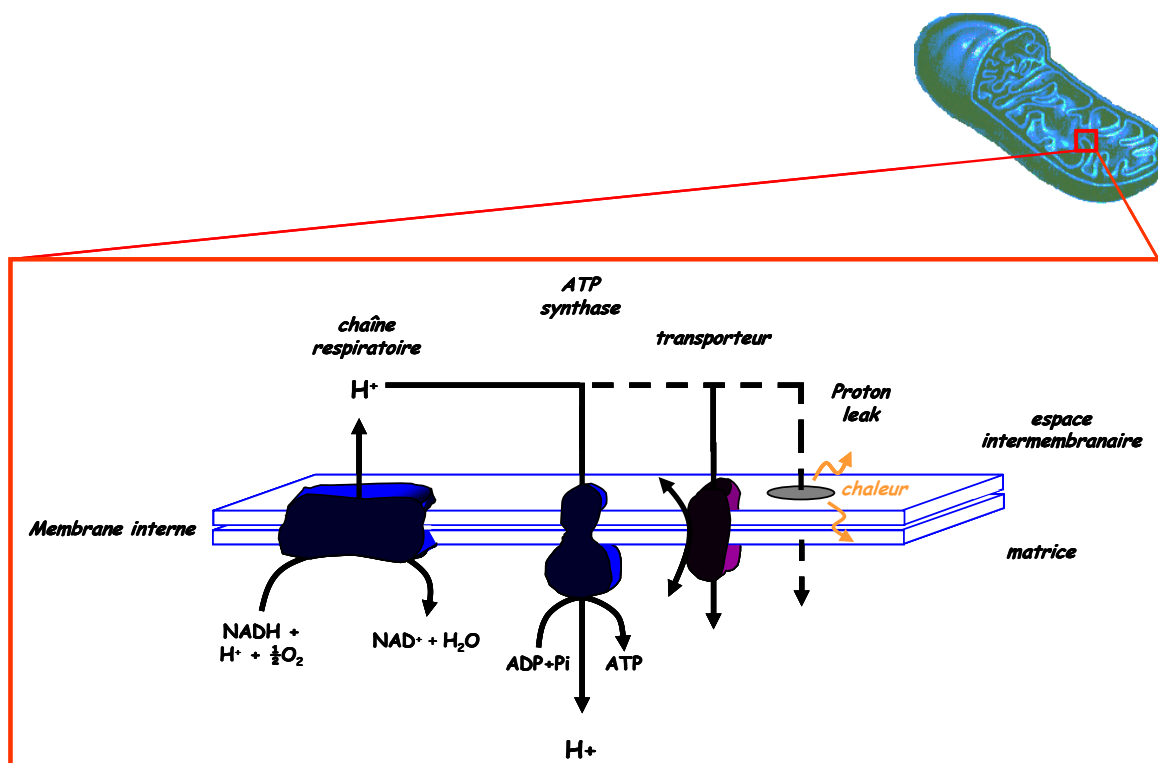
Le cycle de Krebs (ou cycle de l'acide citrique) utilise des fragments moléculaires formés au cours du catabolisme des hydrates de carbone, des graisses et des protéines. Les enzymes de cette voie se localisent dans le compartiment mitochondrial interne, la matrice.

La principale molécule qui entre dans le cycle de Krebs est l'acétylcoenzyme A (acétyl-CoA). La formation d'acétyl-CoA provient soit du pyruvate, le produit terminal de la glycolyse aérobie, soit de la dégradation de certains acides gras, par  $\beta$ -oxydation, à l'intérieur de la mitochondrie, soit de certains acides aminés. Le cycle de Krebs aboutit à la formation d'1 ATP ou GTP, mais génère du NADH et du FADH<sub>2</sub> utilisés dans l'oxydation phosphorylante pour former de grandes quantités d'ATP.

#### 4.1.3 L'oxydation phosphorylante

La mitochondrie est un organite intracellulaire délimité par deux membranes, l'une interne, et l'autre externe, qui définissent un espace matriciel contenant notamment les enzymes du cycle de Krebs et de la  $\beta$ -oxydation. La membrane interne accueille les quatre complexes de la chaîne de transport des électrons, ainsi que l'ATP synthase. Elle est le siège de la production d'ATP par le processus d'oxydation phosphorylante (figure 8). Le mécanisme de couplage entre respiration mitochondriale et synthèse d'ATP fut décrit par Mitchell en 1961 (Mitchell, 1961).

Figure 8 : L'oxydation phosphorylante



La chaîne respiratoire oxyde des équivalents réduits provenant des substrats alimentaires et expulse des protons en dehors de la matrice mitochondriale. Le gradient de protons ainsi formé constitue la force protonmotrice ( $\Delta p$ ). Cette force permet aux protons de rentrer dans la matrice mitochondriale via l'ATP synthase, autorisant ainsi la synthèse d'ATP. L'imperméabilité de la membrane interne étant toute relative, une partie du gradient de protons est dissipée par retour passif des protons, sans passer par l'ATP synthase («leak»).



La chaîne respiratoire mitochondriale oxyde les équivalents réduits provenant des nutriments, c'est-à-dire transfère leurs électrons sur un accepteur final qui est l'oxygène. Ce transfert d'électrons s'accompagne d'une expulsion de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire. La membrane interne étant relativement imperméable aux protons, un gradient électrochimique se forme. Ce gradient est composé d'un potentiel de membrane électrique ( $\Delta\psi$ ) et d'un gradient de pH ( $\Delta\text{pH}$ ), constituant ainsi la force protonmotrice ( $\Delta p$ ). Ce gradient de protons est en réalité une force utilisable pour la synthèse d'ATP. En effet, il permet le retour des protons dans la matrice mitochondriale via l'ATP synthase, les protons cédant au passage leur énergie, la synthèse d'ATP est permise. L'ATP ainsi synthétisé sera alors exporté vers le cytosol en échange d'ADP grâce au translocateur ANT (translocateur des nucléotides adényliques), tout en consommant une partie du potentiel de membrane. La force protonmotrice permet également le transport actif d'ions et de métabolites contre leur gradient de concentration (ion phosphate, calcium, pyruvate...). L'imperméabilité de la membrane interne mitochondriale n'est pas absolue, de ce fait, une partie de la force protonmotrice est consommée par un retour passif des protons à travers la membrane, sans passer par l'ATP synthase. L'énergie est alors dissipée sous forme de chaleur. Ces fuites passives de protons, appelées « proton «leak» », sont responsables d'un « découplage » entre l'oxydation et la phosphorylation, puisque les protons expulsés lors de l'oxydation ne sont pas utilisés pour la phosphorylation. Ce découplage provoque une diminution de la synthèse d'ATP pour une consommation d'oxygène identique ou augmentée, induisant ainsi une diminution du rendement de l'oxydation phosphorylante.

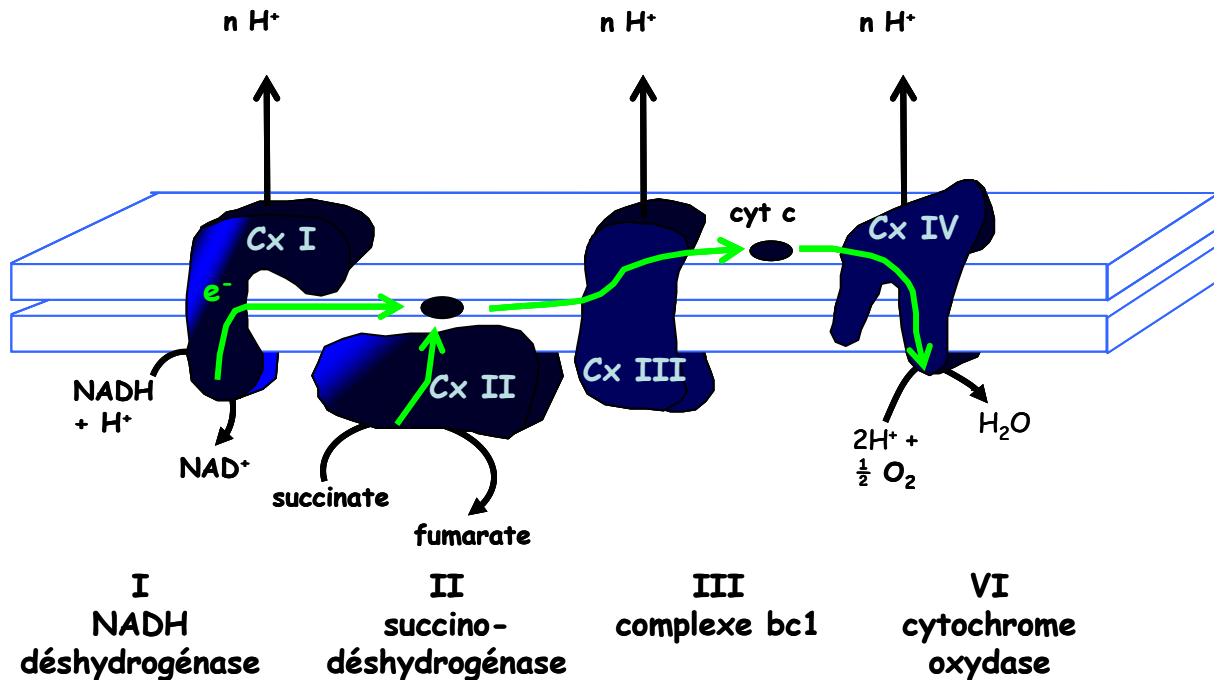
#### ***4.2 Régulation de l'oxydation phosphorylante et pertes énergétiques***

Les premières études sur les mécanismes de régulation des oxydations phosphorylantes datent des années 1950. Il avait été observé que la vitesse de respiration des mitochondries isolées de foie de rats était stimulée par l'ajout d'ADP et de Pi. L'amplitude de cette stimulation étant dépendante de la concentration en ADP et Pi, Chance et Williams (Chance and Williams, 1956) ont émis l'hypothèse selon laquelle la respiration mitochondriale et la synthèse d'ATP étaient contrôlées cinétiquement par la disponibilité en substrats de l'ATP synthase. En d'autres termes, l'oxydation phosphorylante serait limitée par les concentrations en ADP et Pi. A l'opposé de cette vision purement cinétique, Klingenberg (Klingenberg, 1961) puis Erecinska et Wilson (Erecinska and Wilson, 1982), en se fondant sur des mesures thermodynamiques, ont émis la possibilité que l'ensemble des réactions impliquées dans l'oxydation phosphorylante fonctionnait dans des conditions proches de l'équilibre thermodynamique, à l'exception toutefois de la cytochrome oxydase.

## 4.2.1 Par la nature des équivalents réduits

La chaîne respiratoire est constituée d'un ensemble de complexes multienzymatiques (figure 9) enchâssés dans la membrane mitochondriale interne. Il existe quatre complexes principaux (complexes I, II, III et IV), et deux éléments complémentaires (quinones et cytochrome c) transportant les électrons.

Figure 9 : La chaîne respiratoire



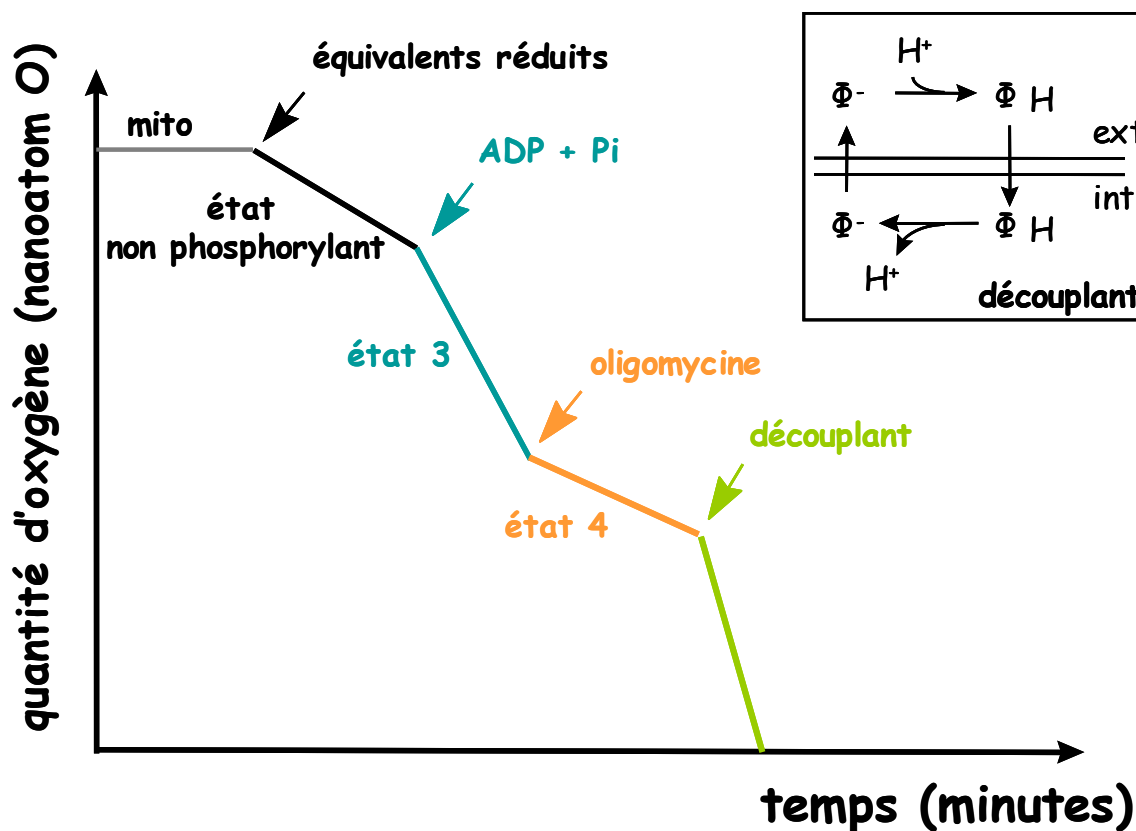
Le NADH + H<sup>+</sup> est oxydé au niveau du complexe I avec expulsion de protons, tandis que le FADH<sub>2</sub> est oxydé au niveau du complexe II, sans expulser de protons. Les flèches schématisent le flux d'électrons à travers les différents complexes.

Si la disponibilité en ADP et Pi est un paramètre essentiel de régulation de l'oxydation phosphorylante, une part importante du contrôle de la respiration est exercée au niveau de l'apport en coenzymes réduits à la chaîne respiratoire. Une augmentation de l'apport en substrats respiratoires stimule la respiration de cellules et mitochondries isolées. Cette augmentation de la capacité d'oxydation phosphorylante est dépendante du tissu étudié d'une part, de la nature du substrat respiratoire (pyruvate, acides aminés, corps cétoniques, acides gras...) et du potentiel redox (NADH/NAD<sup>+</sup>) d'autre part. La majorité des expériences portant sur la régulation de l'oxydation phosphorylante dans les mitochondries isolées a été réalisée en présence de concentrations saturantes de substrats. Cependant, dans ces conditions, le transport des substrats respiratoires, de même que l'activité des déshydrogénases peuvent exercer un contrôle significatif sur le flux respiratoire de mitochondries isolées (Groen et al., 1982 ; Tager et al., 1983).

Les deux coenzymes réduits, oxydés au niveau de la chaîne respiratoire, sont le NADH et le FADH<sub>2</sub>. Le NADH est oxydé au niveau du complexe I, tandis que la FADH<sub>2</sub> n'entre qu'au niveau du complexe II, court-circuitant le complexe I. De ce fait, lorsque la chaîne respiratoire oxyde du FADH<sub>2</sub>, le nombre de protons expulsés est plus faible pour une même quantité d'oxygène consommé, par comparaison à l'utilisation du NADH. Le rendement, évalué par le rapport ATP/O, c'est-à-dire le nombre de molécules d'ATP formées en un temps donné, divisé par le nombre d'atomes d'oxygène consommés dans ce même temps, sera donc plus faible : ATP/O NADH = 3 et FADH<sub>2</sub> = 2. Dans le cas précis du glucose utilisé comme substrat, il en résulte alors la formation de 10 NADH et 2 FADH<sub>2</sub>, soit un ratio NADH/FADH<sub>2</sub> de 5 ; tandis que l'oxydation d'un acide gras à 6 carbones fournit 11 NADH et 5 FADH<sub>2</sub>, soit un rapport NADH/FADH<sub>2</sub> de 2. Le rendement d'oxydation des acides gras est donc moins élevé que celui des glucides.

Lorsque les mitochondries sont en suspension avec un substrat fournissant des équivalents réduits, par exemple du succinate induisant la formation de FADH<sub>2</sub>, on observe une consommation d'oxygène (figure 10).

Figure 10 : Respiration mitochondriale.



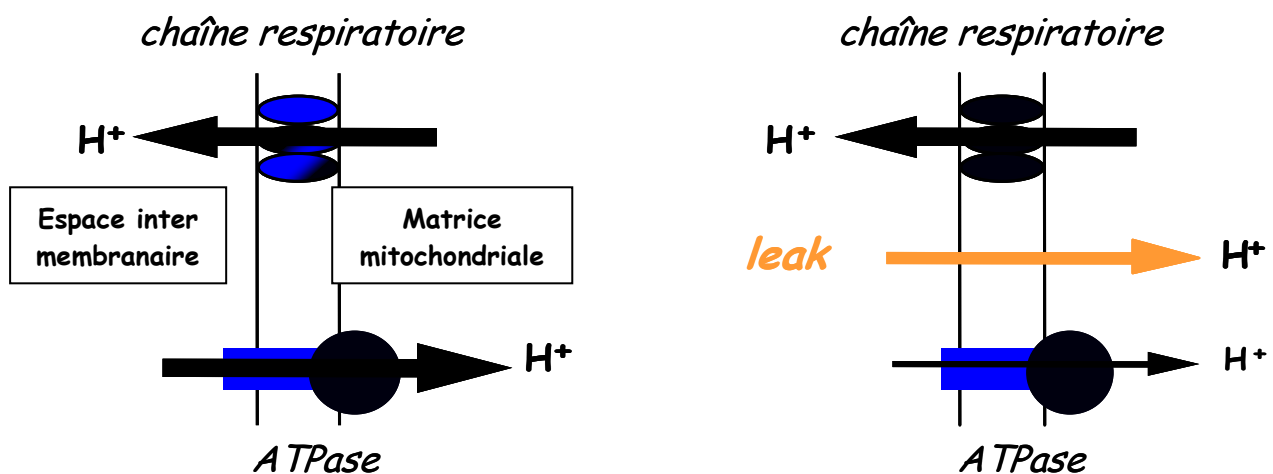
Les mitochondries sont incubées dans un milieu contenant de l'oxygène. La vitesse de respiration (déterminée en mesurant la pente de la courbe) est calculée par la quantité d'oxygène consommée / minutes / mg de protéines. L'état non phosphorylant ou état 2 est la respiration observée en l'absence de synthèse d'ATP. L'état 4 est obtenu en présence d'oligomycine, un inhibiteur de l'ATP synthase. Enfin, un découplant protonophore permet le retour des protons dans la matrice mitochondriale.

Cette respiration en l'absence de synthèse d'ATP, appelée état non phosphorylant ou état 2, sert à compenser les pertes de protons («leak» et autres phénomènes dissipateurs d'énergie). L'ajout d'ADP et de Pi stimule la respiration car la force protonmotrice diminue sous l'effet du retour des protons dans la matrice via l'ATP synthase, permettant ainsi la synthèse d'ATP. Cette respiration en état phosphorylant est appelée état 3. L'addition d'oligomycine, un inhibiteur de l'ATP synthase, inhibe la respiration qui revient à un niveau proche de l'état non phosphorylant (état 4). Si l'on ajoute un découplant qui perméabilise la membrane interne aux protons, la respiration est de nouveau stimulée. Le rapport des flux de respiration état 3 / état 4 constitue le contrôle respiratoire (RCR : respiratory control ratio), et diminue en cas de découplage de l'oxydation et de la phosphorylation.

#### 4.2.2 Par la perméabilité membranaire

L'inhibition de l'ATP synthase par l'oligomycine n'abolit pas complètement la consommation mitochondriale d'oxygène. Cette respiration insensible à l'oligomycine est expliquée en partie par un retour passif de protons au travers de la membrane mitochondriale interne vers la matrice mitochondriale. En effet, si la force protonmotrice permet la synthèse d'ATP en générant un flux de protons au travers de l'ATP synthase, une certaine quantité de protons retourne dans la matrice sans passer par cette ATP synthase. Ce processus de fuites membranaires, connu sous le nom de « leak », induit une moindre production d'ATP de sorte que, plus les fuites sont importantes, plus l'efficacité de l'oxydation phosphorylante diminue (figure 11).

Figure 11 : Perméabilité membranaire («leak»).



En imaginant une membrane totalement imperméable aux protons (figure de gauche), chaque proton sortant serait utilisé pour la synthèse d'ATP. En réalité, la membrane n'est jamais intégralement imperméable aux protons (figure de droite) et des protons peuvent traverser la membrane pour retourner dans la matrice. Plus ce retour passif de protons est important, plus le rendement de l'oxydation phosphorylante diminue. Les découplants favorisent ce retour de protons à travers la membrane interne mitochondriale.

Ces fuites de protons au travers de la membrane interne mitochondriale entraînent une diminution de la force protonmotrice, moteur de l'ATP synthase. Ce phénomène peut être mimé ou amplifié via l'utilisation de découplants. En effet, ces derniers augmentent la perméabilité aux protons de la membrane interne et diminuent la force protonmotrice, ce qui se traduit par une chute de la synthèse d'ATP, mais une augmentation de la vitesse de respiration, donc par une diminution du rapport P/O (Luvisetto et al., 1987).

En théorie, différents mécanismes peuvent être à l'origine du retour des protons à travers la membrane mitochondriale interne : mouvements à travers la membrane elle-même, mouvements à l'interface lipides / protéines membranaires, ou transfert à l'aide de transporteurs spécifiques.

#### 4.2.2.1 Les protéines découplantes UCPs

Il existe des protéines induisant une conductance aux protons au sein de la membrane mitochondriale interne, dissipant ainsi le gradient de protons élaboré par la chaîne respiratoire mitochondriale. Ces protéines sont appelées UCPs (uncoupling proteins). UCP1, spécifique du tissu adipeux brun, fut la première découverte, et considérée comme une acquisition tardive chez les mammifères pour des besoins de thermogenèse adaptative, et ce, jusqu'à la découverte d'UCP de plantes. Depuis, plusieurs homologues d'UCP1 furent mis en évidence, notamment UCP2, relativement ubiquitaire, et UCP3, spécifique du muscle squelettique. Il est désormais établi que ces protéines ne sont pas essentielles pour le recrutement du tissu adipeux brun, et la thermogenèse au sein de ce tissu, mais on peut néanmoins se poser la question de leur action découplante au sein des autres tissus.

Il a été mesuré que la fuite passive des protons à travers des membranes de liposomes reconstituées à partir de phospholipides, ne représente que 5% des fuites totales de protons observées à travers la membrane de mitochondries isolées (Brookes et al., 1997). 95% des fuites de protons au travers des membranes mitochondriales seraient donc dues au « leak » induit par des protéines. Il est désormais bien établi que ces fuites de protons s'opèrent bien dans des tissus autres que le BAT (Rolfe and Brand, 1996). Les fuites de protons contribueraient à 26% du métabolisme de base dans des hépatocytes isolés de rat (Brand et al., 1994a ; Brand et al., 1994b) et à 52% dans du muscle squelettique perfusé de rat (Rolfe and Brand, 1996). Au niveau de l'organisme entier, les fuites passives de protons à travers la membrane mitochondriale interne participeraient à hauteur de 15 à 20% au métabolisme de base (Rolfe and Brown, 1997).

Les mécanismes associés à ces fuites de protons ne sont pas parfaitement connus, mais des protéines homologues d'UCP1 pourraient en être à l'origine. Les fonctions physiologiques d'un découplage mitochondrial via les UCPs ne sont pas uniquement liées à une thermogenèse (Argyropoulos and Harper, 2002), mais elles peuvent également avoir

trait à la régulation du rendement de l'oxydation phosphorylante, la réduction de la production d'espèces radicalaires de l'oxygène (reactive oxygen species, ROS), ou même le maintien du rapport  $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$  (Brand and Esteves, 2005). En effet, des souris double KO  $\text{UCP1}^{-/-} / \text{UCP3}^{-/-}$  et des souris seulement  $\text{UCP1}^{-/-}$  montrent les mêmes propriétés de thermorégulation, suggérant l'absence de relation entre UCP3 et thermogénèse (Gong et al., 2000). Cependant, les souris  $\text{UCP3}^{-/-}$  présentent des mitochondries mieux couplées, confirmant donc la capacité découplante de cette protéine (Vidal-Puig et al., 2000).

La capacité découplante des UCPs autres qu'UCP1 reste toujours très discutée dans la littérature, il convient de rester prudents et de prendre en considération le fait que les conditions expérimentales pour montrer l'activité découplante de protéines sur des préparations de mitochondries sont cruciales. En effet, UCP2 et UCP3 augmenteraient la conductance aux protons seulement en présence d'activateurs tels que les ions superoxydes et l'hydroxynonéal alors que le retour passif des protons dans la matrice mitochondriale, en conditions basales, donc en l'absence d'activateurs, ne serait pas le fait des UCPs (Esteves and Brand, 2005). Il existerait donc d'autres protéines, comme le translocateur de nucléotides adényliques (adenine nucleotide translocator, ANT), ou mécanismes, capables d'induire ce découplage de base en dehors des UCPs.

#### 4.2.2.2 Protéine découplante UCP1

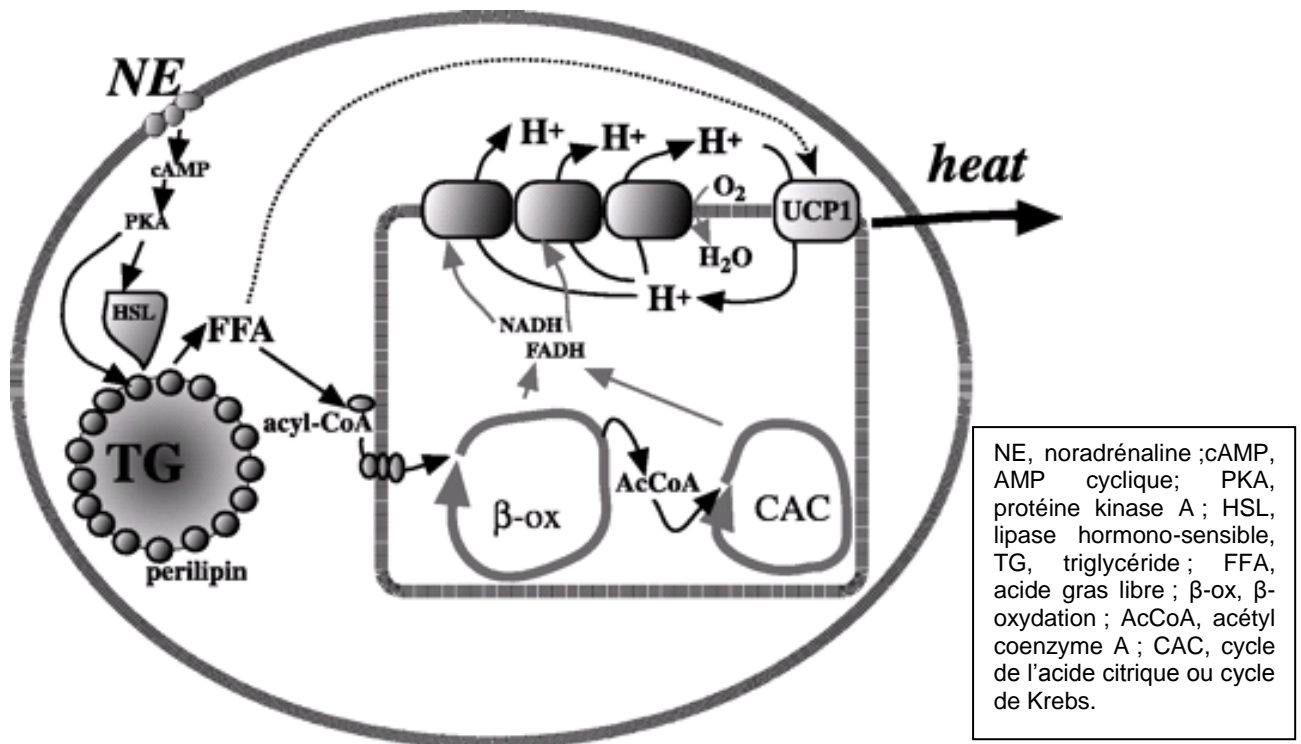
Initialement connue sous le nom de thermogénine, ou GDP-binding protein, UCP1 reste, à ce jour, la protéine découplante la mieux caractérisée. Elle permet le découplage des oxydations et des phosphorylations dans la mitochondrie de tissu adipeux brun, induisant ainsi une production de chaleur. En effet, il a été montré qu'en l'absence d'UCP1, aucune stimulation de la thermogénèse n'est induite, par la noradrénaline, dans le tissu adipeux brun (Matthias et al., 2000).

Les processus thermogènes dans les adipocytes bruns peuvent être amplifiés par l'ajout d'acides gras. La thermogénèse induite par les acides gras est aussi complètement UCP1-dépendante. Toutes les manipulations qui induisent une lipolyse dans les adipocytes bruns induisent également une thermogénèse (Matthias et al., 2000).

La lipolyse, entraînant une libération de glycérol et d'acides gras, est induite par la noradrénaline. La lipolyse est stimulée par les récepteurs  $\beta_3$ -adrénergiques, tout comme la thermogénèse (Zhao et al., 1994). La fixation de la noradrénaline sur ses récepteurs induit la formation d'AMPc qui active la protéine kinase A. La stimulation de la lipolyse se fait donc en deux temps : tout d'abord activation de la lipase hormono-sensible (LHS) puis phosphorylation de la périlipine (figure I.12). La LHS est responsable de l'hydrolyse des triglycérides (TG) dans l'adipocyte brun. La périlipine protège la gouttelette lipidique des attaques de la LHS, mais lorsqu'elle est phosphorylée, elle se détache des TG, et la LHS peut donc accéder à la gouttelette de TG. Les acides gras libérés dans le cytoplasme des

adipocytes bruns peuvent, pour certains, quitter la cellule, et pour la majorité d'entre eux, être transportés à l'intérieur de la cellule. Dans le cytosol, ils sont probablement liés à des isoformes, spécifiques des adipocytes, de fatty acid binding proteins (FABP), telles que FABP4 et A-FABP. De plus, contrairement aux adipocytes blancs, le tissu adipeux brun possède la forme cardiaque de FABP appelée H-FABP, et dont l'expression est très nettement stimulée par la noradrénaline. Bien entendu, l'abondance relative en ARNm de FABP ne présume en rien de la quantité de cette protéine, mais il y aurait effectivement d'importantes quantités de cette protéine dans les adipocytes bruns. Compte tenu de ce résultat, la présence d'acides gras libres dans le cytosol de ces cellules est probablement faible, malgré l'activité intense de lipolyse (Cannon and Nedergaard, 2004).

**Figure 12 : Stimulation de la thermogénèse par la noradrénaline dans les adipocytes bruns (Cannon and Nedergaard, 2004)**



Bien que les acides gras à très grande chaîne soient dégradés dans les peroxysomes, la plupart sont transportés à l'intérieur de la mitochondrie. Dans l'environnement mitochondrial, ils peuvent alors répondre de plusieurs fonctions. Ils servent de substrats à la thermogénèse, mais sont également impliqués dans la régulation et/ou la fonction d'UCP1.

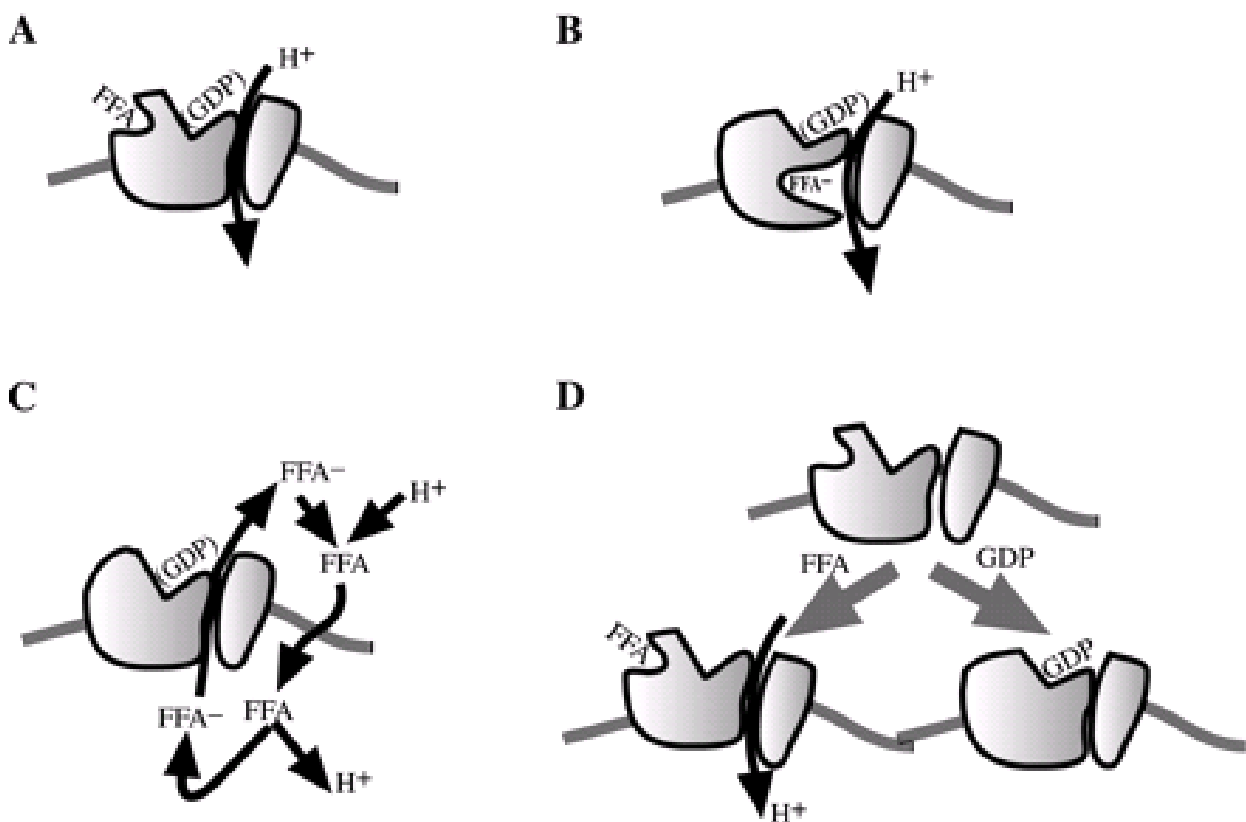
Lorsqu'ils sont utilisés à des fins de substrats, les acides gras sont transférés à l'intérieur de la mitochondrie par la navette carnitine-palmitoyl transférase (CPT) et subissent alors une  $\beta$ -oxydation dans la mitochondrie. L'acétyl-CoA ainsi formé sera utilisé par le cycle

de Krebs (figure 12), et les équivalents réduits par la chaîne respiratoire mitochondriale. Les processus thermogènes qui peuvent en résulter sont le fait d'une protéine particulière dans l'adipocyte brun : UCP1.

UCP1 appartient à la famille des transporteurs mitochondriaux. Beaucoup de données bibliographiques sont à ce jour publiées, et les paragraphes suivants résumeront brièvement les points majeurs pour la compréhension de la fonction de cette protéine.

UCP1 présente de nombreuses régions d'homologie avec les autres membres de la famille des transporteurs mitochondriaux. Une particularité de la structure d'UCP1 intéressante pour expliquer sa fonction est le résidu d'acide aminé impliqué dans la fixation du GDP. Il a été observé que le GDP (ou le GTP, ADP et ATP) peut inhiber l'augmentation de la perméabilité aux protons mise en évidence lors d'un découplage mitochondrial. Il existerait donc une régulation physiologique de la protéine UCP1. A l'inverse, les acides gras sont impliqués dans l'activation physiologique d'UCP1, mais la question qui demeure concerne les mécanismes précis d'action de ces acides gras, et pour tenter d'y répondre, 4 théories principales s'affrontent (figure 13).

Figure 13 : Hypothèses concernant le rôle des acides gras dans l'activation d'UCP1 (Cannon and Nedergaard, 2004)



Dans le modèle de *régulation allostérique* (figure 13 A), les acides gras interagiraient avec un site spécifique de l'UCP1. Ce site présumé de fixation n'est toujours pas identifié. La



fixation des acides gras induirait une modification de conformation du site de fixation du GDP et aboutirait au relargage du GDP initialement fixé (Strieleman and Shrago, 1985). Cependant il n'existe aucune preuve que les acides gras agiraient comme compétiteur du GDP.

Dans la théorie du *cofacteur* (figure 13 B), les acides gras permettraient le passage des protons à travers un canal de conductance aux protons qui n'est, à ce jour, pas clairement identifié (Yazbeck et al., 1989). Les acides gras n'interagiraient pas avec le site de fixation du GDP.

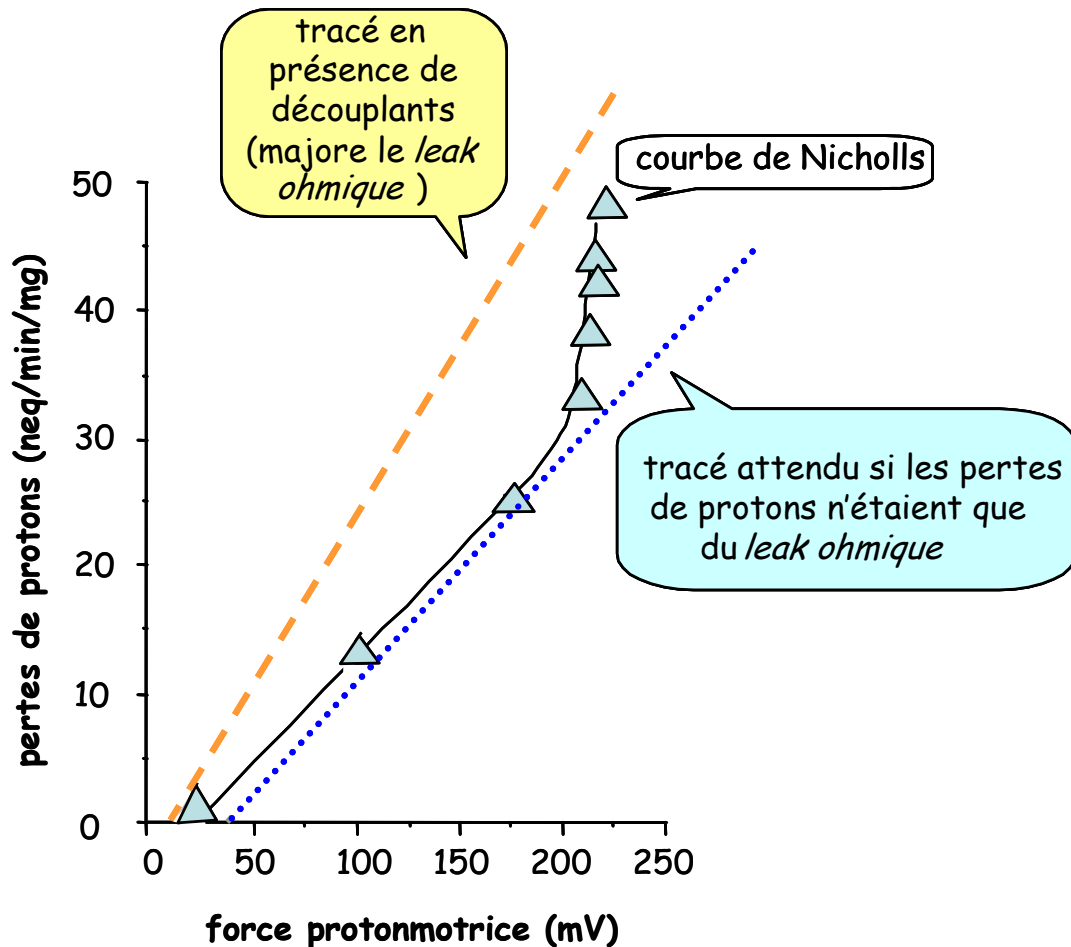
La théorie des *navettes* (figure 13 C), a été initiée par Skulachev (Andreyev et al., 1989) qui a montré que les autres transporteurs mitochondriaux tels que la navette ATP/ADP (ANT), en présence d'acides gras libres, pourrait agir comme une protéine découplante. Les protons ne seraient pas transportés directement à travers la protéine UCP1. En effet, les acides gras sous leur forme anionique s'associeraient à un proton et traverseraient ainsi la membrane mitochondriale interne (Garlid et al., 2000). Une fois dans la matrice mitochondriale, le proton serait libéré, et l'acide gras sortirait de la matrice mitochondriale grâce à UCP1 qui jouerait le rôle de transporteur d'acides gras anioniques. Cependant, aucun des trois modèles proposés n'explique totalement la régulation et les propriétés protonophores d'UCP1.

Une quatrième hypothèse émise par Rial et Nicholls (Cannon and Nedergaard, 2004) (figure 13 D) suggère que l'UCP1 verrait sa conformation tridimensionnelle modifiée par les acides gras, d'une part, mais aussi le GDP à différents niveaux, ce qui pourrait induire l'apparente compétition observée entre ces deux molécules.

#### 4.2.3 Par le patinage des pompes («slip»)

Il apparaît que la respiration subsistant en l'absence de phosphorylation n'est pas totalement expliquée par la perméabilité membranaire. En effet, le découplage peut être induit par des fuites de protons, mais également par une modification de l'efficacité des pompes. En 1974, Nicholls, dans un article de référence (Nicholls, 1974), montre que la relation existant entre la respiration à l'état 4 et la force protonmotrice n'est pas linéaire lorsque la respiration est graduellement diminuée par l'emploi d'un inhibiteur de la chaîne respiratoire (figure 14).

Figure 14 : Relation entre la force protonmotrice et les pertes de protons



La courbe mesurée par Nicholls est tracée avec les symboles ( $\Delta$ ). Les droites en pointillés sont des simulations. Adapté de Nicholls DG (Nicholls, 1974).

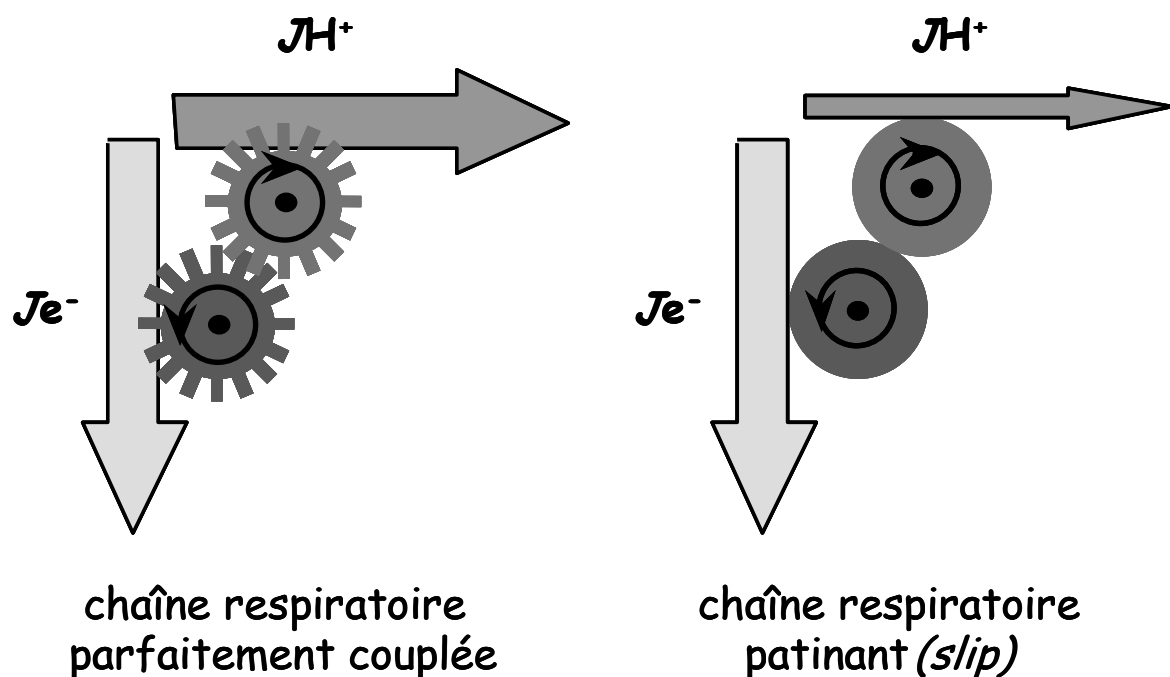
Cette respiration en l'absence de synthèse d'ATP sert à compenser les pertes de protons. Si les pertes de protons n'étaient que des fuites passives de protons, c'est-à-dire du «leak» ohmique, ces pertes devraient être d'autant plus importantes que le gradient de protons, donc la force protonmotrice, sont élevés. En traçant la relation entre la force protonmotrice et les pertes de protons (calculées à partir de la respiration oligomycine insensible), on aurait donc dû trouver une relation linéaire (figure 14). En effet, en présence de découplants protonophores, rendant la membrane perméable aux protons (donc augmentant ainsi expérimentalement le «leak» ohmique), la relation se linéarise (Schmehl et al., 1995). Or la courbe obtenue par Nicholls montre que lorsque la force protonmotrice est élevée, le tracé s'infléchit : les pertes de protons deviennent beaucoup plus importantes que prévu. Ce résultat fut, par la suite, largement confirmé dans la littérature.

Deux hypothèses principales ont été émises pour expliquer ce phénomène : (i) une perméabilité de la membrane variable en fonction de la force protonmotrice («leak» non ohmique) (Brand et al., 1994b), (ii) un changement de stoechiométrie (patinage ou «slip») des pompes membranaires (chaîne respiratoire et/ou ATP synthase) en fonction de la force

protonmotrice et/ou du flux au travers de ces pompes (Murphy and Brand, 1987; Pietrobon et al., 1983 ).

Selon l'hypothèse du «leak» non ohmique, la membrane mitochondriale interne ne se comporterait pas suivant la loi d'Ohm, mais sa conductance serait variable et augmenterait avec la force protonmotrice. A partir d'une certaine force protonmotrice (alors située au point d'inflexion de la courbe de Nicholls), la membrane deviendrait brusquement plus perméable aux protons, et les fuites de protons augmenteraient. Cependant, une autre hypothèse a émergé, selon laquelle les pertes de protons ne dépendent pas que de la force protonmotrice, mais aussi du flux à travers les pompes membranaires. Ces auteurs ont alors proposé un modèle de fonctionnement des pompes à protons, comportant un certain degré de découplage intrinsèque ou patinage (« slip » ou « slipping ») (figure I.15). Le « slipping » est une perte d'efficacité des pompes membranaires : quand la chaîne respiratoire patine : moins de protons sortent, pour le même flux des équivalents réduits.

**Figure 15 : Patinage («slip» ou «slipping») de la chaîne respiratoire**

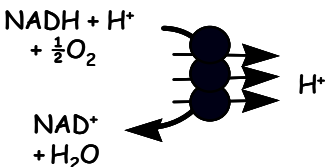
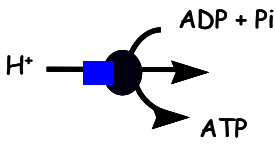


Quand la pompe est parfaitement couplée, le rapport entre le flux de protons sortant et le flux de transfert d'électrons provenant de l'oxydation des équivalents réduits est constant. Lorsque la pompe patine, moins de protons sortent pour le même flux d'oxydation d'équivalents réduits.

Le «leak» non ohmique ne dépend que de la force protonmotrice. Au contraire, le «slipping» subit des contraintes à la fois thermodynamiques (forces en présence) et cinétiques (flux des réactions). Les forces qui influencent le fonctionnement des pompes membranaires sont schématisées dans le tableau 1. Le «slip» dépend donc des forces exercées de chaque côté des complexes enzymatiques. Si les deux forces augmentent, les contraintes sur le système sont fortes comme si l'on appuyait à la fois sur l'accélérateur et le

frein ; le patinage augmentera alors et dissipera l'énergie sous forme de chaleur. Cette capacité de patinage permet d'augmenter très rapidement l'efficacité, de la même façon qu'un cycle futile. Par exemple, un avion, avant le décollage, se place en début de piste, monte le régime des moteurs tout en maintenant les freins, ce qui consomme du carburant pour produire de la chaleur et non un déplacement. Dès l'instant où le pilote lâche les freins, l'efficacité du système augmente instantanément, ce qui permet à l'avion d'atteindre sa vitesse de décollage sur une plus courte distance. Il apparaît donc que quand la force protonmotrice diminue, le «slip» diminue. Etant donné que le retour passif de protons diminue  $\Delta p$ , il existe une compétition entre le «leak» et le «slip». Si le «leak» est stimulé, le «slipping» sera minimisé.

Tableau 1 : Forces influençant le patinage des pompes membranaires.

force «qui pousse»	complexe enzymatique	force «qui freine»
<p>potentiel redox</p> $\frac{NADH}{NAD}$	<p><i>chaîne respiratoire</i></p>  <p>NADH + H<sup>+</sup> + <math>\frac{1}{2}</math>O<sub>2</sub></p> <p>NAD<sup>+</sup> + H<sub>2</sub>O</p>	<p>force protonmotrice</p> $(\Delta p)$
<p>force protonmotrice</p> $(\Delta p)$	<p><i>ATP synthase</i></p>  <p>H<sup>+</sup></p> <p>ADP + Pi</p> <p>ATP</p>	<p>potentiel phosphate</p> $\frac{ATP}{ADP.Pi}$

Contrairement au «leak» non ohmique, qui ne dépend que de la force protonmotrice, le «slip» subit les contraintes des deux forces en présence : la force protonmotrice ainsi que la variation d'énergie libre de la réaction chimique (potentiel redox ou potentiel phosphate).

Bien que le « proton slip» corresponde à un retour de protons à travers la membrane interne mitochondriale, variable en fonction de  $\Delta p$ , il ne s'agit pas de fuites membranaires assimilables au «leak». En effet, le proton «slip» dépend également du flux à travers la pompe à protons, alors que le «leak» ne répond à aucun contrôle cinétique. «Leak» et «slip» ne sont pas les seuls mécanismes influençant le rendement de la chaîne respiratoire mitochondriale, les transporteurs mitochondriaux peuvent eux aussi induire une dissipation d'énergie.

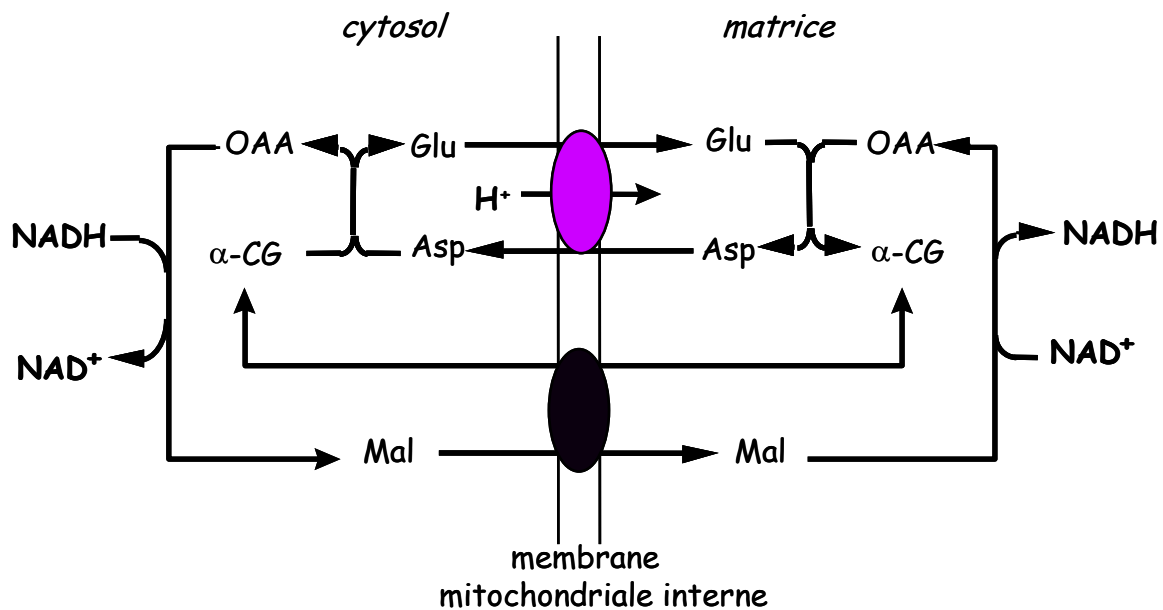
#### 4.2.4 Par les transporteurs

La membrane mitochondriale interne possède des transporteurs de métabolites et d'ions (LaNoue and Schoolwerth, 1979). Ces transporteurs utilisent l'une ou l'autre des composantes de la force protonmotrice ( $\Delta\text{pH}$  ou  $\Delta\psi$ ), par exemple en couplant le transport d'un métabolite à l'entrée d'un proton. Les mouvements d'ions ou de métabolites peuvent donc conduire à une consommation de la force protonmotrice et affecter le rendement de l'oxydation phosphorylante. Des mouvements d'ions tels que le sodium et le potassium sont impliqués dans l'homéostasie ionique et osmotique de la mitochondrie (Garlid, 1994). Le calcium a un rôle particulier dans la régulation de l'oxydation phosphorylante en stimulant des déshydrogénases matricielles et en activant la chaîne respiratoire et l'ATP synthase (McCormack et al., 1990). La translocase (ANT) fait rentrer l'ADP et expulse l'ATP hors de la matrice en consommant du  $\Delta\psi$ , car l'ATP porte quatre charges négatives alors que l'ADP n'en possède que trois. Le transporteur du phosphate couple l'entrée du phosphate (portant une charge négative) à celle d'un proton, et consomme ainsi du  $\Delta\text{pH}$ .

La membrane mitochondriale interne est imperméable au NADH. Il en résulte que les équivalents réduits portés par le NADH cytoplasmique doivent être transférés dans les mitochondries. Ce transfert s'effectue indirectement, en réduisant certaines molécules acceptrices qui traversent la membrane mitochondriale interne pour aller reformer des équivalents réduits intramitochondriaux, puis reviennent dans le cytoplasme à l'état oxydé. Ce mécanisme est appelé *système de navettes*. Deux navettes sont bien identifiées comme fonctionnant *in vivo* selon ce principe : la navette malate / aspartate, et la navette glycérol-3-phosphate / dihydroxyacétone phosphate.

La navette malate / aspartate (figure 16) transfère les électrons du pool de NADH cytosolique vers le pool matriciel. Le potentiel redox de la matrice étant plus électronégatif, ce processus est thermodynamiquement défavorable et est rendu possible grâce à la force protonmotrice. Ainsi, l'échangeur glutamate / aspartate est électrogénique et couple la sortie d'un aspartate à l'entrée d'un glutamate et d'un proton. La force permettant le fonctionnement de cette navette est donc essentiellement le potentiel de membrane électrique  $\Delta\psi$ . Cette navette permet de maintenir un gradient redox entre la mitochondrie et le cytosol favorable au fonctionnement de la chaîne respiratoire, c'est-à-dire un rapport NADH / NAD élevé dans la mitochondrie, afin de fournir des substrats à la chaîne respiratoire, et faible dans le cytosol. Si  $\Delta\psi$  diminue, le fonctionnement de cette navette s'affaiblira, et le potentiel redox cytosolique augmentera. Ceci favorisera l'utilisation de la navette du glycérol-3-phosphate.

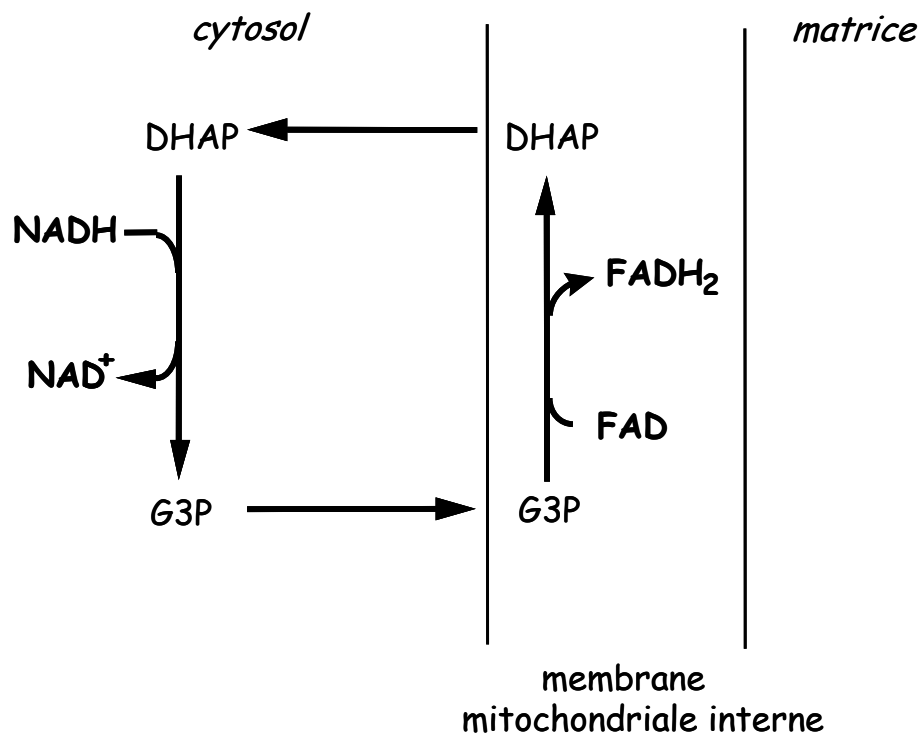
Figure 16 : Navette malate / aspartate



La navette malate / aspartate transfère les électrons du pool de  $\text{NADH}$  cytosolique au pool matriciel en consommant de la force protonmotrice. Glu, glutamate ; Asp, aspartate ; OAA, oxaloacétate ;  $\alpha\text{-CG}$ ,  $\alpha$ -cétoglutarate ; Mal, malate.

Le fonctionnement de la navette du glycérol-3-phosphate (figure 17) diminue le rendement de l'oxydation phosphorylante. En effet, pour chaque molécule de  $\text{NADH}$  cytosolique consommée, une molécule de  $\text{FADH}_2$  sera formée dans la matrice. Comme le  $\text{FADH}_2$  « court-circuite » le complexe I, l'activité de cette navette entraîne une diminution du nombre de protons expulsés par molécule d'oxygène consommée à partir du  $\text{NADH}$  cytosolique. Les enzymes assurant le fonctionnement de cette navette sont les glycérol-3-phosphate déshydrogénases cytosolique et mitochondriale. Il semblerait que plus que la quantité d'enzyme, ce soit la quantité de substrat qui contrôle cette voie. Ainsi l'augmentation du potentiel redox cytosolique stimule l'activité de cette navette.

Figure 17 : Navette glycérol-3-phosphate (G3P)



Pour chaque molécule de NADH cytotolique consommée correspond une molécule de FADH<sub>2</sub> formée dans la matrice mitochondriale. DHAP, dihydroxyacétone phosphate ; G-3-P, glycérol-3-phosphate.

Il apparaît donc que ces deux navettes sont complémentaires et ne fonctionnent pas dans les mêmes conditions. Si le potentiel de membrane est élevé, la navette malate / aspartate tourne vite alors que la navette glycérol-3-phosphate n'est pas stimulée, d'une part parce que le rapport NADH / NAD cytosolique est bas, et d'autre part car le NADH / NAD mitochondrial élevé inhibe les déshydrogénases. A l'opposé, si le potentiel de membrane est bas, la navette malate / aspartate ne tourne pas, et l'augmentation du potentiel redox cytosolique stimule la navette du glycérol-3-phosphate.

De nombreux mécanismes peuvent être, de façon plus ou moins directe, à l'origine de la dissipation de l'énergie superflue sous forme de chaleur : ils seraient alors impliqués dans la régulation de la balance énergétique de modèle de résistance à l'obésité.

## 5. Pertinence du modèle Lou/C et objectifs du travail expérimental

### 5.1 Caractéristiques phénotypiques anti-obèses du rat Lou/C

#### 5.1.1 Masse corporelle et adipeuse

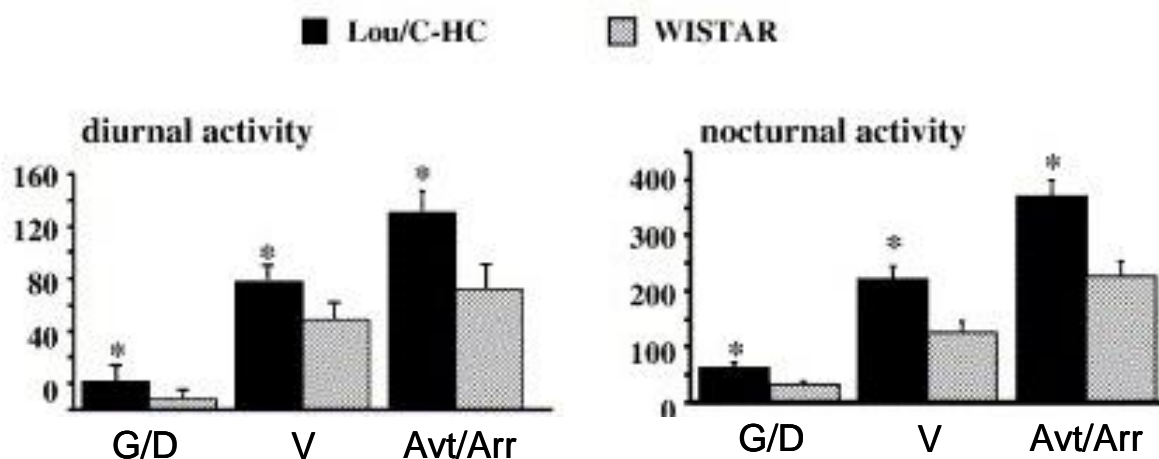
Comme nous l'avons souligné dans la partie 2.3.2.2, le rat Lou/C présente des caractéristiques phénotypiques de résistance à l'obésité. En effet, la masse corporelle du rat

Lou/C est nettement inférieure à celle du rat Wistar, souche de laquelle il est issu, et cette caractéristique est principalement liée à une moindre masse grasse (Couturier et al., 2002). Cette adiposité réduite est le reflet d'une hypotrophie (adipocytes de plus petite taille) et d'une hypoplasie (réduction du nombre d'adipocytes) (Soulage C, 2008). De plus, le rat Lou/C possède la faculté de rester maigre tout au long de sa vie. Lorsque les rats Lou/C ont le choix entre glucides, protides et lipides, ils se nourrissent préférentiellement de lipides au détriment des carbohydrates (Garait et al., 2005 ; Helies et al., 2005; Veyrat-Durebex and Alliot, 1997 ). Lorsqu'ils sont contraints à un régime hypercalorique, enrichi au lard, l'augmentation de la masse corporelle est inférieure pour le rat Lou/C malgré une prise alimentaire relative identique à celle du rat Wistar. *Cette absence d'accumulation de tissu adipeux, première caractéristique du rat Lou/C, pourrait être liée à activité spontanée majorée par rapport aux rats Wistar.*

### 5.1.2 Activité physique spontanée du rat Lou/C

Le rat Lou/C se caractérise également par une activité locomotrice importante. L'activité locomotrice spontanée de rats Lou/C et Wistar âgés de 30 semaines, a été mesurée à l'aide d'un actimètre qui permet de quantifier les mouvements horizontaux (G/D), verticaux (V), et d'avant en arrière (Avt/Arr) de l'animal dans sa cage (surface : 0,06 m<sup>2</sup> et volume : 0,01 m<sup>3</sup>). Ces mouvements sont considérablement augmentés chez le rat Lou/C (figure 18) (Garait et al., 2005 ; Soulage C, 2008), et pourraient en partie contribuer au moindre stockage de graisse chez cette souche de rat, de par la dépense énergétique supplémentaire qu'ils génèrent.

Figure 18 : Activité physique des rats Wistar et Lou/C dans leur cage (Garait et al., 2005)





De même, lorsque les rats Lou/C, âgés de 6 à 27 semaines, ont à leur disposition une roue d'activité, en libre accès, ils montrent un engouement spectaculaire pour l'activité physique spontanée, ce qui n'est absolument pas le cas des rats Wistar de même âge (Servais et al., 2003).

*L'hyperactivité dont fait preuve le rat Lou/C, seconde caractéristique de cette souche, induit probablement une dépense énergétique accrue (Girardier et al., 1995), bien que cela n'ait pas été mesuré chez le rat Lou/C. On peut toutefois douter que l'hyperactivité puisse à elle seule expliquer le phénotype maigre du rat Lou/C en l'absence de caractérisation de la balance énergétique du rat Lou/C.*

### 5.1.3 Balance énergétique du rat Lou/C

La balance énergétique d'un organisme est la résultante entre les apports d'énergie et les dépenses d'énergie. Plusieurs auteurs se sont intéressés à ces deux composantes, et ont effectué des comparaisons entre les souches Wistar et Lou/C.

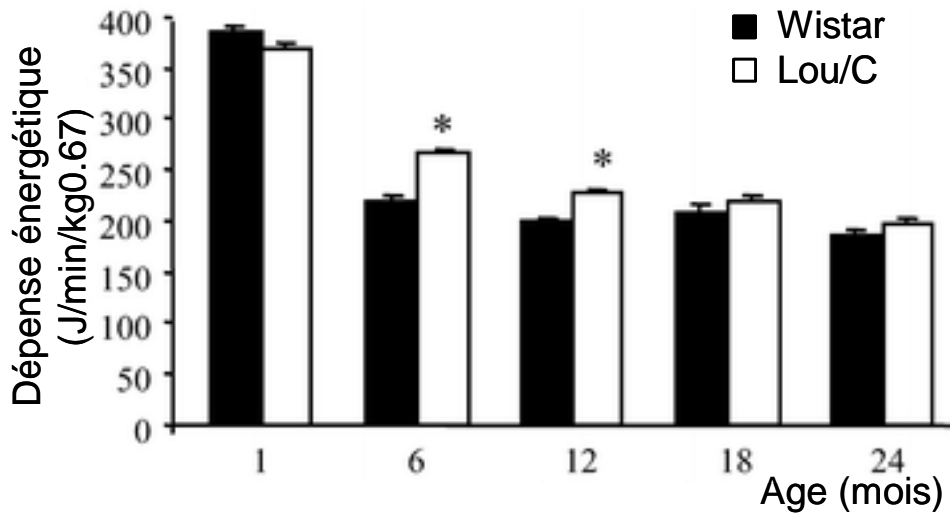
#### 5.1.3.1 Prise alimentaire du rat Lou/C

Une réduction de l'ingéré des rats Lou/C par comparaison aux rats Wistar pourrait expliquer leur meilleure gestion des stocks adipeux. Deux théories s'affrontent : certains auteurs utilisent la prise calorique brute de l'animal et montrent que le rat Lou/C est en restriction calorique de 40% (Couturier et al., 2002; Garait et al., 2005), ce qui expliquerait en partie leur phénotype maigre. Cependant, compte tenu de l'écart considérable de masse corporelle entre les deux souches Wistar et Lou/C, d'autres auteurs expriment la prise alimentaire des rats Lou/C en fonction de leur masse corporelle. Avec ce mode d'expression des résultats, il apparaît que le rat Lou/C ingère la même quantité de nourriture que le rat Wistar (Perrin et al., 2003b; Soulage C, 2008).

#### 5.1.3.2 Dépense énergétique du rat Lou/C

Une dépense énergétique accrue pourrait être à l'origine de la maigreur des rats Lou/C. Cette hypothèse a été testée par différentes mesures effectuées par calorimétrie indirecte et il a été montré que la dépense énergétique globale des rats Lou/C, mesurée sur 24 heures et à 26°C, peut être supérieure à celle des Wistar mais seulement à certains âges: de 21% à l'âge de 6 mois et de 14% à l'âge de 12 mois (figure 19) (Perrin et al., 2003b).

Figure 19 : Dépense énergétique des rats Wistar et Lou/C (Perrin et al., 2003b)



Il a été confirmé que les rats Lou/C présentent bien une dépense énergétique globale plus élevée à l'âge de 30 semaines, et ce, au cours de la phase active (nocturne chez les rats) ou quiescente (diurne) (Garait et al., 2005 ; Soulage C, 2008). Le fait que la dépense énergétique globale des rats Lou/C soit augmentée, y compris le jour, signifierait que l'activité physique spontanée des rats Lou/C ne peut, à elle seule, expliquer entièrement les différences de dépense énergétique globale constatées (Soulage C, 2008). Cette augmentation de dépense énergétique globale pourrait bien contribuer à la fine régulation de la masse corporelle du rat Lou/C.

*Au vu de ces résultats comparatifs de prise alimentaire et de dépense énergétique, entre les souches Wistar et Lou/C, dont fait état la littérature, il apparaît que les différentes composantes de la dépense énergétique du rat Lou/C ne sont pas caractérisées. On ne sait pas si chacune des composantes de la dépense énergétique est stimulée dans la souche Lou/C puisque les études publiées n'ont pas différencié les dépenses énergétiques de repos, liée au repas, et/ou à l'activité physique.*

*D'après les résultats de la littérature, l'hyperactivité du rat Lou/C devrait induire une dépense énergétique liée à l'activité physique accrue mais cela n'a pas été mesuré directement. On ne sait pas non plus si l'énergie dépensée pour un exercice de même intensité est la même entre rats Wistar et Lou/C, en d'autres termes, si le rendement de conversion énergétique est le même dans les deux souches.*

**Il serait donc important d'établir clairement le budget énergétique du rat Lou/C, afin d'estimer par la suite quelles pourraient être les voies métaboliques impliquées dans la réduction du stockage de graisse observée dans cette souche.**

## 5.2 Caractéristiques métaboliques du rat Lou/C

### 5.2.1 Métabolisme des lipides et des glucides

Le rat Lou/C semble faire preuve d'un métabolisme différent de celui du rat Wistar. En effet, chez le rat Lou/C, la glycémie, le glycogène hépatique ainsi que l'activité de l'hexokinase hépatique et musculaire (enzyme clé de la glycolyse) sont inférieurs (Couturier et al., 2002). De plus, lors d'un exercice aigu (60 minutes de nage dans une piscine maintenue à 36-37°C), le rat Lou/C, âgés de 14 semaines, maintient sa glycémie sans avoir recours à ses réserves de glycogène hépatique et musculaire (Couturier et al., 2004). Une augmentation de la néoglucogenèse associée à une moindre utilisation de glucose par les muscles squelettiques, rendues possible par un métabolisme lipidique accru, pourraient expliquer ce phénomène.

Le métabolisme des lipides apparaît effectivement modifié au vu des concentrations plasmatiques de glycérol et de  $\beta$ -hydroxybutyrate, deux marqueurs de la lipolyse et de la  $\beta$ -oxydation, plus élevées chez le rat Lou/C (Couturier et al., 2002). Ces résultats suggèrent que le rat Lou/C présenterait une plus forte activité de mobilisation et d'oxydation des substrats lipidiques. Les mécanismes en amont de cette orientation métabolique sont encore méconnus. Il a été montré que la concentration en noradrénaline du tissu adipeux blanc était supérieure chez les rats Lou/C (Perrin et al., 2003b), ce qui pourrait stimuler leur lipolyse et favoriser l'oxydation périphérique des acides gras. Cependant, une récente étude a mesuré l'activité lipolytique d'adipocytes épidydimaux, ainsi que l'activité lipogénique, *in vivo*, dans le foie et le tissu adipeux épidydimal, de rats Wistar et Lou/C âgés de 30 semaines. De façon inattendue, ces deux activités ne sont pas différentes entre les deux souches de rats (Soulage C, 2008). *Ces études posent la question du devenir des lipides synthétisés par le foie et qui ne s'accumulent pas dans le tissu adipeux blanc? Les capacités d'oxydation des lipides et les échanges pouvant exister entre foie et tissu adipeux dans la gestion des lipides n'ont pas été abordés.*

### 5.2.2 Caractéristiques hormonales

Le rat Lou/C présente une sensibilité à l'insuline accrue, évaluée par clamp euglycémique-hyperinsulinémique (Perrin et al., 2003b) et caractérisée par une consommation de glucose double de celles des rats Wistar. De plus, l'insulinémie à jeun est inférieure chez le rat Lou/C à jeun, même pour des rats âgés de 22 mois, alors que chez le rat Wistar, l'insulinémie augmente avec le temps suggérant une évolution vers un diabète lié à l'âge (Perrin et al., 2003b). La même tendance est observée pour la leptinémie qui est identique pour des rats Wistar et Lou/C de 1 mois, mais qui est multipliée par 15 chez le rat

Wistar âgé de 12 mois et plus, et stable, à un niveau nettement inférieur, chez le rat Lou/C âgé (Couturier et al., 2004 ; Kappeler et al., 2004; Perrin et al., 2003b ). Cette faible leptinémie pourrait être le reflet de la moindre adiposité de la souche Lou/C. Enfin, le phénotype et le métabolisme particulier de ces rats soulève la question de leur statut thyroïdien. Deux études n'ont pas révélé de différence de concentration plasmatique en T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> et TSH entre les rats Wistar et Lou/C âgés de 20 (Mitchell et al., 2006) ou 30 semaines (Garait et al., 2005). Ces données surprenantes contrastent avec le profil « hyperthyroïdien » du rat Lou/C mais pourraient être expliquées par un nombre accru de récepteurs nucléaires aux hormones thyroïdiennes dans certains tissus comme le foie des rats Lou/C, suggérant une sensibilité hépatique accrue à ces hormones (Taleux et al., 2009).

*Si dans un premier temps il est indispensable de caractériser au mieux la balance énergétique du rat Lou/C, il apparaît également essentiel de fournir des arguments en faveur du ou des tissu(s) qui pourrai(en)t être responsable(s) de la plus grande dépense énergétique globale observée dans la souche Lou/C. La dissipation de l'énergie ingérée en excès, chez le rongeur, met essentiellement en jeu des mécanismes thermogènes développés dans le BAT (Rothwell and Stock, 1997) (cf. paragraphe I.3.3.2). Plusieurs études montrent que la masse relative de BAT est supérieure chez le rat Lou/C (Couturier et al., 2004; Mitchell et al., 2006; Soulage C, 2008) comparativement au rat Wistar et suggèrent que son activité puisse être augmentée expliquant la dépense énergétique stimulée. Cependant, aucune étude, à ce jour, n'a validé cette hypothèse. Seuls Abdoulaye et al. ont montré une hyperactivité du BAT des rats Lou/C par comparaison aux rats Fischer F344, souche prédisposée à l'obésité (Abdoulaye et al., 2006). **Il manque une étude complète de l'activité du BAT des rats Lou/C, siège des mécanismes thermogènes, par comparaison aux rats Wistar. Tant que l'hyperactivité du BAT du rat Lou/C n'est pas démontrée, elle ne peut être tenue comme responsable principale des caractéristiques phénotypiques de cette souche.***

*L'activité physique spontanée importante dont fait preuve le rat Lou/C, qu'il ait ou non accès librement à une roue d'activité, devrait générer une dépense énergétique supplémentaire. Les mécanismes thermogènes en amont de cette dépense énergétique accrue ne sont pas établis chez le rat Lou/C. Comme le muscle squelettique peut contribuer à la dépense énergétique globale à la fois lors de la contraction et au repos (cf. paragraphe I.3.5.4), **nous nous sommes questionnés sur l'implication du muscle squelettique dans le maintien de la masse corporelle du rat Lou/C. Cela pourrait passer par des capacités oxydatives accrues dans le muscle squelettique, liées à l'augmentation de l'activité physique et des mécanismes potentiellement thermogènes, induits par l'activité de protéines découplantes au sein des mitochondries de ce tissu. Le rôle de l'activité physique spontanée sur la fonction mitochondriale est encore méconnu. La plupart***

des rats couramment utilisés en laboratoire montrent un engouement limité pour la roue d'activité. Notre modèle Lou/C, particulièrement prompt à l'utilisation de ces roues, constitue donc un modèle de choix pour l'étude des adaptations musculaires à l'activité physique spontanée non contrainte et sans stress. Une augmentation des capacités mitochondriales musculaires chez les rats Lou/C pourrait contribuer à oxyder un surplus de lipides surtout dans le cas d'une activité prolongée de type endurance.

Si le BAT et le muscle squelettique sont des tissus thermogènes potentiels, le foie doit également être considéré. Dans certains cas de défaillance du BAT, la dissipation de l'énergie superflue peut être partiellement attribuée au foie (cf. paragraphe 1.3.3.3). L'observation d'une sensibilité accrue du foie aux effets métaboliques des hormones thyroïdiennes chez les rats Lou/C (Taleux et al., 2009) conforte un rôle potentiel de ce tissu dans un métabolisme énergétique accru dans cette souche. **Il serait donc intéressant de vérifier par des approches fonctionnelles une activité métabolique et oxydative accrue du foie dans la souche Lou/C.**

Le foie constitue également un organe central dans la gestion du métabolisme et du transport des lipides dans l'organisme. Les lipides du foie ont plusieurs origines : ils peuvent provenir des lipides alimentaires, être issus de la mobilisation des réserves adipocytaires ou être directement synthétisés dans les hépatocytes par la lipogénèse de novo (Diraison et al., 2003; Pessayre et al., 2002). Dans les hépatocytes, les acides gras non estérifiés peuvent i) soit entrer dans la mitochondrie et subir une  $\beta$ -oxydation afin de fournir de l'énergie, soit ii) être estérifiés en triglycérides (TG, la forme de stockage des acides gras libres) qui seront stockés dans le cytoplasme des hépatocytes ou seront sécrétés sous forme de VLDL (very low density lipoproteins) (Chao et al., 1986; Heid et al., 1998). Cette sécrétion hépatique sera au profit des tissus tels que le tissu adipeux blanc où ils seront éventuellement stockés ou le muscle squelettique où ils pourront être oxydés. De l'activité métabolique de ces tissus dépend la gestion des stocks de lipides de l'organisme. Comme les capacités de lipolyse ou de lipogénèse ne sont pas modifiées dans le tissu adipeux blanc ou le foie des rats Lou/C par comparaison aux rats Wistar (Soulage C, 2008), les capacités de  $\beta$ -oxydation doivent être augmentées pour expliquer la maigreur des rats Lou/C. L'hypothèse d'une oxydation accrue des lipides dans cette souche a été émise d'après les concentrations circulantes de lipides (Couturier et al., 2002) mais n'a jamais été directement abordée. On pourrait également imaginer que des échanges de substrats lipidiques entre le foie et le tissu adipeux blanc pourraient constituer des cycles métaboliques futiles consommateurs d'énergie, induits par des cycles de synthèse et d'oxydation de ces molécules. L'existence de tels cycles reste toutefois à étayer par des données expérimentales. Une première étape pourrait être de **vérifier si les capacités de synthèse et d'oxydation des acides gras dans le foie et le tissu adipeux blanc peuvent être stimulées parallèlement dans cette souche.**

### 5.3 Intérêt du modèle Lou/C

La plupart des travaux relatifs à l'obésité font appel à des souches de rats ou de souris génétiquement obèses. Nous avons plutôt choisi d'étudier le rat Lou/C qui est issu de la souche Wistar, et qui présente une résistance à l'obésité. Même soumis à un régime constitué à plus de 80% de lipides, le rat Lou/C conserve une masse de tissu adipeux constante au cours du temps et n'excédant pas 12% de sa masse corporelle, alors que celle des rats Wistar peut représenter plus de 30% de leur masse corporelle (Helies et al., 2005). L'activité physique spontanée du rat Lou/C est supérieure à celle du rat Wistar en cage standard (Garait et al., 2005 ; Soulage C, 2008) et devient impressionnante lorsque les rats ont accès à une roue d'activité de façon volontaire. Bien que quelques hypothèses mécanistiques commencent à être formulées pour expliquer la maigreur du rat Lou/C, peu d'entre elles sont suffisamment étayées par des données expérimentales.

Afin de mieux caractériser ce modèle animal, les objectifs de ce travail ont donc été :

- **D'étudier plus précisément la balance énergétique du rat Lou/C**, comparativement à celle du rat Wistar, en évaluant ses apports énergétiques ainsi que ses dépenses. L'ingéré alimentaire des rats Lou/C et leur dépense énergétique globale ont été mesurées de façon globale pour confronter nos résultats à ceux de la littérature, et, dans un second temps, pour vérifier si la faible masse adipeuse des rats Lou/C était liée à une réduction des entrées et/ou une augmentation des dépenses. Afin de caractériser au mieux la dépense énergétique des rats Lou/C, il apparaissait nécessaire de mesurer les différents postes de cette dépense. Bien que le métabolisme de base d'un rat puisse être théoriquement quantifiable, à jeun et en période d'inactivité, des études montrent que le métabolisme de base d'un animal est extrêmement difficile à obtenir précisément (Bramante, 1968). Nous avons donc exclu ce paramètre, lui préférant une mesure de la dépense de repos et en nous focalisant sur la dépense énergétique liée au repas et à celle liée à l'activité physique. Pour permettre une bonne estimation de la dépense énergétique liée au repas, nous avons fixé, dans un protocole expérimental, la durée d'accès à la nourriture. Ne faisant aucun doute que l'activité physique augmentée du rat Lou/C génère une dépense énergétique supplémentaire, nous avons mesuré l'énergie dépensée, pour un exercice de même intensité en roue motorisée, par les souches Wistar et Lou/C. Ces résultats nous permettaient de caractériser plus finement la balance énergétique du rat Lou/C, apportant une avancée significative aux connaissances actuelles.

- **De vérifier l'implication du BAT du rat Lou/C dans la régulation de sa balance énergétique.** En effet, le BAT est connu pour induire la dissipation de l'énergie ingérée en excès chez le rongeur (Cannon and Nedergaard, 2004; Rothwell and Stock, 1997). L'hypothèse la plus probable permettant d'expliquer le phénotype maigre du rat Lou/C était un BAT hyperactivé en conditions basales, dont l'activité mitochondriale stimulée induirait une dépense énergétique accrue. Aucune étude, à ce jour, n'a comparé la fonctionnalité du BAT du rat Lou/C à celle du rat Wistar. *In vivo*, par un test fonctionnel à la noradrénaline, nous avons observé la capacité maximale d'activation du BAT de rats Wistar et Lou/C, suite à une injection intrapéritonéale de noradrénaline. Puis, *in vitro*, nous avons étudié l'activité mitochondriale de ce tissu, via l'activité de la protéine découplante UCP1, et via l'expression de l'abondance relative de transporteurs du métabolisme lipidique et glucidique.
  
- **De vérifier la réactivité du BAT du lou/C** par un protocole d'exposition prolongée au froid afin de tester son intégrité fonctionnelle.
  
- **De mettre en évidence les tissus thermogènes impliqués dans la résistance à l'obésité du rat Lou/C.** Afin de déterminer un rôle potentiel du muscle squelettique ou du foie à la dépense énergétique accrue des rats Lou/C, nous avons utilisé une approche sur mitochondries isolées, afin de rechercher des modifications fonctionnelles sur l'efficacité du couplage énergétique entre les rats Wistar et Lou/C.

**D'observer l'effet de l'activité physique spontanée sur l'activité mitochondriale du BAT, du foie et du muscle squelettique.** Puisque le rat Lou/C constitue un formidable modèle d'hyperactivité physique spontanée en roue, et que la littérature est relativement peu fournie à ce sujet, nous avons recherché d'éventuelles modifications fonctionnelles des mitochondries induites par l'activité physique spontanée de rats Wistar et Lou/C, bénéficiant d'un accès libre à une roue d'activité.

**De mettre en évidence d'éventuels cycles futiles entre le foie et le tissu adipeux blanc.** L'activité lipogénique du foie et l'activité lipolytique du tissu adipeux étant identiques chez le rat Lou/C (Soulage C, 2008), se pose la question du devenir des

acides gras synthétisés par le foie et libérés par le tissu adipeux. Nous avons donc estimé les activités de synthèse et d'oxydation des acides gras au sein de ces deux tissus, fondamentaux en terme de métabolisme lipidique, afin de vérifier la possibilité de l'existence de cycles futiles consommateurs d'énergie, au sein du foie et du tissu adipeux blanc.





# Chapître B :

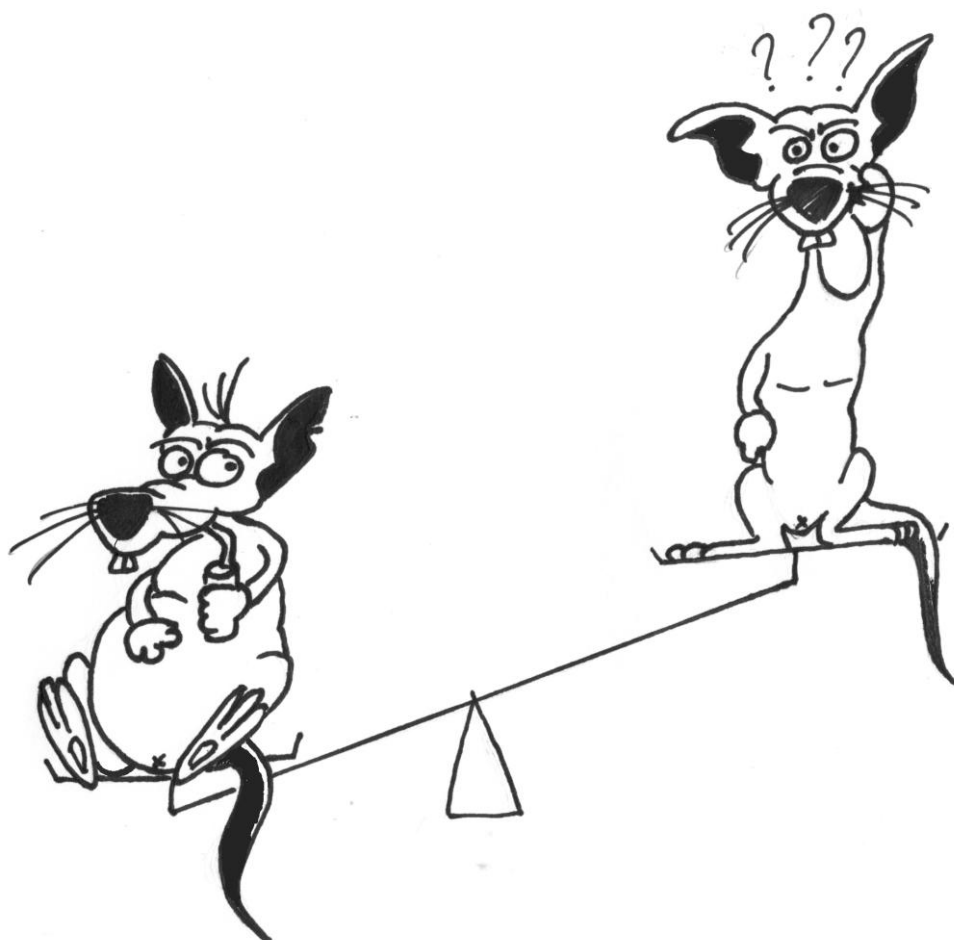
# Etude

# expérimentale



# Etude I:

## La balance énergétique du rat Lou/C





## Composantes de la balance énergétique chez le rat Lou/C, un modèle de résistance à l'obésité

Maud BELOUZE<sup>1</sup>, Jean-Louis ROUANET<sup>1</sup>, Benjamin REY<sup>1</sup>, Damien ROUSSEL<sup>1</sup>, Dominique LETEXIER<sup>1</sup>, Caroline ROMESTAING<sup>1</sup>, Loïc TEULIER<sup>1</sup>, Delphine BAETZ<sup>1</sup>, Harry KOUBI<sup>1</sup>,  
Brigitte SIBILLE<sup>2</sup>, Claude DUCHAMP<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Laboratoire de Physiologie Intégrative, Cellulaire et Moléculaire, Université Lyon 1, Lyon, CNRS, 43 Bvd 11 Novembre 1918, F-69622 Villeurbanne Cedex, France.

<sup>2</sup> INSERM U907, Université de Nice-Sophia Antipolis, Faculté de Médecine, 28 avenue de Valombrose, 06107 Nice, France.

### RESUME

Contrairement à la souche Wistar dont il est issu, le rat Lou/C se caractérise par une maigreur maintenue tout au long de sa vie. Les mécanismes responsables de cette remarquable résistance au développement de la surcharge adipeuse observée chez le Wistar ne sont pas identifiés. Le but de cette étude était de caractériser les différentes composantes de la balance énergétique de ce rat Lou/C afin d'identifier les mécanismes potentiellement responsables de cette maigreur.

Nos résultats montrent que l'ingéré alimentaire exprimé par unité de masse corporelle, ou par unité de masse maigre, n'était pas différent entre les rats Wistar et Lou/C âgés de 15 à 21 semaines. La dépense énergétique journalière déterminée par calorimétrie indirecte était supérieure chez le rat Lou/C âgé de 20 semaines (+ 20%). Les rats Lou/C présentaient une activité physique spontanée nettement supérieure à celle des rats Wistar (12,5 vs. 0,35 km/j) lorsqu'une roue d'activité volontaire leur était proposée. Le coût énergétique associé à un exercice physique imposé dans une roue d'activité motorisée (+ 30%) et la dépense énergétique mesurée dans la période de récupération post-exercice (+ 35%) étaient également supérieures chez le rat Lou/C. La thermogenèse associée à la prise alimentaire était plus forte chez le rat Lou/C (+ 12%).

La remarquable capacité du rat Lou/C à rester maigre apparaît liée à une balance énergétique mieux équilibrée avec une stimulation de plusieurs postes de dépense énergétique (repos, activité, repas) sans restriction de son ingéré.

## INTRODUCTION

L'obésité est une pathologie dont l'incidence ne cesse de croître dans le monde, et plus particulièrement dans les pays industrialisés. Non seulement source d'inconfort et de dépression, l'obésité est associée à un grand nombre de pathologies, telles que le diabète non insulino-dépendant, certains cancers ou maladies cardiovasculaires. Ceci se traduit par une diminution de l'espérance de vie chez les sujets obèses (Thompson et al., 1999). L'augmentation des ressources alimentaires disponibles, particulièrement en termes de glucides et lipides saturés (Kopelman, 2000), n'est pas associée à une augmentation de l'activité physique, bien au contraire. L'homme moderne se sédentarise sans restreindre son ingéré quotidien ce qui crée un déséquilibre de sa balance énergétique.

La balance énergétique d'un individu est composée par les entrées d'énergie sous forme d'aliments ainsi que par différentes composantes de la dépense d'énergie. Quatre grands postes de dépense peuvent être identifiés : la dépense énergétique basale, la dépense énergétique liée au repas, la dépense énergétique liée à l'activité physique et la dépense énergétique liée à la thermorégulation au froid. Une balance énergétique parfaitement équilibrée permet de couvrir les dépenses sans variation de la masse corporelle. L'obésité, et le stockage excessif de graisse qui lui est associé, sont le reflet d'une balance énergétique positive, où les entrées d'énergie sont largement supérieures aux dépenses.

Il existe plusieurs modèles de rongeurs obèses, dont la balance énergétique est positive. Cependant, la plupart de ces modèles d'obésité ne permettent pas de comprendre comment certaines personnes ont la faculté de rester mince malgré un environnement « obésogène ». Il existe peu de modèles disponibles pour comprendre ce phénomène de résistance à l'obésité. Le rat Lou/C, issu de la souche Wistar, est à la fois un modèle d' « anti-obésité » (Couturier et al., 2002) et de longévité (Alliot et al., 2002). Alors que le rat Wistar développe une obésité spontanée avec l'âge (Newby et al., 1990), le rat Lou/C se caractérise par une masse corporelle inférieure, et une limitation des dépôts adipeux en dépit de l'âge (Veyrat-Durebex and Alliot, 1997). De plus, le rat Lou/C se montre hyperactif en cage standard (Garait et al., 2005; Perrin et al., 2003b; Soulage C, 2008), mais également lorsqu'il dispose d'une roue d'activité en libre accès (Servais et al., 2003).

Le rat Lou/C semble parvenir à un meilleur équilibre de sa balance énergétique et, jusqu'à présent, la littérature ne nous apporte que peu de données à ce sujet. La maigreur du rat Lou/C pourrait-être liée, soit i) à une réduction de son ingéré, ii) soit à une stimulation de ses dépenses d'énergie. Si la prise alimentaire des rats Wistar à celle des Lou/C a déjà été comparée, le mode d'expression des résultats varie d'une étude à l'autre imposant des conclusions différentes allant d'une même prise alimentaire à une carence alimentaire

spontanée (Couturier et al., 2002; Garait et al., 2005; Helies et al., 2005; Perrin et al., 2003b; Soulage C, 2008; Veyrat-Durebex et al., 2009). La dépense énergétique globale de rats Wistar et Lou/C a également été mesurée (Garait et al., 2005; Perrin et al., 2003b; Soulage C, 2008), mais aucune mesure plus fine des différentes composantes de la dépense énergétique n'a été effectuée. A ce jour, aucune étude n'a réuni des données de prise alimentaire exprimée selon différents paramètres, ainsi que des mesures des dépenses énergétiques : globale, liée à la prise du repas et à l'exercice physique.

Le but de cette première étude était d'évaluer les entrées d'énergie du rat Lou/C par comparaison au rat Wistar, puis de caractériser trois grands postes de dépenses : globale, liée au repas et à l'exercice physique, chez le rat Lou/C par rapport au rat Wistar. Ces informations devraient permettre de savoir si la maigreur du rat Lou/C est liée à une restriction alimentaire et/ou une stimulation des dépenses, afin de cibler au mieux les mécanismes alors responsables de la régulation de la balance énergétique du rat Lou/C.

## **MATERIEL ET METHODES**

### **1. Les animaux**

#### ***1.1 Protocole A : rats sédentaire et actifs***

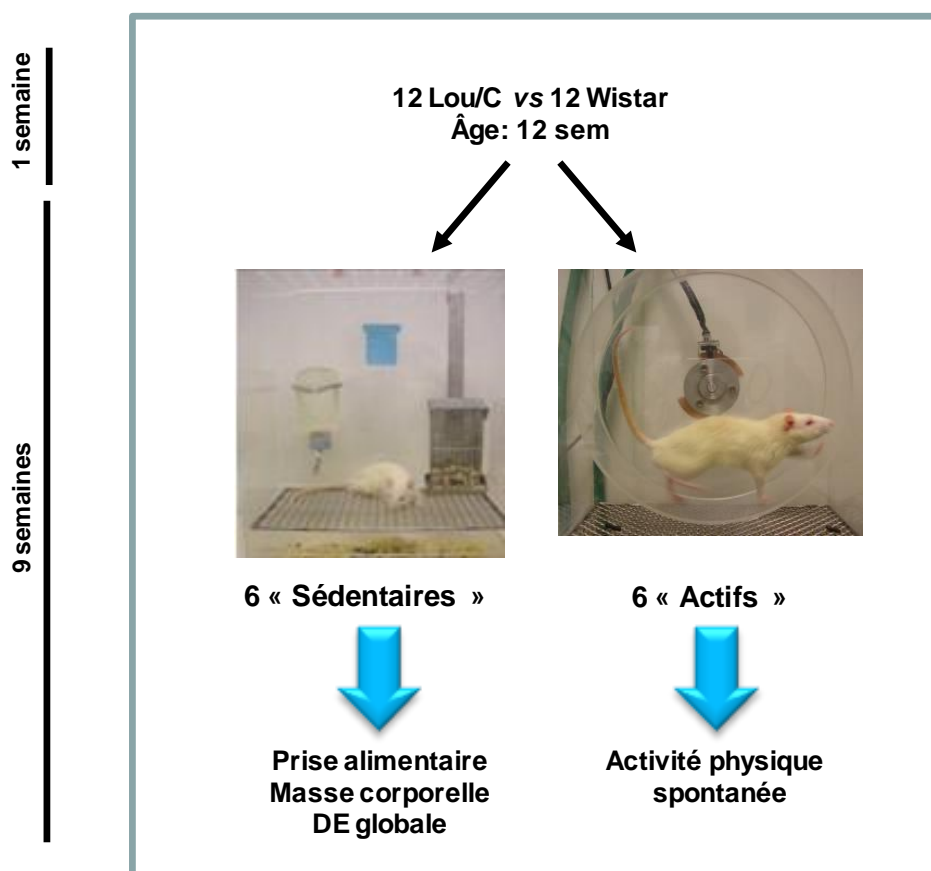
Le premier lot de rats était constitué de 12 rats Lou/C (Harlan, France), issus de la souche Wistar, ainsi que de 12 rats Wistar (Harlan, France), âgés de 12 semaines à leur arrivée dans notre animalerie. 1 semaine fut requise pour que les rats s'habituent à leur nouvel environnement, ces animaux ont été divisés aléatoirement en 2 groupes : 6 rats de chaque souche, dits « sédentaires », étaient placés en cages individuelles simples ; les 6 autres rats de chaque souche, appelés « actifs » disposaient d'une cage individuelle avec libre accès à une roue d'activité. Ces cages d'activité étaient reliées à un système informatique d'acquisition de données, enregistrant le nombre de tours de roue effectué chaque heure, sur une période 24 heures. Chaque jour, un relevé individuel de l'activité physique spontanée des rats ayant accès à une roue était effectué, et connaissant le périmètre de la roue (25 cm), nous calculions la distance parcourue en mètres par 24 heures. Le « design » expérimental est représenté à l'aide de la figure I.1.

Les animaux sont restés dans cette configuration pendant 9 semaines : les 3 premières leur permettaient de se familiariser à leur nouvelle cage, limitant ainsi le risque de voir un stress perturber nos observations ; les 6 semaines suivantes étaient dévolues à l'enregistrement des différents paramètres expérimentaux. Ainsi, les 6 rats Wistar et Lou/C sédentaires ont été utilisés pour la mesure de leur prise alimentaire, masse corporelle et dépense énergétique globale. L'enregistrement de l'activité physique spontanée en roue d'activité est effectué à l'aide des 6 rats Wistar et Lou/C actifs.



La luminosité était contrôlée avec un cycle de 12h de lumière et 12h d'obscurité. La nourriture standard (A04 UAR, France) et l'eau de boisson étaient fournies *ad libitum*.

Figure I.1 : Conditions expérimentales du protocole A



### 1.2 Protocole B : animaux soumis à un exercice imposé

Le second lot de rats était composé de 5 rats Lou/C (Harlan, France) et 5 rats Wistar (Charles River, France). Dès leur arrivée à l'âge de 20 semaines, ces animaux ont été hébergés dans notre animalerie à 5 par cage. Après un temps d'adaptation de quelques jours, ces animaux ont été placés régulièrement dans une roue motorisée, qu'un moteur entraînait par frottements, jusqu'à ce qu'ils se familiarisent à ce type d'exercice. Alors âgés de 24 semaines, nous avons mesuré la dépense énergétique pendant et après un exercice imposé de même intensité pour les rats Wistar et Lou/C, dans une roue motorisée.

### 1.3 Protocole C : animaux en cycle inversé

Le troisième lot de rats était composé de 7 rats Lou/C (Harlan, France) et 7 rats Wistar (Harlan, France). Ces animaux sont arrivés dans notre animalerie à l'âge de 8 semaines. Ils ont été répartis aléatoirement en cage collective, par groupe de 5; et après 1 semaine d'acclimatation, ils ont

été soumis à un cycle inversé, c'est-à-dire qu'il faisait jour de 19h à 7h, et nuit de 7h à 19h. La photopériode était de 12 heures de jour et 12 heures de nuit. Les animaux avaient un accès limité à la nourriture, uniquement de 13h à 17h (pendant la phase nocturne, et à volonté). Après 12 à 20 semaines d'acclimatation à ce rythme, la dépense énergétique de ces animaux alors âgés de 20 à 28 semaines était mesurée pendant 24 heures. Ce protocole d'accès limité à la nourriture permettait de fixer à la fois l'heure et la durée du repas et de déterminer par calorimétrie indirecte les variations de la dépense énergétique associées à ce repas. L'inversion du cycle nyctéméral était dévolue uniquement au confort de l'expérimentateur : en effet les rats se nourrissant la nuit, sans inversion du cycle, nous aurions été contraints de fournir, puis d'ôter la nourriture des cages entre 1h et 5 heures, et ce pendant 5 mois d'expérimentation. L'inversion du cycle, tout en maintenant la photopériode nous permettait de travailler plus confortablement en journée. Conscients qu'un tel protocole pouvait générer un stress chez nos animaux, et par là même un biais expérimental, nous avons surveillé la croissance des animaux.

### **2. Activité, prise alimentaire et masse des animaux (protocole A)**

Chaque jour, un relevé individuel de l'activité physique spontanée des rats ayant accès librement à une roue était effectué. Un relevé bihebdomadaire de la masse des animaux sédentaires, par pesée de chaque individu, le matin entre 8 heures et 10 heures, était pratiqué. En parallèle, deux fois par semaine, une pesée de la mangeoire avant et après remplissage était réalisée, afin de définir leur prise calorique individuelle quotidienne. Le gaspillage éventuel des rats était estimé au mieux par les débris de croquettes dans la cage. Connaissant la valeur énergétique de l'aliment (12,12 kJ / g), et à partir de nos relevés bihebdomadaires, nous avons pu calculer la prise calorique quotidienne de chacune des deux souches de rats pendant 7 semaines. Les résultats ont été exprimés en kJ par jour (kJ/jour), ou en kJ par jour en fonction de la masse corporelle de l'animal le jour où les mangeoires étaient pesées (kJ/jour/kg MC). Sachant que la différence de masse corporelle observée dans les souches Wistar et Lou/C est principalement due à une plus faible masse grasse des rats Lou/C, et compte tenu du rôle métabolique limité du tissu adipeux blanc : nous avons également exprimé les résultats de prise alimentaire des rats sédentaires du protocole A, à l'âge de 20 semaines, en kJ par jour et par kg de masse maigre (kJ/jour/kg MM). Pour ce calcul, nous avons eu recours à la composition corporelle de rats Wistar et Lou/C âgés de 20 semaines, obtenue par S. Servais (données non publiées) après dissolution des animaux dans de la potasse et dosage des protéines et lipides totaux. Les animaux de m'étude de S. Servais n'ont pas été hébergés en cage individuelle, mais leur masse n'était pas significativement différente de celle de nos animaux du protocole A.

### **3. Dépense énergétique**

La dépense énergétique a été mesurée par calorimétrie indirecte à partir de la consommation d'O<sub>2</sub> et de la production de CO<sub>2</sub> (Barré et al., 1985; Garait et al., 2005 ).

Les rats étaient placés dans une cage en verre hermétiquement close, dont le volume est adapté à la morphologie de l'animal, et ce afin de minimiser le volume mort (figure I.2). La cage est munie de 2 orifices : l'un assurant l'entrée d'air, et l'autre sa sortie. Cette sortie est reliée à un système de pompe qui aspire l'air à débit constant et l'envoie dans un circuit d'analyse de gaz. Le débit de la pompe était fixé et mesuré à l'aide d'un débitmètre, il était de 4 L/min. Le pourcentage d'O<sub>2</sub> dans l'air était mesuré par un analyseur paramagnétique d'O<sub>2</sub> (amplitude de mesure 20 – 21 % ; délai de mesure 50 s). Le pourcentage de CO<sub>2</sub> était quantifié par un analyseur à infrarouge (amplitude de mesure 0 – 1 % ; délai de mesure 50 s). Les analyseurs d'O<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub> étaient étalonnés avant chaque mesure avec de l'azote pur afin de régler les 0 % d'O<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub>, et avec l'air atmosphérique (20,93 % d'O<sub>2</sub>), ainsi qu'un mélange contenant 0,6 % de CO<sub>2</sub>. La cage était placée dans une enceinte fermée, adiabatique et isolée phoniquement. La température ambiante (Ta) était mesurée et maintenue à 26 °C. Le cycle nycthémeral était identique à celui de la pièce d'élevage.

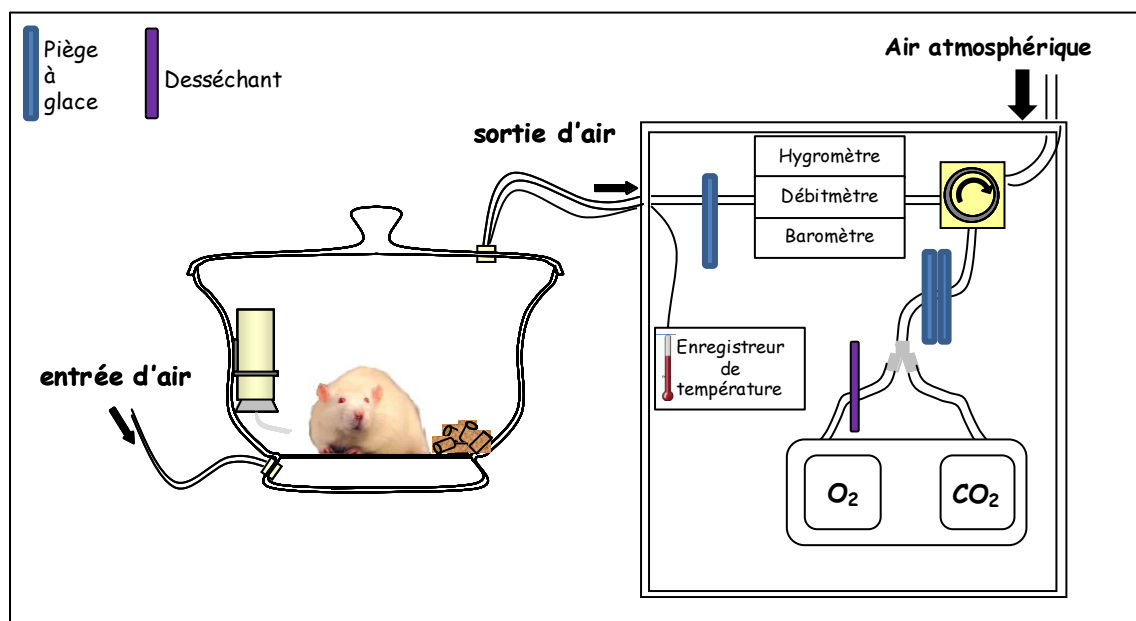
Bien qu'il soit possible de mesurer la dépense énergétique basale des rongeurs, cette pratique reste très délicate. En effet, cela implique que le rat soit à jeun et immobile, mais pas endormi. Il a été démontré que sur 5 heures d'enregistrement, le rat est inactif seulement pendant 4,9% du temps. Et au cours de cette période de « relative » inactivité, il apparaît encore des « microactivités » difficilement identifiables sur le tracé, mais qui surestimeraient la dépense énergétique mesurée de 5% (Bramante, 1968). Nous avons donc opté pour une mesure de dépense énergétique globale, incluant la DIT et l'activité de l'animal. Lors des mesures de dépense énergétique globale, le rat avait accès librement à la nourriture et l'eau ; lors des expériences en cycle inversé, le rat ne pouvait se nourrir et boire qu'entre 13h et 17h, ce qui permettait de mesurer la dépense énergétique post-prandiale. Les mesures étaient effectuées sur 24 heures.

Le système d'acquisition enregistrait une mesure du débit d'air, de la Ta, de la pression atmosphérique, du degré d'hygrométrie de l'air et du pourcentage de CO<sub>2</sub> (FICO<sub>2</sub>) et d'O<sub>2</sub> (FIO<sub>2</sub>) entrant et du pourcentage de CO<sub>2</sub> (FECO<sub>2</sub>) et d'O<sub>2</sub> (FEO<sub>2</sub>) dans l'air de sortie toutes les 30 sec. Le calcul de la dépense énergétique, exprimée en W/kg pour chaque rat, était effectué à l'aide de la formule de Depocas et Hart (Depocas and Hart, 1957).

$$\dot{V}_{O_2} = \dot{V}_{STPD} \left\{ \frac{F_{IO_2} - F_{EO_2}}{1 - [1 - (F_{ECO_2} - F_{ICO_2}) / (F_{IO_2} - F_{EO_2})] F_{IO_2}} \right\},$$

Les mesures effectuées en condition ambiante de température et de pression (ATPS) ont été transformées en conditions standards de température et de pression (STPD).

Figure I.2 : Schéma du circuit ouvert utilisé pour la mesure de la consommation d'oxygène et de la production de dioxyde de carbone.



Elle se décompose en quatre postes distincts : la dépense énergétique basale, la dépense énergétique liée à la prise du repas, la dépense énergétique liée à l'exercice physique, et la dépense énergétique liée à des besoins de thermorégulation. Compte tenu des difficultés de mesure précise de la dépense énergétique basale chez l'animal, notre protocole expérimental nous permettait d'évaluer la dépense énergétique globale, liée au repas et à l'exercice chez le rat Lou/C, afin de les comparer à celle du rat Wistar de même âge. Lors du protocole d'exercice imposé, la dépense énergétique de repos a été estimée lors d'épisodes d'enregistrements de dépense énergétique stabilisée pendant plusieurs minutes sans pics d'activité. En revanche la dépense énergétique de thermorégulation n'a pas été étudiée, puisque nos animaux étaient maintenus à une température ( $25^{\circ}C$ ) proche de la thermoneutralité, c'est-à-dire à une température pour laquelle les besoins de thermorégulation étaient minimales.

### 3.1 Dépense énergétique globale (protocole A)

La dépense énergétique des rats Wistar et Lou/C sédentaires issus du protocole A, et âgés de 20 à 22 semaines, était enregistrée dès 12 heures *PM* et ce pendant 24 heures. Les animaux étaient pesés juste avant le début de la mesure de métabolisme et avaient accès à l'eau et la nourriture *ad libitum*. Les résultats étaient exprimés en kJ par heure (kJ/h) et par kg de masse corporelle (kJ/h/kg MC). Comme pour la prise calorique, nous avons également calculé la dépense énergétique en kJ par jour et rapportée à la masse maigre de l'animal (kJ/jour/kg MM), considérée comme la masse métaboliquement active.

### **3.2 Dépense énergétique liée à l'exercice imposé (protocole B)**

Les rats Wistar et Lou/C du protocole C, âgés de 24 semaines, habitués à courir dans une roue motorisée, étaient placés dans ce système. Cette roue, dont la vitesse de rotation pouvait être modulée par un moteur, se trouvait dans une enceinte de plexiglas close. Cette enceinte présentait 2 orifices : l'un assurant l'entrée d'air, et l'autre sa sortie qui était connectée au système d'analyse des gaz décrit plus haut (figure 1.2). La dépense énergétique globale était préalablement mesurée. L'exercice d'intensité 300 mètres par heure commençait alors pendant que l'enregistrement du métabolisme se poursuivait jusqu'à obtention d'un plateau après plusieurs minutes. L'exercice d'intensité 600 mètres par heure était ensuite lancé, et l'enregistrement se poursuivait jusqu'à apparition d'un second plateau nous signifiant que l'exercice devait être arrêté. La dépense énergétique était encore mesurée en continu, après l'exercice jusqu'à son retour au niveau de repos. L'intégration du tracé jusqu'au retour au niveau de repos pré-exercice permettait de déterminer la dépense énergétique post-exercice. Les rats étaient pesés au début de la mesure de métabolisme, ce qui nous permettait d'exprimer nos résultats en watt par kg de masse corporelle (W/kg MC).

### **3.3 Dépense énergétique post-prandiale (protocole C)**

La dépense énergétique des rats Wistar et Lou/C âgés de 20 à 28 semaines a été mesurée en continu sur 24h. Leur masse corporelle a été déterminée juste avant de débiter la mesure de dépense énergétique, c'est-à-dire à 8 heures. L'accès à l'eau et à la nourriture standard (A04 UAR, France) étaient permis *ad libitum* entre 13 et 17 heures. La prise alimentaire et de boisson au cours de la mesure de dépense énergétique étaient également vérifiées en fin de mesure. La dépense énergétique des animaux étaient alors exprimée en watt par kg de masse corporelle (W/kg MC). La dépense énergétique de repos des rats avant le repas était retranchée de la dépense énergétique mesurée pendant et après le repas, ce qui nous permettait d'obtenir la dépense énergétique liée à la prise du repas (DIT), elle-même exprimée en watt par kg de masse corporelle (W/kg MC).

## **4. Analyse statistique**

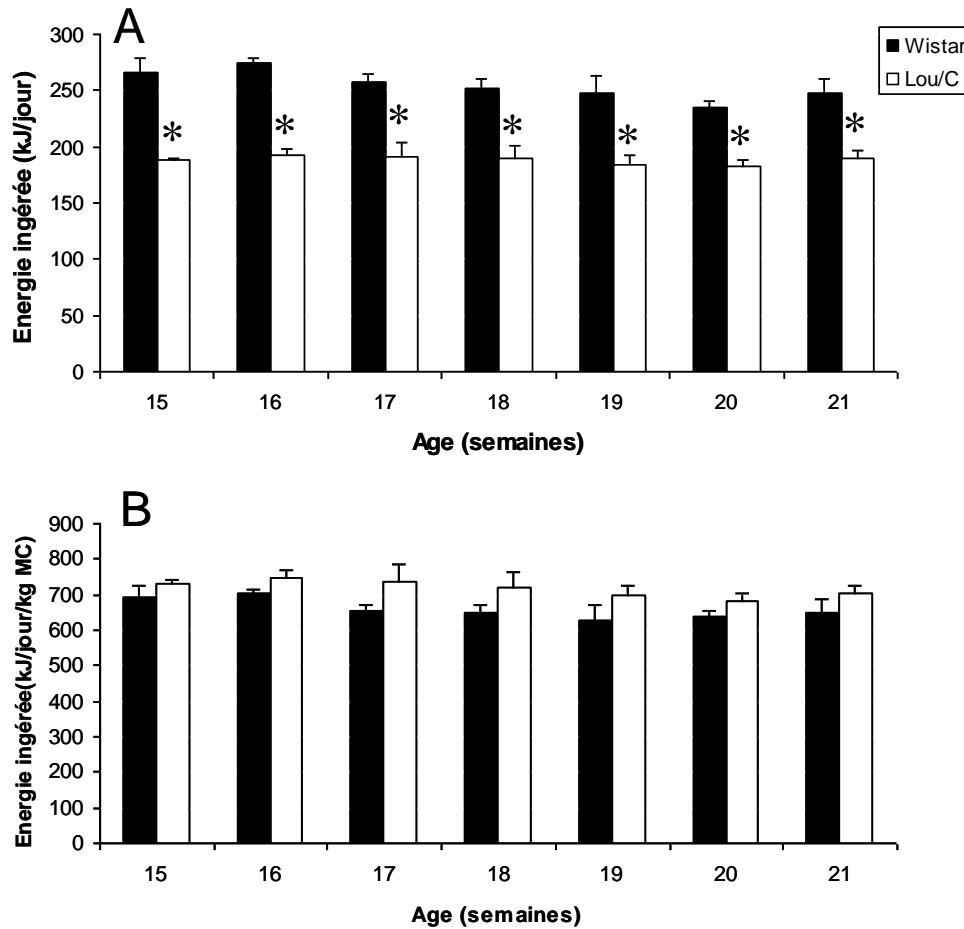
Tous les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  l'erreur standard à la moyenne (sem). Les comparaisons statistiques ont été effectuées par un test d'analyse des variances (ANOVA) pour comparer les groupes entre eux ou l'influence du facteur temporel lors des analyses cinétiques, suivi d'un test post hoc de PLSD Fisher. Les variations au sein d'un même groupe ont été comparées par un test t de Student. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel Statview.

## RESULTATS

### 1. Prise alimentaire

Les entrées d'énergie, première composante de la balance énergétique ont été estimées par l'intermédiaire de la prise alimentaire.

Figure I.3 : Energie ingérée par les rats Wistar et Lou/C.



**A** : La prise alimentaire est calculée quotidiennement pour les rats Wistar et Lou/C élevés à thermoneutralité et est exprimée en kJ par animal (kJ/jour).

**B** : La prise alimentaire est calculée quotidiennement pour les rats Wistar et Lou/C élevés à thermoneutralité et est exprimée en kJ par kg de masse corporelle (kJ/jour/kgMC).

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  sem, n=6. Les comparaisons ( $p < 0,05$ ) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher. \* : Wistar vs Lou/C.

Il apparaît tout d'abord que l'ingéré des deux souches de rats, âgés de 15 à 21 semaines, est stable et ne présente pas de variation en fonction du temps. Les résultats présentés dans la figure I.3A nous montrent que les rats Lou/C absorbent significativement moins d'énergie que les rats Wistar. De 15 à 21 semaines, les rats Wistar consomment en moyenne 284 kJ par jour alors que les rats Lou/C se contentent de 188 kJ par jour. En revanche, lorsque la prise calorique est normalisée par la masse corporelle de l'animal

(figure I.3B), nous remarquons que les rats Lou/C âgés de 15 à 21 semaines ingèrent une quantité d'énergie qui n'est pas significativement différente de celle des rats Wistar de même âge. En effet, au cours de cette période, les rats Lou/C absorbent en moyenne 694 kJ / jour / kg MC et les rats Wistar 639 kJ / jour / kg MC. Il ressort donc que les rats Lou/C ne sont pas en restriction calorique, lorsque l'on rapporte leur prise alimentaire à leur masse corporelle.

**Tableau I.1 : Energie ingérée par les rats Wistar et Lou/C en fonction de leur masse corporelle ou de leur masse maigre.**

Energie ingérée	Wistar	Lou/C	
	n=6	n=6	p
exprimée en kJ/jour/kg	<b>650 ± 35</b>	<b>704 ± 24</b>	NS
exprimée en kJ/jour/kg MM	<b>851 ± 46</b>	<b>800 ± 28</b>	NS

La prise alimentaire est calculée quotidiennement pour les rats Wistar et Lou/C (20 semaines) élevés à thermoneutralité et est exprimée en kJ par kg de masse corporelle (kJ/jour/kgMC) ou par kg de masse maigre (kJ/jour/kgMM).

Les résultats sont exprimés en moyenne ± sem, n=6. Les comparaisons (p<0,05) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher. \* : Wistar vs Lou/C.

Que la prise alimentaire des animaux des deux souches soit exprimée en fonction de sa masse corporelle totale, ou bien de sa masse maigre ne change pas notre interprétation (tableau I.1). En effet, nos résultats ne mettent pas en évidence de différence significative de la prise alimentaire entre les souches Wistar et Lou/C, entre 15 à 21 semaines d'âge pour la consommation masse spécifique et à 20 semaines pour la consommation rapportée à la masse maigre de l'animal. *En considérant la balance énergétique du rat Lou/C, nous pouvons conclure qu'une diminution des apports ne serait pas à l'origine du caractère anti-obèse de cet animal.*

## 2. Dépense énergétique

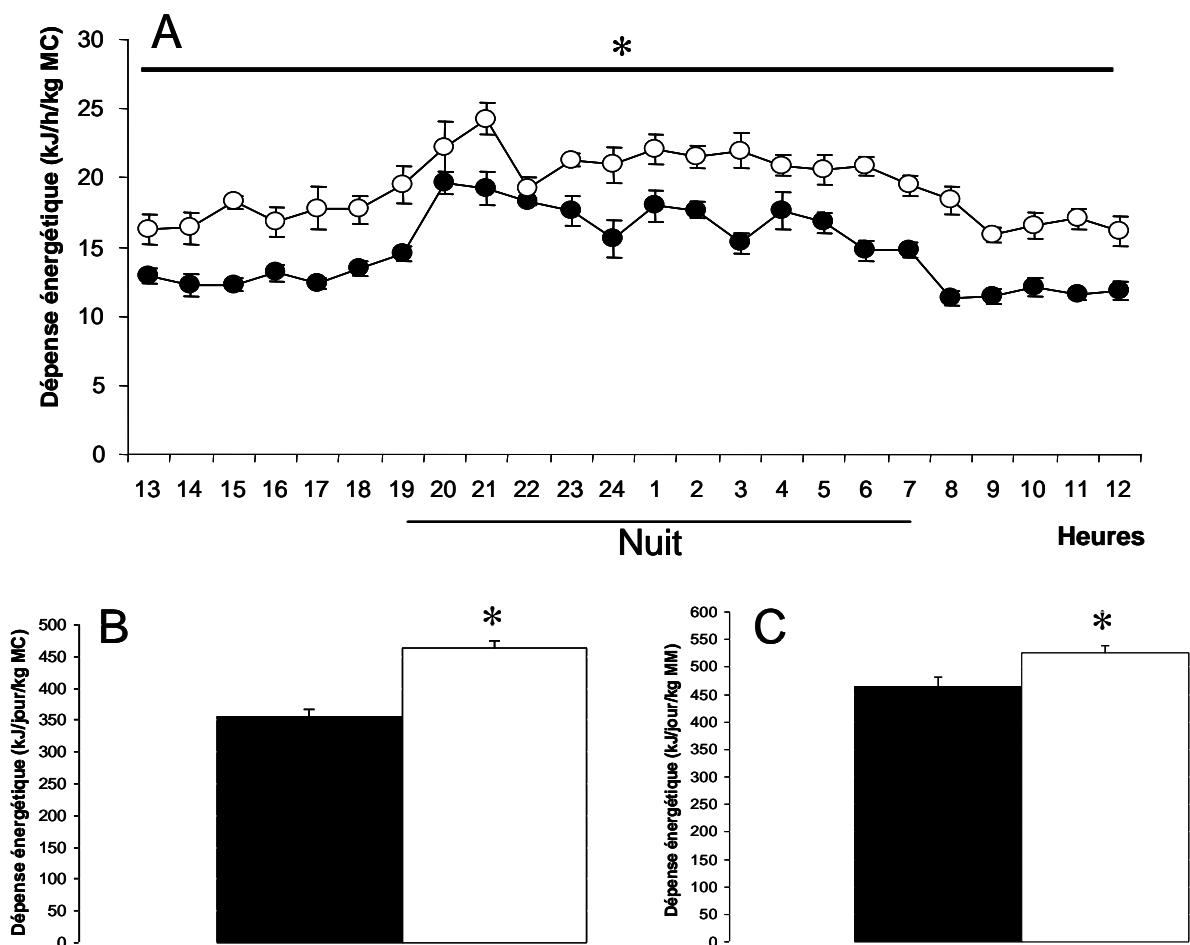
La dépense énergétique constitue la seconde partie de la balance énergétique d'un individu. Les dépenses énergétiques globale, liée à l'exercice physique et au repas ont été évaluées et comparées entre les souches Wistar et Lou/C.

### 2.1 Dépense énergétique globale

Nous obtenons chez les rats Wistar un profil de dépense énergétique classiquement observé (Blanc et al., 2001; Rothwell and Stock, 1982) (figure I.2A). Leur dépense

énergétique est en moyenne de  $299 \pm 7$  kJ/jour/kg durant la période diurne. Les rats Lou/C montrent le même profil que les rats Wistar, mais avec des valeurs de dépense énergétique nettement supérieures. En effet, le jour, la dépense énergétique des rats Lou/C est en moyenne de  $414 \pm 8$  kJ/jour/kg, soit 28% supérieure à la dépense énergétique des rats Wistar. La période nocturne correspond à la période de prise alimentaire des rats, et s'accompagne d'une augmentation de leur activité (Perrin et al., 2003b) ; ce qui se manifeste par une augmentation de la dépense énergétique (figure I.4A), classiquement observée chez ces rongeurs (Garait et al., 2005; Rothwell and Stock, 1982).

Figure I.4 : Energie dépensée pendant 24 heures par les rats Wistar et Lou/C.



**A** : La dépense énergétique est mesurée par calorimétrie indirecte sur une période de 24 heures. Les résultats sont présentés heure par heure et sont exprimés en kJ/heure/kg MC.

**B** : La dépense énergétique est mesurée par calorimétrie indirecte sur une période de 24 heures. Les résultats sont présentés en kJ/jour/kg MC.

**C** : La dépense énergétique est mesurée par calorimétrie indirecte sur une période de 24 heures. Les résultats sont présentés en kJ/jour/kg MM.

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  sem, n=5 pour les rats Wistar (●) et Lou/C (○). Les comparaisons ( $p < 0,05$ ) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher.

\* : Wistar vs Lou/C. MC: masse corporelle; MM: masse maigre.

Pendant cette période dite « active », les rats Wistar dépensent en moyenne  $410 \pm 12$  kJ/jour/kg, alors que les rats Lou/C montrent une dépense énergétique globale



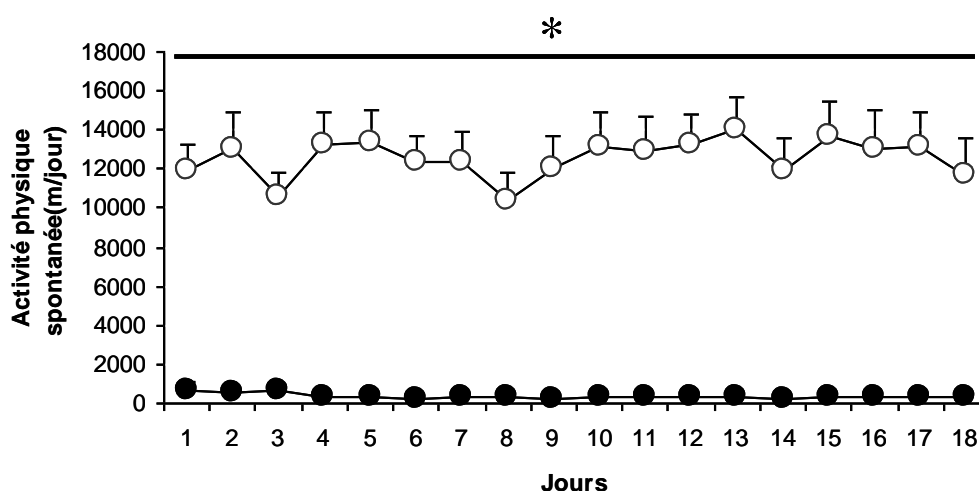
supérieure :  $511 \pm 9$  kJ/jour/kg (+20% vs. Wistar). En moyenne sur 24h, les rats Wistar dépensent 354 kJ/jour/kg MC, c'est-à-dire moins que les rats Lou/C dont la dépense énergétique moyenne est de 462 kJ/jour/kg MC (figure I.4B). Le rat Lou/C étant plus maigre que le rat Wistar, nous avons également calculé une moyenne de la dépense énergétique quotidienne rapportée à la masse maigre des animaux (figure III.4C). Avec ce référentiel, les rats Lou/C présentent toujours une dépense énergétique significativement augmentée par comparaison à celle des rats Wistar (respectivement 526 et 464 kJ/jour/kg MM).

*Ces résultats indiquent que la dépense énergétique du rat Lou/C est globalement plus élevée que celui du rat Wistar, et ce, au cours de la phase diurne comme de la phase nocturne. Une dépense énergétique accrue associée à un ingéré équivalent peut contribuer au moindre stockage adipeux de cet animal. Cette augmentation de dépense énergétique globale ne semble pas être imputée à une plus grande activité physique puisque, lors des mesures de métabolisme, le rat est maintenu dans une petite enceinte limitant très fortement la capacité de mouvements du rat. Cependant, l'activité locomotrice plus importante du rat Lou/C, en cage standard, pourrait contribuer à augmenter encore sa dépense énergétique.*

## 2.2 Dépense énergétique liée à l'exercice physique

### 2.2.1 Activité physique spontanée

Figure I.5 : Activité physique spontanée de rats Wistar et Lou/C.



6 rats Wistar et 6 rats Lou/C sont maintenus en condition standard de température (25°C) et disposent d'une roue d'activité en libre accès. Les roues disposent d'un détecteur relié à un système d'acquisition permettant une mesure en continu de l'activité des rats. Cette activité est ensuite convertie en m/jour pour chaque rat. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  sem pour les rats Wistar (●) et Lou/C (○). Les comparaisons ( $p < 0,05$ ) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher. \* : Wistar vs Lou/C.

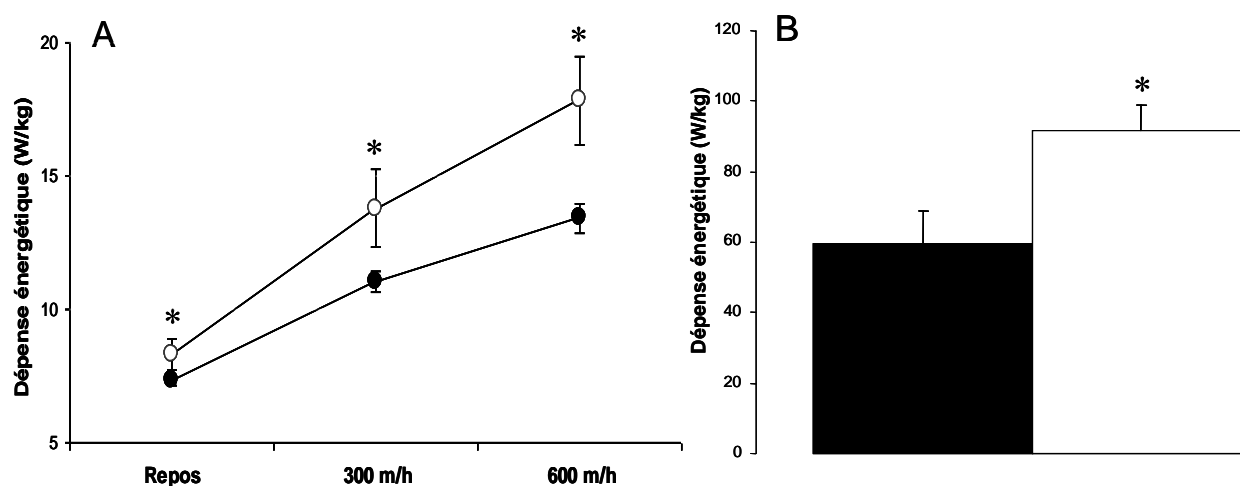
Une composante de la dépense énergétique globale est la dépense énergétique liée à l'activité physique. Dans un premier temps, nous nous sommes demandés quelle serait l'activité du rat Lou/C s'il avait à disposition une roue d'activité en libre accès. Les résultats obtenus chez des rats Wistar et Lou/C, âgés de 19 à 21 semaines, sont présentés figure I.5. Comme attendu, et quel que soit le groupe de rats étudiés, la phase active des rats est essentiellement nocturne (résultats non présentés). Les rats Wistar courent quelques centaines de mètres par jour (350 m/jour), alors que l'activité des rats Lou/C est fortement stimulée puisqu'ils parcourent en moyenne 12500 mètres par jour.

*Le rat Lou/C est plus actif que le rat Wistar, lorsqu'il dispose d'une roue d'activité. Cette hyperactivité particulière induit une dépense énergétique supérieure à celle du rat Wistar. On peut désormais se demander si le coût associé à l'exercice physique est majoré chez le rat Lou/C.*

### 2.2.2 Exercice imposé

Comme les rats Wistar ont une très faible activité locomotrice spontanée, il était difficile d'utiliser ce protocole d'activité spontanée pour déterminer la dépense énergétique associée. Afin de déterminer la dépense énergétique liée à l'exercice physique, nous avons utilisé un protocole d'exercice imposé, où les rats Wistar et Lou/C, âgés de 24 semaines, préalablement entraînés, devaient marcher dans une roue motorisée.

Figure I.6 : Dépense énergétique liée à un exercice imposé.



**A** : La dépense énergétique (W/kg) est mesurée par calorimétrie indirecte au repos, puis au cours d'un exercice en roue motorisée, à une intensité de 300 m/h puis de 600 m/h.

**B** : La dépense énergétique post-exercice est mesurée par calorimétrie indirecte après arrêt de l'exercice d'intensité 600 m/h et jusqu'au retour à une dépense énergétique de repos. L'aire sous la courbe ainsi obtenue est calculée et intégrée (W/kg).

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  sem pour les rats Wistar (●) et Lou/C (○), n=5 par groupe. Les comparaisons ( $p < 0,05$ ) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher.

\* : Wistar vs Lou/C.

Avant l'exercice, la stabilisation du rat dans l'enceinte métabolique permettait d'atteindre des niveaux faibles et relativement constants pendant plusieurs minutes que nous avons utilisés pour déterminer la dépense énergétique de repos des rats. Cette dépense de repos est plus élevée chez le rat Lou/C que chez le Wistar (+ 12%). Pour les 2 intensités d'exercice imposé, 300 et 600 mètres par heure, la dépense énergétique associée à l'exercice est supérieure chez le rat Lou/C par comparaison au rat Wistar (respectivement + 24% et + 33%) (figure 1.6A). *Lorsque les rats Wistar et Lou/C sont soumis à un exercice d'une même intensité, il apparaît que la dépense énergétique associée est plus élevée chez le rat Lou/C.*

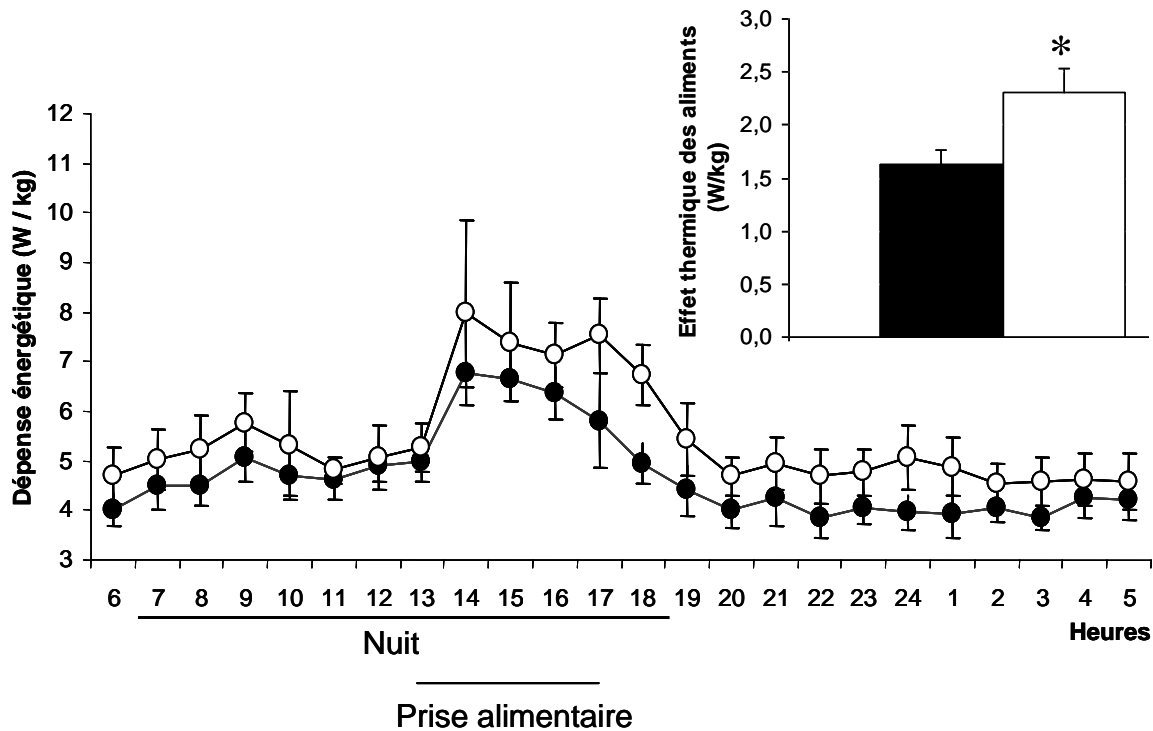
La dépense énergétique post-exercice est également supérieure de 35% chez le rat Lou/C par rapport au rat Wistar (figure 1.6B). *Les rats Lou/C sont donc plus actifs que les rats Wistar, et la dépense énergétique liée à l'exercice physique, pendant et après, est plus élevée chez les rats Lou/C.* Ces données complètent les résultats de dépense énergétique globale préalablement obtenus, et pourraient expliquer en partie la maigreur du rat Lou/C. Afin de compléter ces résultats de dépense énergétique, il est essentiel de s'intéresser également à la dépense énergétique associée au repas, troisième grand poste de dépense d'énergie.

### **2.3 Dépense énergétique liée au repas**

Comme le rat a une alimentation principalement nocturne et discontinue avec des prises d'aliment variables, il est difficile d'apprécier sur des rats nourris *ad libitum* la dépense énergétique liée au repas. Pour standardiser le repas, nous avons dû élaborer un protocole d'accès à l'alimentation pendant un temps limité.

Dans ce protocole, nous observons un profil de dépense énergétique classique pour chacune des 2 souches de rats (figure 1.7). Elle est augmentée la nuit, où les rats sont plus actifs, et notamment au cours de la prise du repas (Blanc et al., 2001; Rothwell and Stock, 1982 ). La dépense énergétique globale des rats Lou/C est plus élevée que celle des rats Wistar, confirmant les résultats obtenus dans la figure 1.4. L'accroissement de la dépense énergétique induit par le repas a été calculé par comparaison avec le niveau pré-prandial, et est représenté dans la figure 1.7. Cette augmentation de la dépense énergétique liée au repas est supérieure chez le rat Lou/C par comparaison au rat Wistar (+ 12%,  $P < 0,05$ ).

Figure I.7 : Dépense énergétique des rats Wistar et Lou/C en cycle inversé et effet thermique des aliments.



La dépense énergétique est mesurée par calorimétrie indirecte sur une période de 24 heures au cours de laquelle les rats sont en cycle inversé avec accès à la nourriture *ad libitum* seulement entre 13h et 17h. L'effet thermique des aliments est calculé au cours de la prise alimentaire, après soustraction de la dépense énergétique de repos.

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  sem (W/kg),  $n=7$  pour les rats Wistar (●) et Lou/C (○). Les comparaisons ( $p<0,05$ ) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher.

\* : Wistar vs Lou/C.

*Chacun des postes de dépense énergétique du rat Lou/C est stimulé : globale, au cours de l'exercice physique et du repas. Cette hyperstimulation du métabolisme pourrait aboutir à un plus faible stockage sous forme de tissu adipeux blanc.*

## DISCUSSION

Dans cette première étude, nous souhaitons comparer la balance énergétique du rat Lou/C à celle du rat Wistar. Pour cela, nous avons caractérisé les différents postes d'entrée ou de sortie d'énergie composant cette balance énergétique, le but étant, dans un premier temps, de comprendre si la maigreur du rat Lou/C était liée à une régulation originale de sa balance énergétique. Nous avons tout d'abord mesuré l'ingéré de rats Wistar et Lou/C, puis détaillé trois postes de dépense d'énergie : la dépense énergétique globale, liée à l'activité physique, et à la prise du repas. La dépense énergétique de thermorégulation n'était, quant à elle, pas prise en compte puisque les animaux étaient maintenus à une température proche de la neutralité thermique.

Nos résultats ne montrent pas de différence significative de prise alimentaire entre les rats Wistar et Lou/C par unité de masse corporelle. Par contre, les rats Lou/C ont une prise alimentaire spontanément plus faible en valeur absolue. Ces résultats sont cohérents avec la littérature (Couturier et al., 2002, Garait, 2005 #41). Si l'on exprime l'ingéré du rat Lou/C en le rapportant à sa masse corporelle totale, métabolique, ou par rapport à sa surface corporelle (Refinetti, 1989; Schmidt-Nielsen, 1975), le rat Lou/C absorbe autant de nourriture que le rat Wistar à l'âge de 1, 6, 12 et 18 mois, et plus à l'âge de 24 mois lorsque la prise alimentaire est exprimée en g / kg<sup>0,67</sup> (Perrin et al., 2003b). Si la dépense énergétique peut être normalisée avec la masse corporelle de l'animal par l'utilisation d'exposants (0,67-0,75), il est plus important de tenir compte de la composition corporelle des animaux. S. Servais (au cours de sa thèse effectuée au sein du laboratoire) a calculé, après dissolution des animaux dans de la potasse, que les rats Wistar étaient composés à 24% de graisse, contre seulement 12% pour les rats Lou/C. Le tissu adipeux blanc n'étant pas considéré comme métaboliquement actif, nous avons calculé la prise alimentaire des animaux par kilogramme de masse maigre. Aucune différence de prise alimentaire n'apparaît entre les souches de rats lorsque l'on se rapporte à ce référentiel. Ces résultats sont cohérents avec l'absence d'activation chez le rat Lou/C de l'AMP-kinase hypothalamique, impliquée dans le contrôle la sécrétion des molécules orexigènes ou anorexigènes (Taleux et al., 2008). Une activation de cette AMPK est au contraire observée chez les Wistar restreints en alimentation. Une étude récente montre même que les rats Lou/C, âgés de 30 semaines, ont une prise calorique totale, exprimée en kcal/100g de masse corporelle, significativement augmentée par rapport aux rats Wistar (Soulage C, 2008). De même, lorsque la prise alimentaire, évaluée par 100g de masse corporelle, des rats Lou/C est comparée à celle de rats Fischer F344, montrant une prédisposition à l'obésité, aucune différence n'est observée de 10 à 12 semaines (Abdoulaye et al., 2006). Que le rat Lou/C absorbe autant, voire plus d'énergie que le rat Wistar, comme le montrent ces dernières études, semble donc confirmer qu'il ne serait pas en restriction calorique, si toutefois les résultats de prise alimentaire sont rapportés à la masse corporelle ou métabolique de l'animal. La maigreur du rat Lou/C ne serait donc pas associée à un moindre ingéré calorique, c'est pourquoi nous nous sommes intéressés à sa dépense énergétique.

L'analyse de nos résultats montre que les rats Wistar comme Lou/C ingèrent beaucoup plus d'énergie qu'ils n'en dépensent (respectivement +45% et +35%). Une énergie ingérée supérieure de 30% à l'énergie dissipée a déjà été observée (Rothwell et al., 1982). Les auteurs ne discutent pas cet écart, mais il pourrait être imputé en partie aux pertes liées aux aliments non métabolisés. Le bilan énergétique paraît toutefois plus équilibré chez les rats Lou/C avec une moindre quantité d'énergie ingérée disponible pour le stockage.

Ce meilleur équilibre de la balance énergétique est permis par une stimulation de la dépense énergétique journalière des rats Lou/C (+28%) par comparaison aux rats Wistar. Ces résultats confirment donc des études antérieures qui montrent que la dépense énergétique globale du rat Lou/C est supérieure à celle du rat Wistar (Perrin et al., 2003a) ; et que cette différence de dépense énergétique est majorée au cours de la phase diurne (Garait et al., 2005, Soulage C, 2008 #49). Comme la mesure de la dépense énergétique des rats se fait dans une enceinte dont le petit volume ne permet qu'une liberté de mouvements très limitée, la composante activité physique ne peut rendre compte de toute la différence observée entre les souches. La nuit, lors de la phase active des animaux, l'activité des rats Lou/C doit être supérieure à celle des rats Wistar expliquant leur dépense énergétique supérieure. Le jour, lorsque les animaux sont généralement inactifs et dorment, les rats Wistar doivent être très calmes alors que les rats Lou/C, pourraient être plus agités, augmentant leur activité de toilettage par exemple, même lorsqu'ils se trouvent dans la petite enceinte métabolique.

Une autre composante importante de la balance énergétique est la dépense énergétique associée à l'activité physique. Nous mettons en évidence la surprenante activité des rats Lou/C parcourant plus de 12 km par jour, contre quelques centaines de mètres pour les rats Wistar, et ce de façon très régulière, au cours des 3 semaines de mesure. Ces résultats montrent une hyperactivité des rats Lou/C, et sont en accord avec les études précédentes utilisant un dispositif similaire (Servais et al., 2003). L'hyperactivité des rats Lou/C a également été observée avec un autre dispositif mesurant l'activité locomotrice à l'aide d'un système de faisceaux infrarouges relié à un actimètre : + 87% la nuit, et + 102% la journée par comparaison aux rats Wistar (Soulage C, 2008). Ces résultats pourraient en partie expliquer que la dépense énergétique des rats Lou/C soit plus élevée, particulièrement le jour. Une telle activité locomotrice spontanée permettrait par la dépense d'énergie induite de limiter le stockage de graisse (Servais et al., 2003, Garait, 2005 #41, Soulage C, 2008 #49). Plus l'effort physique est prolongé, et plus le coût énergétique associé à cet effort l'est.

Ce comportement hyperactif du rat Lou/C suscite un certain nombre d'interrogations. Pourquoi le rat Lou/C montre-t-il ce besoin d'être toujours en mouvements ? Courir dans une roue d'activité peut avoir plusieurs causes. La génétique, le statut hormonal (oestrogènes, testostérone, corticostérone), la faim ou la soif, la psychologie, la perception sensorielle pourraient influencer l'activité spontanée d'animaux ayant accès à une roue d'activité. Il a été montré que le niveau d'activité volontaire de l'animal serait modulé par les métabolites circulant dans son sang, et notamment par la concentration en acides gras libres (Sherwin, 1998). Le rat Lou/C est maigre et sa couche adipeuse sous-cutanée est très inférieure à celle du rat Wistar. Sa couche isolante est donc fortement réduite, pourtant, D. Perrin a montré que la température corporelle, mesurée à l'aide de thermocouples, n'était pas

significativement différente pour ces deux souches de rats (Perrin D., thèse de sciences 2003). Si la température interne n'est pas différente, la plus faible masse corporelle du rat Lou/C entraîne une plus importante surface corporelle relative à sa masse imposant de plus fortes pertes thermiques vers l'environnement. Le rat Lou/C étant donc soumis à des pertes thermiques plus importantes, il doit fournir plus d'énergie que le rat Wistar pour des besoins de thermorégulation afin de maintenir sa température corporelle à un niveau élevé et constant. Même si la température de stabulation des rats était proche de la neutralité thermique, il est possible que le rat Lou/C se trouve dans une situation thermique plus défavorable et doive stimuler sa thermogenèse de régulation. Cela devrait donc avoir pour conséquence de stimuler son tissu adipeux brun, qui est classiquement responsable de la production de chaleur chez le petit rongeur (Cannon and Nedergaard, 1985; Cannon and Nedergaard, 2004; Foster and Frydman, 1978; Foster and Frydman, 1979; Himms-Hagen, 1990; Jansky, 1973), et son activité implique la production et l'utilisation d'acides gras. L'activation du tissu adipeux brun du rat Lou/C devrait donc être évaluée. Toutefois, nous avons montré que le rat Lou/C était beaucoup plus actif que le rat Wistar et la contraction musculaire peut lui permettre de fournir la chaleur nécessaire au maintien de sa température corporelle, nécessitant également l'oxydation des acides gras. Les modulations de la concentration circulante en acides gras pourraient permettre non seulement de produire de la chaleur, mais également d'agir comme un stimulus au niveau central déclenchant l'envie de courir. Cependant, il a été montré que la concentration d'acides gras circulants n'était pas différente entre les rats Wistar et Lou/C (Couturier et al., 2002).

Le stress pourrait également agir au niveau central et causer une hyperactivité. Lors des expérimentations, nous avons effectivement constaté que les rats Lou/C appréhendaient plus les manipulations, notamment lors des pesées et de l'entretien des cages. Ils semblaient à la fois plus agressifs et plus craintifs que les rats Wistar. Une étude a montré que les rats Lou/C sécrètent moins de corticostérone que les rats Fischer F344, surtout pendant la nuit (Marissal-Arvy et al., 2007). Nous pourrions donc envisager que l'activité, initialement déclenchée par un stress plus important, permet aux rats Lou/C d'enrayer l'excès de stress, notamment grâce aux endorphines sécrétées, au cours de la phase nocturne, expliquant ainsi leur sécrétion plus faible de corticostérone. En période de repos, lorsque nous les manipulons, ils étaient inactifs, et par conséquent plus sujets au stress. Cependant une quantité importante d'études concernant les causes de l'hyperactivité spontanée ont été menées et beaucoup restent contradictoires. Les fonctions inhérentes à l'activité physique spontanée ont été également largement étudiées. Pour certains auteurs, elle permettrait la régulation de la balance énergétique en autorisant l'animal à ajuster finement son ingéré à sa dépense. L'activité physique spontanée serait un moyen de dissiper l'énergie superflue ingérée, et donc permettrait à l'animal de réguler sa masse corporelle. Des résultats récents (Rouanet J-L., communication personnelle) ont montré que

lors de la mesure du métabolisme dans un petit espace ne leur autorisant que très peu de mouvements, le rat Wistar maigrit alors que le rat Lou/C grossit (respectivement  $-4,4 \pm 2,1$  g et  $+1,6 \pm 1,2$  g ;  $p < 0,05$ ). Au cours de cette expérience, la prise alimentaire n'était pas significativement différente entre les souches et par comparaison avec la prise alimentaire mesurée en cage standard. Lorsqu'il ne peut bouger, la dépense énergétique liée à l'activité physique spontanée est réduite, ne permettant pas au rat Lou/C de dissiper l'énergie superflue emmagasinée.

Le rat Lou/C est plus actif que le rat Wistar, ce qui génère un coût énergétique supplémentaire, mais qu'en est-il de l'énergie dépensée pour une même intensité d'exercice ? Il apparaît que pour un exercice physique d'une même intensité (300 puis 600 mètres par heure), la dépense énergétique qui lui est associée est augmentée chez le rat Lou/C (respectivement + 24% puis + 33%). Il est connu que la masse de l'organisme influe sur la dépense énergétique. En effet, un animal de petite masse a une dépense énergétique plus élevée au repos et lors d'un exercice physique (Dejours, 1990). Si l'on suit ce principe, cela signifierait que le rat Lou/C dépense plus d'énergie à l'exercice car il est plus petit que le rat Wistar. Cependant, une étude, réalisée au sein du laboratoire, a montré que la dépense énergétique de rats Wistar de même masse que les rats Lou/C était augmentée par l'exercice imposé dans les mêmes proportions que celle des rats Wistar plus lourds (Duchamp C., communication personnelle). L'effet métabolique accru de l'exercice apparaît donc assez spécifique du rat Lou/C et la seule différence de masse corporelle ne suffit pas à expliquer la différence observée avec les rats Wistar.

La dépense énergétique post exercice est également fortement augmentée chez le rat Lou/C par comparaison au rat Wistar (+ 35%). Cette dépense énergétique représente la consommation élevée d'oxygène observée après un exercice physique et correspond aux besoins métaboliques nécessaires à la reconstitution des stocks musculaires de phosphocréatine. Cette dépense accrue a été nommée « excess post exercise oxygen consumption » (EPOC) (Gaesser and Brooks, 1984). Le système sympathique apparaît impliqué dans l'EPOC car le degré d'activation du système nerveux sympathique dépend de l'intensité et de la durée de l'exercice, tout comme la valeur de l'EPOC. Une réduction de l'EPOC est observée quand des antagonistes des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques sont administrés avant l'exercice (Barnard and Foss, 1969) (Borsheim et al., 1998a). Nos résultats suggèrent que les rats Lou/C pourraient avoir une plus grande activité adrénérique induisant ainsi une consommation d'oxygène accrue après l'effort, par comparaison au rat Wistar. Toutefois, la concentration d'adrénaline circulante est inférieure et celle de noradrénaline identique chez le rat Lou/C par comparaison au rat Wistar (Couturier et al., 2002) mais ces valeurs ont été déterminées au repos. Il a néanmoins été observé que le contenu en noradrénaline du tissu adipeux blanc de rat Lou/C est augmenté par rapport au rat Wistar (Perrin et al., 2003a). Dans ce tissu, l'activation sympathique pourrait être plus



forte, induisant une lipolyse supérieure pouvant alimenter l'EPOC en substrats. Il serait également intéressant de mesurer le contenu noradrénergique musculaire, ainsi que la lipolyse au sein de ce tissu afin de mieux comprendre les causes de la majoration de l'EPOC chez le rat Lou/C.

Nos résultats montrent que la dépense énergétique liée à la prise du repas est également accrue chez les rats Lou/C. Toutefois, nous avons dû utiliser un protocole d'accès limité à l'aliment pour fixer la durée et l'heure du repas ingéré. Le profil de variation de la dépense énergétique des rats soumis à ce protocole est toutefois classique, même s'il induit une légère différence de dépense énergétique journalière par comparaison avec le protocole d'alimentation à volonté (+2% pour les rats Lou/C et +13% pour les rats Wistar). Malgré un accès à l'aliment limité à 4h/jour, nous n'avons pas observé de différence de prise alimentaire des rats indiquant une bonne capacité de régulation de l'ingéré et une anticipation remarquable des rats pour la gestion de leur ingéré quotidien. Le léger écart de dépense énergétique observé pourrait être causé par le stress généré par le fait que les rats n'ont pas un accès permanent à la nourriture et sont contraints de manger vite sur une période restreinte. L'intérêt majeur de ce protocole réside dans le fait que nous pouvons calculer la dépense énergétique liée à la prise du repas des rats. La DIT est significativement augmentée chez le rat Lou/C par comparaison au rat Wistar (+ 12%). En l'absence de mesure de l'activité physique en parallèle, il est difficile d'attribuer la différence de thermogenèse alimentaire à l'activité locomotrice accrue, à une gestion métabolique différente des aliments ingérés ou à la stimulation de mécanismes thermogènes facultatifs. Il est toutefois intéressant d'observer qu'une plus faible thermogenèse alimentaire est observée chez les patients obèses (Kaplan and Leveille, 1976) ou dans de nombreux modèles de rongeurs obèses (Cannon and Nedergaard, 2004; Himms-Hagen, 1983; Rothwell et al., 1981; Rothwell and Stock, 1979; Rothwell and Stock, 1984). La DIT pourrait résulter d'une activation de l'hydrolyse d'ATP via des cycles futiles, ou une augmentation du transport des cations. Des études, utilisant les effets de l'inhibition de la ouabaïne sur la respiration de mitochondries de tissu adipeux brun (BAT) de hamster, suggèrent que le transport sodium / potassium pourrait être une source de thermogenèse (Horwitz, 1973). De façon similaire, chez les rats montrant une forte DIT, de nettes augmentations de l'activité de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase dans le BAT ont été observées, avec une stimulation considérable de cette enzyme par la noradrénaline (Rothwell and Stock, 1981). La DIT, comme la thermogenèse sans frisson, résulte d'une activation sympathique de la thermogenèse du BAT. Si les cycles futiles dans le BAT peuvent être en partie responsable de cette DIT, un autre mécanisme possible serait une diminution de l'efficacité mitochondriale due à des fuites de protons à travers la membrane mitochondriale de BAT (Nicholls, 1979). Un découplage des oxydations et phosphorylations entraînerait des fuites de protons,

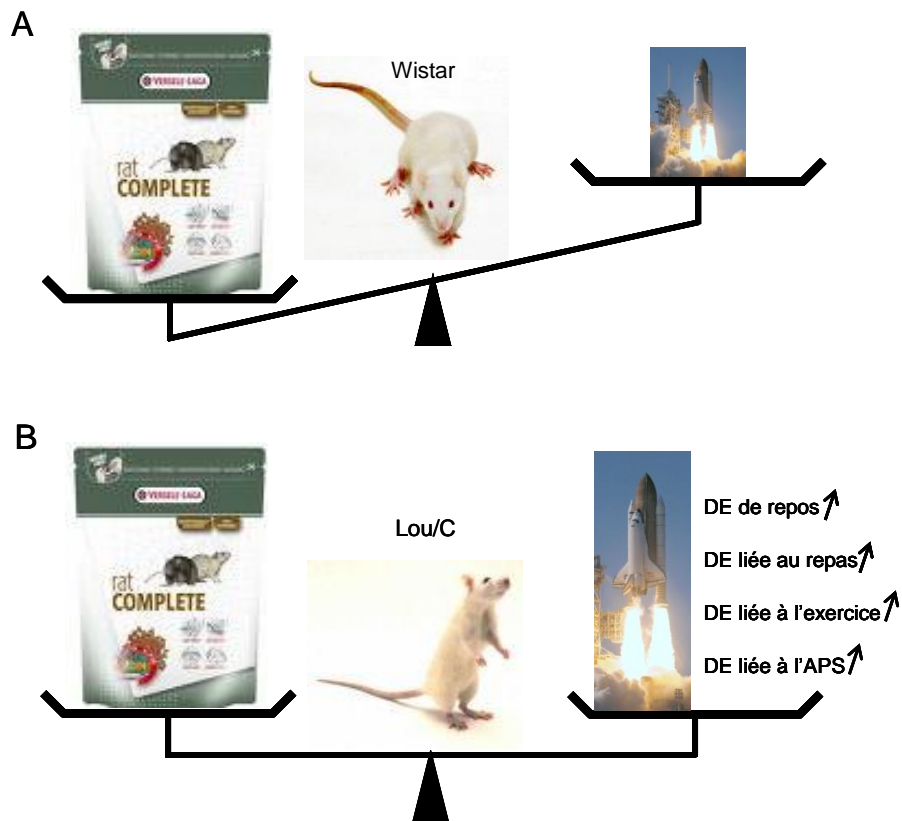
génératrices de chaleur. Le rat Lou/C, présentant une DIT supérieure à celle du rat Wistar, pourrait avoir une hyperactivité de son BAT, expliquant que moins d'énergie ne soit stockée sous forme de graisse.

## CONCLUSION

L'ensemble des données obtenues à l'issue de cette étude permet d'établir une comparaison des entrées et sorties d'énergie chez les rats Wistar et Lou/C. Le premier point pris en compte est la prise calorique : il apparaît que, lorsqu'elle celle-ci est exprimée en fonction de la masse corporelle, le rat Lou/C ingère autant d'énergie que le rat Wistar.

Si la quantité d'énergie ingérée ne diffère pas chez le rat Lou/C par rapport au rat Wistar, ce sont ses dépenses énergétiques augmentées qui seraient à l'origine de sa capacité à dissiper l'énergie superflue, limitant ainsi un stockage excessif sous forme de tissu adipeux blanc (figure I.8). Cette balance énergétique équilibrée pourrait s'expliquer par une forte activité de son tissu adipeux brun, connu chez le rongeur pour permettre la dissipation d'énergie sous forme de chaleur. Une seconde partie nous permettra donc de vérifier si le tissu adipeux brun du rat Lou/C est bien en cause dans l'hypermétabolisme observé dans la souche Lou/C.

Figure I.8 : Représentation schématique des balances énergétiques des rats Wistar et Lou/C.



**A** : Balance énergétique du rat Wistar, composée par ses apports d'énergie (plateau de gauche) et ses dépenses d'énergie (plateau de droite).

**B** : Balance énergétique du rat Lou/C, composée par ses apports d'énergie (plateau de gauche) équivalents à ceux du rat Wistar et ses dépenses d'énergie (plateau de droite) largement supérieures à celles du rat Wistar.

Etude II :  
Le BAT peut-il  
contribuer à la DE  
accrue du Lou/C ?





## Absence de stimulation du tissu adipeux brun chez le rat maigre Lou/C

Maud BELOUZE<sup>1</sup>, Brigitte SIBILLE<sup>2</sup>, Benjamin REY<sup>1</sup>, Jean-Louis ROUANET<sup>1</sup>, Damien ROUSSEL<sup>1</sup>,  
Dominique LETEXIER<sup>1</sup>, Caroline ROMESTAING<sup>1</sup>, Loïc TEULIER<sup>1</sup>, Delphine BAETZ<sup>1</sup>,  
Claude DUCHAMP<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Laboratoire de Physiologie Intégrative, Cellulaire et Moléculaire, Université Lyon 1, Lyon, CNRS, 43 Bvd 11 Novembre 1918, F-69622 Villeurbanne Cedex, France.

<sup>2</sup> INSERM U907, Université de Nice-Sophia Antipolis, Faculté de Médecine, 28 avenue de Valombrose, 06107 Nice, France.

### RESUME

Chez les rongeurs, le tissu principalement impliqué dans la dissipation de l'énergie ingérée en excès est le tissu adipeux brun (BAT). Le but de cette étude était de vérifier l'hyperactivité du BAT dans la souche de rat Lou/C résistante à l'obésité et montrant une dépense énergétique accrue.

Nos résultats montrent, de façon inattendue, que la capacité maximale d'activation du BAT, *in vivo*, déterminée par un test fonctionnel à la noradrénaline (NA), est inférieure chez le rat Lou/C, par comparaison au rat Wistar. *In vitro*, la respiratin des mitochondries isolées de BAT et l'activité de la protéine découplante UCP1 étaient similaires entre les rats Lou/C et Wistar. Dans le BAT de rat Lou/C, l'abondance relative en ARNm d'UCP1 était identique à celle des Wistar et le contenu mitochondrial en protéine UCP1 était significativement diminué. L'expression relative des gènes codant des protéines impliquées dans le captage, le transport et l'oxydation des substrats et dans la régulation du métabolisme énergétique n'était pas non plus très différente dans le BAT des rats Lou/C ou Wistar.

Contrairement à toute attente, cette étude montre que l'hypermétabolisme du rat Lou/C n'est pas lié à une hyperactivité de son BAT, ce qui fait du rat Lou/C un modèle animal original de régulation de la balance énergétique.

## INTRODUCTION

L'obésité est une pathologie dont l'incidence ne cesse de croître dans le monde, et plus particulièrement dans les pays industrialisés. L'obésité est fréquemment associée à de nombreuses pathologies, telles que le diabète non insulino-dépendant, certains cancers ou maladies cardiovasculaires entraînant une diminution de l'espérance de vie chez les sujets obèses (Thompson et al., 1999).

Il existe plusieurs modèles de rongeurs développant spontanément une surcharge adipeuse et une obésité, induite par le régime ou à l'issue de manipulations génétiques. Au contraire, très peu de modèles animaux permettent de comprendre comment certaines personnes ont la faculté de rester mince malgré un environnement « obésogène ». Le rat Lou/C, issu de la souche Wistar, est à la fois un modèle d' « anti obésité » (Couturier et al., 2002) et de longévité (Alliot et al., 2002). Alors que le rat Wistar développe une surcharge adipeuse spontanée avec l'âge (Newby et al., 1990), le rat Lou/C se caractérise par une masse corporelle inférieure, et une limitation des dépôts adipeux en dépit de l'âge (Veyrat-Durebex and Alliot, 1997).

Le rat Lou/C montre une dépense énergétique accrue chez par comparaison au rat Wistar (Belouze et al., étude I) ; (Perrin et al., 2003b). Associée à une prise alimentaire similaire à celle du Wistar, l'hypermétabolisme du rat Lou/C permettrait de dissiper l'énergie alimentaire superflue plutôt que de la mettre en réserve. Les sites tissulaires et les mécanismes de cet hypermétabolisme du rat Lou/C ne sont pas connus.

Il a été montré, chez le rongeur, qu'un des tissus principalement mis en cause dans la régulation de la balance énergétique et dans la dissipation de l'énergie en excès est le tissu adipeux brun (BAT) (Cannon and Nedergaard, 2004; Rothwell and Stock, 1997). En effet, le rat obèse Zucker montre une capacité de DIT réduite ainsi qu'une activité de son BAT largement diminuée (Holt and York, 1982; Rothwell and Stock, 1981). Le modèle classique proposé par Rothwell et Stock suppose une propension au développement de l'obésité par défaut de thermogénèse dans le BAT de rats Zucker génétiquement obèses (Rothwell and Stock, 1981 ; Rothwell and Stock, 1984). La protéine découplante UCP1 confère aux mitochondries de BAT la capacité de dissiper l'énergie superflue sous forme de chaleur (Cannon and Nedergaard, 1985 ; Cannon and Nedergaard, 2004; Nicholls and Locke, 1984). L'activation du BAT des rongeurs permet donc de limiter l'accumulation de réserves. Elle nécessite un apport accru en substrats lipidiques et glucidiques afin de fournir l'énergie nécessaire à l'activité des mitochondries.

Par leur nature hydrophobe, les acides gras à chaîne longue sont très peu solubles dans le plasma ou les liquides physiologiques en général. Leur transport, en vue de leur stockage sous forme de triglycérides dans les gouttelettes lipidiques du tissu adipeux brun, ou de leur oxydation, nécessite donc la présence d'enzymes permettant leur captage à partir

des triglycérides circulant dans le sang par l'activité de la lipoprotéine lipase (LPL) et des systèmes de solubilisation tels que les « fatty acid binding protein » (FABP).

La LPL, massivement localisée dans les tissus extra-hépatiques qui stockent et oxydent les lipides (tissus adipeux blanc et brun, cœur, muscle squelettique) (Radomski and Orme, 1971), joue un rôle fondamental dans le contrôle de la triglycéridémie. Associée aux cellules endothéliales, la LPL permet le captage de ces triglycérides. Son activité de type lipase induit l'hydrolyse des triglycérides et conditionne donc l'entrée des acides gras dans l'adipocyte brun.

En liant les acides gras à longue chaîne provenant de l'hydrolyse des triglycérides par la LPL, la FABP<sub>PM</sub> (plasma membrane) facilite leur passage à travers les membranes cellulaires pour agir comme substrats ou modulateurs de l'activité des cellules. La FABP<sub>PM</sub> facilite également l'entrée des acides gras dans les adipocytes pour ensuite être transportés sur leur lieu de stockage (vésicules de triglycérides) ou d'oxydation (mitochondries et péroxysomes). Pour cela, ils doivent être pris en charge sur la membrane externe de la mitochondrie par l'acyl-CoA synthase. Cette enzyme convertit les acides gras en acyl-CoA destinés soit à la synthèse de triglycérides, soit à la  $\beta$ -oxydation mitochondriale. Lorsqu'ils sont dirigés vers la  $\beta$ -oxydation, les acyl-CoA doivent traverser les membranes mitochondriales internes et externes à l'aide de la navette carnitine, pour laquelle la première étape, c'est-à-dire la conversion de l'acyl-CoA en acyl-carnitine, médiée par la carnitine palmitoyl-transférase I (CPT1), constitue une étape limitante de la  $\beta$ -oxydation, et par conséquent du métabolisme cellulaire (McGarry et al., 1989). Cependant, de récentes études ont montré que la régulation de la CPT1 ne peut complètement expliquer les variations

**Allard, M. and Leblanc, J. (1988). Effects of cold acclimation, cold exposure, and palatability on postprandial thermogenesis in rats. *Int J Obes* 12, 169-78.**

AI(Dean et al., 2000; Odland et al., 1996). Une étude a montré que la protéine FAT/CD36 serait présente au niveau de la membrane mitochondriale externe de muscle squelettique, et pourrait jouer un rôle dans le transfert des acides gras à travers la membrane mitochondriale, par action conjointe avec CPT1 (Campbell et al., 2004).

(Dean et al., 2000; Odland et al., 1996). Une étude a montré que la protéine FAT/CD36 serait présente au niveau de la membrane mitochondriale externe de muscle squelettique, et pourrait jouer un rôle dans le transfert des acides gras à travers la membrane mitochondriale, par action conjointe avec CPT1 (Campbell et al., 2004).

Dans le tissu adipeux brun, l'énergie provient principalement de l'oxydation des acides gras non estérifiés (Nicholls and Locke, 1984), mais également de l'oxydation du glucose (Ferre et al., 1985 ; Young et al., 1985). Le captage du glucose sanguin est permis par des transporteurs de type GLUT4 dans les tissus sensibles à l'insuline et notamment le BAT (Assimacopoulos-Jeannet et al., 1991). Dans le BAT, comme dans le tissu adipeux blanc, le transport du glucose est apparu comme étant l'étape limitante de l'utilisation du glucose (Fain et al., 1967). L'exposition au froid est une condition connue pour induire une hyperactivité du tissu adipeux brun et s'accompagne d'un captage et d'une utilisation accrue de glucose à la fois *in vitro* (Steiner et al., 1970), et *in vivo* (Greco-Perotto et al., 1987). La régulation de l'expression de ces différents transporteurs est liée à l'activité de certains gènes du métabolisme énergétique.



Les « peroxisome proliferator-activated receptors » ou PPARs sont des ligands activant des facteurs de transcription qui contrôlent l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides en particulier, et dont font partie les transporteurs d'acides gras et les enzymes de la  $\beta$ -oxydation. Trois sous-types de PPAR sont à ce jour identifiés : alpha, gamma et bêta/delta. PPAR $\alpha$  est retrouvé majoritairement dans le foie des rongeurs et est impliqué dans l'oxydation des acides gras, le métabolisme des lipides, notamment par son rôle sur le métabolisme de la LPL, et les processus d'inflammation. PPAR $\gamma$  est le sous-type prédominant dans le tissu adipeux (Ahmed et al., 2007). L'expression du gène de la protéine UCP1 est étroitement liée à l'expression des PPARs, dont PPAR $\gamma$ , connu pour son implication dans la différenciation des précurseurs des adipocytes bruns, le stockage des lipides, et l'homéostasie glucidique, en stimulant l'expression notamment de la LPL, de FABP ou GLUT4.

Les coactivateurs tels que le « peroxisome proliferator-activated receptors- $\gamma$  coactivator 1alpha » ou PGC-1 $\alpha$  appartiennent à la classe des régulateurs transcriptionnels qui ne lient pas directement l'ADN, mais stimulent l'expression de nombreux gènes. L'activité du tissu adipeux brun de rat Lou/C, que nous souhaitons comparer à celle du rat Wistar dans cette étude, est dépendante de la protéine UCP1, exprimée uniquement dans les adipocytes bruns. PGC-1 $\alpha$ , exprimée préférentiellement dans les adipocytes bruns, interagit avec PPAR $\gamma$ , et est nécessaire pour induire la différenciation des adipocytes bruns, la biogénèse mitochondriale et l'expression d'UCP1 (Puigserver et al., 1998). Ces différents activateurs ou protéines sont essentiels à l'activation du BAT, et sont donc des paramètres à prendre en compte dans l'estimation de l'activité du BAT d'un organisme.

A l'inverse du modèle Zucker, nous avons supposé que le BAT des rats Lou/C pourrait être hyperstimulé, expliquant leur maigreur. Le but de cette étude était donc d'infirmer ou confirmer cette hypothèse, tout d'abord par l'utilisation d'un test fonctionnel à la noradrénaline, *in vivo*, utilisé classiquement (Mejsnar and Jansky, 1971) pour extrapoler les capacités thermogènes du BAT du Lou/C. Puis, par l'exploration fonctionnelle, *in vitro*, des mitochondries de BAT de Lou/C par comparaison au rat Wistar, nous permettant de statuer sur le degré d'activation du BAT de rat Lou/C en conditions basales, en terme de capacités oxydatives et de découplage.

## MATERIEL ET METHODES

## 1. Les animaux

Deux lots de rats ont été utilisés.

Dans une première étude, 5 rats Wistar et 5 rats Lou/C (Harlan, France) ont été hébergés dans notre animalerie, au nombre de 5 animaux de même souche par cage. La photopériode était de 12 de jour et 12 heures de nuit. L'eau et la nourriture standard (A04 UAR, France) étaient fournies *ad libitum*. Ces animaux ont été utilisés à l'âge de 22 semaines pour un test fonctionnel à la noradrénaline (NA).

Dans une seconde étude, 6 rats Wistar et 6 rats Lou/C (Harlan, France) ont été reçus à l'âge de 12 semaines dans notre animalerie. Après 1 semaine d'habituation à leur environnement, les animaux ont été hébergés en cage individuelle. 9 semaines se sont alors écoulées ainsi, afin de se placer dans les mêmes conditions expérimentales que précédemment (Belouze et al., étude I). Les animaux âgés de 22 semaines ont été assommés puis décapités, afin de prélever rapidement le tissu adipeux brun interscapulaire, pour les études biochimiques et biomoléculaires. Les prélèvements étaient effectués à heure fixe (7h30 ± 30 min), à raison d'un rat de chaque groupe par jour afin de limiter les effets de l'âge.

## 2. Test fonctionnel à la NA

Ce test consiste à mesurer la dépense énergétique à 25°C suite à une injection aiguë de NA chez des rats Wistar et Lou/C âgés de 22 semaines. L'effet thermogène était mesuré par calorimétrie indirecte (Belouze et al., étude I). Le rat était pesé à 8 heures juste avant d'être introduit dans l'enceinte métabolique. La consommation d'O<sub>2</sub> de l'animal était enregistrée pendant au moins 90 min avant l'injection intrapéritonéale unique de NA, à raison de 0,3 mg/kg en solution physiologique (NaCl 0,9 %). La dépense énergétique a été moyennée sur des intervalles de 10 min après injection et exprimée en watt par kg de masse corporelle (W/kg). La capacité thermogène maximale a été calculée comme l'augmentation nette du métabolisme causée par l'injection de NA : VO<sub>2</sub> max après injection – métabolisme basal de l'animal.

## 3. Isolement et respiration de mitochondries de BAT et activité d'UCP1

Le tissu adipeux brun interscapulaire (BAT) a été rapidement extrait, nettoyé de sa graisse et tissu conjonctif, puis pesé soigneusement. Des aliquots de BAT ont ensuite été : i) soit congelés immédiatement dans l'azote liquide, puis conservés à -80 °C pour la détection d'éventuelles modifications d'expression de gènes ou de protéines par des techniques de biologie moléculaire, ou d'activité enzymatique par des techniques biochimiques ; ii) soit utilisés pour l'isolement des mitochondries.

L'extraction des mitochondries de BAT inter scapulaire repose sur une technique de fractionnement des composés cellulaires par centrifugation différentielle (Hogeboom and Kupp, 1955). Elle a été réalisée à l'aide d'une ultracentrifugeuse (Beckman modèle L3 70) thermostatée à 4°C. Une fois prélevés, le BAT a été immédiatement placé à 4°C dans un milieu d'isolement approprié : KCl 100mM, TES 20 mM, EGTA 0.1 mM, pH 7,0 à raison de 10 mL/g. Le BAT a ensuite été émincé aux

ciseaux en petits morceaux, qui sont rincés abondamment avec le même tampon froid pour éliminer le maximum d'hématies et des dépôts lipidiques. Ces morceaux sont ensuite homogénéisés par 5 passages successifs de piston en téflon, dans un potter en verre, type Elvehjem (200 tr/min). Un aliquot de 100 µL d'homogénat a été prélevé et congelé dans l'azote liquide, afin de réaliser des dosages de rendement d'extraction ultérieurs.

Après une première centrifugation à 800g, le surnageant a été filtré sur gaze et le culot repris dans du tampon d'isolement puis centrifugé à 800g. Cette étape a alors été répétée. Les 2 pools de surnageant ont ensuite été centrifugés à 8700g. Le culot obtenu a été remis en suspension dans le même tampon, auquel est additionné 0,3% de d'albumine bovine sérique (BSA) délipidée, afin de complexer les acides gras libres. La BSA a ensuite été enlevée par 3 lavages et centrifugations à 8700g avec du tampon d'isolement sans BSA. Le culot ainsi obtenu est remis en suspension dans un volume minimum de tampon d'homogénéisation ( $\approx 100 \mu\text{L}$ ) (Oufara et al., 1988).

La concentration de la suspension mitochondriale était estimée par dosage des protéines selon la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA), se fondant sur la réduction du  $\text{Cu}^{2+}$  en  $\text{Cu}^+$  des protéines lorsqu'elles se trouvent en milieu alcalin. 2 µL de suspension diluée ont été mis en présence de 1 mL de réactif du kit de dosage « BCA Protein Assay » de Pierce. Après avoir été vortexés, les échantillons ont été incubés 30 minutes à 37°C, puis ont été refroidis à température ambiante. La détection se fait par colorimétrie grâce à l'interaction de l'acide bicinchoninique avec le  $\text{Cu}^{2+}$ . Les densités optiques des échantillons étaient lues au spectrophotomètre à 562 nm. La quantité de protéines contenues dans l'échantillon a été déterminée et exprimée en mg / mL à l'aide d'une gamme étalon réalisée avec une solution d'albumine bovine sérique (BSA) à 2 mg/mL. La concentration protéique de la suspension mitochondriale était déterminée avant chaque manipulation afin de travailler avec des quantités connues de protéines mitochondriales.

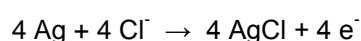
Après détermination de la quantité de protéines contenues dans le culot mitochondrial, la consommation d'oxygène des mitochondries de BAT a été mesurée à l'aide d'une électrode de Clark, en présence de BSA qui piège les acides gras contenus dans le milieu.

### **3.1 Principe de la mesure de la consommation d'oxygène**

La consommation d'oxygène ( $\text{O}_2$ ) par les mitochondries isolées était mesurée dans une chambre d'oxygraphie thermostatée (37°C), fermée et agitée à l'aide d'un barreau aimanté, munie d'une électrode de Clark mesurant en continu la concentration d'oxygène du milieu. L'électrode de Clark est composée d'une cathode en platine polarisée à -0,6 Volts et d'une anode en argent, immergées dans une solution à demi saturée de KCl, et isolées de la cuve de mesure par une membrane de téflon, laissant diffuser l'oxygène. Dans ces conditions, les variations de courant induites par la réduction de l'oxygène au niveau de la cathode sont directement proportionnelles aux variations de la pression partielle en oxygène dans le milieu d'incubation.

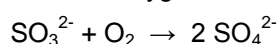
Au contact de la cathode (platine), l'oxygène provenant du milieu à tester est réduit selon la réaction :  $\text{O}_2 + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 4 \text{OH}^-$

Au niveau de l'anode (argent), la réaction d'oxydation se produisant est de la forme :



Il existe donc un faible courant électrique entre les 2 électrodes ( $4 e^-$  transférés par l' $O_2$  réduit) proportionnel à la pression partielle d' $O_2$  dans le milieu électrolytique. La cinétique de variation de ce courant dépend *in fine* de la vitesse de respiration des mitochondries que l'on peut enregistrer en fonction de différents produits ajoutés séquentiellement.

La consommation d'oxygène était mesurée en continu à l'aide d'un oxygraphe préalablement calibré en effectuant un « zéro » et un « 100% ». Le zéro est le point correspondant à une pression partielle en oxygène nulle. Cette condition était obtenue en ajoutant, en excès, du bisulfite de sodium ( $Na_2SO_3$ ) à de l'eau distillée, lequel transforme l'oxygène du milieu selon la réaction :



Ce point zéro était vérifié lors de la première mesure de respiration mitochondriale en laissant l'enregistrement défilier jusqu'à utilisation de tout l'oxygène présent.

Le 100% était obtenu après équilibration du milieu de respiration avec l'air atmosphérique par bullage, et correspond à la saturation du milieu en oxygène dissout à la pression atmosphérique (440 nanoatomes d' $O_2$  / mL, à 37°C dans un milieu KCl).

### 3.2 Procédure

La consommation d'oxygène par les mitochondries isolées était mesurée à 37°C dans un milieu de respiration tamponné à pH 7,25 contenant 125 mM de KCl, 1mM d'EGTA, 20 mM de Tris-HCl et 2 mM de  $KH_2PO_4$  additionné ou non de BSA délipidée à la concentration finale de 0,3%.

A ce tampon étaient ajoutées les mitochondries : 0,1 à 1,5 mg/mL de suspension mitochondriale selon le tissu étudié. Les mitochondries étaient activées par différents substrats : 5 mM de succinate permettaient de fournir son substrat à la succinate déshydrogénase liée au complexe II. En effet, le succinate est réduit en fumarate par la succinate déshydrogénase, formant par cette réaction du  $FADH_2$ . 1,25  $\mu$ M de roténone étaient administrés parallèlement au succinate, évitant ainsi le flux inverse des électrons vers le complexe I. Après addition du substrat, les mitochondries respirent de façon non phosphorylante, c'est-à-dire non couplée à la synthèse d'ATP. Cela correspond à la respiration basale en présence de substrat, appelée « état 2 ». L'addition de 1 mM d'ADP permettait d'alimenter l'ATP-synthase ce qui lui autorisait l'utilisation du gradient électrochimique de protons pour catalyser la réaction  $ADP + Pi \rightarrow ATP$ . Nous avons mesuré cette fois-ci la respiration en condition phosphorylante, nommée « état 3 ». L'ajout de 1,25  $\mu$ g/ $\mu$ L d'oligomycine, un inhibiteur de l'ATP-synthase, permettait d'apprécier la respiration résiduelle, due aux pertes énergétiques, c'est-à-dire au retour passif des protons au travers de la membrane mitochondriale interne. Cette respiration insensible à l'oligomycine est appelée « état 4 ».

La consommation d'oxygène a été obtenue en rapportant la diminution de la concentration d'oxygène dans le milieu respiratoire par unité de temps et par mg de protéines mitochondriales.

Afin de connaître quelle est la part de la respiration liée aux fuites de protons à travers la membrane mitochondriale interne, via UCP1, protéine responsable de l'activité du BAT, nous avons inhibé l'ATP synthase par ajout d'oligomycine dans la cuve de l'oxygraphe, puis inhibé l'UCP1 en utilisant du GDP. Nous avons alors calculé la respiration GDP-sensible, représentant les fuites de protons via UCP1.

#### 4. Quantification mitochondriale des protéines UCP1 et FAT/CD36

L'expression des protéines UCP1 et FAT/CD36 était réalisée par Western Blot, à partir des extraits mitochondriaux congelés du BAT. Les protéines mitochondriales de BAT ont été séparées par électrophorèse sur gel SDS-PAGE en fonction de leur poids moléculaire, puis elles ont été transférées sur membrane de PVDF. La membrane a été bloquée avec : soit du lait pour la quantification d'UCP1, soit de la BSA pour FAT/CD36. La protéine d'intérêt est détectée par immuno-marquage après hybridation avec un anticorps primaire: soit anti-UCP1 (alpha-diagnostic, 1 :15000) ou anti-FAT/CD36 ((Matsuno et al., 1996), utilisé dans le laboratoire du Pr. Glatz à Maastricht). L'anticorps secondaire était lié de manière covalente à l'enzyme HRP. Après réaction de chemiluminescence, une autoradiographie était réalisée puis analysée à l'aide d'un logiciel d'images (Kodak Digital Science TM) (cf. annexe méthodologique).

#### 5. Expression de gènes du métabolisme énergétique par RT-PCR

L'abondance relative de différentes cibles du métabolisme énergétique était permise par la technique de RT-PCR. L'extraction des ARN, à partir du BAT congelé des rats du protocole B, était réalisée à l'aide d'un ultraturax dans une solution Trizol (Invitrogen, France). La RT, puis les PCR et l'analyse des transcrits était obtenue selon le protocole décrit en annexe méthodologique. Les différents jeux d'amorces sont répertoriés dans le tableau II.1.

**Tableau II.1 : Séquences des amorces utilisées pour la RT-PCR**

	sens (5' → 3')	antisens (5' → 3')	taille (pb)	n cycles
<b>β-actine courte</b> (gi11420247)	GAC GAG GCC CAG AGC AAG AGA	GGG TGT TGA AGG TCT CAA ACA	225	23
<b>β-actine longue</b> (gi11420247)	TTG TAA CCA ACT GGG ACG ATA TGG	GAT CTT GAT CTT CAT GCT GCT AGG	764	23
<b>CPT1</b> (NM_031559)	TAT GTG AGG ATG CTG CTT CC	CTC GGA GAG CTA AGC TTG TC	629	32
<b>FABP</b> (gi204079)	CTG GAA GCT AGT GGA CAG CA	GAC TTG ACC TTC CTG TCA TC	225	26
<b>GLUT4</b> (gi464195)	CAG ATC GGC TCT GAA GGT GC	CTG AGT AGG CGC CAA TGA G	430	26
<b>LPL</b> (gi205214)	GAC GGT GAC AGG AAT GTA TG	GAG TCA ATG AAG AGA TGG ATG G	588	24
<b>PGC1α</b>	AAA CTT GCT AGG GGT CCT CA	GTG TGA GGA GGG TCA TCG TT	375	37
<b>PPARα</b> (NM_013196)	TCC ACG AAG CCT ACC TGA AG	GAA CTC TCG GGT GAT GAA GC	401	
<b>PPARγ</b> (NM_013124)	GCG ATC TTG ACA GGA AAG AC	GCG ATC TTG ACA GGA AAG AC	331	24
<b>UCP1</b> (gi6981691)	GTG AAG GTC AGA ATG CAA GC	AGG GCC CCC TTC ATG AGG TC	191	19

#### 6. Statistiques

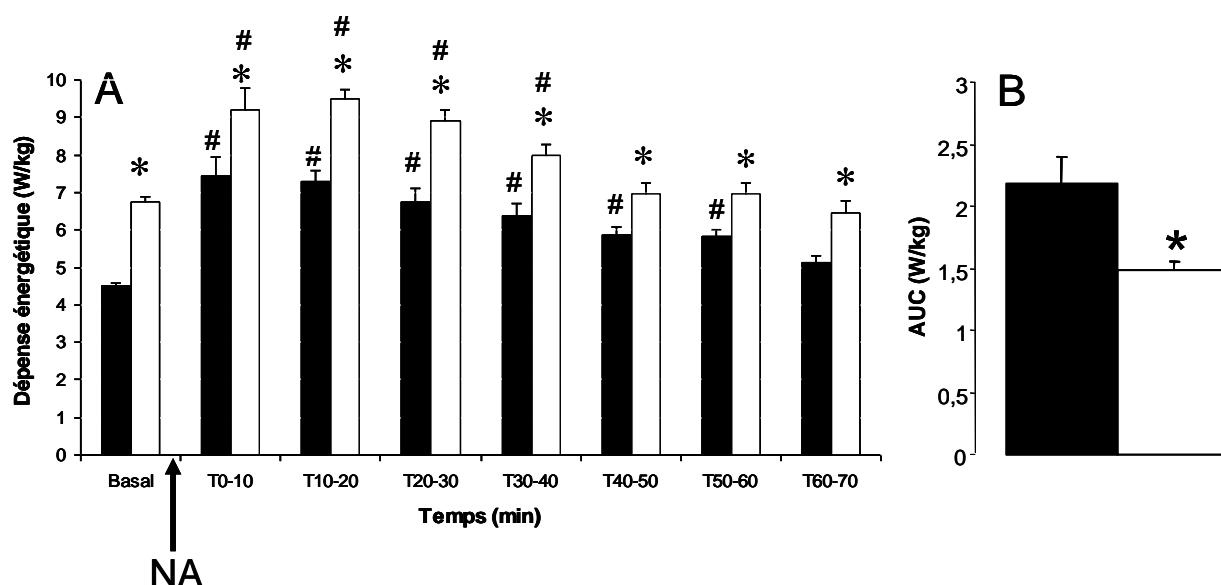
Tous les résultats sont exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  l'erreur standard à la moyenne (sem). Les comparaisons statistiques ont été effectuées par un test d'analyse des variances (ANOVA) pour comparer les groupes entre eux lorsque leur nombre était supérieur à 2, suivi d'un test post hoc de PLSD Fisher. Les variations au sein d'un même groupe ont été comparées par un test t de Student. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel Statview.

## RESULTATS

### 1. Réponse *in vivo* à la noradrénaline

Un test fonctionnel à la noradrénaline (NA) est classiquement utilisé pour apprécier *in vivo* les capacités fonctionnelles du BAT qui contribue majoritairement à l'effet thermogène observé chez les rongeurs (Foster and Frydman, 1978; Foster and Frydman, 1979; Jansky, 1973 ). Cet effet a été recherché chez des rats Wistar et Lou/C maintenus à 25°C.

Figure II.1 : Effet thermogène de la NA sur des rats Wistar et Lou/C.



La dépense énergétique a été mesurée par calorimétrie indirecte en circuit ouvert à thermoneutralité, pendant au moins 1 heure avant injection IP de NA (0,3 mg/kg) en solution physiologique (NaCl 0,9%), puis était enregistrée en continu jusqu'au retour au niveau basal avant injection correspondant à la dépense énergétique de repos.

**A** : La dépense énergétique (DE en W/kg) est représentée sur des intervalles de 10 min.

**B** : L'effet total de l'injection de NA (DE/NA – DE/basale) a été calculé par l'aire sous la courbe (AUC).

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  sem pour les rats Wistar (■) et Lou/C (□).

Les comparaisons ( $p < 0,05$ ) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher.

\* : Wistar vs Lou/C ; # : effet NA.

Les résultats obtenus montrent que la dépense énergétique de repos des rats Lou/C est supérieure à celle des rats Wistar (figure II.1A). Dans tous les groupes, l'injection de NA induit une augmentation rapide de la dépense énergétique, manifeste dès les 10 premières

minutes. Cette stimulation plafonne 10 à 20 minutes après l'injection, avant de s'atténuer progressivement. Si l'on considère que le BAT est un composant majeur de la réponse à la NA de l'animal entier, nous pouvons déduire de ces premiers résultats que le BAT du rat Lou/C semble capable de répondre à la NA. Il est possible de calculer l'augmentation nette du métabolisme après injection de la NA (figure II.1B). La stimulation maximale par la NA apparaît moins importante chez les rats Lou/C par comparaison aux rats Wistar (- 32%,  $P < 0,05$ ).

*Le BAT du Lou/C serait donc activable par une injection de NA mais montre une capacité maximale de stimulation par la NA moindre que le rat Wistar.*

## **2. Etude fonctionnelle de mitochondries isolées de tissu adipeux brun**

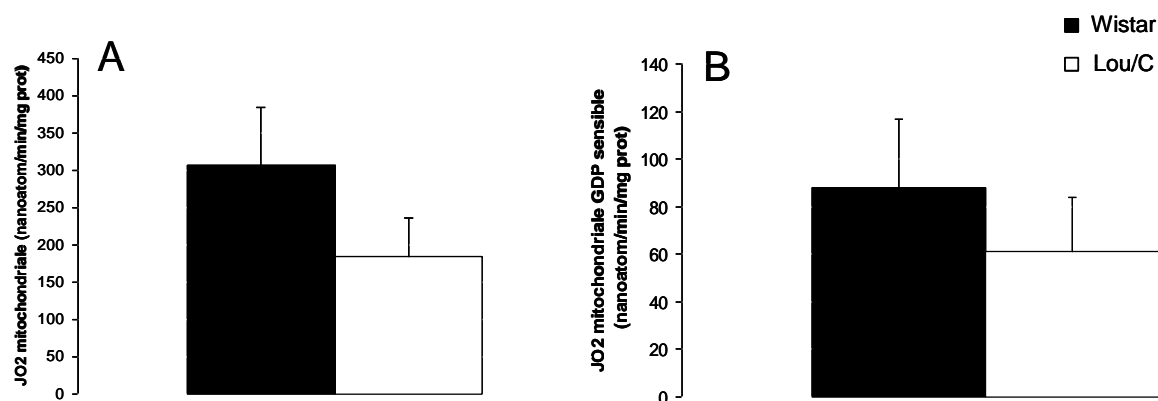
### ***2.1 Protéine découplante UCP1***

#### *2.1.1 Activité de la protéine UCP1*

Afin de vérifier cette diminution inattendue de l'activité du BAT de rat Lou/C, nous avons étudié l'activité de la protéine UCP1 (« uncoupling protein 1 »), connue pour induire le découplage des mitochondries de BAT, et responsable de l'activité thermogène de ce tissu. Après isolement de mitochondries de BAT de rats Wistar et Lou/C élevés à thermoneutralité, la consommation d'oxygène de ces mitochondries a été mesurée en présence d'un substrat, le succinate. Les valeurs obtenues sont présentées dans la figure III.9.

Nous notons que la respiration mitochondriale de BAT de rats Lou/C n'est pas différente de celle de rats Wistar (figure II.2A). Sachant que l'activité thermogène du BAT dépend de l'activité de la protéine UCP1, nous avons cherché quelle était la part de la respiration mitochondriale liée à cette UCP1. Dans un premier temps, nous avons bloqué l'ATP-synthase par ajout d'oligomycine. La respiration subsistant correspond à une consommation d'oxygène sans synthèse concomitante d'ATP. Celle-ci peut être liée à des fuites à travers la membrane mitochondriale interne, notamment via la protéine UCP1. Afin de voir si la protéine UCP1 est impliquée, nous avons utilisé un inhibiteur spécifique des UCPs, le GDP. Plus la consommation d'oxygène résiduelle est faible, plus l'inhibition par le GDP est importante, et plus l'activité d'UCP1 est grande. La figure II.2B nous montre la respiration mitochondriale GDP-sensible, c'est-à-dire la part de la consommation d'oxygène qui disparaît après inhibition de l'ATP-synthase et d'UCP1, et témoigne de l'activité de cette protéine découplante. Les acides gras sont impliqués dans la stimulation physiologique d'UCP1, mais la stimulation de la respiration mitochondriale par l'ajout de concentrations croissantes d'acides gras n'a pas été testée dans nos conditions de mesure en présence d'une forte concentration d'albumine.

Figure II.2 : Respiration des mitochondries isolées de BAT de rats Wistar et Lou/C.



Les mitochondries isolées de BAT (0,1 mg/mL) de rats Wistar et Lou/C ont été incubées dans un milieu KCl. La consommation d'oxygène est mesurée à l'aide d'une électrode de Clark.

**A** : La respiration mitochondriale nommée « état 2 » est obtenue avec 5 mM de succinate plus 2  $\mu$ M de roténone + BSA (0,3%).

**B** : La respiration mitochondriale GDP-sensible (nanoatom/mn/mg prot) est obtenue par différence entre état 2 et état 2 + oligo + GDP.

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  sem, n=6 pour les rats Wistar (■) et Lou/C (□). Les comparaisons ( $p < 0,05$ ) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher.

\* : Wistar vs Lou/C.

Aucune différence significative n'est mise en évidence entre la respiration mitochondriale GDP-sensible de tissu adipeux brun de rats Wistar ou de rats Lou/C (respectivement  $88 \pm 29$  et  $61 \pm 23$  nanoatomes O<sub>2</sub> / min / mg protéines).

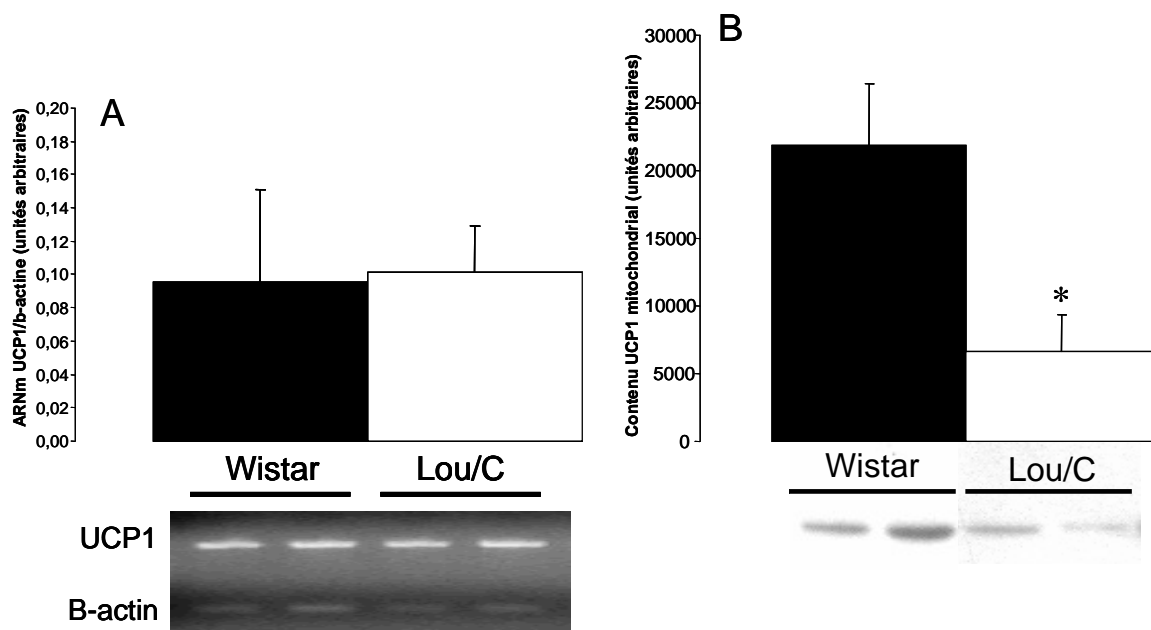
Ce résultat signifie que les fuites de protons à travers la membrane mitochondriale interne de BAT de rats Wistar et Lou/C sont équivalentes en présence de l'inhibiteur spécifique de la protéine UCP1. *En d'autres termes, il n'y aurait pas de différence significative de l'activité d'UCP1 au sein des mitochondries de BAT des rats des 2 souches.* Il y aurait même une tendance à ce que l'activité UCP-dépendante des mitochondries soit plus faible dans le BAT des rats Lou/C que chez les rats Wistar. Afin de confirmer ces résultats, à savoir que l'activité de la protéine UCP1, et par conséquent du tissu adipeux brun, des rats Lou/C n'était pas augmentée, une étude moléculaire a été mise en oeuvre.

### 2.1.2 Abondance relative de la protéine UCP1

L'expression relative de la protéine UCP1, responsable du découplage mitochondrial, dans le BAT a été déterminée au niveau ARNm et protéine dans le BAT des rats de chacune des 2 souches (figure II.3).

Figure II.3 : Effet de la souche sur l'abondance relative en protéine découplante dans le BAT de rats Wistar et Lou/C.





L'abondance relative en (A) ARNm de UCP1 et (B) protéine UCP1 dans le BAT de rats Wistar et Lou/C a été quantifiée à partir d'amorces et d'anticorps primaire anti-UCP1 spécifiques. La  $\beta$ -actine est utilisée ici comme gène de référence.

L'analyse a été réalisée avec 6 rats Wistar (■) et 6 rats Lou/C (□). Les comparaisons ( $p < 0,05$ ) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher. \* : Wistar vs Lou/C.

Dans un premier temps, nous avons déterminé l'abondance relative des ARNm d'UCP1 par RT-PCR semi-quantitative à partir de BAT des rats Wistar et Lou/C (figure II.3A). Il apparaît que l'abondance relative de l'ARNm d'UCP1, rapportée à la quantité d'ARNm de  $\beta$ -actine, utilisée ici comme gène de référence, n'est pas modifiée en fonction de la souche étudiée. Sachant que la corrélation entre la quantité d'ARNm d'UCP1 et la quantité de protéine exprimée dans le tissu n'est pas parfaite et systématique (Cannon and Nedergaard, 2004), nous avons réalisé une étude de l'abondance de la protéine UCP1, par western blot, à l'aide d'un anticorps primaire spécifique dirigé contre la protéine UCP1 de rat. Étonnamment, la quantité de protéine UCP1 est largement diminuée dans les mitochondries de BAT de rat Lou/C par comparaison au rat Wistar (figure II.3B). Le contrôle du niveau de charge en protéines de la membrane ne permet pas d'incriminer ce facteur comme cause de la diminution apparente de l'UCP1 dans cette souche.

L'ensemble de ces résultats, portant sur l'activité des mitochondries de BAT, supporte l'hypothèse que le tissu adipeux brun de rat Lou/C ne serait pas plus actif que celui du rat Wistar. En effet, l'activité de la protéine mitochondriale UCP1, induisant une dissipation de l'énergie sous forme de chaleur dans le BAT, ne semble pas augmentée chez le rat Lou/C. De même, l'abondance relative de la protéine UCP1 est identique, voire diminuée dans cette souche de rat. L'activité mitochondriale du BAT des rats Lou/C n'est pas hyperstimulée et serait même diminuée, confirmant ainsi nos premiers résultats obtenus *in vivo*, montrant une moindre capacité d'activation du BAT par la noradrénaline.

## **2.2 Apports en substrats au tissu adipeux brun**

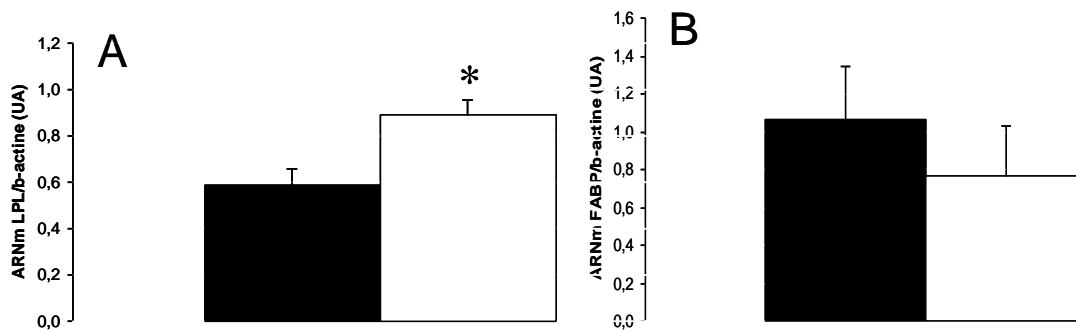
Afin de comparer l'activité du tissu adipeux brun de rats Wistar et Lou/C, il est important d'étudier l'apport en substrats de ce tissu. En effet, même s'il n'existe pas d'augmentation intrinsèque de l'activité mitochondriale de ce tissu, il est possible qu'une augmentation de l'apport en substrats induise une modification des flux métaboliques. Une augmentation des flux métaboliques causerait alors une majoration du potentiel redox (NADH/NAD) qui se traduirait par une stimulation importante de la chaîne mitochondriale. Une activité accrue du tissu adipeux brun pourrait donc se manifester par une activité mitochondriale augmentée. Pour fonctionner, les mitochondries doivent oxyder des équivalents réduits qui lui seront fournis par la glycolyse, le cycle de Krebs et la  $\beta$ -oxydation, à partir de substrats glucidiques et lipidiques. Ces différents substrats devront tout d'abord être captés du sang vers la cellule, entrer puis être transportés à l'intérieur de la cellule adipeuse ; certains substrats lipidiques devront également entrer dans la mitochondrie afin d'y subir la  $\beta$ -oxydation. Toutes ces étapes peuvent s'avérer primordiales pour le bon fonctionnement mitochondrial, et une augmentation de l'activité du tissu adipeux brun passe par une augmentation de la disponibilité en substrats, et donc une activation des systèmes enzymatiques de transport et de métabolisme des substrats.

### *2.2.1 Apports en substrats lipidiques*

#### 2.2.1.1 Captage et transport des acides gras à chaîne longue

Nous avons recherché l'expression relative de la LPL et de la FABP<sub>PM</sub>, deux protéines impliquées dans l'entrée des acides gras dans l'adipocyte brun, par RT-PCR semi-quantitative (figure II.4).

**Figure II.4 : Effet de la souche sur l'expression de gènes impliqués dans l'utilisation de substrats lipidiques par le BAT.**



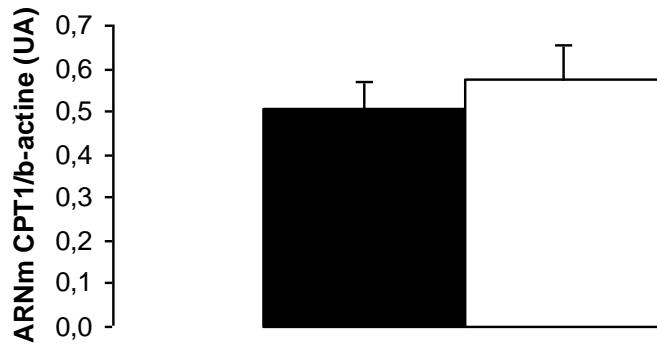
L'abondance relative en ARNm de (A) LPL et (B) FABP<sub>PM</sub> dans le BAT de rats Wistar et Lou/C a été quantifiée à partir d'amorces spécifiques. La β-actine est utilisée ici comme gène de référence. L'analyse a été réalisée avec 6 rats Wistar (■) et 6 rats Lou/C (□). Les comparaisons ( $p < 0,05$ ) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher. \* : Wistar vs Lou/C.

D'après la figure II.4A, il apparaît que l'abondance relative d'ARNm codant la protéine LPL est significativement augmentée chez le rat Lou/C, impliquant une entrée potentiellement accrue des acides gras dans l'adipocyte brun. Cependant, l'expression de la FABP<sub>PM</sub>, n'est pas significativement différente dans le BAT de rats Wistar ou Lou/C (figure II.4B). *L'analyse des résultats obtenus par RT-PCR nous montre que l'abondance relative des ARNm de FABP<sub>PM</sub> ne varie pas, quelle que soit la souche étudiée. Ce résultat va à l'encontre de l'observation précédente montrant une augmentation des transcrits LPL dans le BAT de rat Lou/C, mais serait cohérent avec l'absence d'hyperactivation des mitochondries de BAT de rat Lou/C ne nécessitant pas un surcroît d'apports de substrats lipidiques.*

#### 2.2.1.2 Entrée des acides gras à longue chaîne dans la mitochondrie

La protéine CPT1 catalysant l'étape limitante de l'entrée des acides gras dans la mitochondrie, nous nous sommes intéressés à l'expression de cette protéine en analysant la quantité relative de transcrits de CPT1 dans le BAT de rats Wistar et Lou/C. Les résultats, présentés dans la figure II.5, montrent une même abondance de l'ARNm codant la protéine CPT1 dans le BAT des rats Lou/C et Wistar. Si l'on suppose que cela se répercute sur la protéine et son activité fonctionnelle, ces résultats suggèrent que l'entrée des acides gras dans la mitochondrie de BAT et leur oxydation seraient similaires chez le rat Lou/C et le rat Wistar.

**Figure II.5 : Effet de la souche sur l'expression du gène CPT I au niveau du BAT.**

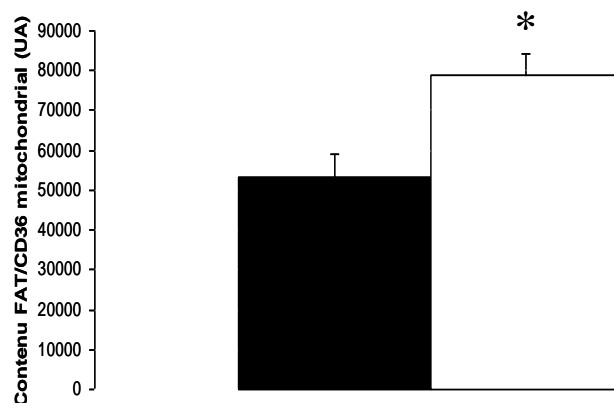


La quantité d'ARNm CPT1 dans le BAT de rats Wistar et Lou/C a été quantifiée par RT-PCR semi-quantitative, à partir d'amorces spécifiques.

L'analyse a été réalisée avec 6 rats Wistar (■) et 6 rats Lou/C (□). Les comparaisons ( $p < 0,05$ ) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher. \* : Wistar vs Lou/C.

La protéine FAT/CD36 serait présente au niveau de la membrane mitochondriale externe de muscle squelettique, et pourrait également jouer un rôle dans le transfert des acides gras à travers la membrane mitochondriale, par action conjointe avec CPT1 (Campbell et al., 2004). Nous nous sommes donc intéressés à cette forme mitochondriale de FAT/CD36 lors d'une collaboration avec le Pr. Glatz, en pratiquant un western blot sur des protéines mitochondriales de tissu adipeux brun de rats Wistar et Lou/C. Les résultats obtenus sont présentés à l'aide de la figure II.6.

**Figure II.6 : Effet de la souche sur l'expression de la protéine FAT/CD36 au niveau du BAT.**



La quantité de protéine FAT/CD36 dans les mitochondries de BAT de rats Wistar et Lou/C a été quantifiée par western blot, à partir d'anticorps primaire spécifique dirigé contre la protéine FAT/CD36 (Pr. Glatz).

L'analyse a été réalisée avec 6 rats Wistar (■) et 6 rats Lou/C (□). Les comparaisons ( $p < 0,05$ ) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher. \* : Wistar vs Lou/C.

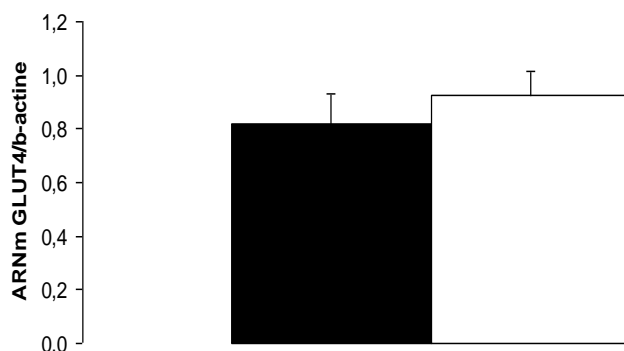
Ce western blot, effectué à partir d'un culot de mitochondries isolées de tissu adipeux brun de rats, nous renseigne de façon inédite sur le fait que la protéine FAT/CD36 est présente au niveau de la membrane des mitochondries de BAT. *De plus, il apparaît que cette protéine FAT/CD36 est plus exprimée au niveau des mitochondries de BAT des rats*

Lou/C par comparaison à la souche Wistar (+ 48%). Ce résultat nous apporte donc un complément d'information concernant les capacités mitochondriales fonctionnelles des rats Lou/C, et tendrait à montrer que le BAT du rat Lou/C pourrait permettre l'entrée de plus d'acides gras à l'intérieur de la mitochondrie. Cependant, cette interprétation devra être nuancée puisque l'expression de la protéine CPT1, connue comme étant l'étape limitante de la  $\beta$ -oxydation n'est pas augmentée dans le BAT du rat Lou/C. Il pourrait donc exister un mécanisme tout particulier de régulation de l'entrée des acides gras dans le BAT du rat Lou/C.

### 2.2.2 Apports en substrats glucidiques

GLUT4 facilite le transport transmembranaire du glucose dans les cellules. Par conséquent, une augmentation de l'utilisation de glucose par les adipocytes bruns devrait se traduire par une stimulation de l'expression de la protéine GLUT4. Nous avons donc procédé à l'analyse par RT-PCR semi-quantitative de la quantité relative de transcrits GLUT4 présents dans le tissu adipeux brun de rats Wistar et Lou/C. Les résultats sont présentés dans la figure II.7.

**Figure II.7 : Effet de la souche sur l'expression de gène impliqué dans le captage de substrats glucidiques par le BAT.**



L'abondance relative en ARNm de GLUT4 dans le BAT de rats Wistar et Lou/C a été quantifiée à partir d'amorces spécifiques. La  $\beta$ -actine est utilisée ici comme gène de référence. L'analyse a été réalisée avec 6 rats Wistar (■) et 6 rats Lou/C (□). Les comparaisons ( $p < 0,05$ ) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher. \* : Wistar vs Lou/C.

Nous observons que l'abondance relative d'ARNm de GLUT4 n'est pas modifiée chez les rats Lou/C par comparaison à la souche Wistar, ce résultat tendrait à montrer que l'utilisation de glucose par le tissu adipeux brun de rat Lou/C serait identique à ce qui est observé chez le rat Wistar. Concernant l'apport en substrats lipidiques et glucidiques au BAT, au vu de nos résultats obtenus par RT-PCR, il n'apparaît pas clairement de différence entre les rats Wistar et Lou/C. Si les transcrits de LPL et les protéines FAT/CD36 sont en

quantité plus importante dans le BAT du rat Lou/C, il n'y a, en revanche, aucune différence au niveau des transcrits FABP<sub>PM</sub> et GLUT4, en accord avec l'absence d'hyperactivité du BAT de rat Lou/C.

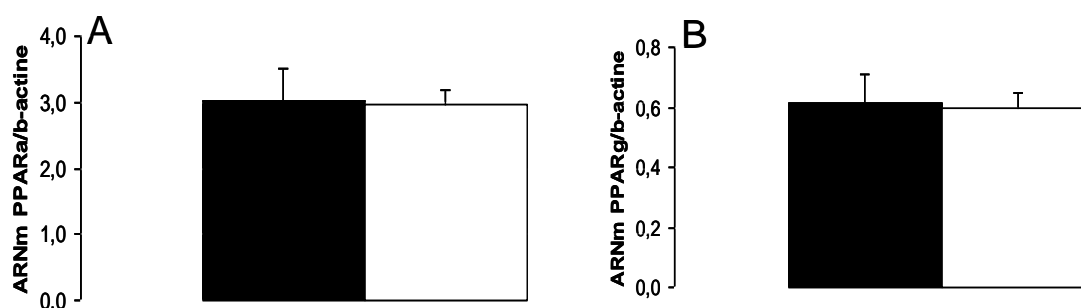
### 2.2.3 Régulation du métabolisme lipidique

Nous nous sommes intéressés à certains gènes impliqués dans le métabolisme des adipocytes, notamment FABP<sub>PM</sub>, LPL, GLUT4 et FAT/CD36 et d'autres corrélés à la fonction thermogène des adipocytes bruns tels que le gène de la protéine UCP1. Une augmentation de l'expression de certains gènes pourrait être reliée à une plus forte activité métabolique du BAT, tissu suspecté d'être à l'origine de la dépense énergétique majorée des rats Lou/C. Cependant, il semblerait que l'activité du tissu adipeux brun des rats Lou/C ne soit pas supérieure à celle des rats Wistar. Afin de vérifier ce résultat, il nous est paru nécessaire de regarder la régulation en amont des gènes impliqués dans le métabolisme des adipocytes bruns.

#### 2.2.3.1 « Peroxisome proliferator-activated receptors » alpha et gamma

Les « peroxisome proliferator-activated receptors » ou PPARs sont des ligands activant des facteurs de transcription qui contrôlent l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides en particulier, et dont font partie les transporteurs d'acides gras et les enzymes de la  $\beta$ -oxydation. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'expression relative des ARNm des formes PPAR  $\alpha$  et  $\gamma$ , par RT-PCR semi-quantitative sur des échantillons de BAT de rats Wistar et Lou/C et les résultats obtenus sont présentés dans la figure II.8.

**Figure II.8 : Effet de la souche sur l'expression de gènes impliqués dans la régulation du métabolisme lipidique de BAT.**



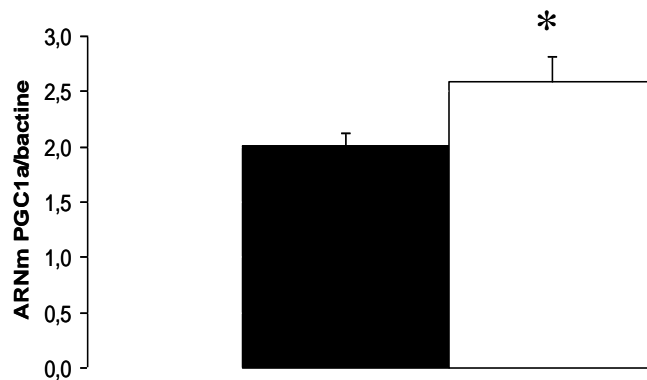
L'abondance relative en ARNm de (A) PPAR $\alpha$  et (B) PPAR $\gamma$  dans le BAT de rats Wistar et Lou/C a été quantifiée à partir d'amorces spécifiques. La  $\beta$ -actine est utilisée ici comme gène de référence. L'analyse a été réalisée avec 6 rats Wistar (■) et 6 rats Lou/C (□). Les comparaisons ( $p < 0,05$ ) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher. \* : Wistar vs Lou/C.

Nous pouvons conclure de l'analyse de la figure III.13 qu'aucune différence significative n'est mise en évidence, en terme de quantité relative de transcrits PPAR $\alpha$  (figure II.8A) et PPAR $\gamma$  (figure II.8B) entre le BAT des rats Wistar et Lou/C. *En considérant que l'abondance des PPARs est corrélée avec l'activité du tissu adipeux brun, en particulier avec la différenciation des adipocytes bruns et leur métabolisme lipidique, il apparaît que le BAT du rat Lou/C ne serait pas plus activé que celui du rat Wistar, confirmant les précédentes expériences.*

### 2.2.3.2 « Peroxisome proliferator-activated receptors- $\gamma$ coactivator 1alpha »

L'activité du tissu adipeux brun de rat Lou/C, que nous souhaitons comparer à celle du rat Wistar dans cette étude, est dépendante de la protéine UCP1, exprimée uniquement dans les adipocytes bruns. PGC-1 $\alpha$ , exprimée préférentiellement dans les adipocytes bruns, interagit avec PPAR $\gamma$ , et est nécessaire pour induire la différenciation des adipocytes bruns, la biogénèse mitochondriale et l'expression d'UCP1 (Puigserver et al., 1998). Nous avons donc choisi de compléter notre étude par la quantification de l'abondance relative des transcrits de PGC-1 $\alpha$  au sein du BAT de rats Wistar et Lou/C (figure III.9).

**Figure II.9 : Effet de la souche sur l'expression de PGC1 $\alpha$ , impliqué dans la biogénèse mitochondriale de BAT.**



L'abondance relative en ARNm de PGC1 $\alpha$  dans le BAT de rats Wistar et Lou/C a été quantifiée à partir d'amorces spécifiques. La  $\beta$ -actine est utilisée ici comme gène de référence. L'analyse a été réalisée avec 6 rats Wistar (■) et 6 rats Lou/C (□). Les comparaisons ( $p < 0,05$ ) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher. \* : Wistar vs Lou/C.

Les résultats obtenus et présentés figure II.9 montrent que le gène de la protéine PGC-1 $\alpha$  serait plus exprimé dans le BAT du rat Lou/C par comparaison au rat Wistar. Si l'on considère ce résultat brut et que l'on suppose un parallélisme entre ARNm et protéine, cela signifierait que la biogénèse mitochondriale serait intensifiée dans le BAT du rat Lou/C. Un plus grand nombre de mitochondries induirait une plus grande capacité d'oxydation des acides gras, et donc une hyperactivité du BAT de rat Lou/C, hypothèse confortée par l'augmentation de l'expression de LPL et FAT/CD36, et expliquant en partie la dépense

énergétique majorée, observée chez le rat Lou/C (cf. étude I). Cependant, nous devons être prudents puisque l'expression des PPARs (alpha et gamma), de FABP<sub>PM</sub>, GLUT4 et UCP1 ne semble pas modifiée. De même que l'activité du BAT des rats Lou/C ne paraît pas hyperstimulée comme en attestent le test fonctionnel à la noradrénaline et la respiration mitochondriale dépendante d'UCP1.

## **DISCUSSION**

Le rat Lou/C est caractérisé par un phénotype maigre dont les causes ne sont pas clairement établies. Lors d'une première étude, nous nous sommes intéressés à la balance énergétique de ce rat, et nous avons réalisé une comparaison méthodique des entrées et des sorties d'énergie chez le rat Lou/C avec les rats Wistar. Il ressort de cette étude que l'ingéré est le même entre ces deux souches, à condition de rapporter la prise calorique à la masse corporelle de l'animal. Concernant les sorties, nous avons caractérisé tous les postes de dépense énergétique et il apparaît que le métabolisme global, lié à la prise du repas, et lié à l'exercice physique est significativement plus élevé chez le rat Lou/C. Nous nous sommes donc demandés quel était le tissu responsable de cette activation du métabolisme, probablement impliquée dans le moindre stockage, sous forme de graisse, observée chez le rat Lou/C. Le tissu adipeux brun (BAT) est connu, chez le rongeur, pour permettre la dissipation de l'énergie superflue sous forme de chaleur, évitant ainsi un stockage excessif. En effet, il a été démontré que le rat Zucker, obèse, possède un tissu adipeux brun déficient (Rothwell and Stock, 1984). Notre hypothèse de travail était donc que le rat Lou/C, présentant une augmentation de sa dépense énergétique devrait présenter un BAT hyperactivé. Afin de vérifier cette hypothèse nous avons réalisé une étude de l'activité BAT de rats Wistar et de rats Lou/C, articulée selon 3 axes majeurs. Dans un premier temps nous avons réalisé une étude *in vivo* de l'activation du BAT ; dans un second temps nous avons procédé à une étude fonctionnelle mitochondriale ; et enfin, nous avons exploré les voies de régulation moléculaire de l'activité du BAT de ces deux souches de rats.

L'activité du tissu adipeux brun est stimulée par la noradrénaline (NA), via les récepteurs  $\beta_3$ -adrénergiques. Afin de mettre en évidence une éventuelle hyperactivation du BAT des rats Lou/C *in vivo*, nous avons pratiqué un test classiquement reconnu pour permettre l'évaluation des capacités d'activation du BAT par la NA. Il ressort de cette étude que la dépense énergétique obtenue avant l'injection, c'est-à-dire la dépense énergétique de repos, des rats Lou/C est supérieure à celle des rats Wistar, validant ainsi nos résultats de l'étude I. Nous remarquons que suite à l'injection de NA, la dépense énergétique est rapidement stimulée dans chacune des souches de rats, et que cette stimulation du métabolisme induite par la NA se poursuit jusqu'à 1 heure après injection. En revanche,



lorsque l'on considère l'effet total de la NA, il apparaît que la capacité maximale de réponse à la NA est diminuée de 32% chez le rat Lou/C par comparaison au rat Wistar.

Bien que d'autres tissus que le BAT contribuent à cette réponse globale à la NA, le BAT intervient à hauteur de 30 à 60% chez des rats maintenus à neutralité thermique (Foster and Frydman, 1979). Le rat Lou/C possède donc un BAT fonctionnel, capable de répondre à la NA, mais moins actif que celui du rat Wistar. Ces résultats fonctionnels *in vivo* s'opposeraient en partie à ceux montrant que le contenu en NA du BAT des rats Lou/C de 6 mois est plus élevé chez le rat Lou/C (+ 47%) que chez le rat Wistar (Perrin et al., 2003b), suggérant une activité sympathique accrue, généralement associée à une stimulation des adipocytes bruns (Cannon and Nedergaard, 2004). Cette divergence indique, d'une part, que le contenu adrénérgique du tissu n'est pas le reflet direct de l'activité des neurones catécholaminérgiques et, en tout cas de l'activation des adipocytes bruns ; et d'autre part, pourrait être reliée à la moindre expression des récepteurs  $\beta_3$ -adrénérgiques du BAT des rats Lou/C par comparaison aux rats Wistar (Duchamp C., communication personnelle), impliquant une potentielle « résistance » des adipocytes bruns des rats Lou/C à l'activation par la NA. Cette résistance hypothétique devra être confirmée par l'étude de l'abondance et de l'affinité des récepteurs  $\beta_3$ -adrénérgiques.

La réponse globale à la NA étant plus faible chez le Lou/C par comparaison au rat Wistar, le BAT du rat Lou/C serait moins actif, ce qui constitue un résultat surprenant. Nous avons donc choisi de réaliser une approche fonctionnelle de l'activité de ce tissu adipeux brun. Le BAT est spécialisé dans la production de chaleur (Himms-Hagen, 1990), et la protéine découplante UCP1 est l'élément clé de cette activité thermogène. Cette protéine est exprimée uniquement dans la membrane interne des mitochondries de BAT, où elle dissipe le gradient de protons généré par la chaîne respiratoire (Cannon and Nedergaard, 1985; Nicholls and Locke, 1984). Un premier indice quant à l'activité du BAT est donné par la consommation d'oxygène, de ses mitochondries isolées, en présence de succinate (état 2) et mesurée par oxygraphie. Nous n'obtenons aucune différence significative entre la respiration à l'état 2 des mitochondries isolées de BAT de rats Lou/C et celle de rats Wistar. Des mitochondries « plus actives » auraient tendance à respirer plus, ce qui n'est pas le cas. Dans le cas du rat Zucker, obèse, la respiration mitochondriale du BAT est diminuée de 50% (Levin et al., 1984), et la fixation spécifique du GDP sur les mitochondries de BAT est inférieure par comparaison à ce qui est observé chez le rat Zucker « lean » (Peachey et al., 1988), ce qui contribue à démontrer l'inactivité de son BAT (Peachey et al., 1988). La respiration GDP sensible n'est pas significativement différente entre les mitochondries de BAT de rats Lou/C et de rat Wistar. Nous en déduisons que l'activité de la protéine UCP1 ne serait pas stimulée chez le rat Lou/C.

Afin de compléter ce résultat, nous avons réalisé une quantification de l'abondance relative des transcrits par RT-PCR, et de la protéine, par western blot, d'UCP1. Il apparaît

alors qu'UCP1 n'est pas plus abondante en terme d'ARNm, voire significativement moins abondante en terme de protéine. Notre étude sur mitochondries isolées permet d'accéder à l'activité fonctionnelle de la protéine UCP1. Nous avons obtenu l'activité de cette protéine en utilisant le GDP, inhibiteur spécifique de l'UCP1. Plus la consommation d'oxygène diminue après addition de GDP, et plus la respiration était découplée du fait de l'UCP1. Toutefois, le niveau d'expression d'UCP1 pourrait affecter les propriétés mitochondriales de bactéries (Stuart et al., 2001). En effet, pour un niveau modéré d'expression d'UCP1, l'activité de la protéine est complètement inhibable par le GDP, en revanche, lorsque l'expression de la protéine UCP1 est très élevée, il apparaît une conductance aux protons insensible au GDP (Stuart et al., 2001). Dans notre étude, la quantité de protéine UCP1 serait inférieure chez le rat Lou/C, ce qui signifierait que nous pouvons comparer l'effet du GDP sur la respiration de mitochondries isolées de BAT dans chacune des deux souches sans craindre de sous-estimer l'activité d'UCP1 dans le BAT des rats Lou/C. Plusieurs études montrent une activité inférieure du BAT, et particulièrement de la protéine UCP1 chez les rat obèses (Himms-Hagen, 1979 ; Rothwell et al., 1981). L'apparente et inattendue absence d'hyperactivité de la protéine UCP1 dans le BAT des rats Lou/C pourraient être liée à nos conditions expérimentales. En effet, UCP1 requiert la présence d'acides gras pour être pleinement activée (Winkler and Klingenberg, 1994). Même s'il ne peut être totalement exclu que l'UCP1 du BAT des rats Lou/C nécessite de plus grandes quantités d'acides gras que celle du rat Wistar pour être activée, le mécanisme moléculaire d'une telle résistance reste inconnu.

Nos résultats, tant au niveau de l'animal entier, qu'au niveau sub-cellulaire tendent à montrer une activité similaire, voire diminuée du tissu adipeux brun des rats Lou/C et Wistar. De façon surprenante nos résultats vont à l'encontre du postulat que nous avons préalablement formulé, et qui supposait que le BAT des rats Lou/C devrait être hyperactif, dissipant ainsi l'énergie superflue, et permettant une régulation précise de sa balance énergétique. Une étude récente, réalisée sur des rats Lou/C et Fischer F344, montre une plus grande conductance aux protons des mitochondries isolées de BAT de rats Lou/C par comparaison aux rats Fischer F344, cette différence disparaissant en présence de GDP (Abdoulaye et al., 2006). Les auteurs concluent donc que ces fuites majorées dans les mitochondries de BAT du rat Lou/C seraient le fait d'UCP1, plus active dans cette souche, contribuant à la maigreur du rat Lou/C (Abdoulaye et al., 2006). Ces résultats sont, en apparence, différents des nôtres. Cependant, cette étude compare des rats Lou/C à des rats Fischer F344, et non des rats Wistar, qui montrent une prédisposition à l'obésité (Helies et al., 2005). Les rats Fischer F344 nous semblent donc moins indiqués que les rats Wistar comme témoins des rats Lou/C. Même si aucune étude n'a comparé l'activité du BAT des rats Wistar et Fischer F344, nous pourrions supposer que cette lignée, prédisposée à l'obésité, aurait un BAT moins actif que celui des rats Wistar. Le BAT des rats Fischer F344

serait alors moins enclin à dissiper l'énergie superflue sous forme de chaleur, expliquant le stockage excessif dont ils semblent sujets avec l'âge.

Après une étude fonctionnelle de l'activité du BAT de rat Lou/C, nous avons réalisé une approche moléculaire afin de vérifier, dans un premier temps, si l'apport en substrats au BAT était différent chez le rat Lou/C, puis, dans un second temps s'il existait une régulation différente du métabolisme lipidique entre les deux souches de rats. Même si l'étude précédente ne met pas en évidence une hyperactivité intrinsèque des mitochondries de BAT chez le rat Lou/C, il est possible d'envisager que plus de substrats parviennent à la mitochondrie, induisant ainsi une augmentation de la vitesse des flux métaboliques par des contraintes thermodynamiques. Le potentiel redox serait alors augmenté, du fait de l'oxydation des substrats, ce qui se traduirait par une stimulation de la chaîne mitochondriale, et donc une augmentation de l'activité du BAT de rat Lou/C. Le but de cette partie était donc de quantifier, par RT-PCR semi-quantitative, les transcrits de différentes protéines impliquées dans le captage et le transport des AG du sang jusqu'à la mitochondrie.

La lipoprotéine lipase (LPL) est l'enzyme clé de la dégradation tissulaire des triglycérides contenus dans les lipoprotéines chylomicrons ou VLDL. Nos résultats montrent une augmentation de l'abondance relative des ARNm de LPL dans le BAT des rats Lou/C par comparaison aux rats Wistar, ce qui tendrait à suggérer, si les variations des transcrits reflètent les variations fonctionnelles de la protéine, une hydrolyse plus importante des triglycérides plasmatiques par les adipocytes bruns du BAT des rats Lou/C, et par conséquent un captage accru des AG libres.

Les AG hydrolysés par la LPL peuvent entrer dans l'adipocyte brun via des transporteurs membranaires tels que les protéines « fatty acid transport protein » (FATP), FAT/CD36 et FABP<sub>PM</sub>. Pour chacun de ces transporteurs, il est connu qu'ils peuvent indépendamment les uns des autres induire une stimulation du transport des acides gras lorsqu'ils sont surexprimés dans une lignée cellulaire (Ibrahimi et al., 1996; Isola et al., 1995). Nous nous sommes intéressés à l'expression de la forme membranaire de la protéine FABP dans le BAT des rats Wistar et Lou/C. Les résultats obtenus tendraient à montrer que la quantité d'ARNm de FABP<sub>PM</sub> n'est pas plus importante chez le rat Lou/C, et que par conséquent les AG n'entrent pas plus dans l'adipocyte brun du rat Lou/C que dans celui du rat Wistar. En effet, une étude montre qu'il existerait une relation directe entre le transport des acides gras et l'activité des transporteurs membranaires FAT/CD36 et FABP<sub>PM</sub> dans le cœur et les muscles squelettiques (Bonen et al., 2002). Cependant il convient d'être prudent dans la mesure où l'abondance relative de l'ARNm ne reflète pas nécessairement la quantité de protéines exprimées, ni même l'activité de cette protéine. L'expression du transporteur FAT/CD36 étant régulée principalement au niveau post-transcriptionnel, il pourrait y avoir discordance entre la transcription et la traduction de cette protéine, comme pour la FABP<sub>PM</sub>. L'augmentation du transport des acides gras est liée, d'une part, à la

quantité de protéines de transport à la membrane plasmique, et d'autre part, à l'activité intrinsèque de ces protéines, que nous n'avons pu quantifier. De plus, il y aurait un pool intracellulaire du transporteur FAT/CD36, sensible à l'insuline et aux contractions musculaires, qui pourrait être transloqué à la membrane plasmique sous l'effet de ces signaux (Dyck et al., 2001). Il a été observé que la protéine FABP<sub>PM</sub> est également présente dans des pools intracellulaires et pouvait être transloquée à la membrane plasmique en cas de besoin (Chabowski et al., 2007 ; Han et al., 2007). En effet, il a été montré une augmentation de la translocation de FABP<sub>PM</sub> à la membrane plasmique, et par conséquent de l'oxydation des acides gras, dans le muscle squelettique de rat avec l'exercice physique (Han et al., 2007). Nous ne pouvons donc pas réfuter la possibilité que la quantité de FABP<sub>PM</sub> localisée sur la membrane plasmique et effectivement fonctionnelle soit augmentée chez le rat Lou/C par comparaison au rat Wistar, bien que cette différence ne soit pas détectée au niveau des transcrits. Comme seules les protéines présentes au niveau de la membrane plasmique peuvent faciliter les mouvements à travers la membrane plasmique, quantifier tous les ARNm de FABP<sub>PM</sub> du BAT, comme nous l'avons fait, ne permet pas de statuer précisément sur la quantité de protéine présente au niveau de la membrane plasmique et sur son activité fonctionnelle.

Afin de poursuivre notre approche moléculaire concernant l'apport de substrats au BAT, nous avons quantifié l'abondance relative des ARNm de la protéine CPT1, et l'abondance de la protéine FAT/CD36 mitochondriale. En effet, une fois que les acides gras sont entrés dans l'adipocyte brun, ils peuvent être transportés à l'intérieur de la mitochondrie, notamment après transformation en acyl-carnitine par la carnitine palmitoyl-transférase-1 (CPT1). Cette étape conditionne leur entrée dans la mitochondrie, afin d'y subir la  $\beta$ -oxydation (McGarry et al., 1989). Dans le muscle squelettique de rat, l'activité de cette CPT1 est allostériquement inhibée par le malonyl-CoA, et la quantité de malonyl-CoA diminue au cours de l'exercice physique afin de lever l'inhibition de la CPT1, et par conséquent permettre une majoration de l'oxydation des acides gras, lorsque les besoins énergétiques sont accrus (Winder et al., 1990). Nos résultats obtenus par RT-PCR semi-quantitative ne mettent pas en évidence de différence d'expression des ARNm de CPT1 dans le BAT de rats Wistar et Lou/C. Il est toutefois envisageable que la quantité de transcrits et de protéines CPT1 ne soit pas modifiée, mais que son activité soit augmentée, ou que son inhibition par la malonyl-CoA soit diminuée chez le rat Lou/C. Cependant, Couturier *et al.* (Couturier et al., 2002) ont montré que l'activité de la CPT n'était pas différente entre rats Wistar et Lou/C dans le muscle squelettique et le foie, tissus, comme le BAT, où le besoin en énergie est considérablement accru avec l'activation du métabolisme. Si nos résultats au niveau ARNm se répercutent au niveau protéique et fonctionnel, il apparaît que dans le BAT des rats Lou/C l'entrée des acides gras dans la mitochondrie de BAT de rat Lou/C n'est pas augmentée ou que la CPT1 n'est pas le seul effecteur.

Il a été montré sur le muscle squelettique humain que la quantité de malonyl-CoA ne décroît pas suffisamment, au cours de l'exercice physique d'intensité modérée, pour expliquer entièrement la stimulation de l'oxydation des acides gras (Holloway et al., 2008; Odland et al., 1996 ; Roepstorff et al., 2005 ). D'autres expériences concernant l'étude de l'activité de la CPTI (Holloway et al., 2008) conduisent à penser qu'il existerait un autre mécanisme de transport des acides gras à travers la membrane mitochondriale impliquant d'autres protéines et la CPTI (Campbell et al., 2004). Récemment, la protéine FAT/CD36, connue pour son rôle dans le transport des acides gras à travers la membrane plasmique, a été identifiée au niveau des membranes mitochondriales de muscle squelettique de rat (Campbell et al., 2004 ; Holloway et al., 2007) et d'humain (Bezaire et al., 2006 ; Holloway et al., 2006 ; Schenk and Horowitz, 2006). Ces études suggèrent que CPT1 et FAT/CD36 agiraient de concert afin de transporter les acides gras à l'intérieur de la mitochondrie ; cependant le mécanisme exact reste à ce jour inconnu. Nous avons quantifié par western blot l'abondance relative de la protéine FAT/CD36 à partir d'extraits mitochondriaux de BAT de rats Wistar et Lou/C, à l'aide d'un anticorps primaire fourni par le Pr. Glatz (Maastricht). Il apparaît, que contrairement à ce qui a été observé avec la CPT1, la quantité de protéine FAT/CD36 mitochondriale est augmentée chez le rat Lou/C par comparaison au rat Wistar. Une étude montre que le contenu mitochondrial de FAT/CD36 peut être augmenté lorsque l'activité musculaire est stimulée de façon chronique, en association avec une stimulation concomitante de l'oxydation des acides gras dans les mitochondries isolées de muscle de rats (Campbell et al., 2004). De même, l'entraînement physique chez l'Homme, associé avec une perte de masse, induit également une augmentation du contenu mitochondrial de la protéine FAT/CD36, qui co-immunoprécipite avec CPT1 (Schenk and Horowitz, 2006), corrélée avec une oxydation accrue des acides gras. Ces études suggèrent que la protéine FAT/CD36, associée à CPT1, stimulerait l'oxydation mitochondriale des acides gras dans le muscle squelettique d'humain et de rats, particulièrement au cours de l'exercice physique. L'augmentation du contenu en protéine FAT/CD36 mitochondriale dans les mitochondries de BAT du rat Lou/C pourrait donc suggérer une augmentation de l'oxydation des acides gras dans le BAT de cette souche. Toutefois, cette interprétation n'est pas corrélée avec la première partie de cette étude concernant l'étude fonctionnelle du BAT des rats Lou/C. En effet, contre toute attente, le BAT des rats Lou/C ne semble pas plus actif que celui des rats Wistar en terme de respiration mitochondriale et d'activité de la protéine UCP1. Nous n'avons cependant pas testé sur nos mitochondries l'utilisation de substrats d'origine lipidique ce qui aurait peut être permis de clarifier cette discordance dans nos résultats. L'abondance relative de la protéine FAT/CD36 mitochondriale reste également à confirmer dans le BAT. En effet, si un contrôle positif FAT/CD36 a été utilisé dans nos western blots, en revanche, nous n'avons pas incubé nos membranes avec un anticorps reconnaissant spécifiquement des protéines de la membrane plasmique telles que la « Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPase » ou

du réticulum sacroplasmique comme la « Ca<sup>2+</sup>-ATPase » (Campbell et al., 2004) afin de vérifier de possibles contaminations par ces membranes. Nous ne sommes pour l'instant pas en mesure de certifier la pureté de l'extraction de nos mitochondries, et d'affirmer que la protéine FAT/CD36 quantifiée est uniquement mitochondriale. Il serait cependant extrêmement intéressant de poursuivre dans cette voie : le rôle de la protéine FAT/CD36 mitochondriale a été découvert relativement récemment dans le muscle squelettique et n'a, à ma connaissance, jamais été mis en évidence dans le BAT. Prouver sa présence et son implication dans le BAT du rat Lou/C ouvrirait alors de nouvelles perspectives dans la compréhension de la régulation de l'oxydation des acides gras chez cette souche particulière. Les résultats obtenus en terme d'ARNm et de protéines demandent également à être confirmés par les activités de ces différents acteurs, notamment à l'aide de différents traceurs radioactifs, technique dont nous ne disposons actuellement pas au sein du laboratoire. On peut toutefois s'interroger sur la cohérence d'un accroissement de l'apport de substrats lipidiques aux mitochondries de BAT du rat Lou/C en l'absence de mécanismes thermogènes activés (voir plus bas).

Les substrats qui parviennent au BAT afin d'être oxydés ne sont pas uniquement lipidiques ; en effet, le glucose est une source importante d'énergie pour le BAT, soit parce qu'il permet de fournir des atomes de carbone pour la synthèse d'acides gras, soit parce qu'il peut également être oxydé dans l'adipocyte brun (Ferre et al., 1986). Dans le BAT, comme dans le tissu adipeux blanc, le transport du glucose par le transporteur GLUT4 est apparu comme étant l'étape limitante de l'utilisation du glucose (Fain et al., 1967). Nous voulions donc évaluer l'expression des transcrits de GLUT4 dans le BAT et nos résultats montrent une absence de différence entre les rats Wistar et Lou/C, ce qui signifierait que l'apport en substrat glucidique au BAT est le même dans les deux souches de rats. Le fait que l'entrée de glucose dans le BAT de rats Lou/C ne soit pas augmentée est cohérent avec une activation similaire de ce tissu chez ce rat et chez le Wistar. Cependant, comme précédemment lors de l'étude de l'apport en substrats lipidiques au BAT, nos résultats devraient être confirmés par une étude plus fonctionnelle.

L'expression génique du BAT étant fortement dépendante de facteurs de transcription comme les PPARs, nous avons déterminé l'abondance relative des ARNm de PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$ . Nos résultats montrent que l'expression de PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$  n'est pas différente dans le BAT des rats Wistar et Lou/C. L'absence de différence d'expression des transcrits de PPAR $\gamma$  dans le BAT des rats Lou/C par comparaison aux rats Wistar tendrait donc à conforter l'absence de stimulation du métabolisme lipidique (transcrits de FABP<sub>PM</sub> et CPT1) et de l'expression d'UCP1. En effet, l'activation de PPAR $\gamma$  est suffisante *in vivo* pour induire l'expression de la protéine UCP1 dans le BAT, et *in vitro* la différenciation de préadipocytes bruns en culture avec une stimulation du gène de l'UCP1 (Kelly et al., 1998). PPAR $\alpha$ , quant

à lui, n'induit pas d'augmentation d'expression de la protéine UCP1 mais activerait notamment l'expression de la lipoprotéine lipase (LPL), enzyme centrale dans le métabolisme des triglycérides. L'absence de variation de l'abondance relative de l'ARNm de PPAR $\alpha$  que nous observons dans le BAT des rats Lou/C par comparaison au rat Wistar ne permet pas d'expliquer la petite stimulation de la transcription de la LPL mise en évidence dans cette souche. Il serait possible d'envisager que dans cette souche de rat le gène de la LPL serait plus sensible aux PPAR $\alpha$ , et que par conséquent la même quantité de PPAR $\alpha$  exprimée permet de stimuler plus fortement le gène de la LPL. Il est possible que l'abondance de la protéine ne soit pas reflète par l'abondance de l'ARNm. Nous pourrions également incriminer d'autres facteurs régulateurs de l'expression de la LPL, comme l'insuline par exemple, permettant l'accroissement de cette enzyme dans cette souche. Il conviendrait d'explorer plus en détails ces possibilités.

Les premières observations réalisées dans cette étude ne permettent pas de mettre en évidence une hyperactivité intrinsèque des mitochondries de BAT des rats Lou/C qui aurait pu expliquer leur surprenante capacité à dissiper l'énergie superflue, sans stockage excessif sous forme de graisse. De plus, nos résultats concernant l'expression de protéines impliquées dans l'apport de substrats au BAT, ne nous permettent pas de conclure à une capacité d'oxydation des AG augmentée dans le BAT des rats Lou/C. La dépense énergétique plus importante mesurée chez le rat Lou/C pourrait être liée non pas à une modification intrinsèque de l'activité des mitochondries de son BAT, mais à une augmentation du contenu mitochondrial de son BAT. Si notre hypothèse s'avère exacte, nous devrions observer une stimulation des facteurs de transcription impliqués dans la biogenèse mitochondriale. PGC-1 $\alpha$  apparaît comme le régulateur majeur de la biogenèse mitochondriale. Une surexpression de ce facteur induit une augmentation de l'expression de nombreuses protéines nucléaires et mitochondriales. Nous avons donc choisi de déterminer l'abondance relative de l'ARNm de PGC-1 $\alpha$  dans le BAT des rats Wistar et Lou/C, et les résultats obtenus par RT-PCR montrent une stimulation de l'expression des transcrits de PGC-1 $\alpha$  dans le BAT des rats Lou/C. Ce résultat irait donc dans le sens d'une augmentation du contenu en mitochondries du BAT du rat Lou/C, induisant alors une augmentation de sa capacité totale d'oxydation des AG. Il nous faut cependant être prudents et modérer cette interprétation. En effet, les mécanismes régulant l'expression de la protéine PGC-1 $\alpha$  sont extrêmement complexes. Des études rapportent que l'ARNm doit subir une phosphorylation pour être stabilisé ou activé et que de nombreuses protéines peuvent supprimer l'activité de PGC-1 $\alpha$  (Holloway et al., 2009). Puigserver et al. (Puigserver et al., 1999) ont même proposé un modèle d'activation de PGC-1 $\alpha$  en trois étapes très lourdes. Une simple quantification de l'abondance relative en ARNm s'avère donc pour le moment insuffisante. Pour essayer d'infirmer ou non l'hypothèse d'une abondance accrue de mitochondries dans le BAT des Lou/C, nous avons estimé la quantité de mitochondries présentes dans le BAT des rats

Wistar et Lou/C à l'aide du volume du culot de mitochondries isolées et de la quantité de protéines dosées dans ce culot, et nous n'obtenons aucune différence significative. Bien que ces résultats soient à confirmer par une mesure de l'activité cytochrome-oxydase intrinsèque qui nous donnerait une idée plus précise du contenu mitochondrial du BAT des rats Wistar et Lou/C, il apparaît que ce n'est peut-être pas non plus le contenu mitochondrial qui serait en cause. D'autres mécanismes, impliquant potentiellement d'autres tissus que le BAT, pourraient être la clé du phénotype maigre du rat Lou/C.

## **CONCLUSION**

Nos résultats montrent que la réponse thermogène à la noradrénaline (NA) du rat Lou/C est inférieure à celle du rat Wistar. La respiration des mitochondries isolées, ainsi que l'activité de la protéine UCP1 (responsable de l'activité thermogène du BAT) des rats Lou/C est également plus faible. De même, le contenu mitochondrial en ARNm et protéine UCP1 n'est pas plus important dans le BAT du rat Lou/C, suggérant que son BAT n'est pas hyperactivé. Les variations des transcrits des protéines régulatrices de l'apport des substrats énergétiques et de l'activité métabolique des adipocytes bruns ne sont pas non plus cohérents avec une activation du BAT.

Le BAT des rats Lou/C n'est donc pas hyperactif par comparaison avec le rat Wistar et ne peut pas être responsable de l'hypermétabolisme mis en évidence dans la souche Lou/C.





# Etude III :

## Le BAT du rat Lou/C

est-il déficient ou  
activable au froid ?





## **L'acclimatation métabolique au froid du rat Lou/C maigre démontre la fonctionnalité de son tissu adipeux brun**

Maud BELOUZE<sup>1</sup>, Brigitte SIBILLE<sup>2</sup>, Benjamin REY<sup>1</sup>, Jean-Louis ROUANET<sup>1</sup>, Damien ROUSSEL<sup>1</sup>,  
Dominique LETEXIER<sup>1</sup>, Caroline ROMESTAING<sup>1</sup>, Harry KOUBI<sup>1</sup>, Delphine BAETZ<sup>1</sup>,  
Claude DUCHAMP<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Laboratoire de Physiologie Intégrative, Cellulaire et Moléculaire, Université Lyon 1, Lyon, CNRS, 43 Bvd 11 Novembre 1918, F-69622 Villeurbanne Cedex, France.

<sup>2</sup> INSERM U907, Université de Nice-Sophia Antipolis, Faculté de Médecine, 28 avenue de Valombrose, 06107 Nice, France.

### **RESUME**

Le rat Lou/C est un rat maigre, issu de la souche Wistar, dont la dépense énergétique est augmentée sans stimulation concomitante de l'activité de son tissu adipeux brun (BAT). Cette particularité diffère du modèle classique de régulation de la balance énergétique dans lequel le BAT joue un rôle clé en dissipant l'énergie alimentaire ingérée en excès.

Le but de cette étude était donc de vérifier si le BAT du rat Lou/C n'est pas plus actif que celui du rat Wistar parce que ce tissu i) est déficient dans cette souche ou ii) n'est pas stimulé car l'excédent de thermogénèse observé serait produit par d'autres tissus.

Pour cela, des rats Wistar et Lou/C de même âge ont été exposés au froid (4°C) pendant 3 semaines, un protocole classique stimulant l'activité thermogène du BAT. Nos résultats mettent en évidence une hypertrophie marquée du BAT avec l'exposition au froid dans les 2 souches de rats, associée à une stimulation de la respiration des mitochondries isolées du BAT, de l'activité et de l'abondance de la protéine UCP1, ainsi que l'augmentation de l'abondance des transcrits de différentes protéines impliquées dans le transport des substrats (LPL, FABP, GLUT4), et l'entrée des acides gras dans la mitochondrie (CPT1). Il apparaît également que le rat Lou/C exposé au froid augmente de façon plus importante son ingéré que le Wistar mais réduit son activité physique spontanée.

En conclusion, le BAT du rat Lou/C n'est pas déficient puisqu'il est activable lors d'une exposition prolongée au froid, cette stimulation étant même supérieure à celle qui est observée chez le rat Wistar. Au froid, le rat Lou/C peut réaliser un compromis énergétique entre la thermogénèse liée à l'activité physique et à l'activation de son BAT. Ces résultats indiquent que d'autres mécanismes dissipateurs d'énergie en dehors du BAT interviennent dans la régulation de la balance énergétique du rat Lou/C maintenu à thermoneutralité.

## INTRODUCTION

Les endothermes exposés au froid doivent augmenter leur production de chaleur pour compenser les pertes thermiques vers l'environnement et maintenir une température centrale élevée et constante. Cette thermogenèse de régulation provient, dans un premier temps, du frisson thermique (Depocas et al., 1956). Si l'exposition au froid se prolonge, le frisson disparaît peu à peu pour laisser place à une thermogenèse sans frisson (« non shivering thermogenesis », NST) (Jansky, 1973). Cette NST est, chez le rongeur, largement dépendante du tissu adipeux brun. En effet, la noradrénaline libérée par les terminaisons nerveuses sympathiques en réponse au froid provoque l'expression du gène de la protéine découplante UCP1, qui joue un rôle direct dans la production de chaleur par ce tissu (Cannon and Nedergaard, 2004). La protéine UCP1 a la propriété d'augmenter la conductance aux protons de la membrane interne mitochondriale, facilitant ainsi le retour des protons vers la matrice mitochondriale (Nicholls and Locke, 1984). La conséquence de cette dissociation entre les oxydations et les phosphorylations est une stimulation des oxydations mitochondriales sans augmentation concomitante de la synthèse d'ATP. L'UCP1 dissipe ainsi sous forme de chaleur l'énergie générée par l'oxydation des acides gras issus de la lipolyse dans les adipocytes bruns. Les acides gras agissant à deux niveaux distincts : comme activateurs de l'UCP1 et comme substrats thermogènes des oxydations cellulaires.

Au cours de la NST, la majeure partie des substrats disponibles sont oxydés dans le BAT, ce qui nécessite une stimulation de l'expression des protéines impliquées dans le transport des acides gras ou du glucose. La noradrénaline libérée par les terminaisons sympathiques innervant les adipocytes bruns stimule l'activité de la LPL, qui capte et hydrolyse les lipides présents dans le sang, ainsi que l'activité de la FABP<sub>PM</sub>, permettant l'entrée des acides gras dans l'adipocyte brun (Carneheim et al., 1984 ; Daikoku et al., 1997 ; Radomski and Orme, 1971 ). L'étape limitante de la  $\beta$ -oxydation des acides gras est leur entrée dans la mitochondrie via la carnitine palmitoyl transferase 1 (CPT1) (McGarry et al., 1989) et son expression est stimulée avec l'exposition au froid. Cependant, de récentes études ayant montré que la régulation de la CPT1 ne peut complètement expliquer les variations d'oxydation mitochondriale des acides gras, particulièrement dans le muscle, lorsque les besoins en énergie sont accrus, par exemple lors de l'exercice physique (Dean et al., 2000 ; Odland et al., 1996 ). D'autres protéines comme la FAT/CD36 présente au niveau de la membrane mitochondriale externe de muscle squelettique pourraient jouer un rôle dans le transfert des acides gras à travers la membrane mitochondriale, par action conjointe avec CPT1 (Campbell et al., 2004). Dans le BAT, si l'énergie se trouve principalement fournie par l'oxydation des acides gras non estérifiés (Nicholls and Locke, 1984), l'oxydation du glucose intervient également (Ferre et al., 1985 ; Young et al., 1985). Le captage du glucose sanguin

est permis par des transporteurs de type GLUT4, qui facilitent le transport transmembranaire du glucose, dans les tissus sensibles à l'insuline et notamment le BAT (Assimacopoulos-Jeannet et al., 1991). L'entrée de glucose est fortement stimulée avec l'exposition au froid.(Cannon and Nedergaard, 2004; Olichon-Berthe et al., 1992). En amont, les « peroxisome proliferator-activated receptors » ou PPARs sont des ligands activant des facteurs de transcription qui contrôlent l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides en particulier, et dont font partie les transporteurs d'acides gras et les enzymes de la  $\beta$ -oxydation. Les PPARs sont également connus pour leur rôle activateur de l'expression du gène de la protéine UCP1, ainsi que pour leur implication dans la différenciation des précurseurs des adipocytes bruns. Leur expression est donc particulièrement importante lors d'une exposition prolongée au froid. De même, les coactivateurs tels que le « peroxisome proliferator-activated receptors- $\gamma$  coactivator 1alpha » ou PGC-1 $\alpha$  appartiennent à la classe des régulateurs transcriptionnels qui stimulent l'expression de nombreux gènes. PGC-1 $\alpha$ , exprimée préférentiellement dans les adipocytes bruns, interagit avec PPAR $\gamma$ , et est nécessaire pour induire la différenciation des adipocytes bruns, la biogenèse mitochondriale et l'expression des activateurs d'UCP1, notamment lors de l'acclimatation au froid (Puigserver et al., 1998).

Le BAT, principal tissu thermogène au froid, est également impliqué dans la régulation de la balance énergétique des rongeurs, en dissipant sous forme de chaleur le surplus d'énergie ingérée (Cannon and Nedergaard, 2004; Himms-Hagen, 1983; Rothwell and Stock, 1982; Rothwell and Stock, 1984; Rothwell and Stock, 1997). Le rat Lou/C, issu de la souche Wistar, est à la fois un modèle d' « anti obésité » (Couturier et al., 2002) et de longévité (Alliot et al., 2002). Alors que le rat Wistar développe une obésité spontanée avec l'âge (Newby et al., 1990), le rat Lou/C se caractérise par une masse corporelle inférieure, et une limitation des dépôts adipeux en dépit de l'âge (Veyrat-Durebex and Alliot, 1997). L'étude de la balance énergétique du rat Lou/C (Belouze et al., étude I) montre que si les apports ne diffèrent pas, les sorties d'énergie sont augmentées chez le rat Lou/C. De façon inattendue, il est apparu que la capacité maximale d'activation de ce tissu par la noradrénaline, ainsi que son activité mitochondriale n'étaient pas supérieures chez le rat Lou/C, par comparaison au rat Wistar, ne traduisant pas une hyperactivité de ce tissu thermogène susceptible de dissiper un excédent d'énergie ingérée (Belouze et al., étude II).

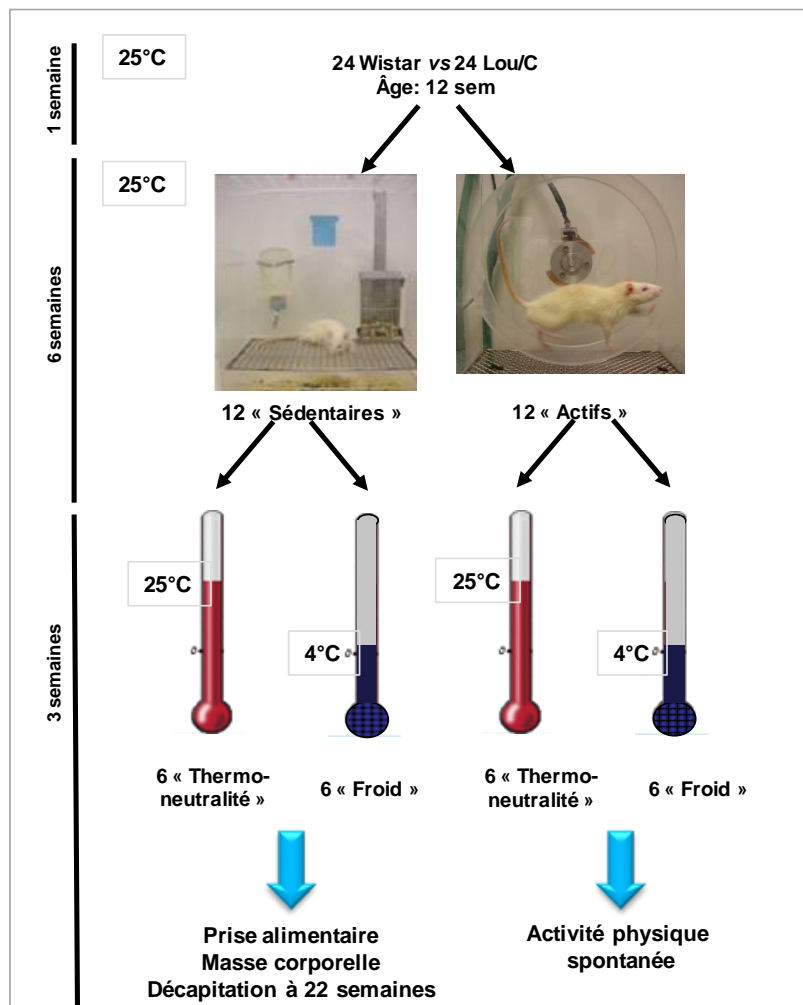
Cette observation pouvait suggérer que le BAT du rat Lou/C n'est pas plus actif que celui du rat Wistar parce que ce tissu i) est déficient dans cette souche ou ii) n'est pas stimulé car l'excédent de thermogenèse observé serait produit par d'autres tissus. Nous avons donc utilisé une condition bien connue pour stimuler l'activité du BAT, l'exposition prolongée au froid, pour tester la réactivité du BAT dans cette souche.

## MATERIEL ET METHODES

### 1. Les animaux

24 rats Lou/C (Harlan, France), issus de la souche Wistar, ainsi que de 24 rats Wistar (Harlan, France), âgés de 12 semaines à leur arrivée dans notre animalerie sont restés 1 semaine, à raison de 6 rats par cage, afin de s'habituer à leur nouvel environnement. Ces animaux ont ensuite été divisés aléatoirement en 2 groupes : 12 rats de chaque souche, dits « sédentaires », étaient placés en cages individuelles simples ; les 12 autres rats de chaque souche, appelés « actifs » disposaient d'une cage individuelle avec libre accès à une roue d'activité. Les animaux sont restés dans cette configuration pendant 6 semaines : les 3 premières leur permettaient de se familiariser à leur nouvelle cage, limitant ainsi le risque de voir un stress perturber nos observations ; les 3 semaines suivantes étaient dévolues à l'enregistrement des différents paramètres expérimentaux. A l'issu de cette période, chaque groupe de rats a lui-même été subdivisé en 2 autres groupes : 24 rats « TN = thermoneutralité » (12 sédentaires et 12 actifs) sont restés 3 semaines supplémentaires à 25°C, tandis que 24 rats « froids » (12 sédentaires et 12 actifs) ont été placés à 4°C pendant 3 semaines. Le design expérimental est représenté à l'aide de la figure III.1.

Figure III.1 : Conditions expérimentales



Ainsi, les 6 rats Wistar et Lou/C sédentaires « TN » ou « froid » ont été utilisés pour la mesure de leur prise alimentaire, masse corporelle, masses tissulaires et études *in vitro*. L'enregistrement de l'activité physique spontanée en roue d'activité est effectué à l'aide des 6 rats Wistar et Lou/C actifs « TN » ou « froid ».

La luminosité était contrôlée avec un cycle de 12h de lumière et 12h d'obscurité. La nourriture standard (A04 UAR, France) et l'eau de boisson étaient fournies *ad libitum*.

## **2. Activité, prise alimentaire et masse des animaux**

Chaque jour, un relevé individuel de l'activité physique spontanée des rats ayant accès librement à une roue était effectué. Un relevé bihebdomadaire de la masse des animaux sédentaires, par pesée de chaque individu, le matin entre 8 heures et 10 heures, était pratiqué. En parallèle, deux fois par semaine, une pesée de la mangeoire avant et après remplissage était réalisée, afin de définir leur prise calorique individuelle quotidienne (Belouze et al., étude I). Connaissant la valeur énergétique de l'aliment (12,12 kJ / g), et à partir de nos relevés bihebdomadaires, nous avons pu calculer, semaine par semaine, la prise calorique quotidienne des rats Wistar et Lou/C âgés de 15 à 18 semaines et maintenus à 25 °C, puis de ces mêmes rats au cours des 3 semaines à 4°C qui ont suivi. Les résultats ont été exprimés en kJ par jour en fonction de la masse corporelle de l'animal le jour où les mangeoires étaient pesées (kJ/jour/kg MC).

## **3. Prélèvements tissulaires**

Après 12 semaines d'expérimentation, les animaux hébergés en cage individuelle, alors âgés de 22 semaines, ont été assommés, puis décapités le matin, à heure fixe (7h30 ± 30 min), à raison de 1 rat de chaque groupe par jour, afin de limiter les effets de l'âge. Le foie, le quadriceps (rouge), le cœur, le tissu adipeux blanc rétro-péritonéal, et le tissu adipeux brun interscapulaire (BAT) ont été rapidement extraits, nettoyés de leur graisse et tissu conjonctif, puis pesés soigneusement. Les rats Lou/C étant beaucoup plus maigres que les rats Wistar au même âge, nous avons exprimé les masses des tissus en milligrammes ou en grammes pour 100 grammes de masse corporelle, afin de permettre une comparaison entre les groupes.

Des aliquots de BAT ont ensuite été : i) soit congelés immédiatement dans l'azote liquide, puis conservés à -80 °C pour la détection d'éventuelles modifications d'expression de gènes ou de protéines par des techniques de biologie moléculaire, ou d'activité enzymatique par des techniques biochimiques ; ii) soit utilisés pour l'isolement des mitochondries.

## **4. Respiration de mitochondries isolées de BAT et activité d'UCP1**

Les mitochondries de BAT ont été isolées par centrifugation différentielle à partir du BAT prélevé sur les 6 rats Wistar et Lou/C sédentaires « TN » ou « froid », âgés de 22 semaines (Belouze et al., étude II ; cf. annexe méthodologique). Après détermination de la quantité de protéines contenues dans le culot mitochondrial par le kit de dosage « BCA Protein Assay », la consommation



d'oxygène des mitochondries de BAT a été mesurée à l'aide d'une électrode de Clark, en présence de BSA qui piège les acides gras contenus dans le milieu (Belouze et al., étude II). Afin de connaître quelle est la part de la respiration liée aux fuites de protons à travers la membrane mitochondriale interne, via UCP1, protéine responsable de l'activité du BAT, nous avons inhibé l'ATP synthase par ajout d'oligomycine dans la cuve de l'oxygraphe, puis inhibé l'UCP1 en utilisant du GDP. Nous avons alors calculé la respiration GDP-sensible, représentant les fuites de protons via UCP1.

## **5. Quantification mitochondriale des protéines UCP1 et FAT/CD36**

L'expression des protéines UCP1 et FAT/CD36 était réalisée par Western Blot, à partir des extraits mitochondriaux congelés du BAT des 6 rats Wistar et Lou/C sédentaires « TN » ou « froid » âgés de 22 semaines. Les protéines mitochondriales de BAT ont été séparées par électrophorèse sur gel SDS-PAGE en fonction de leur poids moléculaire, puis elles ont été transférées sur membrane de PVDF. La membrane a été bloquée avec du lait pour la quantification d'UCP1 ou de la BSA pour FAT/CD36. La protéine d'intérêt est détectée par immuno-marquage après hybridation avec un anticorps primaire: soit anti-UCP1 (alpha-diagnostic, 1 :15000) ou anti-FAT/CD36 ((Matsuno et al., 1996), utilisé dans le laboratoire du Pr. Glatz à Maastricht). L'anticorps secondaire était lié de manière covalente à l'enzyme HRP. Après réaction de chemiluminescence, une autoradiographie était réalisée puis analysée à l'aide d'un logiciel d'images (Kodak Digital Science TM) (Belouze et al., étude II).

## **6. Expression de gènes du métabolisme énergétique par RT-PCR**

L'abondance relative de différentes cibles du métabolisme énergétique était permise par la technique de RT-PCR. L'extraction des ARN, à partir du BAT congelé des 6 rats Wistar et Lou/C sédentaires « TN » ou « froid » âgés de 22 semaines, était réalisée à l'aide d'un ultraturax dans une solution Trizol (Invitrogen, France). La RT, puis les PCR et l'analyse des transcrits ont été réalisés comme décrit précédemment (Belouze et al., étude II). Les séquences des amorces sont présentées dans le tableau III.1.

Tableau III.1 : Séquences des amorces utilisées pour la RT-PCR

	sens (5' → 3')	antisens (5' → 3')	taille (pb)	n cycles
<b>β-actine courte</b> (gi11420247)	GAC GAG GCC CAG AGC AAG AGA	GGG TGT TGA AGG TCT CAA ACA	225	23
<b>β-actine longue</b> (gi11420247)	TTG TAA CCA ACT GGG ACG ATA TGG	GAT CTT GAT CTT CAT GCT GCT AGG	764	23
<b>CPT1</b> (NM_031559)	TAT GTG AGG ATG CTG CTT CC	CTC GGA GAG CTA AGC TTG TC	629	32
<b>FABP</b> (gi204079)	CTG GAA GCT AGT GGA CAG CA	GAC TTG ACC TTC CTG TCA TC	225	26
<b>GLUT4</b> (gi464195)	CAG ATC GGC TCT GAA GGT GC	CTG AGT AGG CGC CAA TGA G	430	26
<b>LPL</b> (gi205214)	GAC GGT GAC AGG AAT GTA TG	GAG TCA ATG AAG AGA TGG ATG G	588	24
<b>PGC1α</b>	AAA CTT GCT AGG GGT CCT CA	GTG TGA GGA GGG TCA TCG TT	375	37
<b>PPARα</b> (NM_013196)	TCC ACG AAG CCT ACC TGA AG	GAA CTC TCG GGT GAT GAA GC	401	
<b>PPARγ</b> (NM_013124)	GCG ATC TTG ACA GGA AAG AC	GCG ATC TTG ACA GGA AAG AC	331	24
<b>UCP1</b> (gi6981691)	GTG AAG GTC AGA ATG CAA GC	AGG GCC CCC TTC ATG AGG TC	191	19

## 7. Statistiques

Tous les résultats sont exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  l'erreur standard à la moyenne (sem). Les comparaisons statistiques ont été effectuées par un test d'analyse des variances (ANOVA) pour comparer les groupes entre eux lorsque leur nombre était supérieur à 2, suivi d'un test post hoc de PLSD Fisher. Les variations au sein d'un même groupe ont été comparées par un test t de Student. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel Statview.

## RESULTATS

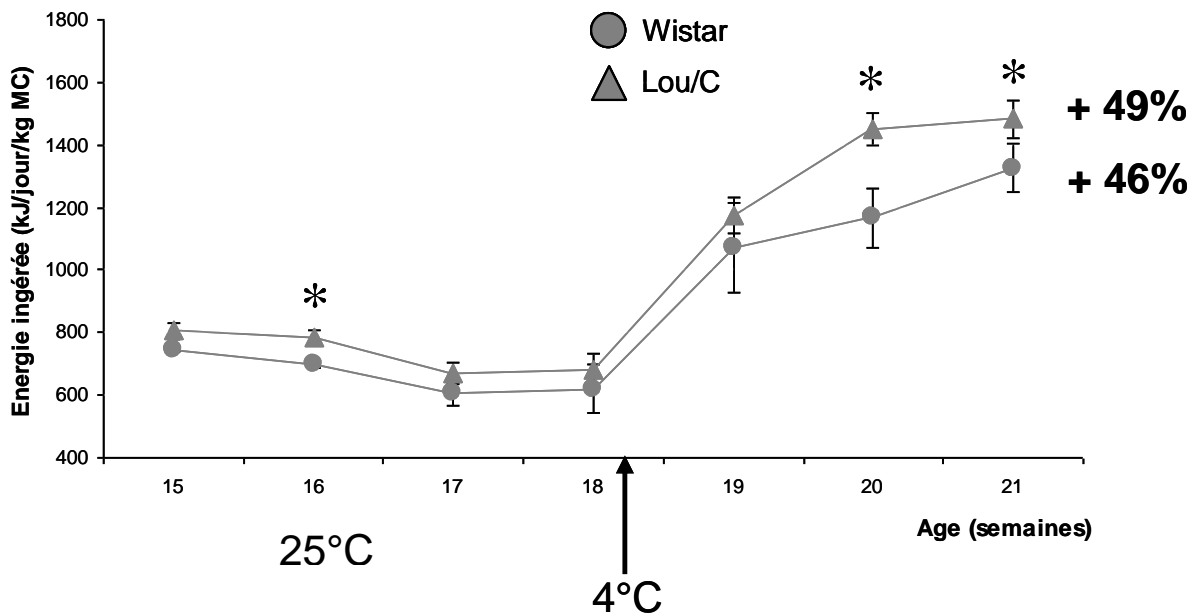
### 1. Effet de l'exposition prolongée au froid sur l'animal entier

Dans un premier temps nous avons observé l'effet de l'exposition prolongée au froid des rats sur la prise alimentaire, l'activité physique spontanée, la masse corporelle et la masse des organes par comparaison avec des rats maintenus à 25°C.

#### 1.1 Effet du froid sur la prise alimentaire des animaux

Suite à une exposition au froid, la dépense énergétique pour des besoins de thermorégulation est fortement augmentée. Afin de fournir l'énergie nécessaire à la production de chaleur, l'organisme doit mobiliser ses réserves et accroître son ingéré pour fournir plus de substrats aux cellules. La prise calorique est donc un élément primordial lors des processus d'acclimatation au froid et les résultats obtenus sont présentée dans la figure II.2.

Figure III.2 : Effet de la souche sur la prise alimentaire de rats Wistar et Lou/C exposés au froid.



La prise alimentaire est calculée à partir de mesures bihebdomadaires pour les rats Wistar et Lou/C élevés à 25°C puis exposés à 4°C à l'âge de 18 semaines.

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  sem (kJ/jour/kg MC), n=6. Les comparaisons ( $p < 0,05$ ) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher. \* : Wistar vs Lou/C.

A thermoneutralité, nos résultats montrent qu'à l'âge de 15, 17 et 18 semaines, les rats Lou/C absorbent autant d'énergie que les rats Wistar, et ce lorsque les prises caloriques

sont exprimées par kilogramme de masse corporelle. A l'âge de 16 semaines, la prise alimentaire est même significativement supérieure chez les rats Lou/C par comparaison aux rats Wistar. Dès leur première semaine d'exposition au froid, les rats Wistar et Lou/C augmentent significativement leur prise calorique (+ 42% pour chacune des deux souches ;  $p \leq 0,05$ ). A partir de la seconde semaine d'exposition au froid, les prises alimentaires des rats Wistar comme Lou/C tendent à se stabiliser. A la troisième semaine d'exposition au froid, l'ingéré des rats est augmenté de, respectivement + 46% et + 49%, pour les rats Wistar et Lou/C. De plus, nous remarquons, que lors des deux dernières semaines d'exposition au froid, l'ingéré des rats Lou/C est significativement augmenté par comparaison à celui des rats Wistar. *Nous pouvons conclure que la prise alimentaire des animaux est nettement stimulée avec l'exposition au froid, et tend à être majorée chez le rat Lou/C par comparaison au rat Wistar.*

### 1.2 Effet du froid sur la masse des animaux et des tissus

Les rats Wistar et Lou/C restés à thermoneutralité ou exposés trois semaines à 4°C ont été pesés à l'âge de 22 semaines, puis décapités. Différents tissus et organes ont été prélevés et pesés (tableau III.2) afin de mieux expliquer et comprendre les différences de masse observées entre les deux souches, ainsi que les processus physiologiques inhérents à l'acclimatation au froid dans ces deux souches de rats.

**Tableau III.2 : Masses corporelles et tissulaires de rats Wistar et Lou/C en fonction de la température d'acclimatation.**

	Wistar			Lou/C		
	TN	Froid	Effet froid	TN	Froid	Effet froid
Masse (g)	429 ± 14	334 ± 11 #	-22%	271 ± 15 *	251 ± 6 *	-7%
Foie (g/100g MC)	2,81 ± 0,08	3,53 ± 0,19 #	+26%	2,87 ± 0,09	3,39 ± 0,14 #	+18%
Quadriceps (g/100g MC)	0,75 ± 0,04	0,68 ± 0,04	-9%	0,86 ± 0,03	0,79 ± 0,04	-8%
Cœur (g/100g MC)	0,24 ± 0,01	0,36 ± 0,02 #	+50%	0,31 ± 0,01 *	0,41 ± 0,01 #	+32%
WAT (mg/100g MC)	825 ± 93	272 ± 69 #	-67%	286 ± 62 *	82 ± 12 #*	-71%
BAT (mg/100g MC)	122 ± 6	282 ± 48 #	+131%	105 ± 7	309 ± 11 #	+194%

La masse des tissus est exprimée par 100g de masse corporelle. WAT : « white adipose tissue » ou tissu adipeux blanc ; BAT : « brown adipose tissue » ou tissu adipeux brun. Les résultats sont exprimés en moyenne ± sem, n=6. Les comparaisons ( $p < 0,05$ ) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher. # : thermoneutralité vs froid ; \* : Wistar vs Lou/C.

A 25°C, température proche de la thermoneutralité, nos résultats montrent que la masse corporelle du rat Lou/C est bien inférieure à celle du rat Wistar de même âge. Cette différence de masse corporelle peut en partie s'expliquer par la différence de masse grasse observée dans ces deux souches d'animaux. En effet, la masse de tissu adipeux blanc (« white adipose tissue » ou WAT) rétro-péritonéal est presque trois fois plus faible chez le rat Lou/C par comparaison au rat Wistar. En revanche, la masse du cœur des rats Lou/C est significativement augmentée, ce qui pourrait être la conséquence de son hypermétabolisme précédemment décrit. Les masses de foie, de quadriceps (rouge) et de tissu adipeux brun (« brown adipose tissue » ou BAT) interscapulaire ne sont pas significativement différentes entre les rats Wistar et Lou/C.

Après trois semaines au froid, la masse des rats Wistar est significativement diminuée alors qu'une tendance non significative est observée chez les rats Lou/C. Nous pouvons cependant noter que la masse des rats Lou/C reste inférieure à celle des rats Wistar. La perte de masse corporelle des rats au froid pourrait être imputée à une stimulation du catabolisme tissulaire, visant à produire de la chaleur, et impliquant une utilisation de leurs réserves adipeuses. En effet, nous remarquons que la masse de WAT est largement diminuée suite à l'exposition au froid, chez les rats Wistar (- 67%) et les rats Lou/C (- 71%). La masse adipeuse des rats Lou/C reste cependant très inférieure à celle des rats Wistar. Au froid, les masses du foie et du cœur sont significativement augmentées dans les deux souches de rats, témoignant probablement de la stimulation de la dépense énergétique imposée par le froid. Nos résultats ne laissent pas apparaître de variation significative de la masse musculaire suite à l'exposition au froid, malgré une légère tendance à la baisse de la masse du quadriceps. La masse du BAT, principal tissu responsable de la thermogénèse de régulation lors d'une exposition prolongée au froid, est largement augmentée chez le rat Wistar (+ 131%) et chez le rat Lou/C (+ 194%). L'hypertrophie tissulaire traduit que le BAT est activé par le froid dans les deux souches de rats.

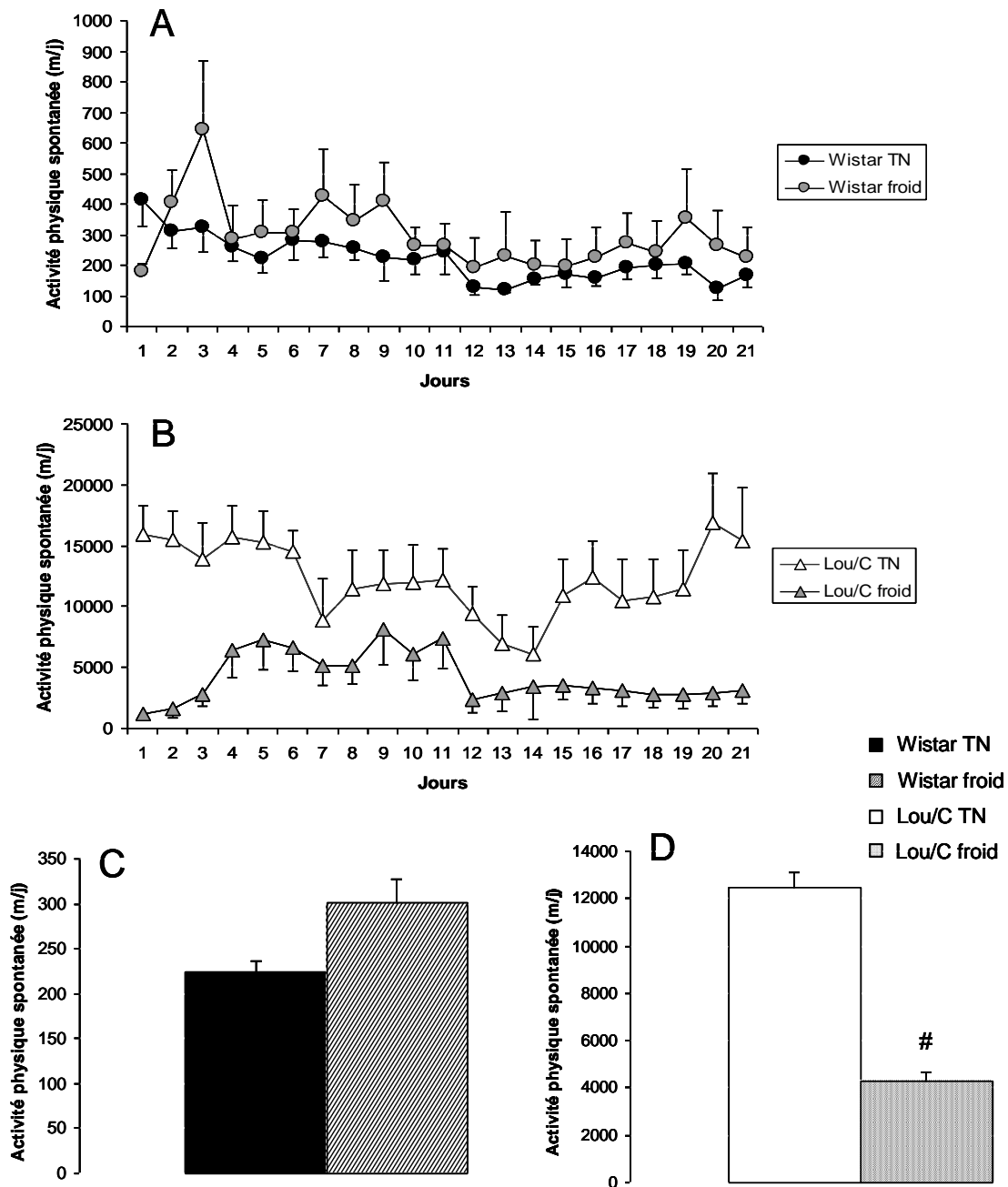
En résumé, l'ensemble de nos résultats confirme donc que le rat Lou/C est plus maigre que le rat Wistar, et que cette différence de masse corporelle serait attribuée en partie à une masse grasse nettement diminuée. La masse du cœur des rats Lou/C est quant à elle légèrement supérieure suggérant une activité métabolique accrue. *Lorsque ces animaux, Wistar et Lou/C, sont exposés trois semaines à 4°C, ils maigrissent, et puisent dans leurs réserves de graisse. Les tissus métaboliquement actifs tels que le foie, le cœur et le BAT montrent une masse nettement augmentée, ce qui signifierait qu'ils jouent un rôle important lors de l'acclimatation au froid des rats Wistar comme Lou/C. En revanche, la masse du quadriceps ne semble pas varier, ni chez le rat Wistar, ni chez le rat Lou/C lors de l'exposition au froid.* Connaissant l'hyperactivité dont peut faire preuve le rat Lou/C, nous avons donc décidé de mesurer le comportement locomoteur des animaux à 4°C.

### **1.3 Effet du froid sur l'activité physique spontanée des animaux**

Le rat Lou/C est un animal hyperactif : comme nous l'avons montré précédemment (Belouze et al., étude I). Il est beaucoup plus actif que le rat Wistar lorsqu'ils ont à disposition dans leur cage individuelle une roue d'activité en libre accès ; mais également en dehors de tout dispositif spécifique à l'intérieur de la cage (Garait et al., 2005 ; Perrin et al., 2003b ; Soulage C, 2008). Notre intention dans cette étude était de vérifier si le tissu adipeux brun (BAT) du rat Lou/C était fonctionnel suite à une exposition prolongée au froid, mais également d'étudier comment les rats se comportaient lors de cette exposition au froid, en terme d'activité physique spontanée. Les résultats des enregistrements présentés dans la figure III.3.

Nos résultats confortent ceux de l'étude I concernant l'hyperactivité spontanée des rats Lou/C, par comparaison aux rats Wistar, lorsqu'ils ont accès librement à une roue d'activité (respectivement  $12447 \pm 243$  vs.  $224 \pm 12$  m / jour). La cinétique donnant l'activité des rats Wistar (figure III.19A) et des rats Lou/C (figure III.19B) montre que, dès le premier jour d'exposition au froid, l'activité des rats Wistar tend à être augmentée alors que celle des rats Lou/C paraît nettement diminuée. Pendant les trois semaines d'exposition au froid ces observations semblent pérennes ce qui nous autorise à réaliser une moyenne de ces activités physiques spontanées sur trois semaines. Il apparaît que les rats Wistar exposés à 4°C courent en moyenne  $302 \pm 26$  m / jour (figure III.19C) : ils ont donc une activité physique spontanée qui tend à être stimulée par l'exposition au froid bien que le seuil de significativité ne soit pas atteint (+ 35%,  $p=0,059$ ). Contrairement à ce qui est observé chez les rats Wistar, l'exposition au froid induit une diminution de l'activité des rats Lou/C (- 66%,  $p \leq 0,05$  ; figure III.19D). Il est cependant important de noter que l'activité des rats Lou/C exposés à 4°C reste toutefois nettement supérieure à celle des rats Wistar (respectivement  $4293 \pm 391$  vs.  $302 \pm 26$  m / jour).

Figure III.3 : Effet du froid sur l'activité physique spontanée de rats Wistar et Lou/C.



Les rats disposent d'une roue d'activité en libre accès. Ces roues associées à un détecteur relié à un système d'acquisition permettent une mesure en continu de l'activité des rats. Cette activité est ensuite convertie en m/jour pour chaque rat.

Cinétique de l'activité physique spontanée de rats Wistar (A) et Lou/C (B) à thermoneutralité (TN) et exposés au froid, exprimée en m/jour, pendant 3 semaines. Les résultats des graphiques A et B sont exprimés en moyenne par jour  $\pm$  sem, n=6 par groupe.

Activité physique spontanée de rats Wistar (C) et Lou/C (D) à thermoneutralité et exposés au froid exprimée en m/jour. Les résultats des graphiques C et D sont exprimés en moyenne sur 3 semaines  $\pm$  sem, n=6 par groupe.

Les comparaisons ( $p < 0,05$ ) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher. #: thermoneutralité vs. froid.

Les résultats obtenus montrent donc que l'exposition au froid tendrait à augmenter l'activité locomotrice des rats Wistar mais réduit fortement l'activité physique spontanée des rats Lou/C, hyperactifs à thermoneutralité.

## 2. Effet de l'exposition prolongée au froid sur la fonction mitochondriale du BAT

Exposés au froid les rats augmentent leur ingéré, mais maigrissent, ce qui implique une stimulation de leur catabolisme tissulaire, probablement pour alimenter en substrats la thermogenèse de régulation. Comme le BAT contribue largement à la NST des rongeurs, nous avons caractérisé les modifications fonctionnelles des mitochondries du BAT chez les rats Lou/C acclimatés au froid par comparaison aux rats Wistar. L'activité d'UCP1 et l'abondance relative de la protéine UCP1 dans le BAT de rats Wistar et Lou/C ont été mesurées.

### 2.1 Respiration mitochondriale de BAT et activité de l'UCP1

Afin d'évaluer l'activité métabolique du tissu adipeux brun (BAT) de rats Wistar et Lou/C, nous avons mesuré la respiration mitochondriale en présence de deux substrats différents : le succinate (associé à la roténone) et le palmitoyl-carnitine / malate. Les résultats sont présentés dans le tableau III.3.

**Tableau III.3 : Effet de l'exposition au froid sur la respiration mitochondriale de BAT en présence de succinate/roténone ou palmitoyl-carnitine/malate + BSA.**

	JO <sub>2</sub> (natomO/min/mg prot) en présence de BSA							
	succinate / roténone				palm-carn / malate			
	état 2	état 4	+GDP	Effet GDP	état 2	état 4	+GDP	Effet GDP
Wistar TN	307 ± 78	257 ± 68	169 ± 40	-34%	170 ± 55	148 ± 46	75 ± 22	-49%
Wistar froid	594 ± 88 #	558 ± 88 #	329 ± 55 °	-41%	319 ± 56	268 ± 54	162 ± 43 °	-40%
Lou/C TN	184 ± 52	178 ± 53	117 ± 31	-34%	167 ± 67	139 ± 60	77 ± 26	-45%
Lou/C froid	689 ± 109 #	590 ± 106 #	326 ± 55 °	-45%	491 ± 100 #	425 ± 104 #	159 ± 54 °	-63%

Les mitochondries isolées de BAT de rats (0,1 mg/mL) Wistar et Lou/C à thermoneutralité ou exposés 3 semaines ont été incubées dans un milieu KCl avec 5 mM de succinate plus 2 µM de roténone + BSA (0,3%) ou 50 µM de palmitoyl-carnitine plus 1 mM de malate + BSA (0,3%). La consommation d'oxygène est mesurée à l'aide d'une électrode de Clark.

Les résultats sont exprimés en moyenne ± sem, n=6. Les comparaisons (p<0,05) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher. # : thermoneutralité vs. froid. La sensibilité au GDP (°) est détectée par une ANOVA mesures répétées.



Les adipocytes bruns sont constitués de nombreuses vésicules de stockage des lipides ainsi que de nombreuses mitochondries. Bien que nous ayons apporté tout le soin nécessaire à l'extraction des mitochondries de BAT de rats Wistar et Lou/C, leur environnement extrêmement riche en acides gras induit nécessairement une contamination de nos préparations de mitochondries isolées. Les résultats obtenus, sans ajout de BSA, un chélateur des acides gras, se sont donc avérés biaisés par les fortes concentrations en acides gras. En effet, les acides gras peuvent jouer un rôle de découplant entre les oxydations et les phosphorylations, mais aussi être utilisés comme substrat, rendant les données obtenues ininterprétables. Nous avons donc choisi de ne présenter que les résultats de respirations mitochondriales de BAT réalisées avec ajout de BSA.

Les résultats ainsi obtenus mettent en évidence une consommation d'oxygène par les mitochondries isolées de BAT majorée lorsque le substrat utilisé est le succinate associé à de la roténone, par comparaison à la consommation d'oxygène liée à l'utilisation du palmitoyl-carnitine / malate.

En présence de succinate / roténone, les mitochondries isolées de rats Wistar exposés trois semaines à 4°C consomment significativement plus d'oxygène que celles des rats Wistar maintenus à thermoneutralité (+ 94%). Les mêmes effets du froid sur la respiration mitochondriale de rats Wistar sont notés avec le palmitoyl-carnitine / malate (+ 88%). Nous observons une stimulation encore plus importante de la respiration de mitochondries isolées de BAT, en présence de succinate / roténone, comme de palmitoyl-carnitine / malate, chez les rats Lou/C exposés au froid (respectivement + 275% et + 194%).

*Ces premiers résultats indiquent que l'activité du BAT des rats Lou/C est stimulée avec l'exposition au froid, démontrant la forte réactivité de ce tissu et donc qu'il n'est pas déficient dans cette souche.*

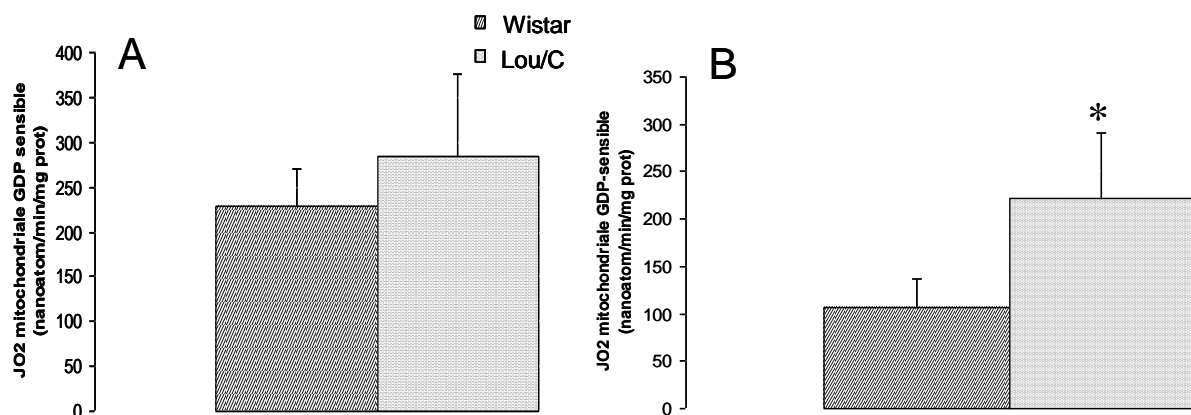
A l'état 4, c'est-à-dire en présence d'oligomycine qui inhibe l'ATP synthase, nous mettons également en évidence une majoration de la consommation d'oxygène, par les mitochondries de BAT de rats Wistar et Lou/C, avec l'exposition au froid. Nous avons vu que la respiration à l'état 4 était contrôlée principalement par les pertes d'énergie (« proton leak » ou « redox slipping ») et dans une moindre mesure par la chaîne respiratoire et les transporteurs de substrats (Brand, 1990; Pietrobon et al., 1983). Dans le cas du BAT, la respiration subsistant à l'état 4 serait liée à des fuites de protons, à travers la membrane mitochondriale interne, médiées par la protéine découplante UCP1 (Cannon and Nedergaard, 2004). Afin de vérifier que cette consommation accrue d'oxygène avec l'exposition au froid est bien liée au découplage entre oxydations et phosphorylations induit par UCP1, nous avons utilisé un inhibiteur spécifique d'UCP1 : le GDP. Après ajout de GDP dans la cuve de l'oxygraphe, il apparaît que la respiration mitochondriale à l'état 4, donc

induite par les fuites d'énergie, est inhibée de façon similaire chez les rats Wistar et Lou/C exposés au froid, en présence de succinate / roténone. Cet effet est majoré chez les rats Lou/C maintenus à 4°C, par comparaison aux rats Wistar, en présence de palmitoyl-carnitine / malate. Nous remarquons également que l'effet GDP est plus fort au froid, ce qui confirme l'activation du BAT des rats Wistar et Lou/C dans cette condition.

*Nos résultats de respiration mitochondriale permettent donc de montrer que le BAT du rat Lou/C est tout à fait activable dans les conditions classiques d'activation de ce tissu, c'est-à-dire l'exposition prolongée des rats au froid. Il apparaît également que l'effet GDP serait au moins aussi important sur la respiration mitochondriale de rats Wistar et Lou/C exposés au froid, ce qui impliquerait une activité de la protéine UCP1 accrue avec le froid pour les deux souches de rats.*

La figure III.4 nous montre la respiration mitochondriale GDP-sensible, c'est-à-dire la part de la consommation d'oxygène qui disparaît après inhibition de l'ATP-synthase par l'oligomycine et d'UCP1 par le GDP, et témoigne de l'activité de cette protéine découplante.

**Figure III.4 : Respiration GDP-sensible des mitochondries isolées de BAT de rats Wistar et Lou/C acclimatés au froid.**



Les mitochondries isolées de BAT (0,1 mg/mL) de rats Wistar et Lou/C ont été incubées dans un milieu KCl avec (A) 5 mM de succinate plus 2 µM de roténone + BSA (0,3%) ou (B) 50 µM de palmitoyl-carnitine plus 1 mM de malate ± BSA (0,3%). La consommation d'oxygène est mesurée à l'aide d'une électrode de Clark. La respiration mitochondriale GDP-sensible (nanoatom/min/mg prot) est obtenue par différence entre état 4 et état 4 + GDP.

Les résultats sont exprimés en moyenne ± sem, n=6. Les comparaisons (p<0,05) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher. \* : Wistar vs Lou/C.

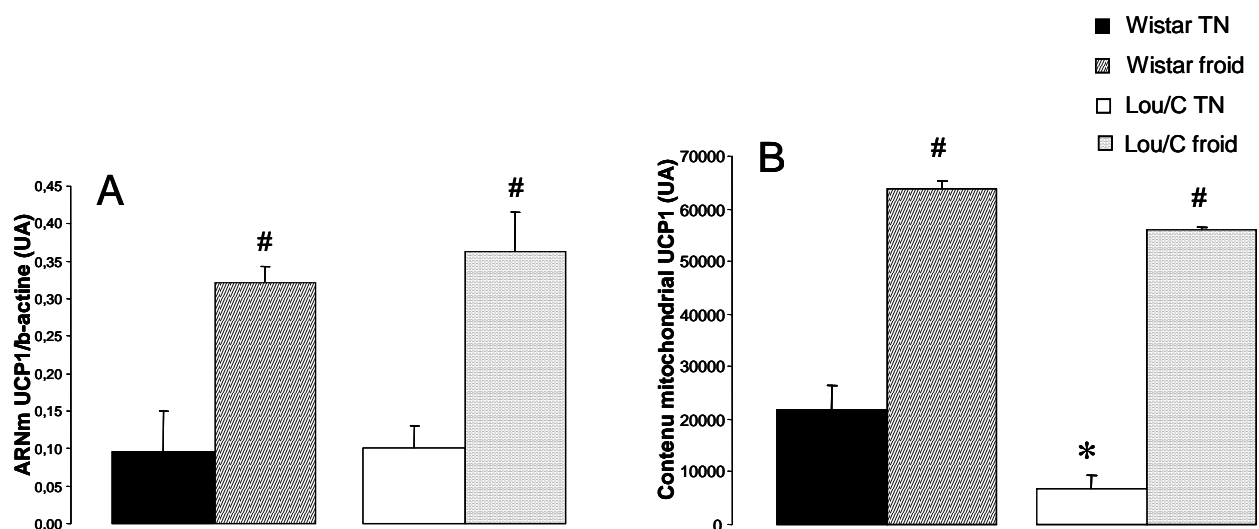
Il apparaît, qu'en présence de succinate / roténone, aucune différence n'est observée entre la respiration GDP-sensible des mitochondries isolées de BAT de rats Wistar et Lou/C exposés au froid (figure III.4A). Lorsque le substrat utilisé est le palmitoyl-carnitine / malate, nous observons que la respiration GDP-sensible est significativement plus importante pour les mitochondries de BAT de rat Lou/C, par comparaison à celle de rat Wistar (figure III.4B).

Ces résultats confirment bien que l'activité de la protéine UCP1 est augmentée dans le BAT des animaux exposés au froid, dans les mêmes proportions, voire de façon plus importante, chez les rats Lou/C par comparaison aux rats Wistar. Le BAT des animaux Lou/C est donc tout à fait activable avec l'exposition au froid.

## 2.2 Abondance relative de la protéine UCP1

Les résultats obtenus en terme d'activité fonctionnelle de la protéine UCP1 sur mitochondries isolées demandaient à être vérifiés par quantification de l'abondance relative en ARNm, par RT-PCR semi quantitative, et en protéines, par western blot, sur les deux souches de rats, à thermoneutralité et après trois semaines d'exposition au froid.

Figure III.5 : Effet de l'exposition au froid sur l'abondance relative en protéine découplante dans le BAT de rats Wistar et Lou/C.



L'abondance relative en (A) ARNm de UCP1 et (B) protéine UCP1 dans le BAT de rats Wistar et Lou/C élevés à thermoneutralité ou exposés au froid a été quantifiée à partir d'amorces et d'anticorps primaire anti-UCP1 spécifiques. La β-actine est utilisée ici comme gène de référence.

L'analyse a été réalisée avec 6 rats dans chaque groupe. Les résultats sont exprimés en moyenne ± sem et les comparaisons ( $p < 0,05$ ) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher. \* : Wistar vs. Lou/C ; # : thermoneutralité vs. froid.

Les résultats obtenus montrent que l'exposition prolongée au froid, situation connue pour induire le recrutement et l'activation du tissu adipeux brun, via l'activité de la protéine découplante UCP1, induit dans le BAT des rats Wistar et Lou/C une augmentation de l'abondance relative des ARNm codant l'UCP1 (figure III.5A) et de la protéine UCP1 (figure III.5B). En effet, dans le BAT des rats Wistar, une exposition au froid se traduit par une augmentation de 240% de la quantité relative d'ARNm d'UCP1 et de 190% de la quantité relative de protéines UCP1 dans les protéines mitochondriales de BAT. Dans le BAT des

rats Lou/C, l'exposition pendant trois semaines à 4°C induit une stimulation de 260% de la quantité relative d'ARNm d'UCP1 et de 745% de la quantité relative de protéines UCP1.

*Cette augmentation importante, d'une part, de l'activité d'UCP1, et d'autre part, de son abondance relative, au sein du BAT des rats Lou/C, tend à confirmer que le BAT des rats Lou/C est tout à fait activable lorsque la situation le nécessite, notamment pour des besoins de thermorégulation.*

Au froid, les mitochondries de BAT de chacune de ces deux souches de rats semblent plus actives, nous pouvons désormais nous demander si l'apport en substrats à ce tissu est augmenté afin d'alimenter la demande énergétique accrue.

### **3. Effet de l'exposition prolongée au froid sur l'apport en substrats au BAT**

Nous avons observé l'influence de la température d'acclimatation sur l'expression des protéines régulatrices de l'apport en substrats lipidiques et glucidiques au BAT des Wistar et Lou/C exposées au froid.

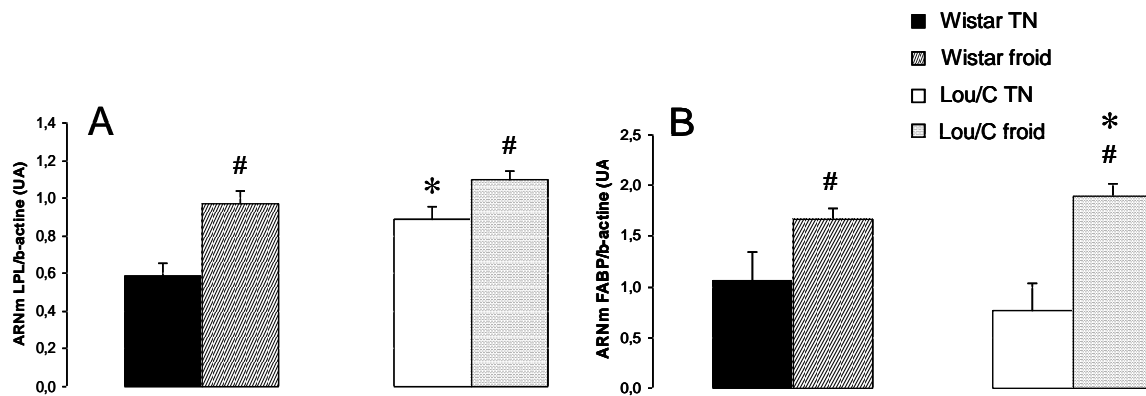
#### ***3.1 Apport en substrats lipidiques au tissu adipeux brun***

##### *3.1.1 Effet du froid sur le captage et le transport des acides gras à chaîne longue*

L'expression des deux protéines LPL et FABP<sub>PM</sub> reflète en partie le niveau d'activité des adipocytes bruns, c'est pourquoi nous avons choisi de déterminer par RT-PCR semi quantitative l'expression des transcrits de ces deux protéines dans le BAT des rats Wistar et Lou/C en fonction de l'exposition au froid. Les résultats sont présentés dans la figure III.6.

Nos résultats montrent que l'abondance relative des ARNm de la LPL (figure III.6A) et FABP<sub>PM</sub> (figure III.6B) est significativement augmentée avec l'exposition prolongée au froid, dans le BAT des rats Wistar comme des rats Lou/C. Il apparaît également que la transcription de la protéine FABP<sub>PM</sub> est significativement supérieure dans le BAT du rat Lou/C exposé au froid, par comparaison au rat Wistar exposé au froid.

**Figure III.6 : Effet de l'exposition au froid sur l'expression de gènes impliqués dans l'utilisation de substrats lipidiques par le BAT.**



L'abondance relative en ARNm de (A) LPL et (B) FABP<sub>PM</sub> dans le BAT de rats Wistar et Lou/C élevés à thermoneutralité ou exposés au froid a été quantifiée à partir d'amorces spécifiques. La  $\beta$ -actine est utilisée ici comme gène de référence.

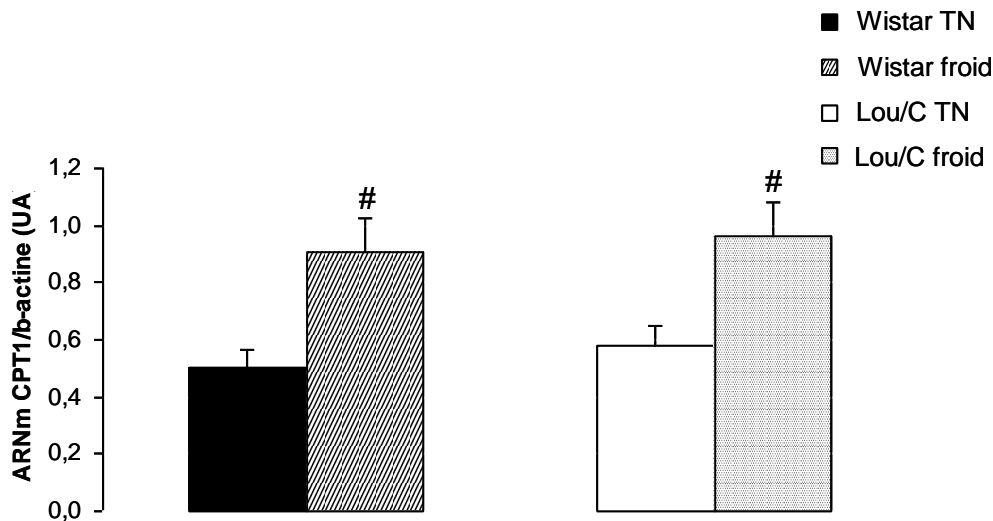
L'analyse a été réalisée avec 6 rats dans chaque groupe. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  sem et les comparaisons ( $p < 0,05$ ) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher. \* : Wistar vs. Lou/C ; # : thermoneutralité vs. froid.

*Si les variations des transcrits s'accompagnent des mêmes variations de l'activité fonctionnelle de ces protéines, ces résultats suggèrent une activation du captage et du transport des acides gras par les adipocytes bruns des rats Wistar et Lou/C après acclimatation au froid. Nous devons désormais vérifier que la transcription des gènes permettant l'entrée des acides gras dans la mitochondrie de BAT est également stimulée, afin de conclure à une éventuelle stimulation de l'apport en substrats aux processus oxydatifs mitochondriaux avec l'exposition au froid dans ces deux souches de rats.*

### 3.1.2 Effet du froid sur l'entrée des acides gras à chaîne longue dans la mitochondrie

. Nous avons réalisé une étude transcriptionnelle de CPT1 dans le BAT des rats Wistar et Lou/C maintenus à thermoneutralité ou exposés trois semaines à 4°C. Les résultats obtenus par RT-PCR semi-quantitative sont présentés dans la figure III.7.

Figure III.7 : Effet de l'exposition au froid sur l'abondance des transcrits de la protéine CPT I au niveau du BAT.



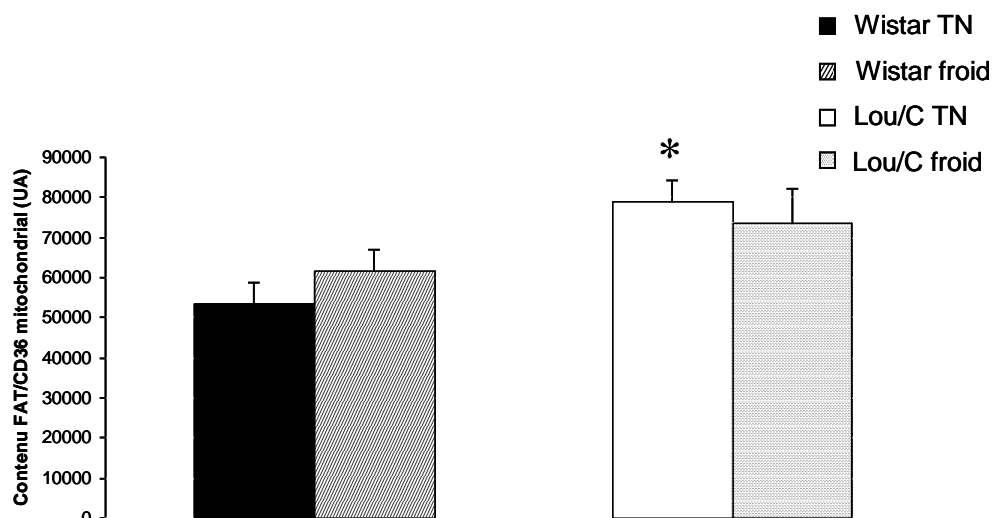
L'abondance relative d'ARNm de CPT I dans le BAT de rats Wistar et Lou/C, élevés à thermoneutralité ou maintenus trois semaines à 4°C, a été quantifiée par western blot, à partir d'amorces spécifiques.

L'analyse a été réalisée avec 6 rats dans chaque groupe. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  sem et les comparaisons ( $p < 0,05$ ) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher. \* : Wistar vs Lou/C ; # : thermoneutralité vs. froid.

Il apparaît que la quantité de transcrits de CPT1 est nettement augmentée avec l'exposition au froid dans le BAT des rats Wistar comme des rats Lou/C. *Nous n'observons cependant pas de différence d'expression de CPT1 entre les deux souches de rats restées trois semaines à 4°C. Ce résultat tend à montrer que les capacités d'entrée des acides gras dans la mitochondrie de BAT sont accrues avec l'exposition au froid, afin, probablement, de permettre une plus grande activité du tissu chez les rats Wistar et Lou/C, sans distinction entre les deux souches.*

Dans une étude précédente (Belouze et al., étude II), nous avons constaté que l'abondance relative de la protéine FAT/CD36 mitochondriale était augmentée de 46% dans le BAT des rats Lou/C, alors que l'abondance relative d'ARNm de CPT1 n'était pas significativement différente entre les rats Wistar et Lou/C. Nous nous sommes donc demandés si cette forme mitochondriale de FAT/CD36 n'interviendrait pas lors de l'exposition au froid, où les besoins en énergie sont accrues. Nous avons analysé par western blot l'abondance relative de la protéine mitochondriale FAT/CD36 dans le BAT de rats Wistar et Lou/C élevés à thermoneutralité ou exposés au froid. Les résultats obtenus sont présentés à l'aide de la figure III.8.

**Figure III.8 : Effet de l'exposition au froid sur l'abondance relative de la protéine FAT/CD36 dans le BAT des rats Wistar ou Lou/C.**



La quantité de protéine FAT/CD36 dans les mitochondries de BAT de rats Wistar et Lou/C élevés à thermoneutralité ou exposés au froid a été quantifiée par western blot, à partir d'un anticorps primaire spécifique.

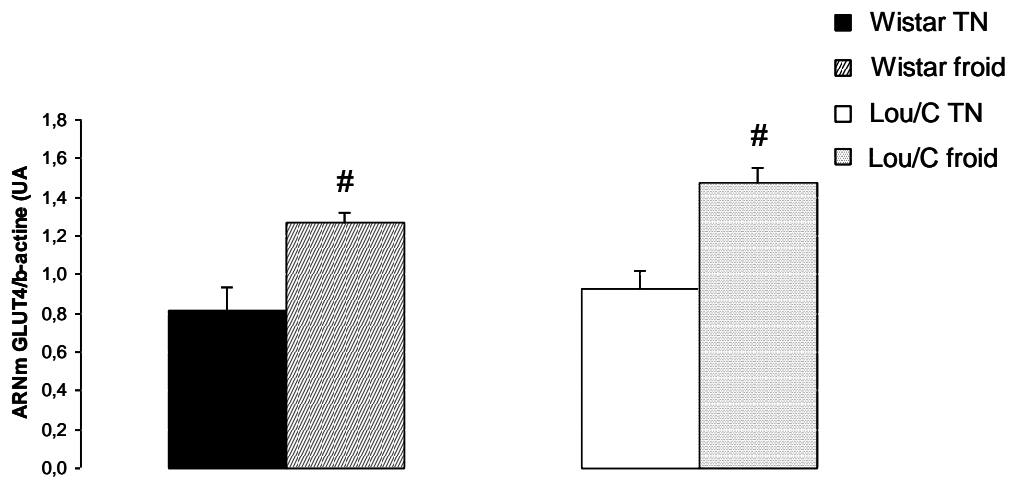
L'analyse a été réalisée avec 6 rats dans chaque groupe. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  sem et les comparaisons ( $p < 0,05$ ) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher. \* : Wistar vs. Lou/C ; # : thermoneutralité vs. froid.

Contrairement à ce qui est observé au niveau de l'expression de CPT1 dans le BAT des rats Wistar et Lou/C, l'exposition prolongée au froid n'induit pas de stimulation de l'expression de la protéine FAT/CD36. L'apparente activation du BAT avec l'exposition au froid observée au niveau mitochondrial ne serait pas corrélée avec une entrée majorée des acides gras dans la mitochondrie via FAT/CD36, mais via la protéine CPT1. Lors de l'exposition prolongée au froid, les apports en substrats lipidiques ne sont pas les seuls à être stimulés : en effet, il est possible d'observer une augmentation de l'apport en substrats glucidiques qui serait corrélée à une hyperactivité du BAT.

### **3.2 Apport en substrats glucidiques au tissu adipeux brun**

L'abondance relative de l'ARNm de GLUT4 dans le BAT des rats Lou/C et Wistar a été étudiée par RT-PCR semi-quantitative en fonction de la température d'acclimatation et les résultats sont donnés dans la figure III.9.

Figure III.9 : Effet de l'exposition au froid sur l'expression de gènes impliqués dans le captage de substrats glucidiques par le BAT.



L'abondance relative en ARNm de GLUT4 dans le BAT de rats Wistar et Lou/C élevés à thermoneutralité ou exposés au froid a été quantifiée à partir d'amorces spécifiques. La  $\beta$ -actine est utilisée ici comme gène de référence.

L'analyse a été réalisée avec 6 rats dans chaque groupe. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  sem et les comparaisons ( $p < 0,05$ ) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher. \* : Wistar vs. Lou/C ; # : thermoneutralité vs. froid.

Les trois semaines d'exposition au froid induisent une augmentation de l'abondance relative des transcrits du transporteur GLUT4 dans le BAT des rats Wistar et Lou/C. Aucune différence significative n'est observée entre l'abondance relative des ARNm de GLUT4 observée chez les rats Wistar et Lou/C exposés au froid.

*Il apparaît, qu'avec l'exposition au froid, l'abondance relative des transcrits de LPL, FABP<sub>PM</sub>, CPT1 et GLUT4 est nettement augmentée. Ces résultats suggèrent que le captage et l'entrée des substrats dans les adipocytes et la mitochondrie pourraient être accrus avec le froid, dans le BAT des rats Wistar et Lou/C, dans l'hypothèse où les variations de transcrits s'accompagnent des variations fonctionnelles des protéines. L'exposition prolongée au froid induirait bien une stimulation du BAT ce qui prouverait que le BAT des rats Lou/C serait tout à fait réactivable en cas de besoin, comme le suggéraient nos résultats en terme de fonctionnement mitochondrial.*

### 3.3 Régulation du métabolisme lipidique dans le tissu adipeux brun

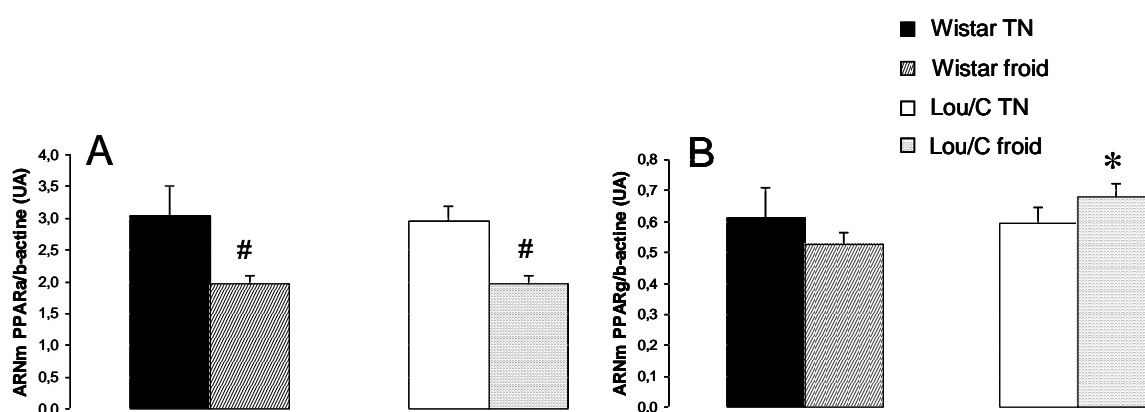
Pour rendre compte de l'activation observée du BAT au froid, nous avons recherché une modulation possible par l'expression de facteurs nucléaires de régulation.



### 3.3.1 « Peroxisome proliferator-activated receptors » alpha et gamma

Dans cette partie, nous avons quantifié l'expression relative des transcrits de PPAR $\alpha$  et de PPAR $\gamma$ , par RT-PCR semi-quantitative, sur des échantillons de BAT de rats Wistar et Lou/C maintenus à thermoneutralité ou exposés trois semaines à 4°C. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure III.10.

Figure III.10 : Effet de l'exposition au froid sur l'expression de gènes impliqués dans la régulation du métabolisme lipidique de BAT.



L'abondance relative en ARNm de (A) PPAR $\alpha$  et (B) PPAR $\gamma$  dans le BAT de rats Wistar et Lou/C élevés à thermoneutralité ou exposés au froid a été quantifiée à partir d'amorces spécifiques. La  $\beta$ -actine est utilisée ici comme gène de référence.

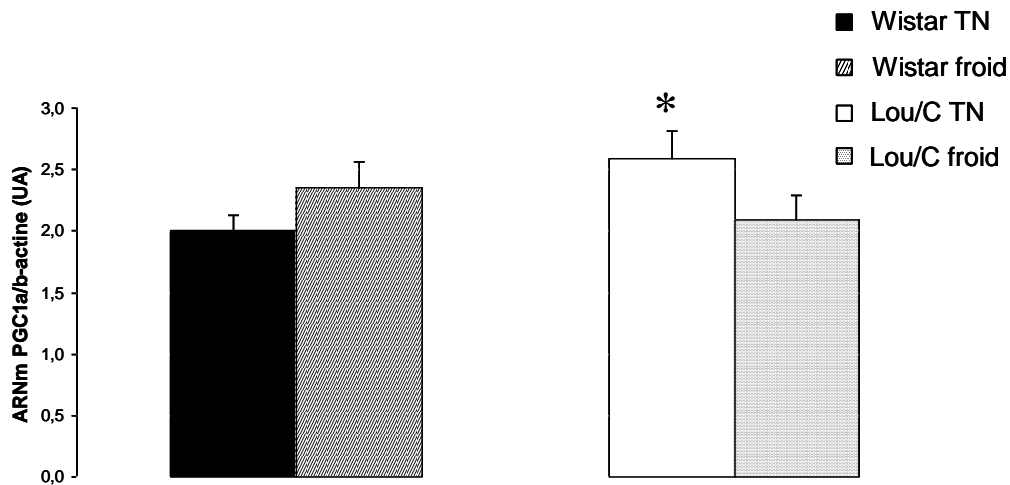
L'analyse a été réalisée avec 6 rats dans chaque groupe. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  sem et les comparaisons ( $p < 0,05$ ) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher. \*: Wistar vs. Lou/C ; #: thermoneutralité vs. froid.

Il apparaît que l'exposition prolongée au froid induit une diminution de l'abondance relative en ARNm de PPAR $\alpha$  dans le BAT des rats Wistar et Lou/C (figure III.10A), mais reste sans effet sur l'abondance relative des ARNm de PPAR $\gamma$  dans le BAT des animaux de souche Wistar comme Lou/C (figure III.10B). Les résultats obtenus montrent toutefois que l'abondance relative des ARNm de PPAR $\gamma$  serait supérieure dans le BAT des rats Lou/C exposés au froid par comparaison aux rats Wistar également exposés au froid. *La transcription de PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$  ne serait pas augmentée avec l'exposition prolongée au froid, elle serait même diminuée dans le cas de PPAR $\alpha$ .*

### 3.3.2 « Peroxisome proliferator-activated receptors- $\gamma$ coactivator 1alpha »

L'abondance relative des transcrits de PGC-1 $\alpha$  a également été déterminée et les résultats apparaissent dans la figure III.11.

Figure III.11 : Effet de l'exposition au froid sur l'expression de PGC-1 $\alpha$ , impliqué dans la biogenèse mitochondriale de BAT.



L'abondance relative en ARNm de PGC1 $\alpha$  dans le BAT de rats Wistar et Lou/C élevés à thermoneutralité ou exposés au froid a été quantifiée à partir d'amorces spécifiques. La  $\beta$ -actine est utilisée ici comme gène de référence.

L'analyse a été réalisée avec 6 rats dans chaque groupe. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  sem et les comparaisons ( $p < 0,05$ ) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher. \* : Wistar vs. Lou/C ; # : thermoneutralité vs. froid.

Nos résultats ne mettent pas évidence un effet de l'exposition au froid sur l'abondance relative des transcrits de PGC-1 $\alpha$  dans le BAT des rats Wistar, comme Lou/C. *Ces résultats surprenants ne sont pas en accord avec ceux obtenus concernant l'activité mitochondriale et les gènes codant différents transporteurs de substrats dans le BAT des animaux exposés au froid. Pour cette raison, ils restent donc à discuter à la lumière d'études précédentes, et à compléter par l'abondance relative des protéines, voire leur activité.*

## DISCUSSION

Les résultats obtenus montrent que le BAT du rat Lou/C est activable lors d'une exposition prolongée au froid dans des proportions même plus importantes que chez le rat Wistar. Cette activation répond à l'accroissement de la thermogénèse de régulation.

Pour tester la réactivité du BAT du rat Lou/C, nous avons utilisé l'exposition prolongée au froid, connue pour induire une activation du BAT basée sur une hypertrophie, ainsi qu'une hyperplasie tissulaire, accompagnées d'une activation thermogénique des adipocytes bruns contenant plus de protéines découplantes UCP1 pour des besoins de thermogénèse (Cannon and Nedergaard, 2004). Nous n'avons pas mesuré directement la thermogénèse de régulation mais l'exposition prolongée au froid s'accompagne d'une forte augmentation de la prise alimentaire chez les rats Wistar et Lou/C (+ 46% et +49%) et d'un

amaigrissement important attestant d'un besoin accru de substrats énergétiques. Une augmentation de la dépense énergétique est également suggérée par les variations des masses tissulaires, notamment par celle du cœur qui est généralement hypertrophié chez les petits rongeurs au froid (Hammond et al., 2001 ; Winkler and Klingenberg, 1994). Nous avons constaté qu'aux deuxième et troisième semaines d'exposition au froid, la prise alimentaire des rats Lou/C était significativement supérieure à celle des rats Wistar. Le rat Lou/C ayant une adiposité réduite (Couturier et al., 2002; Perrin et al., 2003b; Servais et al., 2003; Soulage C, 2008), sa couche de graisse sous-cutanée est par conséquent inférieure et ne doit pas assurer une isolation optimale comme chez le rat Wistar. Le rat Lou/C soumis à un stress froid présente donc plus de pertes thermiques avec l'environnement. La faible taille du rat Lou/C induit probablement un rapport surface / volume supérieur à celui des rats Wistar et très défavorable au froid. Afin de maintenir sa température corporelle à un niveau élevé et constant, il devrait logiquement produire plus de chaleur que le rat Wistar en cohérence avec un ingéré supérieur. La plus faible perte de masse corporelle observée chez le rat Lou/C au froid (- 7% contre - 21% chez le Wistar) pourrait résulter d'une meilleure couverture de ses besoins énergétiques par un plus fort ingéré alimentaire afin de préserver des réserves corporelles plus faibles. Cette suggestion paraît étayée par la masse de tissu adipeux blanc (WAT) des animaux qui diminue très nettement chez les rats Wistar et Lou/C. Si la variation relative de masse grasse (-70%) est équivalente dans les deux souches, en terme d'énergie fournie à l'organisme, cela représente une différence très importante. En masse totale de graisse, et donc en énergie fournie, cela correspondrait à 69 g de graisse chez le Wistar contre 23g chez le Lou/C en considérant la composition corporelle des rats et en attribuant à la masse grasse le même facteur de variation que celui observé dans le dépôt adipeux. Même si quantité totale de graisse est moindre chez le rat Lou/C, après trois semaines d'exposition à 4°C, il est extrêmement maigre et sa survie à long terme s'en trouve probablement compromise.

L'exposition au froid tendait à augmenter l'activité physique spontanée des rats Wistar alors qu'elle réduisait celle des rats Lou/C. Même réduite au froid, l'activité des rats Lou/C restait toutefois très nettement supérieure à celle des rats Wistar. Des variations d'activité spontanée ont déjà été observées en réponse à des variations de la température ambiante. Au chaud, les rongeurs montrent habituellement une augmentation importante de leur activité locomotrice spontanée (Clark, 1971 ; Roberts et al., 1974), probablement en relation avec une tentative de recherche d'une issue de secours chez ces animaux soumis à un stress important. En effet cette réponse ne confère aucun avantage adaptatif puisque la survie des rats soumis à ce stress chaud est inversement proportionnelle à leur activité locomotrice spontanée qui produit de la chaleur en excès (Clark, 1971). Au froid, augmenter son activité physique spontanée pourrait donc être une stratégie pour les animaux pour

produire de la chaleur. Ainsi, il a été montré que les rats Zucker obèses, ayant un BAT défectueux, augmentent leur activité physique spontanée pour générer une chaleur qui participe à leur thermorégulation et compensent ainsi le déficit de thermogenèse du BAT (Girardier et al., 1995). En revanche, les rats Zucker « maigres » augmentent leur activité physique spontanée de façon moins prononcée puisque leur BAT contribue à 60% dans la réponse thermogène à l'exposition au froid. Les rats Wistar de notre étude tendent à courir légèrement plus au froid, mais l'essentiel de leur thermogenèse de régulation peut dépendre de la thermogenèse du BAT. Un BAT déficient devrait conduire les rats Lou/C, comme les rats obèses, à utiliser la thermogenèse induite par l'activité spontanée, or ces animaux montrent, au contraire, une activité physique spontanée réduite lors de l'exposition au froid, ce qui tendrait à prouver que leur BAT est bien activable. Pour le rat Lou/C, petit et maigre et donc peu isolé thermiquement, l'activité physique spontanée au froid peut certes générer de la chaleur mais elle peut également imposer un coût énergétique supplémentaire lié à l'augmentation des pertes de chaleur par convection périphérique. Le rat Lou/C serait donc contraint de limiter son activité physique spontanée au froid, et de privilégier la chaleur produite par son BAT pour survivre. L'exercice au froid déséquilibrerait donc fortement la balance énergétique du rat Lou/C qui se retrouverait dans une situation de balance énergétique négative pouvant contribuer à diminuer l'activité de tissus dissipateurs d'énergie tels que le BAT. Nous pourrions proposer un concept de « compromis métabolique », où la thermogenèse induite par l'activité physique doit compléter la thermogenèse induite par le BAT, sans que la dépense énergétique générée ne soit néfaste à la survie du rat Lou/C.

Les résultats que nous avons obtenus montrent que, comme attendu, l'exposition prolongée au froid induit une stimulation significative de la respiration mitochondriale de BAT aux stades 2 et 4 chez le rat Wistar en présence de succinate / roténone et chez le rat Lou/C en présence des deux types de substrats : succinate / roténone, et palmitoyl-carnitine / malate. Ces résultats, associés à la très forte augmentation de la taille du BAT avec l'exposition au froid dans chacune des deux souches de rats, suggèrent que le BAT est fortement activé dans nos conditions expérimentales. En effet, un BAT plus actif, et particulièrement une augmentation des capacités thermogènes de ce tissu, se traduisent par une mitochondriogenèse, ainsi qu'une prolifération et une différenciation accrue des cellules adipeuses (Cannon and Nedergaard, 2004). L'augmentation de la masse du BAT ne constitue cependant qu'un indicateur de l'activité du tissu car un BAT chargé de lipides peut peser plus lourd alors qu'il ne sera pas nécessairement plus actif (Cannon and Nedergaard, 2004). Nos résultats montrent une activation fonctionnelle du BAT comme l'atteste la consommation d'oxygène mitochondriale accrue suite à l'exposition prolongée au froid dans le BAT des rats Wistar et Lou/C. Cette fonctionnalité accrue est attestée également par la

plus forte inhibition de la respiration par le GDP après exposition au froid. L'effet du GDP sur la respiration liée aux fuites de protons serait même majoré chez les rats Lou/C surtout en présence de palmitoyl-carnitine / malate, suggérant une activité accrue de la protéine UCP1 dans le BAT des rats Lou/C exposés au froid. Cette activité mitochondriale accrue est corrélée avec l'augmentation de près de 250% de l'abondance relative en ARNm d'UCP1 dans le BAT des rats Wistar et Lou/C exposés au froid et de l'abondance de la protéine UCP1 dans le BAT des rats Wistar (+190%) et des Lou/C (+745%). L'abondance relative de protéine UCP1 semble donc beaucoup plus importante dans le BAT des rats Lou/C exposés au froid. Ce résultat est cohérent avec l'activité de la protéine UCP1 déterminée sur mitochondries isolées.

*Nous pourrions envisager que le rat Lou/C, dont la couche de graisse sous-cutanée isolante est très mince et dont les réserves lipidiques sont bien inférieures à celle du rat Wistar, doit, pour survivre au froid, accroître ses mécanismes thermogènes dépendants du BAT, comme semblent l'attester la plus grande quantité de protéine UCP1, et la plus grande activité de cette protéine, par comparaison au rat Wistar. L'activité thermogène du BAT, coûteuse en énergie, impliquerait également que le rat Lou/C augmente plus son ingéré que le rat Wistar, et limite son activité physique spontanée, lorsqu'il est exposé au froid, afin de préserver au mieux ses stocks d'énergie. Enfin, ces résultats semblent bien montrer que le BAT du rat Lou/C est tout à fait activable, et par conséquent qu'il n'est nullement déficient. Afin d'être efficace en terme de thermogénèse, le BAT doit également être doté de capacités accrues à mobiliser ces substrats.*

Une activité thermogène accrue du BAT nécessite un apport accru de substrats (Cannon and Nedergaard, 2004). Nous avons réalisé une approche moléculaire visant à quantifier les principaux systèmes permettant l'hydrolyse des triglycérides (LPL), le transport (FABP<sub>PM</sub>) ou l'entrée de ces substrats dans la mitochondrie (CPT1, FAT/CD36). Nos résultats montrent une stimulation importante de la transcription de LPL et FABP<sub>PM</sub>, dans le BAT des rats Wistar comme Lou/C, avec l'exposition prolongée au froid. Nous notons également que l'abondance relative des transcrits FABP<sub>PM</sub> est significativement augmentée chez le rat Lou/C exposé au froid par comparaison au rat Wistar exposé au froid. Ces données sont en accord avec un certain nombre de travaux antérieurs stipulant que l'expression de la LPL est augmentée avec l'acclimatation au froid. De plus, la noradrénaline (NA) est connue pour accroître l'activité de la LPL, essentiellement en stimulant le taux de transcription du gène de la LPL (Carneheim et al., 1984; Radomski and Orme, 1971). La quantité d'ARNm de LPL, dont la demie vie est assez longue, semble être un bon indicateur de l'activité de la LPL, par comparaison avec la quantité de protéine, dont la demie vie est très courte (Cannon and Nedergaard, 2004). Concernant FABP<sub>PM</sub>, il n'existe pas ou très peu

de données bibliographiques sur son induction avec l'exposition prolongée au froid. Une étude montre que la forme cardiaque de la protéine FABP cytosolique (H-FABP) est retrouvée dans le BAT et non dans le tissu adipeux blanc du rat, ce qui en fait un marqueur spécifique de l'action du froid sur le transport des acides gras dans le BAT. Les auteurs observent une stimulation franche de la transcription de H-FABP dans le BAT de rats exposés au froid. Comme pour la LPL, le contrôle de la transcription de ce gène serait dépendant de la NA (Daikoku et al., 1997). Nous pourrions donc supposer que la forme membranaire de FABP serait régulée également par la NA, et stimulée lors de l'exposition au froid, connue pour induire une forte sécrétion de NA. Nos résultats tendraient donc à montrer un plus grand apport en acides gras à la cellule adipeuse brune avec l'exposition au froid, chez les rats Wistar et Lou/C.

Nos résultats font état d'une augmentation significative de l'abondance relative des ARNm de CPT1 dans le BAT des rats Wistar et Lou/C après exposition prolongée au froid. Les propriétés thermogènes du BAT lors de l'acclimatation au froid impliquent une augmentation de la masse du BAT, ainsi que du nombre de ses mitochondries, de la quantité de protéine découplante UCP1 et de la disponibilité en acides gras. Un BAT plus actif devrait se caractériser par une augmentation de l'entrée de substrats lipidiques dans la mitochondrie de BAT, c'est pourquoi nous nous attendions à une augmentation des transcrits de CPT1 dans le BAT avec l'exposition prolongée au froid. Peu d'études nous renseignent clairement à ce sujet ; néanmoins, des auteurs se sont interrogés sur l'implication du mitoprotéome dans les processus d'acclimatation au froid. CPT1 n'était pas détectée par la technique utilisée. En revanche, après 3 semaines d'exposition à 2°C, une augmentation importante de la malonyl-CoA carboxylase était observée (Navet et al., 2007). Cette enzyme ayant la capacité de lier le malonyl-CoA, un inhibiteur de la CPT1, elle l'empêche d'inhiber la CPT1. Les auteurs proposent donc que la CPT1 serait moins inhibée dans le BAT de rats exposés au froid, donc plus active, ce qui corroborerait nos résultats sur l'ARNm de CPT1. De plus, cette étude montre une régulation positive de la carnitine-O-acétyltransférase, qui permet l'entrée des acides gras à chaîne courte dans la mitochondrie de BAT, avec l'exposition au froid. Nous avons également testé l'hypothèse d'un rôle potentiel de FAT/CD36 dans le BAT des animaux exposés au froid. Nos résultats ne mettent pas en évidence d'effet spécifique du froid sur l'abondance de la protéine FAT/CD36 mitochondriale, mais constituent une approche inédite dans le BAT. Il est également possible que cette protéine soit suffisamment abondante même chez les rats à neutralité thermique pour ne pas limiter une entrée accrue d'acides gras dans les mitochondries lors de l'acclimatation au froid. Toutefois, une éventuelle interaction de FAT/CD36 et CPT1 au niveau de la membrane mitochondriale de BAT n'est pas à exclure puisque nos résultats ne tiennent pas compte de l'activité de la protéine qui pourrait être directement dépendante de

la quantité de la CPT1 dans la mitochondrie de BAT. L'ensemble de nos résultats restent favorable à une augmentation du captage des acides gras par les adipocytes bruns, une entrée accrue de ces acides gras dans la mitochondrie, comme en attestent les variations de l'abondance relative des transcrits de LPL, FABP<sub>PM</sub> et CPT1. Ces résultats constituent un élément supplémentaire qui démontre l'activation du BAT suite à l'exposition au froid aussi bien chez les rats Wistar que Lou/C.

Le glucose représente également un substrat de choix lors de l'acclimatation au froid, c'est pourquoi nous nous sommes intéressés au transporteur du glucose GLUT4, et son expression dans le BAT des rats Wistar et Lou/C exposés au froid. Notre étude montre une augmentation de l'abondance relative des transcrits GLUT4 avec l'exposition au froid, dans les mêmes proportions, dans le BAT des rats Wistar et Lou/C. Ces données sont confirmées par une étude montrant que l'entrée de glucose et son utilisation sont fortement accrues dans le BAT au cours de l'acclimatation au froid (Cannon and Nedergaard, 2004; Greco-Perotto et al., 1987). L'apport en substrats lipidiques et glucidiques serait donc augmenté avec l'exposition prolongée au froid, dans le BAT des deux souches de rats. Cependant, comme les régulations post-transcriptionnelles et post-traductionnelles de ces transporteurs sont nombreuses, il convient d'être prudents et il faudra confirmer ultérieurement ces données par une mesure de l'abondance et de l'activité fonctionnelle de ces protéines. Ces résultats confirment cependant une activation du BAT chez les rats Lou/C exposés au froid, de façon équivalente à ce qui peut être observé chez le rat Wistar.

Nos résultats mettent en évidence une diminution significative de l'abondance relative de transcrits de PPAR $\alpha$  et une absence d'influence de l'exposition au froid sur l'abondance relative des ARNm de PPAR $\gamma$  dans le BAT des rats Wistar et Lou/C. Ces résultats sont *a priori* surprenant car l'activation de la biogenèse mitochondriale se ferait via PGC-1 $\alpha$  et des facteurs tels que NFR (« nuclear respiratory factor ») et mtTFA (« mitochondrial transcription factor A ») (Gomez-Ambrosi et al., 2001; Puigserver et al., 1998), ainsi que via l'augmentation de l'expression d'enzyme du métabolisme lipidique et de l'UCP1 impliquant les PPARs (Klingenspor, 2003). Il apparaît donc, contre toute attente, que malgré une activation du BAT, suite à trois semaines d'exposition à 4°C, suggérée par l'augmentation de la masse du tissu, ainsi que de ses capacités thermogènes et de la quantité de protéine UCP1, l'abondance relative des transcrits de PPARs n'est pas augmentée. Des résultats similaires ont toutefois été rapportés dans la littérature. En effet, les ARNm des différents sous-types de PPARs sont régulés différemment, dans le BAT, au cours de l'exposition au froid. La quantité d'ARNm de PPAR $\alpha$  et de PPAR $\gamma$  est largement diminuée après 5 heures d'exposition au froid. A partir de 10 jours d'exposition au froid, la quantité d'ARNm de PPAR $\alpha$  augmente progressivement, mais reste légèrement inférieure à celle obtenue dans le BAT

des animaux témoins, après 21 jours de froid. De même, la quantité d'ARNm de PPAR $\gamma$  croît graduellement à partir de 5 jours d'exposition au froid, et n'est pas différente de celle quantifiée dans le BAT des rats témoins après 21 jours d'exposition au froid (Guardiola-Diaz et al., 1999). Au cours de la première phase d'exposition au froid, c'est-à-dire pendant les semaines 1 et 2, une augmentation importante de la prolifération de pré-adipocytes est observée (Rehmark and Nedergaard, 1989), sans augmentation de la prolifération des péroxysomes (Guardiola-Diaz et al., 1999). La déplétion en ARNm de PPARs qui est notée au cours de cette phase éviterait que les PPARs interfèrent avec la phase proliférative. Au cours de la seconde phase d'acclimatation au froid, c'est-à-dire pendant les semaines 3 et 4, les quantités d'ARNm PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$  augmentent jusqu'à atteindre le niveau d'expression obtenu dans le BAT des rats témoins. Ce résultat est corrélé avec une stimulation du volume de péroxysomes et de l'activité des enzymes de la  $\beta$ -oxydation (Guardiola-Diaz et al., 1999). De plus, les souris n'exprimant pas PPAR $\gamma$  sont dépourvues de BAT (Rosen et al., 1999), ce qui démontre bien l'implication de PPAR $\gamma$  dans la différenciation de ce tissu. Nous pourrions supposer que le retour à une expression « normale » des PPARs agirait comme un stimulus suffisant pour induire la stimulation du métabolisme lipidique et de l'expression de la protéine UCP1, processus nécessaires à l'acclimatation au froid.

Il a été montré que PPAR $\gamma$  est nécessaire et suffisant pour l'induction de la différenciation du tissu adipeux blanc, et nécessaire, mais non suffisant pour la différenciation du BAT (Rosen et al., 1999). Plusieurs éléments suggèrent que PGC-1 $\alpha$  serait impliqué dans ce processus (Puigserver et al., 1998). En effet, lorsqu'il est introduit dans les cellules adipeuses blanches, PGC-1 $\alpha$  induit l'expression endogène d'UCP1, et la biogenèse mitochondriale, deux éléments essentiels dans la différenciation du BAT. Pour ces raisons, nous avons quantifié l'abondance relative d'ARNm de PGC-1 $\alpha$  dans le BAT de rats Wistar et Lou/C exposés trois semaines au froid. Nos résultats ne montrent pas d'effet significatif du froid sur la transcription de PGC-1 $\alpha$  dans le BAT de rats Wistar et Lou/C. Ce résultat surprenant pourrait être lié au fait que nous avons mesuré seulement la quantité d'ARNm et non la quantité de protéine PGC-1 $\alpha$ . Nous pourrions supposer que la demie vie de l'ARNm de PGC-1 $\alpha$  est trop courte pour qu'il reste présent dans le BAT des rats après trois semaines d'exposition au froid. Il est envisageable que la quantité d'ARNm de PGC-1 $\alpha$  soit augmentée après 10 jours d'exposition au froid, lorsque la quantité d'ARNm de PPAR $\gamma$  est de nouveau importante. PGC-1 $\alpha$  et PPAR $\gamma$  agirait alors conjointement dans la différenciation des adipocytes bruns. Après trois semaines de froid, le BAT est activé et la quantité d'ARNm de PGC-1 $\alpha$  revient à son niveau basal, comme pourrait en attester nos résultats.



## CONCLUSION

Lors d'une exposition au froid le rat Lou/C augmente son ingéré et maigrit comme le Wistar pour alimenter une thermogenèse de régulation. Contrairement au rat Wistar qui accroît son activité locomotrice spontanée au froid, le rat Lou/C la réduit probablement pour limiter la déperdition de chaleur associée. Le BAT du rat Lou/C est parfaitement activable au froid comme l'attestent l'hypertrophie marquée de ce tissu associée à une stimulation de la respiration des mitochondries isolées du BAT, de l'activité et de l'abondance de la protéine UCP1, ainsi que l'augmentation de l'abondance des transcrits de différentes protéines impliquées dans le transport des substrats (LPL, FABP, GLUT4), et l'entrée des acides gras dans la mitochondrie (CPT1). Ces variations témoignent d'une activation thermogène du BAT plus marquée chez le rat Lou/C que chez le rat Wistar de même âge. Ces résultats montrent que le rat Lou/C peut réaliser un compromis énergétique entre thermogenèse liée à l'activité physique et à l'activation de son BAT.

Le BAT du rat Lou/C n'étant pas déficient, cela fait du rat Lou/C un modèle original de régulation de la balance énergétique, dissipant l'énergie superflue, limitant ainsi le stockage excessif, sans hyperstimulation du BAT. La dissipation de l'énergie alimentaire superflue chez le rat Lou/C doit impliquer d'autres tissus.

## Etude IV :

Quels tissus pourraient  
être impliqués dans la DE  
supérieure du rat

Lou/C ?

Influence de l'activité  
physique spontanée et de  
cycles futiles.



## Contribution du foie et de cycles futiles de synthèse et d'oxydation des lipides à la maigreur du rat Lou/C.

Maud BELOUZE<sup>1</sup>, Brigitte SIBILLE<sup>2</sup>, Jean-Louis ROUANET<sup>1</sup>, Damien ROUSSEL<sup>1</sup>, Dominique LETEXIER<sup>1</sup>, Fabien FORCHERON, Caroline ROMESTAING<sup>1</sup>, Delphine BAETZ<sup>1</sup>, Claude DUCHAMP<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Laboratoire de Physiologie Intégrative, Cellulaire et Moléculaire, Université Lyon 1, Lyon, CNRS, 43 Bvd 11 Novembre 1918, F-69622 Villeurbanne Cedex, France.

<sup>2</sup> INSERM U907, Université de Nice-Sophia Antipolis, Faculté de Médecine, 28 avenue de Valombrose, 06107 Nice, France.

### RESUME

Le rat Lou/C est un rat maigre et hyperactif, issu de la souche Wistar, présentant une dépense énergétique accrue en dépit d'une moindre activation thermogène de son tissu adipeux brun (BAT) (Belouze *et al.*, études I et II). Le but de ce travail était de pointer le(s) tissu(s) responsable(s) de la dissipation de l'énergie ingérée en excès chez le rat Lou/C. Les rôles potentiels du muscle squelettique au repos et en liaison avec l'hyperactivité locomotrice spontanée du rat Lou/C, du foie et du tissu adipeux blanc dans la dépense énergétique accrue du rat Lou/C par comparaison au rat Wistar ont été recherchés.

Les résultats obtenus montrent que la forte activité physique spontanée des rats Lou/C ayant eu accès à une roue d'activité n'affecte pas l'activité fonctionnelle des mitochondries isolées de BAT, de muscle squelettique ou de foie. Chez les rats sédentaires, aucune différence fonctionnelle n'est observée pour les mitochondries musculaires entre les deux souches de rats. En revanche, nous mettons en évidence un découplage partiel des oxydations phosphorylantes dans les mitochondries hépatiques. L'association de faibles concentrations circulantes de triglycérides avec des capacités accrues de i) lipogenèse dans le foie et le tissu adipeux blanc et ii) d'oxydation des lipides dans le foie et tissu adipeux blanc suggère l'existence de cycles futiles, potentiellement dissipateurs d'énergie, entre le foie et le tissu adipeux blanc.

Ces résultats mettent en évidence le rôle potentiel du foie et de cycles futiles de synthèse et d'oxydation des lipides dans la dépense énergétique accrue et la meilleure régulation de la balance énergétique du rat Lou/C.

## INTRODUCTION

Contrairement au grand nombre de modèles animaux développant une obésité spontanée ou en réponse à l'environnement, peu de modèles nous permettent d'étudier les mécanismes à l'origine de la résistance à l'obésité. Pourtant chez de nombreuses espèces, la variabilité individuelle face à des environnements obésogènes est manifeste. Le rat Lou/C est un rat maigre, issu de la souche Wistar, et présentant deux caractéristiques principales : une activité physique spontanée très importante (Garait et al., 2005; Perrin et al., 2003b; Servais et al., 2003; Soulage C, 2008) ; ainsi qu'une masse corporelle inférieure à celle du rat Wistar, et une limitation des dépôts adipeux en dépit de l'âge (Couturier et al., 2002; Veyrat-Durebex and Alliot, 1997 ).

Le tissu adipeux brun (BAT) est fortement thermogène, et est impliqué classiquement dans la régulation de la balance énergétique des rongeurs. La protéine UCP1, présente dans la membrane interne des adipocytes bruns, a la propriété d'augmenter la conductance aux protons de la membrane interne mitochondriale, facilitant ainsi le retour des protons vers la matrice mitochondriale (Nicholls and Locke, 1984). La conséquence de cette dissociation entre les oxydations et les phosphorylations est une stimulation des oxydations, donc de la respiration, sans augmentation concomitante de la synthèse d'ATP. L'UCP1 dissipe ainsi sous forme de chaleur l'énergie générée par l'oxydation des substrats (Cannon and Nedergaard, 2004; Himms-Hagen, 1983; Rothwell and Stock, 1982; Rothwell and Stock, 1984; Rothwell and Stock, 1997). Toutefois, des résultats récents ont montré que le BAT des rats Lou/C n'était pas hyperactif si on le comparait avec celui des rats Wistar (Belouze et al., étude II).

En dehors du BAT, d'autres tissus peuvent participer à une dépense énergétique accrue. Le muscle squelettique notamment pourrait également contribuer à la dépense globale de par sa masse relative importante et son activité contractile et grâce à l'existence de fuites de protons (« leak ») à travers la membrane mitochondriale interne qui participent à près de la moitié de la dépense énergétique du muscle squelettique au repos (Rolfe and Brand, 1996). Ces auteurs ont également calculé que les fuites de protons seules dans le muscle squelettique de rat participeraient à hauteur de 20% à la dépense énergétique de repos de l'organisme entier (Rolfe and Brown, 1997).

De par ses multiples fonctions métaboliques chez les mammifères et les oiseaux, et par sa position privilégiée dans la circulation sanguine, le foie est un carrefour métabolique vital. Sa participation au métabolisme de repos de l'animal entier n'est pas négligeable chez les rongeurs (20%) (Foster and Frydman, 1978), compte tenu de sa masse relativement faible (environ 3 à 4% de la masse corporelle). Outre la participation certaine du tissu adipeux brun (BAT) dans l'acclimatation au froid chez les mammifères, de nombreux travaux

suggèrent la contribution du foie dans la thermogénèse de régulation. Cette suggestion repose sur le rôle du foie comme carrefour métabolique, et comme régulateur de la glycémie et du métabolisme lipidique. De plus, le foie participerait à des mécanismes dissipateurs d'énergie chez le rat (Ma et al., 1987) qui interviendraient notamment dans la thermogénèse alimentaire. Après génération d'un gradient de protons, les fuites de protons, à travers la membrane composée de phospholipides, de liposomes obtenus à partir de mitochondries isolées de foie de rat, ont été mesurées. Elles ne représentent que 5% des fuites totales de protons observées à travers la membrane des mitochondries isolées (Brookes et al., 1997). 95% des fuites de protons au travers des membranes mitochondriales hépatiques seraient donc dues au « leak » induit par des protéines.

Un tissu impliqué dans une dissipation excessive de chaleur devrait être doté à la fois de mécanismes thermogènes potentiels et de capacités accrues de captage cellulaire, de synthèse, de transport et d'oxydation des substrats énergétiques glucidiques et lipidiques. Les protéines régulatrices de ces différentes étapes devraient donc être plus fortement exprimées dans un tissu avec un rôle dissipateur d'énergie accru. Il convient également d'identifier des processus futiles de dissipation d'énergie soit en liaison avec une perméabilité accrue des membranes comme par exemple au niveau des membranes mitochondriales, soit en liaison avec un travail cellulaire accru. Le lien entre « leak » induit par des protéines et thermogénèse est controversé dans le muscle squelettique et le foie (Goglia and Skulachev, 2003; Samec et al., 1998). Récemment, il a été découvert, chez le rongeur, que des cycles futiles entre lipogénèse *de novo* et oxydation de lipides, stimulés par la leptine, pourraient être responsables d'une augmentation de la dépense énergétique (Reidy and Weber, 2002; Solinas et al., 2004; Wijers et al., 2009).

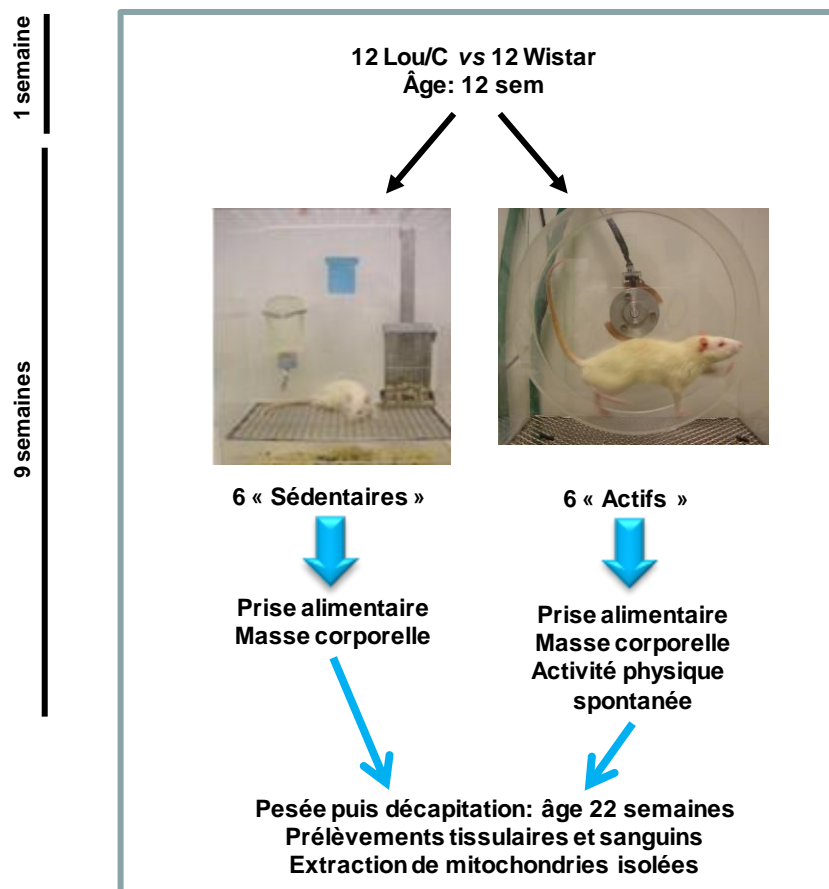
Le but de ce travail a été de rechercher le(s) tissu(s) impliqué(s) dans la stimulation de la dépense énergétique observée chez le rat Lou/C. Pour cela, nous nous sommes intéressés à l'activité physique spontanée du rat Lou/C, nettement plus importante que celle du rat Wistar, et à son influence sur l'activité mitochondriale du BAT, du foie, ainsi que du muscle squelettique : trois tissus pouvant contribuer aux variations de la dépense énergétique. Nous avons également recherché si des fuites de protons au niveau de la membrane mitochondriale interne de muscle squelettique et de foie des rats Lou/C induisent une dépense énergétique supplémentaire au sein de ce tissu, expliquant donc en partie la plus forte dépense énergétique globale du rat Lou/C et sa propension à rester maigre. Enfin nous avons recherché l'existence de possibles cycles futiles dissipateurs d'énergie liés à la synthèse et à la dégradation simultanées d'une molécule.

## MATERIEL ET METHODES

### 1. Les animaux

12 rats Lou/C (Harlan, France), issus de la souche Wistar, ainsi que de 12 rats Wistar (Harlan, France), âgés de 12 semaines à leur arrivée dans notre animalerie sont restés 1 semaine, à raison de 6 rats par cage, afin de s'habituer à leur nouvel environnement. Ces animaux ont ensuite été divisés aléatoirement en 2 groupes : 6 rats de chaque souche, dits « sédentaires », étaient placés en cages individuelles simples ; les 6 autres rats de chaque souche, appelés « actifs » disposaient d'une cage individuelle avec libre accès à une roue d'activité. Les animaux sont restés dans cette configuration pendant 9 semaines : les 3 premières leur permettaient de se familiariser à leur nouvelle cage, limitant ainsi le risque de voir un stress perturber nos observations ; les 6 semaines suivantes étaient dévolues à l'enregistrement des différents paramètres expérimentaux. La luminosité était contrôlée avec un cycle de 12h de lumière et 12h d'obscurité. La nourriture standard (A04 UAR, France) et l'eau de boisson étaient fournies *ad libitum*. Le protocole expérimental est représenté à l'aide de la figure IV.1.

Figure IV.1 : Conditions expérimentales



Ainsi, les 6 rats Wistar et Lou/C sédentaires ou actifs ont été utilisés pour la mesure de leur prise alimentaire, masse corporelle, et de leur activité physique spontanée (pour les animaux actifs uniquement).

### 2. Activité, prise alimentaire et masse des animaux

Chaque jour, un relevé individuel de l'activité physique spontanée des rats ayant accès librement à une roue était effectué. Un relevé bihebdomadaire de leur masse, par pesée de chaque individu, le matin entre 8 heures et 10 heures, était pratiqué. En parallèle, deux fois par semaine, une pesée de la mangeoire avant et après remplissage était réalisée, afin de définir leur prise calorique individuelle quotidienne (cf. paragraphe II.2). Connaissant la valeur énergétique de l'aliment (12,12 kJ / g), et à partir de nos relevés bihebdomadaires, nous avons pu calculer, semaine par semaine, la prise calorique quotidienne des rats Wistar et Lou/C âgés de 15 à 21 semaines et maintenus à 25 °C. Les résultats ont été exprimés en kJ par jour en fonction de la masse corporelle de l'animal le jour où les mangeoires étaient pesées (kJ/jour/kg MC).

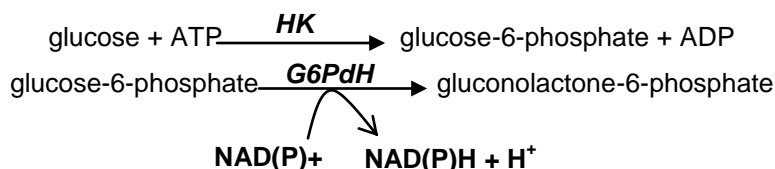
### 3. Prélèvements tissulaires et sanguins

Après 12 semaines d'expérimentation, les animaux alors âgés de 22 semaines, ont été assommés, puis décapités le matin, à heure fixe (7h30 ± 30 min), à raison de 2 rats de groupe différent par jour, afin de limiter les effets de l'âge. Du sang a été recueilli sur héparine, centrifugé rapidement à 5000 g et le plasma a été congelé pour dosage ultérieur des concentrations de substrats circulants. La glycémie, les acides gras, ainsi que les triglycérides plasmatiques ont été dosés à partir des échantillons de sang recueillis immédiatement après décapitation de l'animal, centrifugés puis congelés à -80°C. Le foie, le quadriceps (rouge), le cœur, le tissu adipeux blanc rétro-péritonéal (WAT), et le tissu adipeux brun interscapulaire (BAT) ont été rapidement extraits, nettoyés de leur graisse et tissu conjonctif, puis pesés soigneusement. Les rats Lou/C étant beaucoup plus maigres que les rats Wistar au même âge, nous avons exprimé les masses des tissus en milligrammes ou en grammes pour 100 grammes de masse corporelle, afin de permettre une comparaison entre les groupes. Des aliquots de BAT, foie et quadriceps *femoris* ont ensuite été utilisés pour l'isolement des mitochondries. Des prélèvements de foie, de WAT et de BAT ont également été congelés immédiatement dans l'azote liquide, puis conservés à -80 °C pour la détection d'éventuelles modifications d'expression de gènes ou de protéines par des techniques de biologie moléculaire, ou d'activité enzymatique par des techniques biochimiques.

#### 3.1 Le glucose plasmatique

Le dosage du glucose repose sur la transformation du NAD<sup>+</sup> en NADH lors d'une réaction catalysée par la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH).

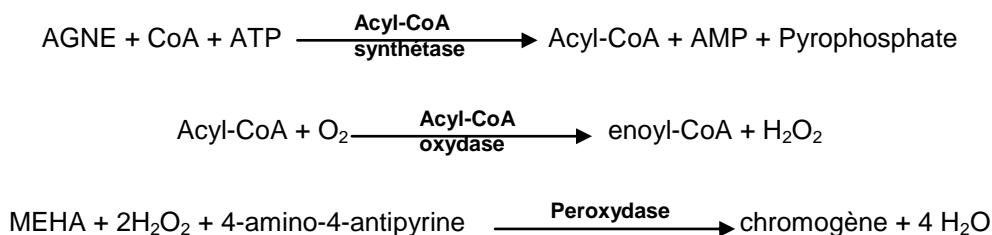




L'échantillon (60 µL) était placé dans une cuve en plastique contenant 2 mL de milieu de dosage standardisé (0,5 mM NAD<sup>+</sup>, 0,625 mM ATP, 0,5 U.I. G6PdH NAD<sup>+</sup>-dépendant, 50 mM TRA-HCl, 7,5 mM MgCl<sub>2</sub> et 3,75 mM EDTA avec NaOH). Une première lecture de densité optique à 340 nm était effectuée afin d'obtenir la valeur du blanc puis 0,3 U.I. d'hexokinase (HK) était ajouté. La solution contenue dans la cuve était homogénéisée puis une deuxième lecture de densité optique était réalisée 60 minutes plus tard. Les résultats étaient exprimés en mM, et calculés à partir d'une gamme étalon de glucose.

### 3.2 Les acides gras non estérifiés (AGNE) plasmatiques

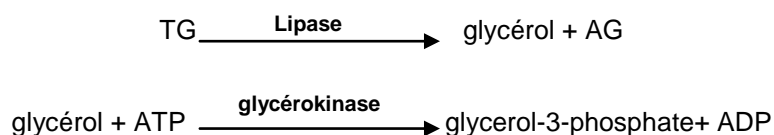
Les acides gras libres ont été dosés par une technique enzymatique grâce à un test Nefa-C (Wako), à partir d'un échantillon de 50 µL de plasma. Le principe du dosage est le suivant :

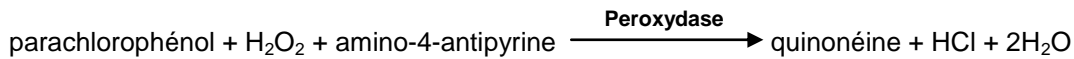
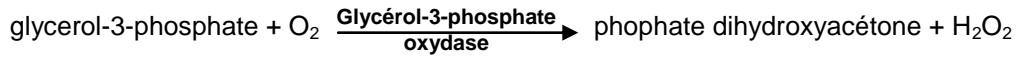


Les AGNE sont convertis en acyl-CoA par l'enzyme acyl-CoA synthétase en présence des cofacteurs CoA et ATP. La deuxième étape consiste en la formation de peroxyde d'hydrogène par l'acyl-CoA synthétase après interaction entre acyl-CoA et oxygène. Lors de la dernière étape, le peroxyde d'hydrogène transforme le 3-méthyl-N éthyl-N (6 hydroxyéthyl) aniline (MEHA) et la 4-amino-4-antipyrine en un chromogène. Une coloration pourpre, proportionnelle à la quantité d'AGNE, se développe. L'intensité de la coloration était mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 550 nm. Les résultats étaient exprimés en mM à partir d'un standard d'acide oléique (1 mM).

### 3.3 Les triglycérides (TG) plasmatiques

10 µL de plasma étaient nécessaires. Les TG plasmatiques étaient dosés à l'aide d'une technique enzymatique fournie dans un kit Biomérieux. Le principe du dosage est représenté ci-dessous :





Les TG sont convertis en acides gras et glycérol par une lipase. La mesure de la concentration de TG repose en fait sur le dosage du glycérol. La seconde étape consiste en la conversion du glycérol en glycérol-3-phosphate par la glycérokinase, en présence d'ATP. Le peroxyde d'hydrogène, issu de la réaction entre glycérol-3-phosphate et oxygène médiée par la glycérol-3-phosphate oxydase, transforme le parachlorophénol et l'amino-4-antipyrine en quinonéine. Une coloration fuschia, dont l'intensité augmente avec la quantité de glycérol, se forme. L'intensité de cette coloration était alors mesurée par spectrophotométrie, à une longueur d'onde de 505 nm. Les résultats étaient exprimés en  $\mu\text{M}$ , à partir d'un étalon de glycérol (2,29 mM).

### 4. Isolement des mitochondries

Les mitochondries ont été isolées par centrifugation différentielle comme décrit précédemment pour le BAT (Belouze *et al.*, étude II ; cf. annexe méthodologique). Elles ont également été extraites à partir du foie et du muscle squelettique sur les 6 rats Wistar et Lou/C sédentaires ou actifs, âgés de 22 semaines.

Comme pour le BAT, l'extraction des mitochondries de muscle squelettique et de foie repose sur une technique de fractionnement des composés cellulaires par centrifugation différentielle (Hogeboom and Kupp, 1955) à l'aide d'une ultracentrifugeuse (Beckman modèle L3 70) thermostatée à 4°C. Une fois prélevés, le muscle quadriceps et le foie ont été immédiatement placés à 4°C dans un milieu d'isolement approprié :

Muscle : saccharose 100 mM, KCl 50 mM, EDTA 5 mM, Tris Base 50 mM, pH 7,4

Foie : saccharose 250 mM, Tris HCl 20 mM, EGTA 1 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 mM, pH 7,25

à raison de 10 mL/g sauf pour le foie qui a été placé entièrement dans 50 mL de tampon.

Les tissus ont ensuite été émincés aux ciseaux, en petits morceaux, qui sont rincés abondamment avec le même tampon froid pour éliminer le maximum d'hématies et des dépôts lipidiques. Ces morceaux sont ensuite homogénéisés par 5 passages successifs de piston en téflon, dans un potter en verre, type Elvehjem (muscle et foie : 600 tr/min). Un aliquot de 100  $\mu\text{L}$  d'homogénat a été prélevé et congelé dans l'azote liquide, afin de réaliser ultérieurement des dosages de rendement d'extraction.

#### 4.1 Mitochondries hépatiques

L'homogénat tissulaire restant était centrifugé à 800g pendant 10 minutes à 4°C, permettant ainsi l'élimination par sédimentation des gros débris cellulaires, les noyaux, le cytosquelette et les cellules intactes.

Le surnageant, contenant les mitochondries, a été filtré à travers une gaze, transvasé puis centrifugé à 8000g afin de précipiter les mitochondries. Le surnageant contient les composants solubles

et les microsomes. Le culot obtenu a été remis délicatement en suspension dans du tampon puis re-centrifugé à 8700g avant d'être rincé une deuxième fois. La suspension de mitochondries finale a été obtenue en reprenant le dernier culot avec un minimum de tampon d'homogénéisation ( $\approx 500 \mu\text{L}$ ) ; elle est conservée à 4°C.

#### ***4.2 Mitochondries musculaires***

Après homogénéisation, le muscle a été soumis à une digestion par une protéase (subtilisine) à raison de 1 mg/g de tissu à 4°C. Après 5 minutes, la réaction a été arrêtée par ajout d'un égal volume de tampon d'isolement et l'homogénat était soumis à un deuxième passage au potter afin de libérer les mitochondries contenues entre les myofibrilles. L'homogénat final a été centrifugé à 1000g et le surnageant obtenu filtré puis traité comme pour le foie. Le dernier culot est resuspendu avec délicatesse dans un volume minimum de tampon de stockage (saccharose 250 mM, Tris-Base 10 mM, EGTA 0,1 mM, pH 7,4).

#### ***4.3 Mesure de la respiration mitochondriale***

Après détermination de la quantité de protéines contenues dans le culot mitochondrial par le kit de dosage « BCA Protein Assay, la consommation d'oxygène des mitochondries a été mesurée à l'aide d'une électrode de Clark comme décrit précédemment (Belouze et al., étude II).

L'activité enzymatique de la COx est généralement considérée comme un bon index des capacités oxydatives des mitochondries d'un organe (Jansky, 1973). Nous l'avons utilisée pour estimer les capacités oxydatives tissulaires des homogénats et des mitochondries pour quantifier le rendement d'extraction.

#### ***4.4 Mesure de l'activité Cox et détermination du rendement d'isolement***

Un volume de 20  $\mu\text{L}$  du culot de mitochondries de muscle, 40  $\mu\text{L}$  du culot de mitochondries de foie, et de 30  $\mu\text{L}$  du culot de mitochondries de BAT, contenant, respectivement, 0,4, 0,8 et 0,2 mg de protéines mitochondriales était dilué 3 fois dans un milieu contenant : ATP 1 mM, HEPES 50 mM, KCl 100 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, EDTA 1 mM, EGTA 5 mM, pH 7,4 contenant du lubrol (100 mg par gramme de protéines mitochondriales). De la même manière, des volumes de 100  $\mu\text{L}$  d'homogénats prélevés au cours de l'isolement des mitochondries étaient dilués 2 fois. Ces solutions étaient incubées à 0°C pendant 30 min, pour permettre au lubrol de démasquer l'activité de la COx par l'éclatement des mitochondries et la libération de la totalité de l'enzyme.

Après l'ajout de 30  $\mu\text{L}$  de mitochondries (0,15 mg de protéines mitochondriales) ou d'homogénat préincubé, l'activité de la COx a été mesurée par oxygraphie, à 25°C, dans un milieu respiratoire saturé en oxygène (cytochrome c 30  $\mu\text{M}$ , roténone 4 $\mu\text{M}$ , 2-4 dinitrophénol 0,5 mM, HEPES 75 mM, malonate de sodium 10 mM, pH 7,4) avec comme substrat un mélange TMPD/ascorbate (8  $\mu\text{M}$  / 0,6 mM, concentration dans la cellule de mesure). L'activité de la COx est obtenue par la différence entre la consommation d'oxygène, mesurée après l'addition du substrat aux mitochondries ou à

l'homogénat, et la consommation d'oxygène liée à l'autooxydation de l'ascorbate (ajout du mélange TMPD/ascorbate seul dans le milieu respiratoire). L'activité COx spécifique est exprimée en nanoatomes d'oxygène par minute et par mg de tissu ou de protéines mitochondriales ( $\text{nAtom O} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ).

Le rendement d'extraction des mitochondries a été calculé en comparant l'activité totale de la cytochrome oxydase dans le tissu à l'activité totale de la cytochrome oxydase dans les mitochondries récupérées. Nous avons ainsi pu évaluer les quantités (en mg) de protéines mitochondriales présentes par g de tissu.

### 5. Quantification mitochondriale des protéines UCP1 et FAT/CD36

L'abondance relative des protéines UCP1 et FAT/CD36 a été déterminée par Western Blot (*cf.* annexe méthodologique), à partir des extraits mitochondriaux congelés du BAT des 6 rats Wistar et Lou/C sédentaires ou actifs âgés de 22 semaines. Les protéines mitochondriales de BAT ont été séparées par électrophorèse sur gel SDS-PAGE en fonction de leur poids moléculaire, puis elles ont été transférées sur membrane de PVDF. La membrane a été bloquée avec : soit du lait pour la quantification d'UCP1, soit de la BSA pour FAT/CD36. La protéine d'intérêt est détectée par immunomarquage après hybridation avec un anticorps primaire: soit anti-UCP1 (alpha-diagnostic, 1 :15000) ou anti-FAT/CD36 ((Matsuno et al., 1996), utilisé au sein du laboratoire du Pr. Glatz à Maastricht). L'anticorps secondaire était lié de manière covalente à l'enzyme HRP. Après réaction de chemiluminescence, une autoradiographie était réalisée puis analysée à l'aide d'un logiciel d'images (Kodak Digital Science TM).

### 6. Dosage de l'activité de synthèse et d'oxydation des acides gras dans le foie et le tissu adipeux blanc

La lipogenèse de novo permet la synthèse de nouvelles molécules d'acides gras à partir de substrats non lipidiques, principalement des carbohydrates. L'une des étapes de la lipogenèse de novo est contrôlée par la « fatty acid synthase » (FAS) : son activité reflète donc l'activité de lipogenèse du tissu. La 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (HAD) est la troisième enzyme de la  $\beta$ -oxydation, et son activité donne donc une approximation de l'activité d'oxydation des lipides du tissu concerné.

#### 6.1 Dosage de l'activité de la fatty acid synthase (FAS)

L'activité de la FAS a été mesurée par méthode spectrophotométrique selon la méthode de Linn en mesurant la consommation de NADPH dans un homogénat de tissu, en présence d'un excès d'acétyl-CoA et de malonyl-CoA (Linn, 1981). Environ 100 mg de tissu (tissu adipeux blanc et foie) ont été broyés dans un potter, dans 300  $\mu\text{L}$  de tampon d'homogénéisation (tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, sucrose 250 mM, pH 7,4) et en présence d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (complete protease inhibitor cocktail tablts, Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne). Après une première centrifugation

(800 g, 10 minutes), permettant d'éliminer le surnageant composé de lipides, ainsi que le culot composé de débris cellulaires, la fraction aqueuse était gardée puis centrifugée une seconde fois (100000g, 1 heure). Le surnageant ainsi obtenu était utilisé pour le dosage de l'activité de la FAS.

Chaque échantillon était dosé en double exemplaire dans un tampon phosphate (100 mM, pH 6,5) contenant de l'acétyl-CoA (85  $\mu$ M) et du NADPH (126  $\mu$ M). Un volume  $v$  (60  $\mu$ L pour le tissu adipeux blanc et 30  $\mu$ L pour le foie) d'homogénat était ajouté à 220  $\mu$ L de tampon et la ligne de base de densité optique 340 nm lue pendant 10 minutes à 37°C. La réaction était initiée par ajout de 35  $\mu$ L d'un tampon phosphate contenant du malonyl-CoA (115  $\mu$ M de concentration finale). La décroissance linéaire de la densité optique était suivie pendant 20 minutes avec des intervalles de lecture de 30 secondes. L'activité de la FAS était alors calculée à partir de cette décroissance selon la formule :

$$\text{Activité FAS} = \frac{(\Delta\text{DO}/\text{min}) * (V \text{ final dosage}) * (\text{masse tissu} + 300)}{6,22 * v \text{ homogénat} * \text{masse tissu}}$$

Où  $V$  final dosage = 315  $\mu$ L pour le tissu adipeux blanc et 285  $\mu$ L pour le foie.

Nous avons choisi d'exprimer les résultats par mg de tissu plutôt que par rapport à la quantité de protéines car la présence d'hémoglobine dans certains tissus conduisait à une surestimation de la concentration en protéines cytosoliques. Les résultats étaient donc exprimés en pmoles de NADPH oxydé / min / mg tissu.

## 6.2 Dosage de l'activité de la 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (HAD)

Les échantillons de tissu adipeux blanc et foie étaient broyés dans un potter en verre à 4°C, dans un tampon phosphate (0,3 mM, pH 7,7) plus 10% de BSA. Trois cycles de congélation / décongélation, à - 80°C étaient nécessaires afin de rompre les membranes et ainsi libérer les enzymes dans le milieu. Les tubes étaient centrifugés à 3000 g pendant 5 minutes. Le surnageant était alors récupéré pour le dosage de l'activité de la HAD. La concentration de protéines était déterminée par la méthode de BCA, décrite dans le paragraphe II.6.

Le principe du dosage repose sur la mesure de la décroissance du NADH au cours de la réaction enzymatique présentée ci-dessous.



10  $\mu$ L de l'échantillon étaient mélangés au milieu réactionnel (EDTA 200 mM, imidazole 40 mM, NADH 10 mM, pH 7) à 25°C. La réaction était initiée par l'ajout de S acétoacétyl-CoA (5 mM). Les variations de DO étaient mesurées par spectrophotométrie à 340 nm et à 25°C. Une lecture de DO était effectuée toutes les 5 secondes, pendant 1 minute. Le calcul de la disparition de NADH suivait la loi de Beer-Lambert, avec un coefficient d'extinction molaire du NADH ( $6,22 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). Les résultats étaient exprimés en  $\mu$ mol / min / g protéines.

## 7. Expression de gènes du métabolisme énergétique par RT-PCR

L'abondance relative de différentes cibles du métabolisme énergétique était permise par la technique de RT-PCR. L'extraction des ARN, à partir du BAT, du foie ou du WAT congelé des 6 rats Wistar et Lou/C sédentaires ou actifs âgés de 22 semaines, était réalisée à l'aide d'un ultraturax dans une solution Trizol (Invitrogen, France). La RT, puis les PCR et l'analyse des transcrits était obtenue selon le protocole décrit précédemment (*cf.* annexe méthodologique). Les amorces utilisées sont redonnées dans le tableau IV.1.

**Tableau IV.1 : Séquences des amorces utilisées pour la RT-PCR**

	sens (5' → 3')	antisens (5' → 3')	taille (pb)	n cycles
<b>ACO1</b> (BC085743)	TTG GAA ACC ACT GCC ACA TA	GGT CCC ATA CGT CAG CTT GT	<b>384</b>	<b>30</b>
<b>β-actine courte</b> (gi11420247)	GAC GAG GCC CAG AGC AAG AGA	GGG TGT TGA AGG TCT CAA ACA	<b>225</b>	<b>23</b>
<b>β-actine longue</b> (gi11420247)	TTG TAA CCA ACT GGG ACG ATA TGG	GAT CTT GAT CTT CAT GCT GCT AGG	<b>764</b>	<b>23</b>
<b>CPT1</b> (NM_031559)	TAT GTG AGG ATG CTG CTT CC	CTC GGA GAG CTA AGC TTG TC	<b>629</b>	<b>32</b>
<b>Cyclophylline</b> (NM_017101)	GTG GCA AGT CCA TCT ACG GAG	CCA CAG TCG GAG ATG GTG ATC	<b>265</b>	<b>23</b>
<b>FABP</b> (gi204079)	CTG GAA GCT AGT GGA CAG CA	GAC TTG ACC TTC CTG TCA TC	<b>225</b>	<b>26</b>
<b>FAS</b> (X62888)	GGC CTG GAC TCG CTC ATG GG	TGG GCC TGC AGC TGG GAG CA	<b>514</b>	<b>24</b>
<b>GLUT4</b> (gi464195)	CAG ATC GGC TCT GAA GGT GC	CTG AGT AGG CGC CAA TGA G	<b>430</b>	<b>26</b>
<b>LPL</b> (gi205214)	GAC GGT GAC AGG AAT GTA TG	GAG TCA ATG AAG AGA TGG ATG G	<b>588</b>	<b>24</b>
<b>PGC1α</b>	AAA CTT GCT AGG GGT CCT CA	GTG TGA GGA GGG TCA TCG TT	<b>375</b>	<b>37</b>
<b>UCP1</b> (gi6981691)	GTG AAG GTC AGA ATG CAA GC	AGG GCC CCC TTC ATG AGG TC	<b>191</b>	<b>19</b>

## 8. Statistiques

Tous les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± l'erreur standard à la moyenne (sem). Les comparaisons statistiques ont été effectuées par un test d'analyse des variances (ANOVA) pour comparer les groupes entre eux lorsque leur nombre était supérieur à 2, suivi d'un test post hoc de PLSD Fisher. Les variations au sein d'un même groupe ont été comparées par un test t de Student. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel Statview.

## RESULTATS

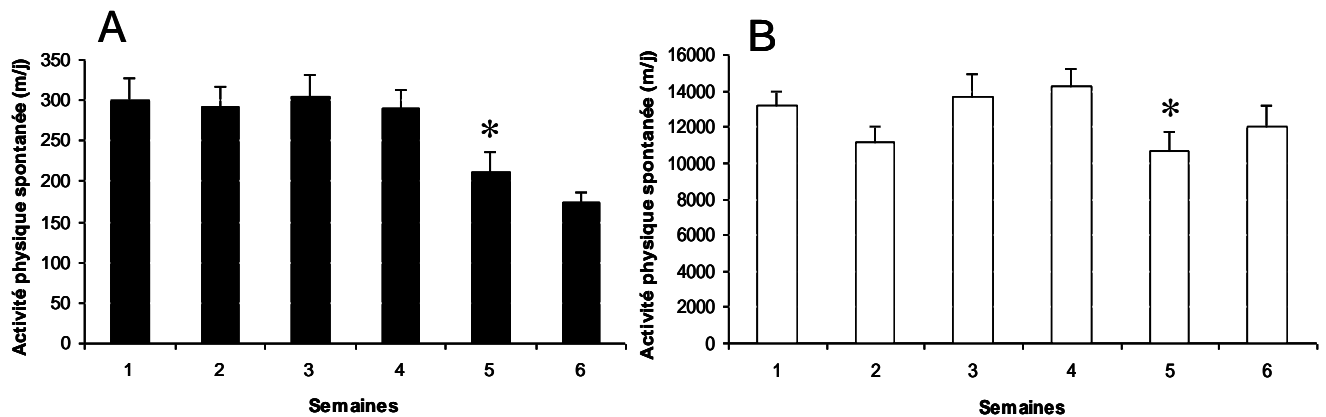
### 1. Influence de l'activité physique spontanée sur l'animal entier

Lorsqu'ils ont un accès libre à une roue d'activité, nous avons montré, en accord avec Servais *et al.*, que les rats Lou/C étaient beaucoup plus actifs que les rats Wistar (Servais *et al.*, 2003). Une forte activité spontanée a été aussi mesurée dans une cage classique à l'aide de faisceaux infrarouges permettant de retranscrire les mouvements des animaux dans les trois dimensions (Garait *et al.*, 2005 ; Perrin *et al.*, 2003b ; Soulage C, 2008). En augmentant la dépense énergétique, la forte activité spontanée des Lou/C pourrait en partie expliquer leur maigreur. Nous avons étudié les conséquences de cette activité physique spontanée sur la prise alimentaire, la masse corporelle et la masse des organes.

#### 1.1 Activité physique spontanée des rats Wistar et Lou/C

Nous avons établi la moyenne de l'activité physique spontanée de 6 rats Wistar et 6 rats Lou/C, âgés de 16 à 21 semaines, en mètres par jour, pour une semaine. Les résultats sont présentés dans la figure IV.2.

Figure IV.2 : Activité physique spontanée de rats Wistar et Lou/C.



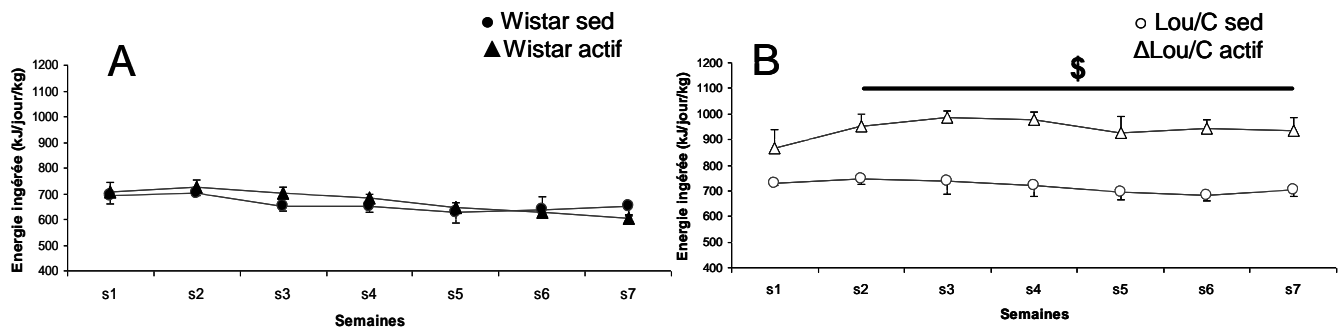
Les rats disposent d'une roue d'activité en libre accès, dans une pièce où la température ambiante est régulée à 25°C. Ces roues associées à un détecteur relié à un système d'acquisition permettent une mesure en continu de l'activité des rats. Cette activité est ensuite convertie en m/jour pour chaque rat. **A** : Activité physique spontanée de 6 rats Wistar (■) exprimée en m/jour mais moyennée par semaine. **B** : Activité physique spontanée de 6 rats Lou/C (□) exprimée en m/jour mais moyennée par semaine. Les résultats sont exprimés en moyenne ± sem pour chaque semaine. Les comparaisons ( $p < 0,05$ ) sont réalisées par une ANOVA mesures répétées suivie d'un test t. \* : semaine n vs. semaine n-1. Bien noter la différence d'échelle des ordonnées entre les figures A et B.

Montrer nos résultats d'activité physique spontanée sur six semaines, et non sur les trois dernières (Belouze *et al.*, étude I), permet de répondre à une question fréquemment soulevée, concernant la régularité de l'activité spontanée des animaux dans les roues. Il apparaît que l'activité physique spontanée des rats Wistar et Lou/C est relativement stable dans le temps, semaine après semaine. Les rats Wistar présentent une activité physique spontanée nettement en deçà de celle observée chez les rats Lou/C. En effet, les rats Wistar parcourent en moyenne, chaque semaine,  $262 \pm 23$  mètres par jour, alors que les rats Lou/C courent  $12497 \pm 588$  mètres par jour, en moyenne. A partir de la cinquième semaine, les rats Wistar et Lou/C montrent cependant une réduction significative de leur activité. *Cet intérêt légèrement décroissant pour la roue d'activité ne semble pas s'accroître et ne modifie en rien l'écart impressionnant entre les distances parcourues par les deux souches.*

### 1.2 Influence de l'activité physique spontanée sur la prise alimentaire

Lorsqu'ils ont accès librement à une roue d'activité, les rats Lou/C sont beaucoup plus actifs que les rats Wistar. Afin de vérifier si cette activité physique spontanée entraînait une dépense énergétique supplémentaire importante, nous avons mesuré la prise alimentaire des animaux sédentaires et actifs. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure IV.3.

Figure IV.3 : Energie ingérée par les rats Wistar et Lou/C en fonction de leur activité



La prise alimentaire est calculée quotidiennement pour les rats Wistar sédentaires et actifs (**A**) ainsi que pour les rats Lou/C sédentaires et actifs (**B**).

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  sem (kJ/jour/kg MC), n=6 par groupe. Les comparaisons ( $p < 0,05$ ) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher.

§ : sédentaires vs. actifs.

Nos résultats montrent que la faible activité physique spontanée du rat Wistar n'a pas d'effet significatif sur sa prise alimentaire. En revanche, le rat Lou/C actif augmente sa prise calorique par comparaison au rat Lou/C sédentaire. En effet, avec l'activité, le rat Lou/C augmente sa ration alimentaire de 223 kJ / jour / kg MC. *Cette étude nous apprend que les*



*Wistar*, qui courent seulement quelques centaines de mètres par jour, lorsqu'ils ont accès à une roue d'activité, n'ont pas besoin d'augmenter leur ingéré. A contrario, les rats *Lou/C*, qui présentent une activité physique spontanée impressionnante d'une dizaine de kilomètres par jour, ont une prise alimentaire stimulée. Sur le plan énergétique, nous pouvons nous demander si cet ingéré alimentaire supplémentaire est suffisant pour couvrir toutes les dépenses d'énergie induites par cette activité ou si les rats doivent puiser dans leurs réserves.

### **1.3 Influence de l'activité physique spontanée sur la masse des animaux et des organes**

L'activité physique spontanée des rats *Lou/C* entraîne une augmentation de leur prise alimentaire, alors que celle des rats *Wistar* paraît sans effet sur leur ingéré. Afin de savoir si leurs apports caloriques sont suffisants pour couvrir l'essentiel de leurs besoins énergétiques, nous avons comparé les masses des animaux et de leurs tissus après euthanasie, à l'âge de 22 semaines, et les valeurs sont données dans le tableau IV.2.

**Tableau IV.2 : Masses corporelles et tissulaires de rats *Wistar* et *Lou/C* en fonction de l'activité.**

	Wistar			Lou/C		
	Sédentaire	Actif	Effet activité	Sédentaire	Actif	Effet activité
Masse (g)	<b>429 ± 14</b>	<b>419 ± 14</b>	<b>NS</b>	<b>271 ± 15 *</b>	<b>282 ± 12 *</b>	<b>NS</b>
Foie (g/100g MC)	<b>2,81 ± 0,08</b>	<b>2,88 ± 0,19</b>	<b>NS</b>	<b>2,87 ± 0,09</b>	<b>3,08 ± 0,04</b>	<b>NS</b>
Quadriceps (g/100g MC)	<b>0,75 ± 0,04</b>	<b>0,76 ± 0,04</b>	<b>NS</b>	<b>0,86 ± 0,03</b>	<b>0,96 ± 0,04</b>	<b>NS</b>
Cœur (g/100g MC)	<b>0,24 ± 0,00</b>	<b>0,25 ± 0,01</b>	<b>NS</b>	<b>0,31 ± 0,01 *</b>	<b>0,34 ± 0,01 *\$</b>	<b>+10%</b>
WAT (mg/100g MC)	<b>825 ± 93</b>	<b>745 ± 91</b>	<b>NS</b>	<b>286 ± 62 *</b>	<b>173 ± 46 *</b>	<b>-40% (p=0,17)</b>
BAT (mg/100g MC)	<b>123 ± 6</b>	<b>122 ± 14</b>	<b>NS</b>	<b>105 ± 7</b>	<b>116 ± 12</b>	<b>NS</b>

La masse des tissus est exprimée par 100g de masse corporelle. WAT : « white adipose tissue » ou tissu adipeux blanc. Les résultats sont exprimés en moyenne ± sem, n=6. Les comparaisons (p<0,05) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher.

\* : *Lou/C* vs. *Wistar* ; \$ : actif vs. sédentaire. NS : différence non significative.

Nos résultats ne montrent aucune influence de l'activité physique spontanée sur la masse corporelle totale des rats. Les rats *Lou/C* qui sont pourtant très actifs ne maigrissent pas avec l'activité ce qui tendrait à montrer que les 223 kJ / jour / kg MC, qu'ils ingèrent quotidiennement en plus de ce que mangent les rats *Lou/C* sédentaires, suffiraient à couvrir leurs dépenses d'énergie. Cependant, bien que la masse corporelle des rats ne soit pas diminuée avec l'activité physique spontanée, nous observons une tendance à la diminution de la masse de tissu adipeux blanc (WAT) chez les rats *Lou/C* actifs, par comparaison aux rats *Lou/C* sédentaires. L'absence de significativité découle de la forte variabilité de la masse

relative du WAT dans cette souche. Cette tendance à l'amaigrissement des rats Lou/C actifs suggère néanmoins que le surplus de dépense énergétique engendré par l'activité physique spontanée du rat Lou/C n'est pas totalement couvert par l'augmentation de l'ingéré.

Les différences de masse relative d'organes entre souches de rats n'étaient manifestes que pour le WAT, plus léger, et le cœur, plus lourd, chez les rats Lou/C que chez les Wistar. La masse cardiaque augmentée chez le rat Lou/C actif suggère l'existence d'un véritable entraînement physique de type endurant qui n'induit pas d'augmentation significative de la masse musculaire, estimée par la masse du quadriceps femoris.

*En conclusion, la masse des rats Lou/C n'est pas diminuée par leur énorme activité physique spontanée, bien que la masse de WAT tende à l'être, ce qui pourrait impliquer que les apports d'énergie plus conséquents du rat Lou/C actif suffisent en grande partie à combler les dépenses induites par l'activité. Les variations de masse tissulaire suggèrent une adaptation à l'exercice endurant qui peut avoir des conséquences sur l'activité mitochondriale de ces tissus.*

## **2. Influence de l'activité physique spontanée sur l'activité des mitochondries de BAT**

Bien que ne présentant pas de variation significative de sa masse, le tissu adipeux brun (BAT) des rats Wistar et Lou/C pourrait contribuer à une dépense énergétique accrue si ses mitochondries ont une activité respiratoire accrue. En effet, la masse du BAT étant largement influencée par les lipides qui le composent, l'absence de variation massique ne suffit pas à conclure à une absence d'activation de ce tissu surtout si les réserves lipidiques de l'organisme sont réduites. Nous avons étudié la fonctionnalité des mitochondries de BAT de rats Wistar et Lou/C, soumis ou non à un protocole d'activité spontanée.

### ***2.1 Effet de l'activité sur la fonctionnalité des mitochondries de BAT***

Les mitochondries de BAT de rats Wistar et Lou/C, âgés de 22 semaines, et disposant ou non d'une roue d'activité à accès libre, ont été isolées par centrifugations différentielles. Afin de déterminer l'activité thermogène du BAT, la respiration des mitochondries isolées, l'activité de la protéine UCP1 et son abondance relative ont été mesurées.

#### ***2.1.1 Respiration de mitochondries isolées de BAT***

Comme précédemment, la respiration de mitochondries isolées de BAT de rats Wistar et Lou/C a été mesurée avec deux substrats : succinate / roténone ou palmitoyl-

carnitine / malate et en présence de BSA, afin de piéger le maximum d'acides gras et limiter leur effet découplant. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau IV.3.

**Tableau IV.3 : Effet de la souche et de l'activité physique sur la respiration mitochondriale de BAT en présence de succinate/roténone ou palmitoyl-carnitine/malate + BSA.**

	JO2 (natomO/min/mg prot) en présence de BSA					
	succinate / roténone			palm-carn / malate		
	état 4	+GDP	Effet GDP	état 4	+GDP	Effet GDP
Wistar sed	257 ± 68	169 ± 40	- 88 soit 34%	148 ± 46	75 ± 22 °	- 73 soit 49%
Wistar actif	323 ± 67	196 ± 42 °	-127 soit 39%	180 ± 55	88 ± 20 °	- 92 soit 51%
Lou/C sed	178 ± 53	117 ± 31	- 61 soit 34%	139 ± 60	77 ± 26	- 62 soit 45%
Lou/C actif	273 ± 62	168 ± 33 °	- 105 soit 39%	193 ± 70	86 ± 20 °	- 107 soit 55%

Les mitochondries isolées de BAT de rats (0,1 mg/mL) Wistar, Lou/C sédentaires ou actifs ont été incubées dans un milieu KCl avec 5 mM de succinate plus 2 µM de roténone + BSA délipidée (0,3%) ou 50 µM de palmitoyl-carnitine plus 1 mM de malate + BSA (0,3%). La consommation d'oxygène est mesurée à l'aide d'une électrode de Clark.

Les résultats sont exprimés en moyenne ± sem, n=6. Les comparaisons (p<0,05) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher. \* : Lou/C vs. Wistar ; \$ : actif vs. sédentaire. L'effet du GDP (°) est testé par une ANOVA mesures répétées.

Chez les rats Wistar, la respiration mitochondriale avec le succinate / roténone est supérieure à celle mesurée en présence de palmitoyl-carnitine / malate. Cette différence est estompée chez les rats Lou/C en relation avec une moindre activité respiratoire en présence de succinate / roténone. Avec les deux substrats, la respiration à l'état 4 (+ oligomycine) tend à être accrue par l'activité physique spontanée bien que les différences ne passent pas le seuil de significativité. L'addition de GDP, un inhibiteur de l'UCP1, réduit fortement la respiration mitochondriale avec les deux substrats et l'effet tend à être supérieur chez les rats Lou/C, suggérant une activité supérieure de l'UCP1.

### 2.1.2 Abondance relative de la protéine UCP1

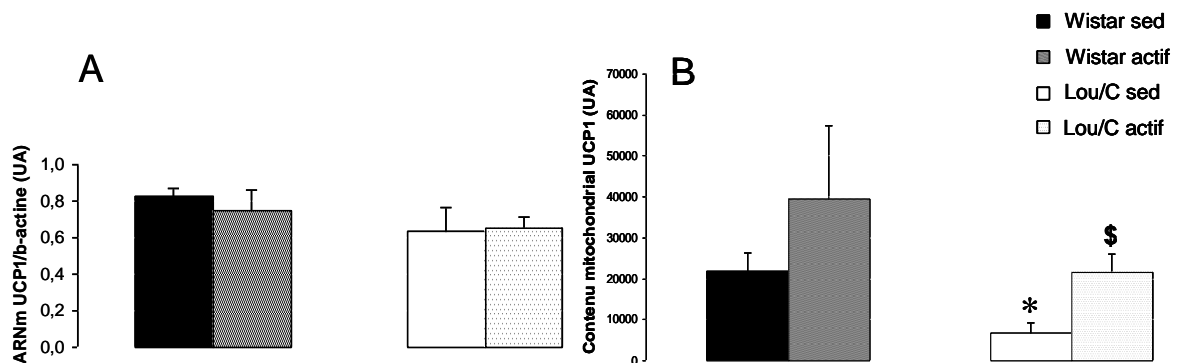
Afin de vérifier si l'activité physique spontanée altère le couplage des oxydations phosphorylantes dans les mitochondries du BAT via la protéine découplante UCP1, nous avons procédé à une quantification de l'abondance relative des transcrits (RT-PCR semi-quantitative) et de la protéine UCP1 (western blot). Les résultats obtenus sont représentés dans la figure IV.4.

Chez les rats Wistar, aucune différence d'abondance relative d'ARNm ou de protéine UCP1 n'est observée entre les animaux actifs ou sédentaires. Chez les rats Lou/C par contre, si l'abondance relative de l'ARNm n'est pas modifiée par l'activité physique spontanée, une augmentation significative (p<0,05) de la quantité de protéine UCP1 est observée dans le BAT des rats Lou/C actifs, par comparaison aux rats Lou/C sédentaires.

L'abondance relative d'UCP1 est plus faible chez les rats Lou/C que chez les rats Wistar alors qu'une tendance est observée à l'échelle des transcrits.

*La forte activité physique spontanée des rats Lou/C s'accompagne d'une augmentation de l'abondance relative d'UCP1 qui peut permettre une respiration mitochondriale accrue dans le BAT, via un découplage de l'oxydation phosphorylante induit par UCP1. On doit toutefois relativiser cet accroissement de l'expression d'UCP1 qui permet seulement de retrouver le niveau d'expression observé dans le BAT des rats Wistar.*

**Figure IV.4 : Effet de l'activité physique sur l'abondance relative en protéine découplante dans le BAT de rats Wistar et Lou/C.**



L'abondance relative en (A) ARNm de UCP1 et (B) protéine UCP1 dans le BAT de rats Wistar et Lou/C, sédentaires ou actifs, a été déterminée à partir d'amorces et d'anticorps primaire anti-UCP1 spécifiques. La  $\beta$ -actine est utilisée ici comme gène de référence.

L'analyse a été réalisée avec 6 rats dans chaque groupe. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  sem et les comparaisons ( $p < 0,05$ ) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher. \* : Lou/C vs. Wistar ; \$ : actif vs. sédentaire.

## 2.2 Effet de l'activité physique sur l'apport en substrats au BAT

Même si nos résultats *in vitro* n'ont montré qu'une tendance non significative à l'augmentation de l'activité respiratoire des mitochondries de BAT en liaison avec l'activité physique spontanée, il est possible qu'une augmentation de l'apport en substrats *in vivo* induise une modification des flux métaboliques et permettent d'alimenter une respiration accrue via UCP1. Une augmentation des flux métaboliques causerait alors une majoration du potentiel redox qui se traduirait par une stimulation importante de la chaîne mitochondriale.

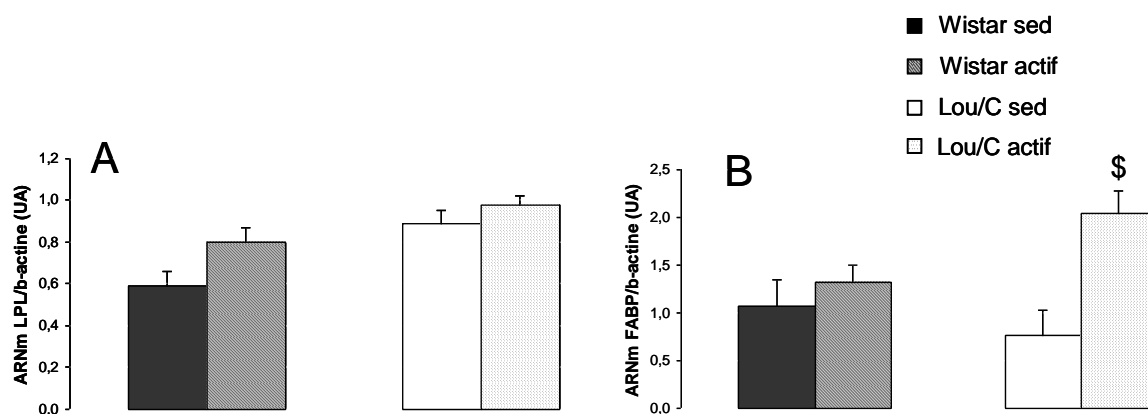
### 2.2.1 Effet de l'activité physique sur les apports en substrats lipidiques

Les variations des apports de substrats au BAT ont été étudiées à partir des variations des transcrits et des protéines modulant ces apports.

### 2.2.1.1 Captage et transport des acides gras à chaîne longue

Les triglycérides circulants captés par la lipoprotéine lipase (LPL) sont hydrolysés en glycérol et acides gras. Les acides gras libérés entreront dans l'adipocyte brun à l'aide de différents transporteurs dont la « plasma membrane fatty acid binding protein » ( $FABP_{PM}$ ), qui est un régulateur important de l'entrée des acides gras dans la cellule. L'abondance relative des transcrits de ces deux protéines a été déterminée par RT-PCR semi-quantitative dans le BAT des rats Wistar et Lou/C, ayant disposé ou non d'une roue d'activité. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure IV.5.

**Figure IV.5 : Effet de l'activité physique sur l'expression de gènes impliqués dans l'utilisation de substrats lipidiques par le BAT.**



L'abondance relative en ARNm de (A) LPL et (B)  $FABP_{PM}$  dans le BAT de rats Wistar et Lou/C, sédentaires ou actifs a été quantifiée à partir d'amorces spécifiques. La  $\beta$ -actine est utilisée ici comme gène de référence.

L'analyse a été réalisée avec 6 rats dans chaque groupe. Les comparaisons ( $p < 0,05$ ) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher.

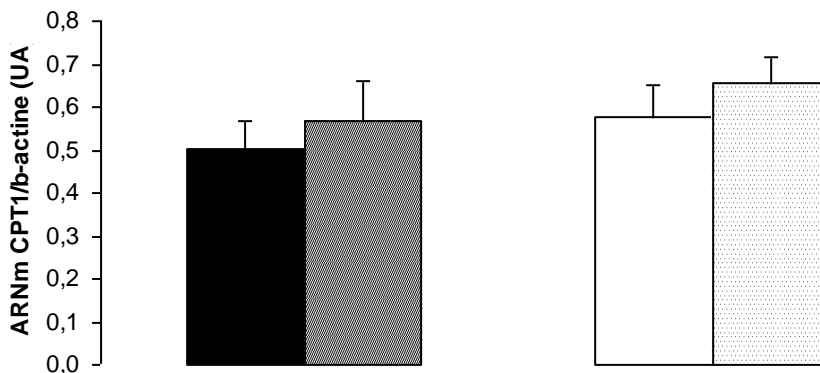
\$ : actifs vs sédentaires.

L'activité physique spontanée ne modifie pas l'abondance relative des ARNm codant la LPL ou la  $FABP_{PM}$  dans le BAT des rats Wistar. En revanche, l'activité physique augmente considérablement l'abondance des transcrits de la  $FABP_{PM}$ , mais pas ceux de la LPL, dans le BAT des rats Lou/C. *Il est possible que la faible activité physique spontanée des rats Wistar ne soit pas suffisante pour modifier la transcription des gènes impliqués dans le captage et l'entrée des acides gras dans les adipocytes bruns. Par contre l'activité impressionnante des rats Lou/C stimule fortement l'expression du gène codant la  $FABP_{PM}$ , suggérant une capacité accrue d'entrée des acides gras dans l'adipocyte brun.*

2.2.1.2 Entrée des acides gras à longue chaîne dans la mitochondrie

Nous avons déterminé par RT-PCR semi-quantitative l'abondance relative des ARNm de CPT1, qui catalyse l'étape limitante de la  $\beta$ -oxydation, dans le BAT de rats Wistar ou Lou/C, disposant ou non d'une roue d'activité. Les résultats sont présentés à l'aide de la figure IV.6.

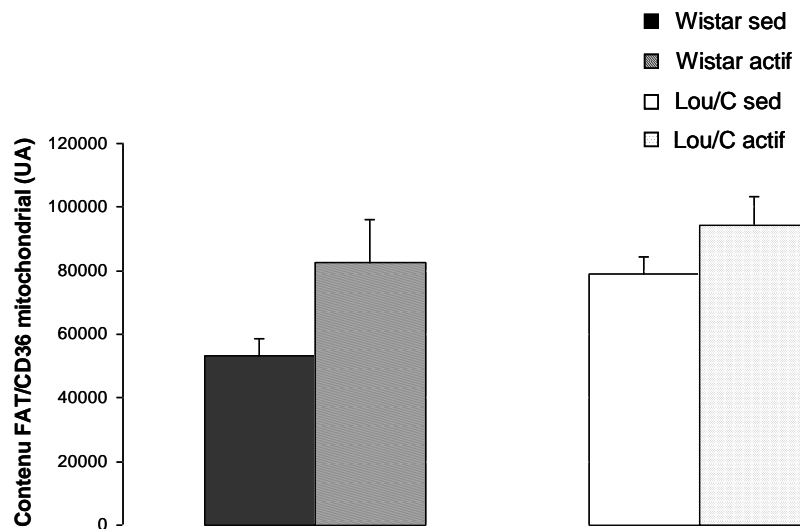
**Figure IV.6 : Effet de l'activité physique sur l'abondance relative de la protéine CPT1 au niveau du BAT.**



L'abondance relative des transcrits de la protéine CPT1 dans le BAT de rats Wistar et Lou/C, sédentaires ou actifs, a été déterminée par RT-PCR semi quantitative. L'analyse a été réalisée avec 6 rats dans chaque groupe. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  sem et les comparaisons ( $p < 0,05$ ) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher. \$ : actifs vs sédentaires.

L'activité physique spontanée ne modifie pas significativement l'abondance relative des transcrits de CPT1 dans le BAT des rats Wistar ou Lou/C. Ces résultats peuvent suggérer que soit l'activité physique importante du rat Lou/C n'augmente pas l'entrée des acides gras dans la mitochondrie, soit que la CPT1 est déjà exprimée en quantité suffisante et n'est pas limitante. Comme le transport et l'oxydation des acides gras à chaîne longue pourrait être médié par FAT/CD36, une protéine déjà connue pour son rôle dans le transport des acides gras dans les adipocytes de rat et le muscle squelettique de rat en réponse à l'exercice (Campbell et al., 2004), nous avons recherché une variation de l'expression de FAT/CD36 dans le BAT des rats Wistar ou Lou/C sédentaires ou actifs. Nous avons donc quantifié, par western blot, l'abondance de la protéine FAT/CD36 dans les mitochondries de BAT de rats Wistar et Lou/C, sédentaires ou actifs. Les données ainsi obtenues sont montrées dans la figure IV.7.

Figure IV.7 : Effet de l'activité physique sur l'expression de la protéine FAT/CD36 au niveau du BAT.



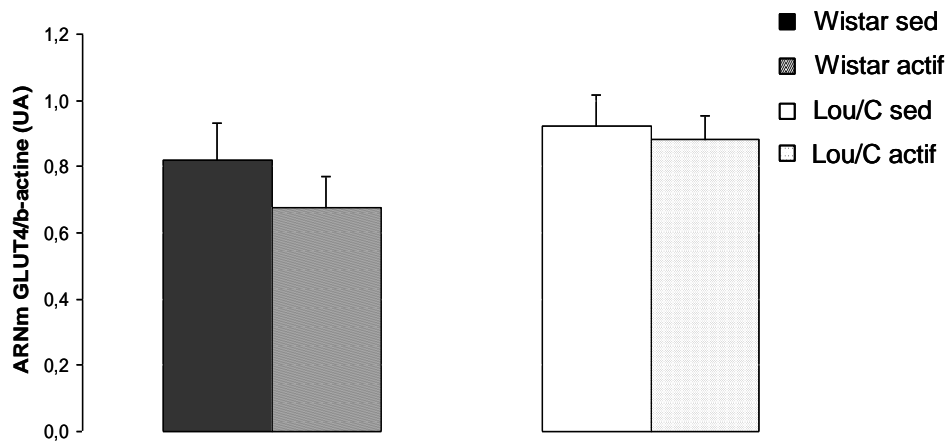
La quantité relative de protéine FAT/CD36 dans les mitochondries de BAT de rats Wistar et Lou/C, sédentaires ou actifs a été quantifiée par western blot, à partir d'un anticorps primaire spécifique. L'analyse a été réalisée avec 6 rats dans chaque groupe. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  sem et les comparaisons ( $p < 0,05$ ) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher. \$ : actifs vs sédentaires.

La quantité relative de la protéine FAT/CD36 dans les mitochondries de BAT de rats Wistar et Lou/C (figure IV.7) n'est pas affectée significativement par l'activité physique spontanée. Comme pour CPT1, ces résultats ne sont pas favorables à une augmentation de l'expression des gènes codant les protéines impliquées dans l'entrée des acides gras dans la mitochondrie en réponse à l'activité physique spontanée. *Seule l'abondance relative des ARNm de FABP<sub>PM</sub> est augmentée dans le BAT des rats Lou/C actifs, suggérant que si l'entrée des acides gras dans les adipocytes bruns pourrait être accrue par la forte activité physique des rats Lou/C, l'entrée de ces acides gras dans les mitochondries n'est soit pas augmentée, soit pas limitante.*

### 2.2.2 Effet de l'activité sur l'apport en substrats glucidiques

Dans le tissu adipeux brun, l'énergie provient principalement de l'oxydation des acides gras non estérifiés (Nicholls and Locke, 1984), mais également de l'oxydation du glucose (Ferre et al., 1985 ; Young et al., 1985), nous avons donc vérifié si l'activité physique pouvait modifier l'expression des transporteurs de type GLUT4. Les résultats ainsi obtenus sont présentés dans la figure IV.8.

**Figure IV.8 : Effet de l'activité physique sur l'expression de gène impliqué dans le captage de substrats glucidiques par le BAT.**



L'abondance relative des ARNm de GLUT4 dans le BAT de rats Wistar et Lou/C, sédentaires ou actifs a été déterminée à partir d'amorces spécifiques. La  $\beta$ -actine est utilisée ici comme gène de référence. L'analyse a été réalisée avec 6 rats dans chaque groupe. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  sem et les comparaisons ( $p < 0,05$ ) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher. \$ : actifs vs sédentaires.

L'activité physique spontanée ne modifie pas l'abondance relative d'ARNm de GLUT4 dans le BAT des rats Wistar ou Lou/C. *L'ensemble des résultats collectés ne montre donc pas d'augmentation généralisée de l'expression des gènes codants des protéines régulatrices des flux métaboliques dans le BAT des rats actifs.*

### **3. Influence de la souche et de l'activité physique spontanée sur l'activité des mitochondries de muscle squelettique**

De par son activité contractile, il est évident que le muscle squelettique contribue à l'accroissement de la dépense énergétique des rats actifs. Ce tissu pourrait également contribuer à la dépense énergétique des rats sédentaires. Nous avons donc vérifié s'il existait une potentielle hyperactivité des mitochondries de quadriceps de rats Lou/C par comparaison aux rats Wistar, et, connaissant le caractère hyperactif des rats Lou/C, nous avons également testé l'effet de l'activité physique spontanée sur les mitochondries isolées de muscle squelettique. Nous avons isolé, puis mesuré la respiration de mitochondries de quadriceps, à l'aide d'un oxygraphe, de rats Wistar et Lou/C, âgés de 22 semaines, sédentaires ou actifs. La respiration à l'état 2 était obtenue après ajout de substrat : succinate / roténone ou palmitoyl-carnitine / malate. Puis la respiration à l'état 3, ou respiration phosphorylante était mesurée après addition d'ADP, et enfin, la respiration à l'état 4, liée aux fuites de protons à travers la membrane mitochondriale, était calculée après blocage de l'ATP-synthase par de l'oligomycine. Les résultats ainsi obtenus sont présentés dans le tableau IV.4.



La respiration des mitochondries de muscle quadriceps est plus forte en présence de succinate / roténone qu'en présence de palmitoyl-carnitine / malate. Dans tous les cas, l'addition de BSA stimule fortement la respiration mitochondriale à l'état 3. Chez les rats sédentaires, aucune différence majeure n'apparaît entre Wistar et Lou/C avec l'un ou l'autre des substrats. L'activité physique spontanée n'a pas d'effet chez les rats Wistar et réduit la respiration à l'état 3 avec les deux substrats et la respiration à l'état 4 avec palmitoyl-carnitine / malate chez les rats Lou/C (tableau IV.4B).

**Tableau IV.4 : Effet de la souche et de l'activité physique sur la respiration mitochondriale de muscle en présence de succinate/roténone ou palmitoyl-carnitine/malate ± BSA.**

A	JO2 (natomO/min/mg prot) avec succ/roténone					
	- BSA			+ BSA		
	état 2	état 3	état 4	état 2	état 3	état 4
Wistar sed	<b>119 ± 8</b>	<b>347 ± 32</b>	<b>151 ± 20</b>	<b>99 ± 9</b>	<b>435 ± 55</b>	<b>133 ± 9</b>
Wistar actif	<b>112 ± 10</b>	<b>337 ± 20</b>	<b>150 ± 14</b>	<b>100 ± 3</b>	<b>427 ± 28</b>	<b>118 ± 11</b>
Lou/C sed	<b>103 ± 11</b>	<b>352 ± 17</b>	<b>146 ± 14</b>	<b>85 ± 6</b>	<b>407 ± 48</b>	<b>113 ± 11</b>
Lou/C actif	<b>87 ± 12</b>	<b>277 ± 29 \$</b>	<b>126 ± 11</b>	<b>72 ± 7 *</b>	<b>295 ± 21 *\$</b>	<b>95 ± 16</b>

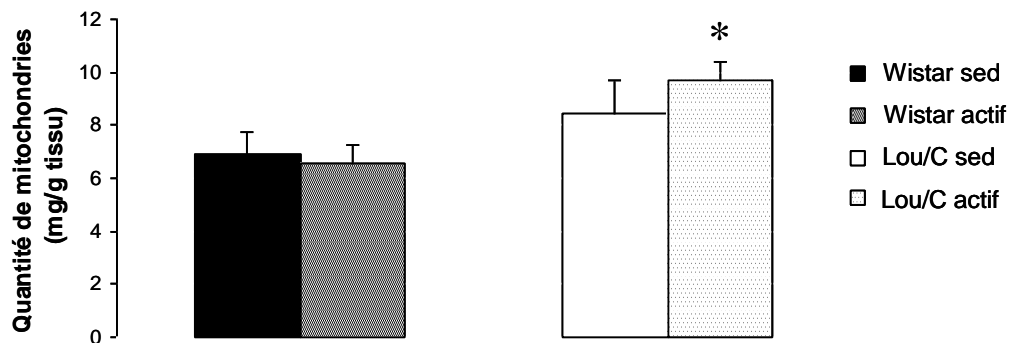
B	JO2 (natomO/min/mg prot) avec palm-carn/malate					
	- BSA			+ BSA		
	état 2	état 3	état 4	état 2	état 3	état 4
Wistar sed	<b>62 ± 4</b>	<b>144 ± 23</b>	<b>69 ± 7</b>	<b>30 ± 1</b>	<b>205 ± 18</b>	<b>36 ± 2</b>
Wistar actif	<b>63 ± 4</b>	<b>112 ± 20</b>	<b>70 ± 3</b>	<b>27 ± 2</b>	<b>212 ± 15</b>	<b>32 ± 1</b>
Lou/C sed	<b>64 ± 8</b>	<b>149 ± 29</b>	<b>73 ± 8</b>	<b>29 ± 2</b>	<b>230 ± 28</b>	<b>35 ± 3</b>
Lou/C actif	<b>40 ± 10</b>	<b>54 ± 17 *\$</b>	<b>33 ± 9 *\$</b>	<b>24 ± 3 *\$</b>	<b>168 ± 30 *</b>	<b>25 ± 3 *\$</b>

Les mitochondries isolées de quadriceps de rats (0,75 mg/mL) Wistar, Lou/C sédentaires ou actifs ont été incubées dans un milieu KCl avec (A) 5 mM de succinate plus 2 µM de roténone ± BSA (0,3%) ou (B) 50 µM de palmitoyl-carnitine plus 1 mM de malate ± BSA (0,3%). La consommation d'oxygène est mesurée à l'aide d'une électrode de Clark. Les résultats sont exprimés en moyenne ± sem, n=6. Les comparaisons (p<0,05) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher.

\* : Lou/C vs Wistar ; \$ : actifs vs sédentaires.

A partir de la concentration protéique des extraits mitochondriaux, nous avons calculé la quantité de mitochondries en mg par gramme de muscle quadriceps. Les valeurs obtenues sont présentées dans la figure IV.9.

**Figure IV.9 : Effet de la souche et de l'activité physique sur la quantité de mitochondries estimée dans le muscle quadriceps.**



Les contenus en protéines mitochondriales en mg par g de tissu sont calculés à partir de la concentration en protéines des culots de mitochondries. Les résultats sont les moyennes  $\pm$  sem, n=6. Les comparaisons ( $p < 0,05$ ) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher. \* : Lou/C vs Wistar ; \$ : actifs vs sédentaires.

Nos résultats montrent que la faible activité physique spontanée des Wistar ne modifie pas le contenu en protéines mitochondriales de ce tissu. Le muscle des rats Lou/C tend à montrer une plus grande richesse en protéines mitochondriales et la forte activité physique de ces rats tend à accroître ce contenu. La conjonction de ces 2 effets conduit à un contenu en protéines mitochondriales plus important ( $P < 0,05$  ; + 30%) dans le muscle quadriceps des rats Lou/C actifs par comparaison aux rats Wistar actifs.

*En conclusion, nous ne mettons pas en évidence de différence d'activité respiratoire des mitochondries musculaires entre les deux souches de rats sédentaires. En revanche, l'importante activité physique spontanée du rat Lou/C entraîne une diminution de l'activité mitochondriale musculaire, associée à une augmentation du contenu mitochondrial musculaire. Ces résultats suggèrent une réduction de la respiration mitochondriale liée aux fuites de protons qui pourrait contribuer à améliorer le couplage des oxydations phosphorylantes et conjointement à l'augmentation de la quantité de mitochondries, à alimenter en ATP l'activité contractile accrue.*

#### 4. Influence de la souche et de l'activité physique spontanée sur l'activité des mitochondries de foie

Tableau IV.5 : Effet de la souche et de l'activité physique sur la respiration mitochondriale de foie en présence de succinate/roténone ou palmitoyl-carnitine/malate ± BSA.

**A** JO2 (natomO/min/mg prot) avec succ/roténone

	- BSA			+ BSA		
	état 2	état 3	état 4	état 2	état 3	état 4
	Wistar sed	25 ± 1	75 ± 8	27 ± 1	21 ± 3	101 ± 5
Wistar actif	28 ± 2	113 ± 19	29 ± 2	22 ± 2	131 ± 22	28 ± 2
Lou/C sed	30 ± 2 *	128 ± 3 *	35 ± 4	27 ± 2	143 ± 9 *	35 ± 5
Lou/C actif	31 ± 4	119 ± 13	46 ± 16	20 ± 4	139 ± 13	24 ± 3

**B** JO2 (natomO/min/mg prot) avec palm-carn/malate

	- BSA			+ BSA		
	état 2	état 3	état 4	état 2	état 3	état 4
	Wistar sed	21 ± 4	33 ± 2	24 ± 2	10 ± 1	35 ± 7
Wistar actif	28 ± 2	40 ± 2	27 ± 1	14 ± 2	47 ± 4	12 ± 0
Lou/C sed	27 ± 6	50 ± 1 *	32 ± 2 *	14 ± 1 *	58 ± 5 *	13 ± 1 *
Lou/C actif	33 ± 1	48 ± 7	32 ± 5	13 ± 0	59 ± 3	12 ± 0

Les mitochondries isolées de foie de rats (1,5 mg/mL) Wistar, Lou/C sédentaires ou actifs ont été incubées dans un milieu KCl avec (A) 5 mM de succinate plus 2 µM de roténone ± BSA (0,3%) ou (B) 50 µM de palmitoyl-carnitine plus 1 mM de malate ± BSA (0,3%). La consommation d'oxygène est mesurée à l'aide d'une électrode de Clark. Les résultats sont exprimés en moyenne ± sem, n=6. Les comparaisons (p<0,05) sont réalisées par une ANOVA suivie d'un test post hoc de PLSD Fisher. \* : Lou/C vs Wistar ; \$ : actifs vs sédentaires.

De façon générale, la respiration des mitochondries hépatiques (tableau IV.5) en présence de succinate / roténone est plus importante qu'en présence de palmitoyl-carnitine / malate. L'activité physique spontanée n'affecte pas les différents paramètres de la respiration des mitochondries isolées de foie de rats Wistar, ni de celles de rats Lou/C, pourtant très actifs. En revanche, des respirations plus fortes chez le rat Lou/C que chez le rat Wistar sont observées en présence de succinate / roténone, à l'état 2 et 3 sans BSA, et uniquement à l'état 3 avec BSA (tableau IV.5A). La respiration des mitochondries de foie de

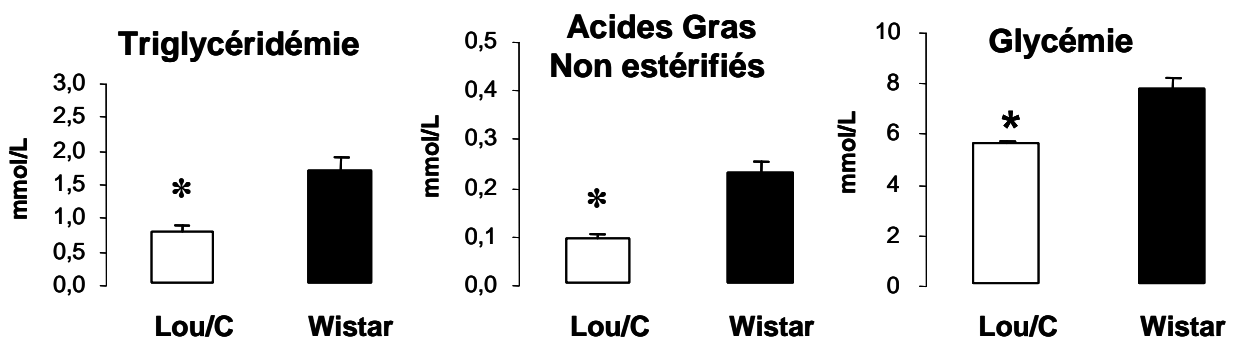
rats Lou/C est également plus forte que chez le rat Wistar en présence de palmitoyl-carnitine / malate à l'état 3 et 4 sans BSA et à l'état 2, 3 et 4 avec BSA (tableau IV.5B).

*Ces données suggèrent donc une plus grande consommation d'oxygène par les mitochondries de foie à l'état phosphorylant, ainsi qu'un découplage potentiel des oxydations et des phosphorylations d'où une possible implication des mitochondries de foie dans la dissipation de l'énergie superflue chez le rat Lou/C. Ce mécanisme pourrait dépendre notamment d'un effet découplant induit par les acides gras, ou d'une oxydation accrue des lipides.*

### 5. Existence d'un cycle futile entre synthèse et oxydation des acides gras impliquant le foie et le tissu adipeux ?

Les capacités respiratoires accrues des mitochondries hépatiques chez les rats Lou/C même en l'absence d'activité physique volontaire dans une roue d'activité pourraient témoigner d'une stimulation de cycles métaboliques potentiellement dissipateurs d'énergie. De plus, le potentiel d'oxydation des substrats lipidiques (palmitoyl-carnitine / malate) étant également supérieur chez les rats Lou/C, ces cycles pourraient affecter principalement le métabolisme des lipides. Afin d'approfondir cette hypothèse nous avons estimé les capacités de synthèse et d'oxydation des acides gras chez les rats Wistar et Lou/C en examinant deux tissus potentiellement impliqués, le foie et le tissu adipeux blanc.

Figure IV.10 : Effet de la souche sur les concentrations circulantes de certains substrats énergétiques



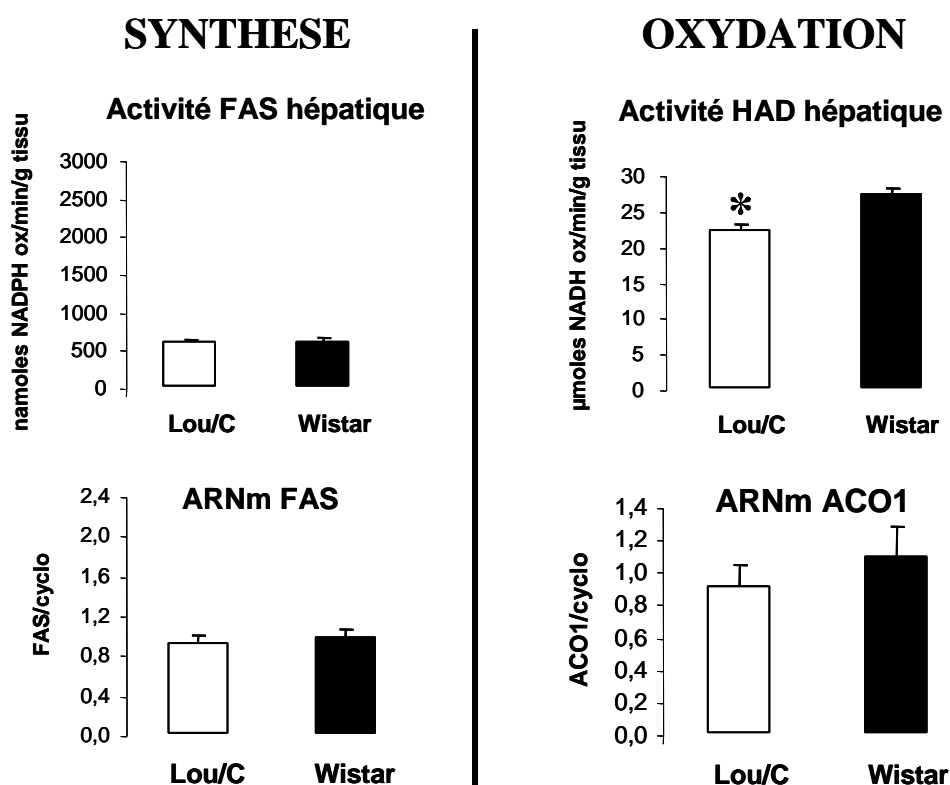
Les concentrations plasmatiques ont été déterminées par des dosages colorimétriques à partir d'échantillons recueillis chez des rats nourris. Les résultats sont les moyennes  $\pm$  sem, n=8. Les comparaisons ( $p < 0,05$ ) sont réalisées par des tests t. \*  $p < 0,05$  Lou/C vs. Wistar.

L'activité de synthèse des acides gras a été estimée à partir de l'abondance relative des ARNm de la synthétase des acides gras (fatty-acid synthase, FAS) et de son activité. L'activité d'oxydation des acides gras a été estimée à partir de l'abondance relative des

transcrits de l'acyl-CoA oxydase (ACO), et de l'activité de la 3-hydroxyacyl déshydrogénase (HAD), respectivement les première et troisième enzymes de la  $\beta$ -oxydation.

Les concentrations plasmatiques des triglycérides, des acides gras et du glucose sont plus faibles ( $p < 0,05$ ) chez les rats Lou/C que chez les rats Wistar (figure IV.11) suggérant soit une moindre capacité de lipogenèse / glucogenèse soit une plus grande activité d'oxydation de ces substrats.

**Figure IV.11 : Effet de la souche de rats sur les activités hépatiques de synthèse et d'oxydation des acides gras**

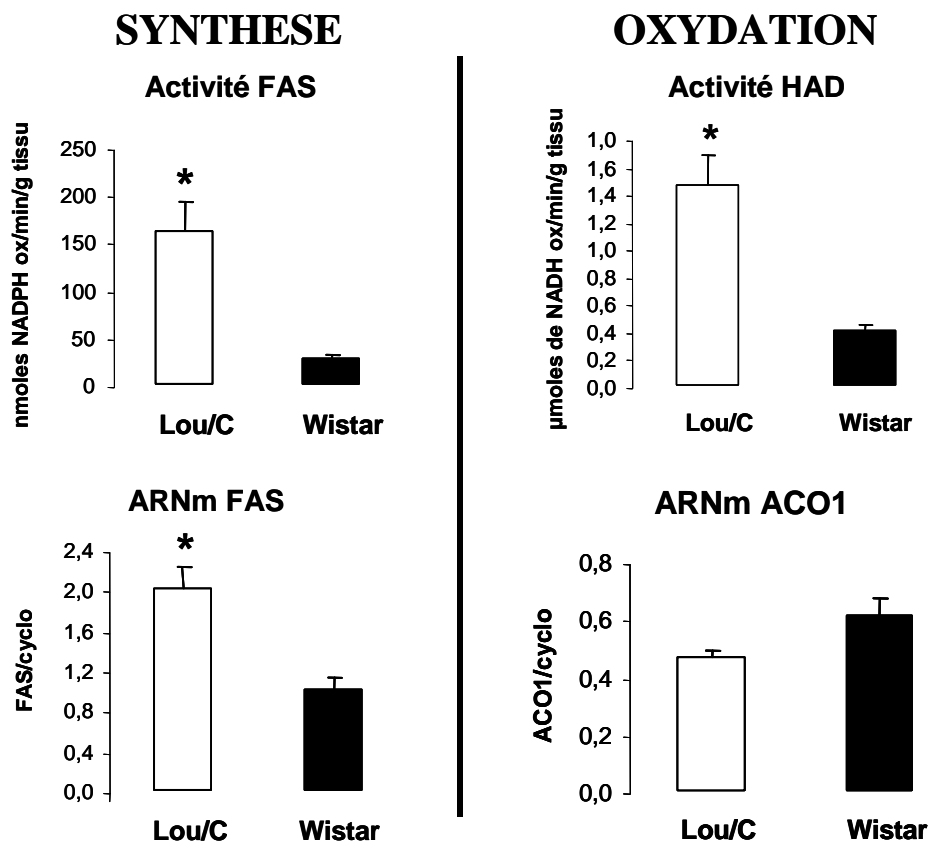


Les activités (fatty-acid synthase, FAS, et 3-hydroxyacyl déshydrogénase, HAD) ont été déterminées sur des homogénats de foie à partir d'échantillons recueillis chez des rats nourris. L'abondance des transcrits (FAS et acyl-CoA oxydase, ACO1) a été déterminée par RT-PCR semi-quantitative. La cyclophiline a été utilisée comme gène invariant. Les résultats sont les moyennes  $\pm$  sem,  $n=7-8$ . Les comparaisons ( $p < 0,05$ ) sont réalisées par des tests t. \*  $p < 0,05$  Lou/C vs. Wistar.

Les résultats obtenus dans le foie (figure IV.10) ne montrent pas de différence dans l'abondance des transcrits ou de l'activité de la FAS entre les rats Wistar et Lou/C. Comme la masse absolue du foie est supérieure chez les rats Wistar, la capacité totale de synthèse des acides gras devrait être néanmoins supérieure chez les rats Wistar. Mais pour 100 g de masse corporelle (cf. tableau IV.2), le foie des rats Lou/C ne montre pas de capacité réduite de synthèse des acides gras. L'activité HAD plus faible chez les rats Lou/C que chez les rats

Wistar malgré une abondance relative en ARNm d'ACO1 identique suggère une capacité légèrement plus faible d'oxydation des acides gras dans le foie des rats Lou/C. La juxtaposition de ces résultats avec les concentrations plasmatiques observées suggère que soit les lipides synthétisés ne sont pas exportés par le foie, soit qu'ils sont majoritairement oxydés dans d'autres tissus. Ils pourraient également servir d'agents découplants des oxydations phosphorylantes mitochondriales hépatiques.

Figure VI.12 : Effet de la souche de rats sur les activités de synthèse et d'oxydation des acides gras du tissu adipeux blanc



Les activités (fatty-acid synthase, FAS, et 3-hydroxyacyl déshydrogénase, HAD) ont été déterminées sur des homogénats de tissu adipeux blanc à partir d'échantillons recueillis chez des rats nourris. L'abondance des transcrits (FAS et acyl-CoA oxydase, ACO1) a été déterminée par RT-PCR semi-quantitative. La cyclophiline a été utilisée comme gène de référence. Les résultats sont les moyennes  $\pm$  sem, n=7-8. Les comparaisons ( $p < 0,05$ ) sont réalisées par des tests t. \*  $p < 0,05$  Lou/C vs. Wistar.

Les résultats obtenus dans le tissu adipeux blanc (figure IV.12) montrent une activité de synthèse des acides gras beaucoup plus élevée (ARNm, + 100%, et activité FAS, + 680%) chez les rats Lou/C par comparaison aux rats Wistar. Dans le même temps, l'activité HAD est 3,6 fois plus élevée dans le tissu adipeux des rats Lou/C par comparaison aux rats Wistar sans variation de l'abondance relative de l'ARNm de l'ACO1. Ces résultats suggèrent une activation de la voie de synthèse des acides gras et de leur oxydation dans le tissu

*adipeux blanc des rats Lou/C, formant un cycle futile dissipateur d'énergie qui pourrait contribuer à la faible abondance des réserves adipeuses dans cette souche.*

## **DISCUSSION**

Les résultats obtenus montrent que l'activité physique spontanée stimule la prise alimentaire sans affecter la masse corporelle mais en modifiant la composition corporelle des rats, notamment celle des rats Lou/C. La souche de rats et l'activité physique spontanée influencent peu les caractéristiques fonctionnelles des mitochondries de BAT et de muscle squelettique alors que le foie semble doté de capacités respiratoires et thermogènes accrues. Enfin nos résultats suggèrent l'existence d'un cycle futile de synthèse et d'oxydation des acides gras dans le tissu adipeux blanc des rats Lou/C.

### **1. L'activité physique volontaire des rats Lou/C affecte sa prise alimentaire et sa composition corporelle**

La mise à disposition d'une roue d'activité en libre accès dans les cages stimule le comportement locomoteur des rats, avec un effet exacerbé chez les rats Lou/C. Même si un léger phénomène de lassitude peut apparaître à partir de la 5<sup>ème</sup> semaine d'enregistrement, donc de la 8<sup>ème</sup> semaine d'activité, chez les rats Wistar et Lou/C, l'activité locomotrice volontaire reste stimulée et bien plus importante chez les rats Lou/C que les rats Wistar. Au cours de cette période d'activité, les rats Wistar n'augmentent pas leur prise calorique, ce qui n'est guère surprenant au vu de la faible distance qu'ils parcourent chaque jour. En revanche, les rats Lou/C, très actifs, ingèrent en moyenne 223 kJ/jour/kg de plus (soit 31% de plus) que les rats Lou/C sédentaires, n'ayant pas accès à une roue d'activité. Ces résultats confirment l'étude de Servais *et al.* qui montrait que l'activité physique spontanée des rats Lou/C atteint son niveau maximum après 4 à 5 semaines, et se maintient au cours des 16 semaines suivantes en association avec une augmentation de l'ingéré alimentaire (Servais *et al.*, 2003). Si la masse corporelle des rats Wistar et Lou/C n'est pas affectée par l'activité physique spontanée, la composition corporelle était par contre légèrement modifiée avec une tendance à la réduction de la masse de tissu adipeux blanc. Une réduction de la masse des dépôts de tissu adipeux blanc épидidymal et rétropéritonéal chez les rats Lou/C actifs par comparaison aux animaux sédentaires a également été décrite (Servais *et al.*, 2003). Ces résultats indiquent que les rats Lou/C doivent puiser dans leurs réserves énergétiques pour compenser la dissipation d'énergie induite par l'activité physique spontanée. De même, des rats Long-Evans, dont l'activité physique spontanée est élevée (environ 4000 mètres par jour à l'âge de 20 semaines), puisent massivement dans leurs

réserves énergétiques adipeuses en l'absence d'augmentation de leur prise alimentaire avec l'activité (Hollooszy, 1997; Holloszy and Schechtman, 1991; Holloszy et al., 1985). Bien que les niveaux d'activité physique spontanée entre les deux souches de rats : Lou/C et Long-Evans ne soient pas tout à fait comparables (12000 vs 4000 m/j), il est possible d'envisager que ces deux souches de rats se retrouvent dans des situations de balance énergétique négative liée à une restriction calorique relative à leur dépense conduisant à la mobilisation des stocks adipeux. Il est intéressant d'observer que si des rats réduisent leur activité physique spontanée après quelques mois d'exposition à une roue d'activité, la restriction calorique reverse cet effet (Hollooszy and Schechtman, 1991; Holloszy et al., 1985). La restriction calorique relative du rat Lou/C actif pourrait donc contribuer à maintenir cette activité. On peut toutefois s'interroger sur l'insuffisance de l'augmentation d'ingéré alimentaire chez le rat Lou/C actif puisqu'il n'a pas atteint le maximum de ses capacités d'ingestion. En effet nous avons montré que l'exposition au froid a un effet activateur plus puissant que l'activité physique sur la prise alimentaire de ces rats (*cf.* étude III).

### **2. Le BAT n'est pas inactivé par l'activité locomotrice spontanée**

Contrairement aux données de la littérature qui indiquent que l'entraînement physique endurant imposé sur tapis roulant réduit l'activité du BAT avec notamment une diminution, chez les rats entraînés, de la conductance aux protons (-40%) (Larue-Achagiotis, 1995) et des capacités oxydatives tissulaires (-400%) (Terblanche et al., 2001), nos résultats ne montrent pas d'inactivation du tissu, voire même une légère stimulation pour les rats Lou/C actifs. Nous observons en effet une tendance à l'augmentation de la respiration mitochondriale de ce tissu en liaison avec une abondance accrue de la protéine UCP1 chez les rats Lou/C actifs. Cette activation reste cependant minime et permet au mieux d'atteindre les niveaux d'expression et d'activité respiratoire observés chez les rats Wistar. Si ces résultats sont favorables à une contribution du BAT dans la dépense énergétique accrue des rats Lou/C, ce rôle doit cependant être quantitativement restreint. Cette légère activation du BAT ne s'accompagne d'ailleurs pas de modifications significatives et généralisées de l'expression des protéines impliquées dans le transport des substrats énergétiques aux mitochondries des adipocytes bruns. La stimulation des capacités oxydatives du BAT pourrait être permise grâce à son innervation sympathique, mais également grâce à des hormones cataboliques telles que la noradrénaline, le glucagon et la 3,5,3'-triiodo-L-thyronine dont les concentrations circulantes sont augmentées lors de l'exercice physique (Christensen and Galbo, 1983).

La divergence entre nos résultats et les données de la littérature pourrait être liée au type d'activité physique en lui-même. En effet, les études citées font référence à un



entraînement physique imposé sur tapis roulant. Les rats courent donc en moyenne une dizaine de minutes par jour, 5 jours par semaine, pendant 4 à 5 semaines. Les rats Wistar et Lou/C de notre étude ne sont pas contraints, mais peuvent utiliser à loisir une roue d'activité : ni l'intensité, ni la durée, ni la fréquence de l'exercice ne sont imposées. Le principe même de ce type d'activité pourrait générer des différences dans les mécanismes d'adaptation sous-jacents, notamment en stimulant fortement les activités enzymatiques, et par conséquent l'accroissement des flux métaboliques. Dans le cas d'une diminution de l'activité du BAT avec l'entraînement physique, les auteurs proposent que cette moindre capacité du BAT à oxyder les substrats chez les animaux entraînés permettrait d'une part, de limiter l'augmentation de température générée par l'activité musculaire, et d'autre part, d'augmenter l'extrusion des acides gras vers d'autres sites d'oxydation, tels que le muscle squelettique, très sollicité lors de ce type d'exercice. Si l'on peut imaginer une substitution partielle de la thermogenèse de régulation au niveau du BAT avec la thermogenèse liée à l'activité physique spontanée, comme cela a été montré chez le rat (Makinen et al., 1996), il n'en demeure pas moins que l'activité physique augmente les pertes de chaleur par convection. L'activité physique spontanée impressionnante du rat Lou/C augmenterait donc fortement ses pertes de chaleur, et il serait donc contraint de stimuler légèrement l'activité mitochondriale de son BAT lorsqu'il est actif, afin de maintenir sa température corporelle. Cette légère activation n'induirait qu'une faible activation des processus d'apports de substrats et pourrait donc être cohérente avec l'augmentation de l'expression de la FABP<sub>PM</sub> dans le BAT des rats Lou/C actifs. Il conviendrait toutefois de confirmer ces résultats en déterminant notamment le devenir des pools intracellulaires de FABP<sub>PM</sub> qui peuvent subir une translocation à la membrane plasmique en cas de besoin (Chabowski et al., 2007 ; Han et al., 2007).

### **3. Le muscle squelettique de rat Lou/C montre peu de modifications fonctionnelles de ses mitochondries mais est plus riche en mitochondries**

Le muscle squelettique pouvait constituer une source importante de dissipation énergétique de par son implication contractile dans la locomotion et sa contribution à la dépense énergétique globale de l'organisme (Rolfe et al., 1999). Nos résultats ne montrent pas de différence marquée dans les caractéristiques fonctionnelles des mitochondries musculaires entre les souches de rats dans nos conditions expérimentales *in vitro*. L'activité physique énorme du rat Lou/C s'accompagne d'une diminution significative de la respiration mitochondriale aux états 2, 3 et 4 par comparaison aux rats Lou/C sédentaires. Ce résultat surprenant s'oppose à ce qui est décrit dans la littérature, où l'état 3 est au moins maintenu chez des rats entraînés sur tapis roulant (Roussel et al., 2000). Il apparaît donc que l'activité

physique spontanée importante ne soit pas transposable à un entraînement imposé.

Toutefois, nos résultats montrent aussi une augmentation de la quantité de mitochondries estimée par gramme de tissu chez les rats Lou/C actifs, par comparaison aux rats Wistar actifs, ce qui pourrait permettre de conserver à l'échelle du tissu une activité globale stimulée malgré une activité respiratoire par mitochondrie plus faible. Il est possible que ce résultat découle d'un enrichissement accru dans nos extraits mitochondriaux de mitochondries subsarcolemmales chez les rats actifs. En effet, il a été montré que la proportion de mitochondries subsarcolemmales augmente fortement après entraînement à l'exercice endurant (Hoppeler, 1986). Comme l'isolement de nos mitochondries de muscle était effectué en présence de protéase, nous permettant d'obtenir une population mixte de mitochondries subsarcolemmales et intermyofibrillaires, la respiration globale peut dépendre d'une plus grande proportion de ces mitochondries subsarcolemmales. Comme la respiration à l'état 3, c'est-à-dire à l'état phosphorylant, des mitochondries subsarcolemmales est 3 fois plus faible que celle des intermyofibrillaires, une augmentation de leur proportion pourrait induire une moindre respiration à l'état 3 globale d'une population mixte de mitochondries.

La réduction de l'état 4 non phosphorylant pourrait traduire une amélioration des processus phosphorylants mitochondriaux dans les mitochondries musculaires en présence de BSA piégeant les acides gras. Une réduction de cet état respiratoire, qui dépend principalement de la perméabilité de la membrane interne aux protons et du patinage des pompes membranaires, traduirait une moindre dissipation du gradient de protons soit à travers la membrane soit en liaison avec un moindre patinage de la cytochrome oxydase (COx), induisant une plus faible consommation d'oxygène pour une même synthèse d'ATP. Cependant, en isolant séparément les mitochondries intermyofibrillaires, il a été montré que les respirations de mitochondries isolées de quadriceps aux états 3 et 4 étaient plus faibles pour les subsarcolemmales que pour les intermyofibrillaires, mais qu'elles n'étaient pas affectées par l'activité physique spontanée (Servais et al., 2003). Ces données renforcent l'hypothèse d'une plus grande proportion de mitochondries subsarcolemmales dans notre population mixte de mitochondries musculaires.

Si l'activité locomotrice accrue des Lou/C peut effectivement activer les oxydations musculaires pour régénérer les phosphagènes consommés par l'activité des protéines contractiles, le rôle du muscle au repos apparaît moins évident dans la dépense énergétique accrue du rat Lou/C. Toutefois, même si l'activité respiratoire par mg de protéines mitochondriales est similaire entre rats Lou/C et Wistar sédentaires, la plus grande richesse en protéines mitochondriales des muscles squelettiques des rats Lou/C pourrait occasionner des oxydations accrues. Il conviendrait de trouver un mécanisme activateur des processus oxydatifs avec une activité contractile réduite. Si les mitochondries isolées de quadriceps de rats Wistar et Lou/C sont identiques en terme de conductance aux protons, en présence de

palmitate, la consommation d'oxygène de ces mitochondries est fortement stimulée, pour un même potentiel de membrane et cet effet est reversé par ajout de GDP, un inhibiteur des protéines découplantes (Garait et al., 2005). Comme on observe une augmentation de l'abondance des transcrits UCP3 dans le muscle quadriceps des rats Lou/C (Garait et al., 2005) et une abondance accrue de la protéine UCP3 dans les mitochondries isolées des muscles soléaires et EDL (Sibille B., données non publiées), un découplage UCP3-dépendant activé par les acides gras pourrait contribuer à une dépense énergétique accrue du muscle squelettique chez les rats Lou/C.

Dans nos conditions de mesure de la respiration mitochondriale, en l'absence d'acides gras ou d'activateurs des UCPs musculaires comme l'ion superoxyde (Cadenas et al., 2002), nous n'étions vraisemblablement pas dans les conditions optimales pour montrer une différence des caractéristiques fonctionnelles des mitochondries musculaires des rats Lou/C. Il conviendrait de reprendre ces études en essayant de reproduire des conditions de stimulation optimales.

#### **4. Le foie pourrait être impliqué dans la dépense énergétique accrue des rats Lou/C**

Le foie est un véritable carrefour métabolique vital et sa participation au métabolisme de repos chez le rongeur, non négligeable, nous a conduits à considérer l'implication de cet organe dans la dépense énergétique accrue du rat Lou/C, mise en évidence lors de l'étude I. Nous avons montré que l'activité physique spontanée n'induisait pas de modification de l'activité mitochondriale du foie des rats Wistar et Lou/C. En revanche, chez les animaux sédentaires, nous observons que la respiration mitochondriale, en présence de succinate / roténone (- BSA) et de palmitoyl-carnitine / malate (+ BSA) est plus importante dans le foie des rats Lou/C, par comparaison aux rats Wistar. De plus, nos résultats mettent en évidence une augmentation de la respiration mitochondriale (états 3 et 4) en présence de palmitoyl-carnitine / malate (+/- BSA) ainsi qu'une tendance à l'augmentation en présence de succinate / roténone (+/- BSA), bien que non significative. Ces résultats indiquent une modification de la bioénergétique mitochondriale dans le foie des rats Lou/C.

Nos résultats confirment une étude récente montrant que la consommation d'oxygène des mitochondries de foie de rat Lou/C était augmentée par comparaison aux rats Wistar (Lacraz et al., 2008). L'importante augmentation de la respiration mitochondriale de foie des rats Lou/C notamment en présence de palmitoyl-carnitine suggère une oxydation préférentielle des acides gras dans ce tissu, comme cela a été montré avec des hépatocytes isolés de rats Lou/C (Taleux et al., 2009). Nous observons une respiration mitochondriale à l'état 4 (+oligomycine), c'est-à-dire en condition non phosphorylante, plus importante dans le foie des rats Lou/C. Deux mécanismes pourraient contribuer à ces pertes énergétiques.

D'une part, la perméabilité membranaire aux protons ou « *proton leak* » pourrait être augmentée. A l'origine de ces fuites de protons à travers la membrane interne mitochondriale, deux phénomènes potentiels seraient envisageables : soit une augmentation de l'activité de protéines telles que l'UCP ou l'ANT, soit une modification de la composition membranaire. D'autre part, un patinage des pompes ou « *slip* » pourrait également expliquer cette stimulation de la respiration à l'état 4 dans le foie des rats Lou/C. Lacraz *et al.* ont travaillé ces différentes hypothèses et montrent que la diminution de l'efficacité de l'oxydation phosphorylante des mitochondries de foie de rats Lou/C n'est pas expliquée par une augmentation de l'expression de la protéine UCP2, dont la présence dans le foie est encore contestée. De plus, dans notre étude, nous ne mettons pas en évidence d'effet du GDP (inhibiteur de l'UCP) sur la respiration à l'état 4, suggérant donc bien que le « *proton leak* » ne serait pas l'explication la plus probable. Toutefois, en l'absence d'étude de l'activité de la protéine ANT et de la composition membranaire des mitochondries de foie de rats Lou/C, nous ne pouvons totalement exclure l'hypothèse d'un « *proton leak* ». L'hypothèse d'un mécanisme de type « *slip* » a par contre été étayée par l'observation d'une respiration accrue pour maintenir un même potentiel de membrane sur des mitochondries de foie du rat Lou/C (Lacraz *et al.*, 2008). Ce résultat suggère soit une perméabilité de la membrane variable en fonction de la force protonmotrice (« *leak* » non ohmique) (Brand *et al.*, 1994b), soit un changement de stoechiométrie (patinage ou « *slip* ») des pompes membranaires en fonction de la force protonmotrice et/ou du flux au travers de ces pompes (Murphy and Brand, 1987; Pietrobon *et al.*, 1983). Le « *slip* » pourrait être expliqué par une augmentation de la quantité de cytochrome oxydase (COx) : la corrélation entre quantité de cytochrome oxydase et « *slip* » étant désormais bien établie (Piquet *et al.*, 2000). Nos résultats montrent que la respiration à l'état 3, c'est-à-dire en conditions phosphorylantes, est stimulée dans les mitochondries de foie de rats Lou/C, ce qui soutiendrait l'hypothèse d'une majoration de la quantité de COx. Lacratz *et al.* ont montré que l'activité de la COx, ainsi que le contenu en cytochrome aa3 étaient augmentés dans le foie des rats Lou/C. En s'appuyant sur nos résultats ainsi que ceux de Lacraz *et al.* (Lacraz *et al.*, 2008), nous pourrions suggérer le « *slip* » au niveau de la COx comme mécanisme prépondérant dans les mitochondries de foie de rat Lou/C, expliquant leur plus forte consommation d'oxygène, et l'oxydation accrue des acides gras par les hépatocytes isolés des rats Lou/C. En effet, plusieurs travaux montrent que les hépatocytes isolés de foie de Lou/C respirent plus, notamment en présence de substrats lipidiques et produisent plus de corps cétoniques, ce qui confirme que le foie des rats Lou/C oxyde plus les acides gras que celui des rats Wistar (B. Sibille, communication personnelle) ; (Taleux *et al.*, 2009).

Malgré des concentrations circulantes en hormones thyroïdiennes identiques dans les deux souches de rats (Garait *et al.*, 2005), il a été observé une plus grande expression

des récepteurs aux hormones thyroïdiennes dans le foie des rats Lou/C (Taleux et al., 2009). Au niveau hépatique, chez le rat Lou/C, l'effet des hormones thyroïdiennes serait donc potentialisé, induisant une stimulation de l'expression de l'enzyme glucose-3-phosphate déshydrogénase ( $G_3PdH$ ) mitochondriale. Cette enzyme était plus active dans le foie des rats Lou/C lorsque le milieu est riche en acides gras. La  $G_3PdH$  assure le fonctionnement de la navette glycérol-3-phosphate (G3P). La navette G3P consomme du NADH cytosolique et produit du  $FADH_2$  dans la matrice mitochondriale (cf. paragraphe I.4.2.4). Comme le  $FADH_2$  est oxydé directement au niveau du complexe II, « ignorant » le complexe I, l'activité de cette navette tendrait à diminuer le nombre de protons expulsés par molécule d'oxygène consommée à partir du NADH. Dans le foie du rat Lou/C, l'activité de la navette  $G_3PdH$  semble plus importante, en présence d'acides gras, expliquant que le rendement de l'oxydation phosphorylante soit diminué, et que les acides gras soient plus oxydés. L'utilisation accrue des acides gras par les mitochondries hépatiques expliquerait en partie le moindre stockage de graisse du rat Lou/C, ainsi que la plus forte dépense énergétique observée dans cette souche.

## **5. Existence d'un cycle futile entre synthèse et oxydation des acides gras entre le foie et le tissu adipeux blanc**

En se basant sur l'activité et l'expression d'enzymes impliquées dans les voies de synthèse et d'oxydation des acides gras, nous mettons en évidence que le foie des rats Lou/C posséderait une activité de synthèse des acides gras comparable à celle des rats Wistar et que le tissu adipeux blanc du rat Lou/C serait doté de capacités considérables de synthèse des acides gras. Au moins en ce qui concerne l'activité enzymatique de synthèse hépatique des acides gras estimée par la fatty acid synthase (FAS), le rat Lou/C maigre semble disposer des mêmes capacités que le rat Wistar. Si l'on rapproche ces observations aux concentrations circulantes d'acides gras qui sont plus faibles chez le rat Lou/C, il apparaît clairement que ces acides gras doivent être oxydés de façon accrue dans cette souche de rats. En effet, il est peu probable qu'une stéatose s'installe dans le foie des rats Lou/C au regard de la masse du foie et de l'aspect de ce tissu à la dissection. De plus, les travaux de thèse de K. Couturier montrent que le contenu en triglycérides hépatiques est nettement inférieur chez le rat Lou/C, par comparaison au rat Wistar. Au vu des caractéristiques fonctionnelles des mitochondries hépatiques, l'un des sites d'oxydation de ces acides gras pourrait être le foie, confortant les observations sur hépatocytes isolés effectuées par d'autres (Taleux et al., 2009). Cette capacité d'oxydation des acides gras ne se reflète toutefois ni sur l'expression de l'acylCoA oxydase (ACO1) dont l'abondance du transcrit n'est pas modifiée chez les rats Lou/C, ni sur l'activité de la 3-hydroxyacyl

déshydrogénase (HAD) qui semble diminuée. Il pourrait être judicieux d'approfondir les processus d'échanges des lipides entre le foie et le tissu adipeux blanc ou le muscle afin de déterminer si ces étapes peuvent être stimulées chez les rats Lou/C.

Il est spectaculaire d'observer que le tissu adipeux blanc de ces rats Lou/C présente à la fois une forte activité enzymatique de synthèse des acides gras et une forte activité d'oxydation de ces substrats. Si les capacités oxydatives du tissu adipeux blanc sont faibles, elles ne peuvent être considérées comme négligeables, et nos résultats seraient en faveur de processus futiles de synthèse et d'oxydation des acides gras dans ce tissu. Ce résultat est à rapprocher de la mise en évidence de l'expression de l'UCP1 dans le tissu adipeux blanc des rats Lou/C (Veyrat-Durebex et al., 2009) suggérant soit une expression de ce gène dans les adipocytes blancs soit une infiltration du tissu adipeux blanc par des adipocytes bruns. Comme l'expression du gène de l'UCP1 apparaît très spécifique des adipocytes bruns, la seconde hypothèse devrait être privilégiée.

En tout état de cause, la maigreur des rats Lou/C ne peut être incriminée à un déficit de synthèse des acides gras au vu de l'activité FAS dans le foie et les adipocytes blancs, mais devrait être liée à des capacités accrues d'oxydation de ces substrats. L'installation de tels cycles futiles entre synthèse et oxydation des acides gras pourrait contribuer à réduire le stockage de ces molécules même en l'absence d'hyperactivité locomotrice et donc se produire y compris chez les rats Lou/C sédentaires qui restent plus maigres que les rats Wistar. Même si l'activité physique des rats Lou/C peut être supérieure à celle des rats Wistar, elle est sans commune mesure avec celle développée en présence d'une roue d'activité. Dans ces conditions de sédentarité, l'influence du muscle squelettique doit certainement être plus faible. Le relais peut être pris par d'autres tissus comme le foie, le tissu adipeux blanc et dans une moindre mesure par le muscle squelettique.

## CONCLUSION

Lorsqu'il est actif, le rat Lou/C augmente fortement sa dépense énergétique qui ne peut être compensée par l'augmentation de la prise alimentaire. Le muscle squelettique, le foie et le tissu adipeux brun peuvent contribuer à cette dépense énergétique accrue liée à l'activité physique très importante de ce modèle.

Chez les rats sédentaires, l'implication du BAT et du muscle squelettique paraît moindre. La dépense énergétique accrue des rats Lou/C dans les conditions basales peut être soutenue par des processus accrus d'oxydation des acides gras notamment dans le foie, associés à une synthèse accrue des acides gras dans le tissu adipeux blanc constituant un possible cycle futile dissipateur d'énergie.



# Annexe méthodologique





### 1. Technique d'isolement des mitochondries

L'extraction des mitochondries de muscle squelettique, de BAT inter scapulaire et de foie repose sur une technique de fractionnement des composés cellulaires par centrifugation différentielle {Hogeboom, 1955 #323}. Elle a été réalisée à l'aide d'une ultracentrifugeuse (Beckman modèle L3 70) thermostatée à 4°C. Une fois prélevés, le muscle quadriceps, le BAT, ainsi que le foie ont été immédiatement placés à 4°C dans un milieu d'isolement approprié :

Muscle : saccharose 100 mM, KCl 50 mM, EDTA 5 mM, Tris Base 50 mM, pH 7,4

BAT : KCl 100mM, TES 20 mM, EGTA 0.1 mM, pH 7,0

Foie : saccharose 250 mM, Tris HCl 20 mM, EGTA 1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, pH 7,25

À raison de 10 mL/g sauf pour le foie qui a été placé entièrement dans 50 mL.

Les tissus ont ensuite été émincés aux ciseaux, en petits morceaux, qui sont rincés abondamment avec le même tampon froid pour éliminer le maximum d'hématies et des dépôts lipidiques. Ces morceaux sont ensuite homogénéisés par 5 passages successifs de piston en téflon, dans un potter en verre, type Elvehjem (muscle et foie : 600 tr/min ; BAT : 200 tr/min). Un aliquot de 100 µL d'homogénat a été prélevé et congelé dans l'azote liquide, afin de réaliser des dosages de rendement d'extraction ultérieurs.

#### 1.1 Mitochondries hépatiques

L'homogénat tissulaire restant était centrifugé à 800g pendant 10 minutes à 4°C, permettant ainsi l'élimination par sédimentation des gros débris cellulaires, les noyaux, le cytosquelette et les cellules intactes.

Le surnageant, contenant les mitochondries, a été filtré à travers une gaze, transvasé puis centrifugé à 8000g afin de précipiter les mitochondries. Le surnageant contient les composants solubles et les microsomes. Le culot obtenu a été remis délicatement en suspension dans du tampon puis re-centrifugé à 8700g avant d'être rincé une deuxième fois. La suspension de mitochondries finale a été obtenue en reprenant le dernier culot avec un minimum de tampon d'homogénéisation (≈ 500 µL) ; elle est conservée à 4°C.

#### 1.2 Mitochondries musculaires

Après homogénéisation, le muscle a été soumis à une digestion par une protéase (subtilisin) à raison de 1 mg/g de tissu à 4°C. Après 5 minutes, la réaction a été arrêtée par ajout d'un égal volume de tampon d'isolement et l'homogénat était soumis à une deuxième pottérisation afin de libérer les mitochondries contenues entre les myofibrilles. L'homogénat

final a été centrifugé à 1000g et le surnageant obtenu filtré puis traité comme pour le foie. Le dernier culot est resuspendu avec délicatesse dans un volume minimum de tampon de stockage (saccharose 250 mM, Tris-Base 10 mM, EGTA 0,1 mM, pH 7,4).

### **1.3 Mitochondries de BAT**

Après la première centrifugation à 800g, le surnageant a été filtré sur gaze et le culot repris dans du tampon d'isolement puis centrifugé à 800g. Cette étape a alors été répétée. Les 2 pools de surnageant ont ensuite été centrifugés à 8700g. Le culot obtenu a été remis en suspension dans le même tampon, auquel est additionné 0,3% de d'albumine bovine sérique (BSA) délipidée, afin de complexer les acides gras libres. La BSA a ensuite été enlevée par 3 lavages et centrifugations à 8700g avec du tampon d'isolement sans BSA. Le culot ainsi obtenu est remis en suspension dans un volume minimum de tampon d'homogénéisation ( $\approx$  100  $\mu$ L) {Oufara, 1988 #176}.

### **1.4 Détermination de la quantité de protéines**

La concentration de la suspension mitochondriale était estimée par dosage des protéines selon la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA), se fondant sur la réduction du  $\text{Cu}^{2+}$  en  $\text{Cu}^+$  des protéines lorsqu'elles se trouvent en milieu alcalin. 2  $\mu$ L de suspension diluée ont été mis en présence de 1mL de réactif du kit de dosage « BCA Protein Assay » de Pierce. Après avoir été vortexés, les échantillons ont été incubés 30 minutes à 37°C, puis ont été refroidis à température ambiante. La détection se fait par colorimétrie grâce à l'interaction de l'acide bicinchoninique avec le  $\text{Cu}^{2+}$ . Les densités optiques des échantillons étaient lues au spectrophotomètre à 562 nm. La quantité de protéines contenues dans l'échantillon a été déterminée et exprimée en mg / mL à l'aide d'une gamme étalon réalisée avec une solution d'albumine bovine sérique (BSA) à 2 mg/mL. La concentration protéique de la suspension mitochondriale était déterminée avant chaque manipulation afin de travailler avec des quantités connues de protéines mitochondriales.

## **2. Mesure de la consommation d'oxygène par les mitochondries isolées**

### **2.1 Principe**

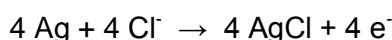
La consommation d'oxygène ( $\text{O}_2$ ) par les mitochondries isolées était mesurée dans une chambre d'oxygraphie thermostatée (37°C), fermée et agitée à l'aide d'un barreau

aimanté, munie d'une électrode de Clark mesurant en continu la concentration d'oxygène du milieu. L'électrode de Clark est composée d'une cathode en platine polarisée à -0,6 Volts et d'une anode en argent, immergées dans une solution à demi saturée de KCl, et isolées de la cuve de mesure par une membrane de téflon, laissant diffuser l'oxygène. Dans ces conditions, les variations de courant induites par la réduction de l'oxygène au niveau de la cathode sont directement proportionnelles aux variations de la quantité d'oxygène dissoute dans le milieu d'incubation.

Au contact de la cathode (platine), l'oxygène provenant du milieu à tester est réduit selon la réaction suivante :

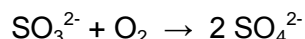


Au niveau de l'anode (argent), la réaction d'oxydation se produisant est de la forme :



Il existe donc un faible courant électrique entre les 2 électrodes (4 e<sup>-</sup> transférés par l'O<sub>2</sub> réduit) proportionnel à la pression partielle d'O<sub>2</sub> dans le milieu électrolytique. La cinétique de variation de ce courant dépend *in fine* de la vitesse de respiration des mitochondries que l'on peut enregistrer en fonction de différents produits ajoutés séquentiellement.

La consommation d'oxygène était mesurée en continu à l'aide d'un oxygraphe préalablement calibré en effectuant un « zéro » et un « 100% ». Le zéro est le point correspondant à une pression partielle en oxygène nulle. Cette condition était obtenue en ajoutant, en excès, du bisulfite de sodium (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>) à de l'eau distillée, lequel transforme l'oxygène du milieu selon la réaction :



Ce point zéro était également vérifié lors de la première mesure de la respiration mitochondriale en laissant l'enregistrement défiler jusqu'à consommation de tout l'oxygène présent.

Le 100% était obtenu après équilibration du milieu de respiration avec l'air atmosphérique par bullage, et correspond à la saturation du milieu en oxygène dissout à la pression atmosphérique (440 nanoatomes d'O<sub>2</sub> / mL, à 37°C dans un milieu KCl).

### 2.2 Procédure

La consommation d'oxygène par les mitochondries isolées était mesurée à 37°C dans un milieu de respiration tamponné à pH 7,25 contenant 125 mM de KCl, 1mM d'EGTA, 20 mM de Tris-HCl et 2 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> additionné ou non de BSA délipidée à la concentration finale de 0,3%.

A ce tampon étaient ajoutées les mitochondries : 0,1 à 1,5 mg/mL de suspension mitochondriale selon le tissu étudié. Les mitochondries étaient activées par différents

substrats : 5 mM de succinate permettaient de fournir son substrat à la succinate déshydrogénase liée au complexe II. En effet, le succinate est réduit en fumarate par la succinate déshydrogénase, formant par cette réaction du FADH<sub>2</sub>. 1,25 µM de roténone étaient administrés parallèlement au succinate, évitant ainsi le flux inverse des électrons vers le complexe I. Un autre substrat utilisé était le palmitoyl-carnitine (50 µM) qui reflète la respiration liée au métabolisme des acides gras. On lui associait 1 mM de malate qui génère du NADH au sein de la matrice mitochondriale par l'intermédiaire de la malate déshydrogénase.

Après addition du substrat, les mitochondries respirent de façon non phosphorylante, c'est-à-dire non couplée à la synthèse d'ATP. Cela correspond à la respiration basale en présence de substrat, appelée « état 2 ». L'addition de 1 mM d'ADP permettait d'alimenter l'ATP-synthase ce qui lui autorisait l'utilisation du gradient électrochimique de protons pour catalyser la réaction  $ADP + P_i \rightarrow ATP$ . Nous avons mesuré cette fois-ci la respiration en condition phosphorylante, nommée « état 3 ». L'ajout de 1,25 µg/µL d'oligomycine, un inhibiteur de l'ATP-synthase, permettait d'apprécier la respiration résiduelle, due aux pertes énergétiques, c'est-à-dire au retour passif des protons au travers de la membrane mitochondriale interne. Cette respiration insensible à l'oligomycine est appelée « état 4 ». Sur la respiration à l'état 4 des mitochondries de BAT, du GDP, inhibiteur spécifique des UCPs, était ajouté. Si la respiration résiduelle était le fait des UCPs, l'ajout du GDP induisait alors une diminution des fuites de protons, donc une diminution de la consommation d'oxygène.

### ***2.3 Calcul des paramètres respiratoires***

La consommation d'oxygène aux états 2, 3 et 4 a été obtenue en rapportant la diminution de la concentration d'oxygène dans le milieu respiratoire par unité de temps et par mg de protéines mitochondriales.

La qualité, ainsi que la fonctionnalité des mitochondries ont été estimées par le rapport de contrôle respiratoire ou RCR (état 3 / état 4), lequel renseigne sur le degré de contrôle de la respiration par l'ADP, qui traduit directement l'état de couplage de la mitochondrie (Estabrook, in *methods in enzymology*, vol X, 1967).

### 3. Technique de Western Blot

#### 3.1 Electrophorèse sur gel SDS-PAGE

Le gel SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) est un polymère qui permet la séparation des protéines dénaturées en fonction de leur poids moléculaire. Le SDS, un puissant détergent anionique, dénature les protéines et dissocie les chaînes polypeptidiques ; il induit également une charge fortement négative des protéines, ce qui rend négligeable la charge propre de la protéine. Ainsi, sous un champ électrique, seul le poids moléculaire détermine la migration sur gel d'acrylamide.

Le gel de concentration et le gel de séparation étaient préparés en additionnant le TEMED et l'APS (persulfate d'ammonium) au dernier moment. Le choix du pourcentage d'acrylamide se fait en fonction du poids moléculaire de la protéine d'intérêt.

#### Solutions et volumes utilisés pour préparer les gels de poly-acrylamide (0,75 mm)

Solutions	gel de concentration	concentration	gel de séparation (13%)	concentration
Acrylamide-bis acrylamide (30%-0,8%)	185 µL	5%	1,3 mL	13%
TEMED	1,5 µL	6,7 mM	4 µL	6,63 mM
APS 10%	11,5 µL	0,08%	30 µL	0,08%
SDS 10%	15 µL	0,10%	40 µL	0,10%
Tris 1 M, pH 8,8			1 mL	3,375 M
Tris 0,25 M, pH 6,8	750 µL	0,125 M		
H2O	537 µL		1,626 mL	

Lorsque les gels étaient polymérisés, les échantillons étaient dénaturés dans un tampon de charge (Tris-HCl 100 mM, glycérol 12,5%, β-mercaptoéthanol 2%, SDS 2% et bleu de bromophénol 0,05%) et portés à ébullition pendant 5 minutes. Les échantillons étaient ensuite chargés dans les puits et l'électrophorèse était lancée dans un tampon de migration (Tris-base 25 mM, Glycine 192 mM, SDS 0,1%) pendant environ 90 minutes à 110 V, à température ambiante.

### **3.2 Transfert sur membrane PVDF**

Une fois l'électrophorèse terminée, les protéines étaient transférées sur une membrane de polyvinylidène difluoride (PVDF, Immobilon-P, Millipore) par électrophorèse dans du tampon de transfert (Tris-base 50 mM, Glycine 386 mM, méthanol 20% et SDS 0,1%) à 4°C. Le transfert était terminé après 1 heure à 300 mA.

### **3.3 Blocage**

La membrane était placée dans un milieu contenant une protéine non spécifique : soit de la caséine (lait écrémé), soit de la BSA, selon l'anticorps utilisé, et ce afin d'éviter une absorption non spécifique de l'anticorps. Les membranes étaient incubées 3 heures en agitation douce, à température ambiante, dans une solution à pH 7,4 de PBS (Phosphate Buffered Saline) 0,1% Tween 20 (polyéthylène sorbitan monolaurate, détergent non ionique) et 5% de lait ou de BSA.

### **3.4 Couplage avec l'anticorps primaire**

La protéine d'intérêt était détectée par immuno-marquage. L'anticorps primaire : anti-UCP1 (alpha-diagnostic, 1 :15000) ou anti-FAT/CD36 ((Matsuno et al., 1996), donné par le Pr. Glatz à Maastricht) était dilué dans une solution de PBS 0,1% Tween 20 (pH 7,4) contenant 1% de lait ou de BSA, et mis en contact avec la membrane 12 heures à 4°C sous agitation douce. La membrane était ensuite lavée 2 fois 10 min et 1 fois 15 min avec une solution de PBS 0,1% Tween 20 (pH 7,4) sous agitation vigoureuse.

### **3.5 Couplage avec l'anticorps secondaire**

La membrane, préalablement couplée à l'anticorps primaire était incubée avec un anticorps secondaire, dirigé contre l'anticorps primaire et lié de manière covalente à l'enzyme HorseRadish Peroxidase (HRP). L'anticorps secondaire était dilué dans du PBS 0,1% Tween 20 (pH 7,4) contenant 1% de lait ou de BSA et mis en présence de la membrane pendant 1 heure à température ambiante, sous agitation douce. La membrane était ensuite lavée 4 fois 5 min et 1 fois 15 min avec une solution de PBS 0,1% Tween 20 (pH 7,4) sous agitation vigoureuse. Puis la membrane était lavée 10 min dans une solution de PBS sans Tween 20.

### **3.6 Révélation**

La membrane était incubée pendant 1 min dans un tampon de chemiluminescence améliorée (Enhanced ChemiLuminescence, ECL plus, Amersham) permettant de révéler la position des complexes antigène-anticorps. En effet, en présence de peroxyde d'hydrogène, la peroxydase catalyse l'oxydation de diacylhydrazide, générant ainsi l'émission de photons. La membrane était placée 1 min en présence d'ECL puis une autoradiographie de la luminescence émise était réalisée. Les autoradiographies des membranes étaient analysées à l'aide d'un logiciel d'analyse d'images (Kodak Digital Science™). Les bandes étaient quantifiées en unités arbitraires (UA).

La membrane était ensuite colorée avec un colorant spécifique des protéines (amido-black 0,1% dilué dans 25% d'isopropanol et 10% d'acide acétique). Cette opération permet de vérifier l'homogénéité de la charge des protéines dans les différents puits et de vérifier si l'électrophorèse et le transfert se sont bien déroulés.

## **4. Technique de RT-PCR**

### **4.1 Extraction et dosage des ARN totaux**

Environ 80 mg de tissu ont été broyés 15 secondes à l'aide d'un ultraturax dans 1 mL d'une solution Trizol (Invitrogen, France). L'extraction des ARN totaux est obtenue par séparation de phase (organique et aqueuse), les ARN étant solubilisés dans la phase aqueuse. La concentration en ARN a été dosée par spectrophotométrie en mesurant la densité optique à 260 nm et leur pureté vérifiée par la mesure du rapport des densités optiques à 260 et 280 nm (supérieur à 1,8). L'absence de dégradation des ARN a été vérifiée par électrophorèse sur minigel d'agarose à 1 %.

### **4.2 La Reverse Transcription**

Cette étape permet de synthétiser des ADNc à partir d'ARNm. Pour cela, nous avons utilisé la M-MLV RT (Moloney-Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) (Promega, France) en présence d'oligo(dT) servant d'amorce et permettant la complémentarité avec la queue poly (A) de l'ARNm. En effet, 1 µg d'ARN en présence d'1 µg d'oligo(dT) étaient chauffés à 70°C pendant 5 minutes dans un volume final de 17,5 µL. Cette étape permet la déstabilisation des structures secondaires, favorisant ainsi la linéarisation des ARNm. Ensuite, 7,5 µL d'un mélange de RT étaient ajoutés à chaque échantillon. Ce mélange était constitué de 5 µL de Tampon M-MLV RT (5X), 20 U de Rnasin Inhibitor, 15 nanomoles de



dNTP, 100 U de M-MLV RT. L'ensemble était incubé pendant 1h30 à 42°C, ce qui permet la transcription inverse, puis pendant 10 min à 70°C, favorisant la dénaturation de l'enzyme.

#### **4.3 Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)**

L'amplification par PCR des ADNc était réalisée à partir de 2,5 µL de produits de RT obtenus précédemment et mélangés à 5 µL de tampon 10X, 2 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 2,5 U de EurobioTaq Pol (Eurobio, les Ullis, France), 1,5 µL de dNTP (10 mM) et 1,5 µL d'amorces sens et antisens (15 µM) (InVitrogen, Cergy Pontoise, France), pour un volume final de 47 µL. Après une dénaturation initiale à 94°C pendant 2 min, chaque échantillon subissait un nombre de cycles de PCR (n) variable en fonction des cibles. Chaque cycle comprenait 1 min à 94°C (dénaturation), 1 min à 60°C (hybridation) et 1 min à 72°C (élongation). Une étape finale de 10 min à 72°C était réalisée pour terminer l'amplification. L'appareil utilisé était un thermocycleur Thermo Hybaid (Ashford, UK). Un mélange de 1,5 µL d'amorces sens et 1,5 µL d'amorces antisens de β-actine (15 µM) était ajouté dans chaque tube de façon à ce que cette dernière subisse toujours 23 cycles de PCR. La β-actine sert dans ce cas de standard interne à l'échantillon et est utilisée pour quantifier les ARNm cibles de manière semi-quantitative.

#### **4.4 Analyse des produits PCR**

Comme l'ADN est une molécule chargée uniformément négativement, elle migre proportionnellement à son poids moléculaire, lorsqu'elle est soumise à un champ électrique. L'analyse semi quantitative des produits PCR était donc réalisée par électrophorèse sur un gel d'agarose. 1,5% d'agarose étaient dilués par ébullition dans du milieu TAE (Tris 40 mM, acide acétique 20 mM, EDTA 1 mM, 1 µL /20 mL SYBRsafe, pH 8). Du bromure d'éthidium était ajouté lorsque le gel, encore liquide, a refroidi. Après solidification, le gel était immergé dans du TAE. Les échantillons étaient alors chargés dans les puits. Après migration à 80 V pendant 30 min, les produits séparés étaient visualisés sous UV et l'intensité lumineuse des bandes était déterminée à l'aide d'un système d'analyse d'images Kodak Digital Science™ camera (DC120). L'analyse semi quantitative de l'expression du gène cible était déterminée par le calcul du rapport entre l'intensité de la bande du gène cible et celle de la β-actine. Des expériences préliminaires étaient réalisées dans chaque cas pour bien vérifier que le nombre de cycles utilisé n'induit pas de saturation de l'amplification obtenue.

**Chapître C :**  
**Synthèse,**  
**Conclusions et**  
**Perspectives**



De par sa masse corporelle et son adiposité inférieures à celles du rat Wistar, le rat Lou/C représente un modèle extrêmement intéressant de résistance à l'obésité. Relativement peu d'études se sont portées sur ce modèle, et aujourd'hui encore les causes exactes de la maigreur de ce rat restent mystérieuses.

L'obésité, véritable épidémie de notre siècle, est le reflet d'un déséquilibre de la balance énergétique, où les dépenses d'énergie demeurent insuffisantes pour contrer les entrées d'énergie, représentées par les apports alimentaires. L'absence de stockage excessif sous forme de tissu adipeux blanc observé chez le rat Lou/C peut s'expliquer par une restriction calorique et/ou une augmentation de sa dépense énergétique. Définir précisément les caractéristiques de la balance énergétique du rat Lou/C, et les comparer au rat Wistar constituaient donc le premier point, crucial, de ce travail.

✓ ***Le rat Lou/C ne présente pas de carence alimentaire mais dépense plus d'énergie***

Nos résultats montrent une prise alimentaire, exprimée par unité de masse corporelle, tout à fait équivalente à celle des rats Wistar. Ce résultat s'oppose à certaines études qui n'ont tenu compte que de la valeur absolue de l'ingéré alimentaire entre les 2 souches de rats pour les comparer (Garait et al., 2005 ; Perrin et al., 2003 ; Soulage et al., 2008). Il est alors évident qu'un rat plus petit mange moins qu'un rat plus gros ! Rapportée à la masse corporelle cette différence disparaît.

Si l'ingéré relatif est similaire dans les 2 souches, la dépense énergétique globale des rats Lou/C est supérieure à celle des rats Wistar. Nous avons caractérisé chaque composante de la dépense énergétique : les rats Lou/C présentent une augmentation de 20% de leur dépense énergétique de repos, de 12% de leur dépense énergétique liée au repas, et de 24 et 33% de leur dépense énergétique liée à un exercice imposé (respectivement 300 et 600 m / h). Le métabolisme post-exercice est également largement stimulé chez le rat Lou/C (+ 35%). Les différences de dépense énergétique se réduisent un peu sans disparaître si l'on tient compte de la différence d'adiposité entre les 2 souches et que l'on exprime les résultats par unité de masse maigre. Il est intéressant d'observer que c'est la différence entre l'énergie ingérée et l'énergie dépensée qui tend ainsi à se réduire chez le rat Lou/C par comparaison au Wistar, laissant moins d'énergie alimentaire en excès disponible pour le stockage. Cette observation suggère que la régulation de la prise alimentaire est plus fine chez le rat Lou/C que chez le rat Wistar.

En plus d'une activité métabolique soutenue, les rats Lou/C se montrent très actifs (Garait et al., 2005 ; Perrin et al., 2003 ; Soulage et al., 2008), particulièrement lorsqu'ils disposent d'une roue d'activité en libre accès, dans laquelle ils peuvent parcourir près de 10

km chaque nuit. Cette activité locomotrice spontanée, nettement plus importante que celle des rats Wistar, devrait générer une dépense énergétique supplémentaire.

En conclusion de cette étude, il apparaît que les rats Lou/C ne présentent pas de restriction calorique spontanée. Cependant, une moindre absorption des lipides chez les rats Lou/C réduirait leurs apports caloriques, il conviendrait donc de vérifier que l'absorption intestinale soit la même dans les deux souches de rats, par exemple en analysant la composition de leurs fèces. Il serait notamment intéressant de déterminer la composition du microbiote intestinal, en particulier l'équilibre entre les deux grands groupes bactériens - le groupe des Firmicules et le groupe des Bacteroidetes - qui est différent chez les sujets obèses ou normaux (Ley et al., 2005) et qui pourrait contribuer à une différence d'absorption énergétique intestinale.

Le plus surprenant reste tout de même l'hyperactivité des rats Lou/C. Infatigables lorsqu'ils disposent d'une roue d'activité, ils se montrent également beaucoup plus mobiles que les rats Wistar, et cette différence s'accroît lors de la phase diurne (Garait et al., 2005 ; Soulage C, 2008), qui est une période de repos chez les rats. Il serait intéressant de comprendre d'où vient le besoin d'activité du rat Lou/C. Est-il lié à un trouble d'ordre psychique, ou bien cette activité est-elle nécessaire, physiologiquement, pour permettre au rat Lou/C de réguler sa balance énergétique ? Un protocole où des rats Wistar et Lou/C sédentaires, ou ayant à disposition une roue d'activité, et nourris soit avec une alimentation standard, soit avec un régime hyperlipidique nous permettrait de statuer sur le rôle de l'activité physique spontanée dans la régulation de la balance énergétique du rat Lou/C.

✓ ***Le rat Lou/C ne dépense pas plus d'énergie à cause d'une hyperactivité thermogène du tissu adipeux brun***

La première étude nous a permis de montrer qu'une dépense énergétique supérieure était à l'origine de la meilleure gestion des stocks d'énergie observée chez le rat Lou/C. Dans une deuxième étude nous avons recherché à quel niveau se produit le gaspillage de l'énergie superflue. Le BAT est un tissu connu pour permettre la dissipation de l'énergie ingérée en excès sous forme de chaleur, et pour sa participation significative à la dépense énergétique globale des rongeurs (Cannon and Nedergaard, 2004). En effet, dans la mitochondrie de BAT, la présence de la protéine découplante UCP1, permet de dissiper le gradient de protons, créant ainsi un découplage entre les oxydations de substrats et les phosphorylations. Puisqu'un BAT déficient est responsable de l'obésité des rats Zucker (Rothwell and Stock, 1984), notre hypothèse de travail était que le rat Lou/C, dont les dépenses énergétiques sont accrues, devrait avoir un BAT hyperactivé. Cette hypothèse était également soutenue par l'observation d'une plus forte activité sympathique chez les rats Lou/C (Perrin et al., 2003). Notre étude s'est articulée selon trois axes complémentaires.

Nos résultats ont permis de mettre en évidence, *in vivo*, et de façon inattendue, que le BAT des rats Lou/C n'était pas activé par comparaison aux rats Wistar voire qu'il était moins actif dans cette souche. *In vivo*, un test fonctionnel classique de l'activité du BAT par la réponse calorigène à une injection de noradrénaline montrait même une plus faible réponse chez le rat Lou/C par comparaison à des rats Wistar de même âge. Cette première approche a été confirmée, *in vitro*, où l'activité des mitochondries de BAT via la protéine UCP1, ainsi que l'abondance relative de cette protéine étaient plus faibles chez le rat Lou/C. Il semblerait donc, que, contrairement aux conclusions de Abdoulaye *et al.*, le phénotype maigre du rat Lou/C, ne puisse être imputé à une hyperactivité de son BAT (Abdoulaye *et al.*, 2006). La divergence entre cette étude et nos résultats pourrait être liée au référentiel utilisé : dans notre étude il s'agit du rat Wistar, souche de laquelle le rat Lou/C est issu, mais dans l'étude de Abdoulaye *et al.*, il s'agit du rat Fischer F344, prédisposé à l'obésité, et dont le BAT pourrait être moins actif en conditions basales. Dans un troisième temps, une approche moléculaire ne nous a pas permis de mettre en évidence de stimulation nette de l'apport en substrats lipidiques et glucidiques aux adipocytes bruns, par comparaison aux rats Wistar. L'expression des PPARs, impliqués dans l'expression d'enzymes du métabolisme lipidique et d'UCP1 n'est pas augmentée dans le BAT des rats Lou/C, alors que PGC-1 $\alpha$ , responsable notamment de la biogenèse mitochondriale, tend à être plus fortement exprimée. Nos résultats ne sont donc pas favorables à une augmentation de l'activité intrinsèque des mitochondries de BAT des rats Lou/C. Toutefois il conviendrait de vérifier que le contenu mitochondrial ne soit pas augmenté dans le BAT des rats Lou/C.

Si les résultats concernant le versant moléculaire de notre étude devront être confirmés par une approche plus fonctionnelle de l'activité métabolique du BAT, par exemple en mesurant les flux métaboliques dans le BAT des rats Wistar et Lou/C, les éléments que nous avons recueillis ne sont pas en faveur d'une hyperactivation thermogène du BAT contribuant à la maigreur du rat Lou/C. Cette souche de rats représente donc un modèle original de régulation de la balance énergétique, ne suivant pas le modèle classique proposé par Rothwell et Stock (Rothwell and Stock, 1984), impliquant une propension à l'obésité par défaut de thermogénèse du BAT, et *a contrario*, une maigreur dans le cas d'un BAT hyperactif.

✓ ***Le rat Lou/C peut réactiver son BAT lorsque les besoins de thermorégulation le nécessitent***

Les conclusions de la seconde étude se sont avérées surprenantes et inattendues. La moindre capacité d'activation du BAT par la noradrénaline ainsi que l'absence d'hyperactivité mitochondriale du BAT de rat Lou/C, en dépit de sa forte dépense énergétique, nous ont conduits à nous interroger sur l'intégrité de ce tissu. En effet, on

pouvait imaginer que le BAT du rat Lou/C n'était pas plus actif que celui du rat Wistar en conditions basales parce qu'il est déficient. Afin de répondre à cette troisième question, nous avons testé l'activation du BAT du rat Lou/C suite à une exposition de trois semaines à 4°C, situation reconnue pour induire l'activation thermogène de ce tissu.

Lorsqu'ils sont exposés au froid, les rats Lou/C réduisent significativement leur activité physique spontanée en roue d'activité, à l'inverse des rats Wistar qui tendent à se montrer plus actifs. Lorsque le BAT est déficient, comme chez le rat obèse Zucker, l'activité physique peut permettre de produire de la chaleur (Girardier et al., 1995). En revanche, le rat Lou/C, maigre, dispose de très peu de réserves de graisse, et par conséquent d'une faible couche adipeuse isolante, lui imposant de préserver ses réserves d'énergie, notamment en limitant la dépense énergétique et les pertes de chaleur par convection induites par l'activité physique spontanée, ainsi qu'en augmentant de façon très importante sa prise calorique lors d'une exposition prolongée au froid. L'hypertrophie marquée du BAT de rat Lou/C suite à l'exposition au froid, ainsi que la stimulation de la respiration de ses mitochondries isolées, de l'activité de la protéine découplante UCP1 et de son expression suggèrent que le BAT des rats Lou/C est parfaitement activable lorsque les conditions environnementales l'exigent. On observe même que cette activation se produit dans des proportions supérieures à ce qui est observé chez le rat Wistar. Cette stimulation des capacités oxydatives et thermogènes du BAT était doublée d'une augmentation de l'abondance relative des transcrits codant des protéines impliquées dans le captage et l'entrée des acides gras dans l'adipocyte brun et la mitochondrie (LPL, FABP<sub>PM</sub>, CPT1), ainsi que de la protéine GLUT4 responsable de l'entrée du glucose dans l'adipocyte, suggérant une stimulation de l'expression des protéines contrôlant l'apport des substrats aux sites d'oxydation mitochondriale. De plus, l'utilisation des substrats lipidiques au froid est attestée par la réduction marquée des réserves adipeuses, confirmant une lipolyse accrue.

Nos résultats montrent que le rôle du BAT lors d'une exposition prolongée au froid est d'autant plus important chez le rat Lou/C que sa couche de graisse sous-cutanée est limitée. Il apparaît qu'une exposition de trois semaines à 4°C lui impose de limiter son activité physique spontanée et de stimuler fortement l'activité de son BAT. Cette activité thermogène du BAT, extrêmement coûteuse en énergie, nécessite un catabolisme accru imposant d'augmenter l'ingéré alimentaire et de puiser dans ses réserves adipeuses. Le froid serait donc particulièrement délétère chez cette souche de rats à long terme, du fait de son grand rapport surface/volume et de sa faible isolation thermique, et l'on peut s'interroger sur les capacités de survie de cet animal au froid. Il serait intéressant de mesurer, par calorimétrie indirecte, les dépenses énergétiques de rats Wistar et Lou/C soumis au froid. En effet, il serait envisageable que le rat Lou/C réduise les dépenses liées à la DIT ou à l'activité physique, afin de préserver ses réserves adipeuses. Il conviendrait également de connaître la température interne des rats Wistar et Lou/C au cours d'une exposition de trois semaines

à 4°C : nous ne sommes pas certains que le rat Lou/C parvienne à maintenir sa température corporelle à un niveau stable en environnement extrême. Il est possible que sa température soit légèrement inférieure à celle du rat Wistar lors d'une exposition prolongée au froid, ou bien que sa dépense énergétique, pour des besoins de thermorégulation, soit nettement supérieure à celle du rat Wistar, compte tenu de la faible couche isolante du rat Lou/C, ainsi que du rapport surface / volume, défavorable, induisant de plus grandes pertes de chaleur par convection. Afin de survivre à une exposition prolongée au froid, le rat Lou/C se voit donc contraint d'augmenter son ingéré, puiser dans ses maigres réserves, et stimuler la thermogenèse du BAT. La stimulation du BAT est alors très nette et confirme par l'inverse que ce tissu n'est pas activé dans les conditions basales de stabulation à thermoneutralité chez le rat Lou/C.

✓ ***Contribution du muscle squelettique, du foie et du tissu adipeux blanc à la dépense énergétique accrue du rat Lou/C***

Si le BAT du rat Lou/C peut être activé suite à une exposition de trois semaines au froid, comme en atteste notre troisième étude, il n'en demeure pas moins que ses capacités de dissipation de l'énergie ingérée en excès, en conditions basales, ne sont pas liées à une hyperactivation de son BAT. Dans une quatrième et dernière étude, nous avons étudié, d'une part, le rôle de l'activité physique spontanée surprenante du rat Lou/C sur l'activité thermogène de différents tissus, tels que le BAT, le muscle squelettique, et le foie ; et d'autre part, le(s) tissu(s) thermogène(s) ainsi que les cycles futiles qui pourraient être impliqués dans la dissipation de l'excédent d'énergie observée chez le rat Lou/C.

L'activité physique spontanée induit, chez le rat Lou/C, une légère diminution de sa masse grasse, malgré une stimulation de sa prise alimentaire, suggérant que la balance énergétique du rat Lou/C deviendrait négative avec l'activité : les apports alimentaires ne seraient pas suffisants pour pallier l'augmentation des dépenses. Il semblerait que l'activité physique spontanée induise une faible stimulation de l'activité mitochondriale du BAT via la protéine découplante UCP1. En revanche, l'activité physique spontanée ne paraît pas modifier les flux métaboliques dans le BAT des rats Wistar ou Lou/C, tout en gardant à l'esprit que l'abondance relative des transcrits étudiés devra être confirmée par une analyse de l'expression des protéines ainsi que des études plus fonctionnelles. L'activité mitochondriale de foie ne semble pas affectée par l'activité physique spontanée ; alors que, de façon surprenante, nous avons constaté une diminution de l'activité des mitochondries de quadriceps de rats Lou/C avec l'activité physique spontanée. Nous proposons que seule l'activité des mitochondries subsarcolemmales pourrait être augmentée par l'activité physique spontanée, c'est pourquoi il serait important de dissocier ces deux populations mitochondriales, intermyofibrillaires et subsarcolemmales lors de prochaines études. Nos



résultats montrent donc que seul le BAT semble être légèrement activé en lien avec l'activité physique spontanée, expliquant la balance énergétique négative des rats Lou/C actifs. Cette activation thermogène du BAT pourrait être liée à une augmentation des pertes convectives induites par la locomotion et non compensées par la thermogenèse liée à l'activité contractile. L'augmentation de la sécrétion des catécholamines en liaison avec l'activité locomotrice soutenue pourrait également participer à cette activation thermogène du BAT chez le rat Lou/C.

En conditions basales, l'activité thermogène du BAT n'intervient pas dans le maintien du phénotype maigre du rat Lou/C (étude II). Dans le muscle quadriceps, nous ne mettons pas en évidence de modification marquée des caractéristiques fonctionnelles mitochondriales. En revanche, une étude (Garait et al., 2005) montre une possible stimulation de la protéine découplante UCP3 en présence d'un activateur, le palmitate : résultat que nous confirmons par l'abondance de la protéine UCP3, accrue dans le muscle de rat Lou/C. Il serait intéressant de vérifier l'expression des récepteurs aux hormones thyroïdiennes dans le muscle squelettique. Si celle-ci est augmentée, la sensibilité à ces hormones serait accrue, induisant probablement une stimulation de l'expression d'UCP3 et de la mG3PdH. Le muscle squelettique pourrait alors contribuer à la régulation de la balance énergétique du rat Lou/C. Il est possible que l'absence d'effet net de la souche et surtout de l'activité locomotrice sur les caractéristiques fonctionnelles des mitochondries puisse être liée au type de muscle que nous avons sélectionné pour cette étude, le muscle quadriceps qui est un muscle mixte avec des fibres rapides glycolytiques et oxydatives glycolytiques et une moindre proportion des fibres lentes oxydatives. On peut penser que le type d'activité s'apparentant à un entraînement de type endurant ait plus affecté des muscles avec des proportions plus importantes de fibres lentes oxydatives. La quantité importante de tissu nécessaire pour l'isolement des mitochondries ne nous a pas permis d'explorer les caractéristiques fonctionnelles de muscles plus lents comme le soléaire par exemple.

Contrairement aux résultats obtenus dans le muscle squelettique, nous observons une stimulation de la respiration de mitochondries isolées de foie de rat Lou/C, ainsi qu'un relatif découplage entre les oxydations et les phosphorylations. D'autres travaux montrent que ce découplage serait lié à un patinage des pompes (B. Sibille), probablement au niveau de la COx (Lacraz et al., 2008). Une augmentation de la sensibilité aux hormones thyroïdiennes a également été détectée dans le foie de rats Lou/C, induisant une surexpression de la mG3PdH et de son activité, à l'origine de cycles futiles (Taleux et al., 2009). Ces mécanismes dissipateurs d'énergie pourraient expliquer en partie la plus forte activité oxydative des mitochondries du foie des rats Lou/C et contribuer pour partie, à la forte dépense énergétique observée chez le rat Lou/C en conditions basales.

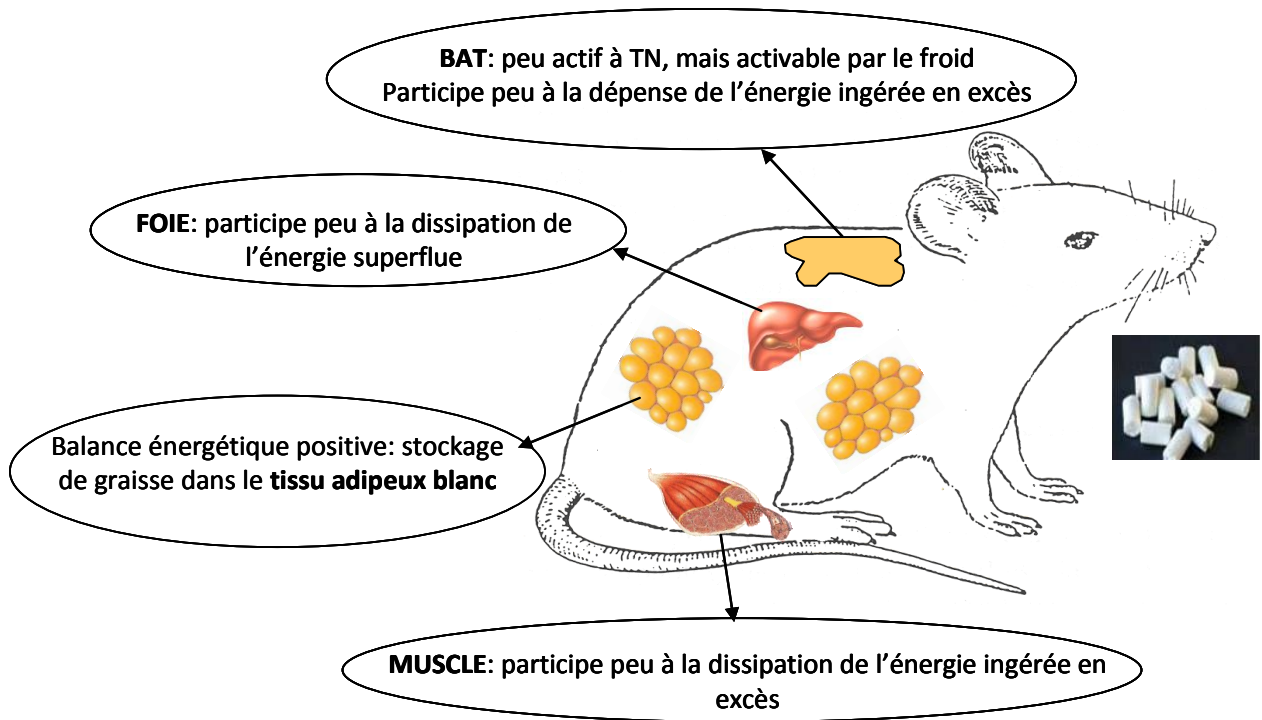
Le foie pourrait également contribuer à une dissipation énergétique accrue en fournissant des substrats à d'autres tissus. Il est intéressant d'observer que le rat Lou/C

maigre dispose de capacités de synthèse des acides gras équivalentes à celles qui sont détectées dans le foie des rats Wistar. Le rat Lou/C n'est donc pas maigre parce qu'il produit moins d'acides gras. Nous n'avons pas étudié les capacités d'exportation des lipides par le foie et il conviendrait d'aborder ces aspects pour, notamment, évaluer s'ils contribuent à la moindre triglycéridémie observée chez le rat Lou/C. Si le foie est un site de lipogenèse chez le rat, le tissu adipeux blanc peut également contribuer à cette activité. Il est spectaculaire d'observer que la capacité de synthèse des acides gras est très supérieure dans le tissu adipeux blanc des rats Lou/C. Même si une partie de cet effet peut dépendre de la taille des adipocytes blancs, il est difficile d'attribuer toute la différence à ce seul effet référentiel d'expression. Cette capacité de synthèse des acides gras est associée à une capacité accrue d'oxydation de ces substrats indiquant que les acides gras synthétisés pourraient être oxydés localement. Si les capacités oxydatives des adipocytes blancs sont faibles, notamment par comparaison avec celles du tissu adipeux brun, elles ne sont pas nulles et pourraient avoir une contribution significative à l'échelle de l'organisme si l'on tient compte de la masse totale de ce tissu qui représente près de 12% de la masse corporelle chez le rat Lou/C. L'association d'une capacité accrue de synthèse et d'oxydation des acides gras au sein du tissu adipeux blanc, suggère l'existence d'un processus futile d'anabolisme et de catabolisme de ces molécules. Ces résultats sont à rapprocher d'autres études soulignant l'implication du tissu adipeux blanc dans une thermogenèse indépendante du BAT (Granneman et al., 2003). Plus récemment, l'expression d'UCP1 a été détectée dans le tissu adipeux blanc du rat Lou/C alors qu'elle ne l'est pas dans celui du rat Wistar (Veyrat-Durebex et al., 2009). Cette expression atypique d'UCP1 dans le tissu adipeux blanc est corrélée à une augmentation de l'expression de PPAR $\gamma$  et PGC-1 $\alpha$  ainsi qu'à une plus forte innervation sympathique ce qui suggérerait un rôle thermogène potentiel du tissu adipeux blanc de rat Lou/C, dépendant d'UCP1 (Veyrat-Durebex et al., 2009). Il conviendrait donc d'étudier l'activité mitochondriale de ce tissu, sa sensibilité à la noradrénaline ainsi qu'aux hormones thyroïdiennes, afin de vérifier le rôle thermogène et la régulation de l'UCP1 du tissu adipeux blanc de rat Lou/C. Il faudra vérifier si cette activité thermogène est propre aux adipocytes blancs ou liée à l'infiltration du tissu adipeux blanc par des adipocytes bruns.

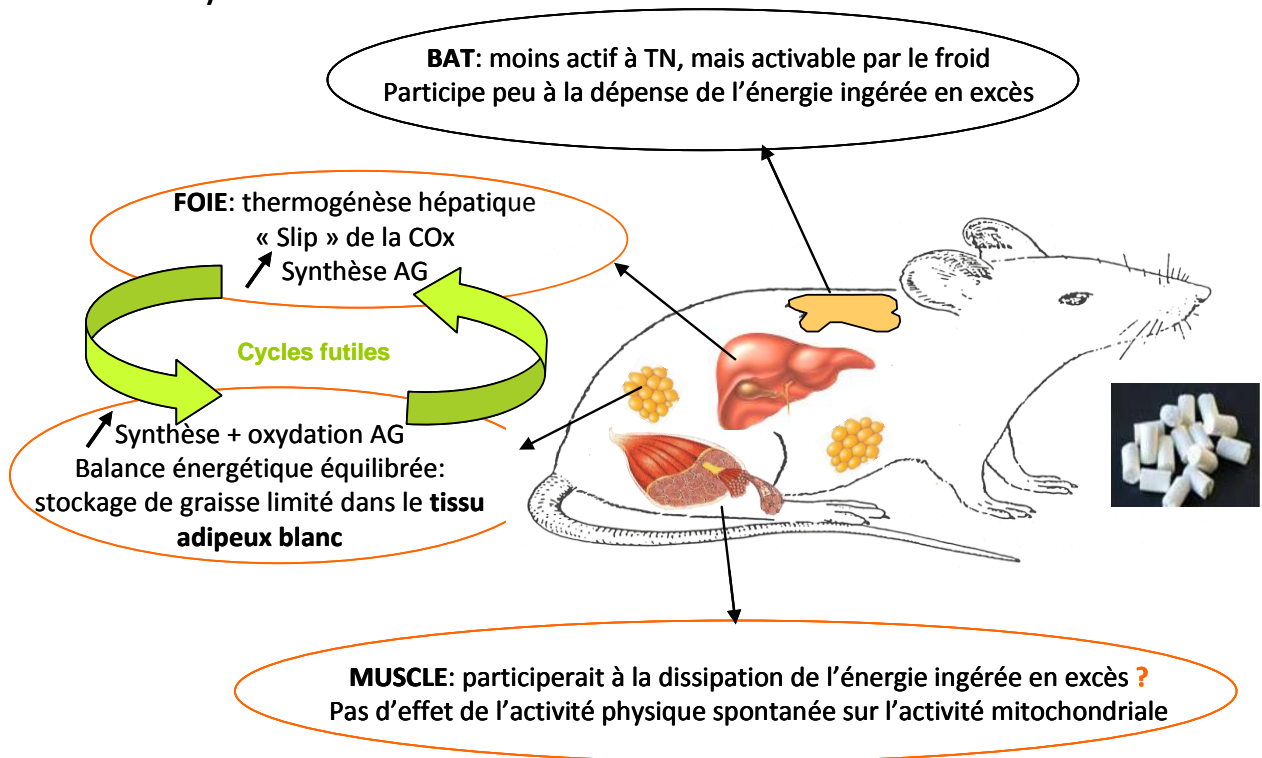
Si le rat Lou/C est un modèle de balance énergétique équilibrée, ne suivant pas le modèle classique proposé par Rothwell et Stock (Rothwell and Stock, 1984), il pourrait être, au delà de l'aspect fondamental, un modèle extrêmement intéressant de résistance à l'obésité, applicable à des espèces dont l'activité du BAT est limitée, tel que l'homme par exemple.

Organes impliqués dans la dissipation de l'énergie ingérée en excès, en conditions standard, dans les souches Wistar et Lou/C.

### Rat Wistar



### Rat Lou/C



# Chapître D :

# Bibliographie



## A

Abdoulaye, D., Wetzler, S., Gubern, M., Helies, J. M., Fromentin, G., Tome, D. and Larue-Achagiotis, C. (2006). Comparison of energy balance in two inbred strains of rats: Fischer F344 prone to obesity and Lou rats resistant to obesity. *Physiol Behav* 87, 245-50.

Ahima, R. S., Prabakaran, D., Mantzoros, C., Qu, D., Lowell, B., Maratos-Flier, E. and Flier, J. S. (1996). Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 382, 250-2.

Ahmed, W., Ziouzenkova, O., Brown, J., Devchand, P., Francis, S., Kadakia, M., Kanda, T., Orasanu, G., Sharlach, M., Zandbergen, F. et al. (2007). PPARs and their metabolic modulation: new mechanisms for transcriptional regulation? *J Intern Med* 262, 184-98.

Allard, M. and Leblanc, J. (1988). Effects of cold acclimation, cold exposure, and palatability on postprandial thermogenesis in rats. *Int J Obes* 12, 169-78.

Alliot, J., Boghossian, S., Jourdan, D., Veyrat-Durebex, C., Pickering, G., Meynial-Denis, D. and Gaumet, N. (2002). The LOU/c/jall rat as an animal model of healthy aging? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 57, B312-20.

Allison, D. B., Fontaine, K. R., Manson, J. E., Stevens, J. and VanItallie, T. B. (1999). Annual deaths attributable to obesity in the United States. *Jama* 282, 1530-8.

Andreyev, A., Bondareva, T. O., Dedukhova, V. I., Mokhova, E. N., Skulachev, V. P., Tsofina, L. M., Volkov, N. I. and Vygodina, T. V. (1989). The ATP/ADP-antiporter is involved in the uncoupling effect of fatty acids on mitochondria. *Eur J Biochem* 182, 585-92.

Argyropoulos, G. and Harper, M. E. (2002). Uncoupling proteins and thermoregulation. *J Appl Physiol* 92, 2187-98.

Assimacopoulos-Jeannet, F., Cusin, I., Greco-Perotto, R. M., Terrettaz, J., Rohner-Jeanrenaud, F., Zarjevski, N. and Jeanrenaud, B. (1991). Glucose transporters: structure, function, and regulation. *Biochimie* 73, 67-70.

## B

Baker, E. J. and Gleeson, T. T. (1999). The effects of intensity on the energetics of brief locomotor activity. *J Exp Biol* 202, 3081-7.

Barnard, R. J. and Foss, M. L. (1969). Oxygen debt: effect of beta-adrenergic blockade on the lactic acid and alactic acid components. *J Appl Physiol* 27, 813-6.

Barre, H., Geloën, A., Chatonnet, J., Dittmar, A. and Rouanet, J. L. (1985). Potentiated muscular thermogenesis in cold-acclimated muscovy duckling. *Am J Physiol* 249, R533-8.

Barzilai, N. and Rossetti, L. (1995). Relationship between changes in body composition and insulin responsiveness in models of the aging rat. *Am J Physiol* 269, E591-7.

Bazin, H., Kints, J. P. and Rousseaux, J. (1986). Genetic control of the resistance to spontaneous immunocytoma (plasmacytoma-IR tumour) development in LOU/C rats. *Anticancer Res* 6, 45-8.

Bazin, H., Pear, W. S. and Sumegi, J. (1988). Louvain rat immunocytomas. *Adv Cancer Res* 50, 279-310.

Bazin, H., Rousseaux, J., Kints, J. P. and Herno, J. (1980). Studies on the incidence of rat ileocecal malignant immunocytoma: vertical transmission of the high tumour incidence. *Cancer Lett* 8, 353-7.

Beckers, A. and Bazin, H. (1978). Incidence of spontaneous ileocecal immunocytomas in hybrids of LOU/C rats and rat strains with low spontaneous tumor incidence. *J Natl Cancer Inst* 60, 1505-8.

Bezair, V., Bruce, C. R., Heigenhauser, G. J., Tandon, N. N., Glatz, J. F., Luiken, J. J., Bonen, A. and Spriet, L. L. (2006). Identification of fatty acid translocase on human skeletal muscle mitochondrial membranes: essential role in fatty acid oxidation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290, E509-15.

Bianchini, F., Kaaks, R. and Vainio, H. (2002). Overweight, obesity, and cancer risk. *Lancet Oncol* 3, 565-74.

Black, A. E., Coward, W. A., Cole, T. J. and Prentice, A. M. (1996). Human energy expenditure in affluent societies: an analysis of 574 doubly-labelled water measurements. *Eur J Clin Nutr* 50, 72-92.

Blanc, S., Geloën, A., Normand, S., Gharib, C. and Somody, L. (2001). Simulated weightlessness alters the nycthemeral distribution of energy expenditure in rats. *J Exp Biol* 204, 4107-13.

Block, B. A. (1994). Thermogenesis in muscle. *Annu Rev Physiol* 56, 535-77.

Boghossian, S. and Alliot, J. (2000). A moderate swimming exercise regularly performed throughout the life induces age and sex-related modifications in adaptive macronutrients choice. *Mech Ageing Dev* 120, 95-109.

Boghossian, S., Veyrat-Durebex, C. and Alliot, J. (2000). Age-related changes in adaptive macronutrient intake in swimming male and female Lou rats. *Physiol Behav* 69, 231-8.

Bonen, A., Luiken, J. J. and Glatz, J. F. (2002). Regulation of fatty acid transport and membrane transporters in health and disease. *Mol Cell Biochem* 239, 181-92.

Borsheim, E., Bahr, R., Hostmark, A. T. and Knardahl, S. (1998a). Effect of beta-adrenoceptor blockade on postexercise oxygen consumption and triglyceride/fatty acid cycling. *Metabolism* 47, 439-48.

Borsheim, E., Knardahl, S., Hostmark, A. T. and Bahr, R. (1998b). Adrenergic control of post-exercise metabolism. *Acta Physiol Scand* 162, 313-23.

Bramante, P. O. (1968). Energy metabolism of the albino rat at minimal levels of spontaneous muscular activity. *J Appl Physiol* 24, 11-6.

Brand, M. D. (1990). The contribution of the leak of protons across the mitochondrial inner membrane to standard metabolic rate. *J Theor Biol* 145, 267-86.

Brand, M. D., Chien, L. F., Ainscow, E. K., Rolfe, D. F. and Porter, R. K. (1994a). The causes and functions of mitochondrial proton leak. *Biochim Biophys Acta* 1187, 132-9.

Brand, M. D., Chien, L. F. and Dirolez, P. (1994b). Experimental discrimination between proton leak and redox slip during mitochondrial electron transport. *Biochem J* 297 ( Pt 1), 27-9.

Brand, M. D. and Esteves, T. C. (2005). Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metab* 2, 85-93.

Brookes, P. S., Rolfe, D. F. and Brand, M. D. (1997). The proton permeability of liposomes made from mitochondrial inner membrane phospholipids: comparison with isolated mitochondria. *J Membr Biol* 155, 167-74.

C

Cadenas, S., Echtay, K. S., Harper, J. A., Jekabsons, M. B., Buckingham, J. A., Grau, E., Abuin, A., Chapman, H., Clapham, J. C. and Brand, M. D. (2002). The basal proton conductance of skeletal muscle mitochondria from transgenic mice overexpressing or lacking uncoupling protein-3. *J Biol Chem* 277, 2773-8.

Campbell, S. E., Tandon, N. N., Woldegiorgis, G., Luiken, J. J., Glatz, J. F. and Bonen, A. (2004). A novel function for fatty acid translocase (FAT)/CD36: involvement in long chain fatty acid transfer into the mitochondria. *J Biol Chem* 279, 36235-41.

Cannon, B. and Nedergaard, J. (1985). The biochemistry of an inefficient tissue: brown adipose tissue. *Essays Biochem* 20, 110-64.

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

Carneheim, C., Nedergaard, J. and Cannon, B. (1984). Beta-adrenergic stimulation of lipoprotein lipase in rat brown adipose tissue during acclimation to cold. *Am J Physiol* 246, E327-33.

Chabowski, A., Gorski, J., Luiken, J. J., Glatz, J. F. and Bonen, A. (2007). Evidence for concerted action of FAT/CD36 and FABPpm to increase fatty acid transport across the plasma membrane. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 77, 345-53.

Chance, B. and Williams, G. R. (1956). Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. VI. The effects of adenosine diphosphate on azide-treated mitochondria. *J Biol Chem* 221, 477-89.

Chao, F. F., Stiers, D. L. and Ontko, J. A. (1986). Hepatocellular triglyceride synthesis and transfer to lipid droplets and nascent very low density lipoproteins. *J Lipid Res* 27, 1174-81.

Christensen, N. J. and Galbo, H. (1983). Sympathetic nervous activity during exercise. *Annu Rev Physiol* 45, 139-53.

Clark, R. V. (1971). Behavioral thermoregulation by the white rat at high ambient temperatures. *J Exp Zool* 178, 387-92.

Couturier, K., Servais, S., Koubi, H., Sempore, B., Cottet-Emard, J. M., Guigas, B., Lavoie, J. M. and Favier, R. (2004). Metabolic and hormonal responses to exercise in the anti-obese Lou/C rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28, 972-8.

Couturier, K., Servais, S., Koubi, H., Sempore, B., Sornay-Mayet, M. H., Cottet-Emard, J. M., Lavoie, J. M. and Favier, R. (2002). Metabolic characteristics and body composition in a model of anti-obese rats (Lou/C). *Obes Res* 10, 188-95.

## D

Daikoku, T., Shinohara, Y., Shima, A., Yamazaki, N. and Terada, H. (1997). Dramatic enhancement of the specific expression of the heart-type fatty acid binding protein in rat brown adipose tissue by cold exposure. *FEBS Lett* 410, 383-6.

Dauncey, M. J. (1990). Thyroid hormones and thermogenesis. *Proc Nutr Soc* 49, 203-15.

Dean, D., Daugaard, J. R., Young, M. E., Saha, A., Vavvas, D., Asp, S., Kiens, B., Kim, K. H., Witters, L., Richter, E. A. et al. (2000). Exercise diminishes the activity of acetyl-CoA carboxylase in human muscle. *Diabetes* 49, 1295-300.

Dejours, P. (1990). Comparative aspects of maximal oxygen consumption. *Respir Physiol* 80, 155-62.

Depocas, F. and Hart, J. S. (1957). Use of the Pauling oxygen analyzer for measurement of oxygen consumption of animals in open-circuit systems and in a short-lag, closed-circuit apparatus. *J Appl Physiol* 10, 388-92.

Depocas, F., Hart, J. S. and Heroux, O. (1956). Cold acclimation and the electromyogram of unanesthetized rats. *J Appl Physiol* 9, 404-8.



Detournay, B., Fagnani, F., Phillippo, M., Pribil, C., Charles, M. A., Sermet, C., Basdevant, A. and Eschwege, E. (2000). Obesity morbidity and health care costs in France: an analysis of the 1991-1992 Medical Care Household Survey. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24, 151-5.

Diraison, F., Moulin, P. and Beylot, M. (2003). Contribution of hepatic de novo lipogenesis and reesterification of plasma non esterified fatty acids to plasma triglyceride synthesis during non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Metab* 29, 478-85.

Dodane, V., Chevalier, J., Bariety, J., Pratz, J. and Corman, B. (1991). Longitudinal study of solute excretion and glomerular ultrastructure in an experimental model of aging rats free of kidney disease. *Lab Invest* 64, 377-91.

Doi, K. and Kuroshima, A. (1982a). Modified metabolic responsiveness to glucagon in cold-acclimated and heat-acclimated rats. *Life Sci* 30, 785-91.

Doi, K. and Kuroshima, A. (1982b). Thermogenic response to glucagon in cold-acclimated mice. *Jpn J Physiol* 32, 377-85.

Dumonteil, E., Barre, H. and Meissner, G. (1994). Effects of palmitoyl carnitine and related metabolites on the avian Ca(2+)-ATPase and Ca<sup>2+</sup> release channel. *J Physiol* 479 ( Pt 1), 29-39.

Dyck, D. J., Steinberg, G. and Bonen, A. (2001). Insulin increases FA uptake and esterification but reduces lipid utilization in isolated contracting muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281, E600-7.

## E

Erecinska, M. and Wilson, D. F. (1982). Regulation of cellular energy metabolism. *J Membr Biol* 70, 1-14.

Esteves, T. C. and Brand, M. D. (2005). The reactions catalysed by the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Biochim Biophys Acta* 1709, 35-44.

## F

Fain, J. N., Reed, N. and Saperstein, R. (1967). The isolation and metabolism of brown fat cells. *J Biol Chem* 242, 1887-94.

Felber, J. P. and Golay, A. (2002). Pathways from obesity to diabetes. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26 Suppl 2, S39-45.

Ferre, P., Burnol, A. F., Leturque, A., Terretaz, J., Penicaud, L., Jeanrenaud, B. and Girard, J. (1986). Glucose utilization in vivo and insulin-sensitivity of rat brown adipose tissue in various physiological and pathological conditions. *Biochem J* 233, 249-52.

Ferre, P., Leturque, A., Burnol, A. F., Penicaud, L. and Girard, J. (1985). A method to quantify glucose utilization in vivo in skeletal muscle and white adipose tissue of the anaesthetized rat. *Biochem J* 228, 103-10.

Fisler, J. S., Yoshida, T. and Bray, G. A. (1984). Catecholamine turnover in S 5B/P1 and Osborne-Mendel rats: response to a high-fat diet. *Am J Physiol* 247, R290-5.

Flegal, K. M., Carroll, M. D., Kuczmarski, R. J. and Johnson, C. L. (1998). Overweight and obesity in the United States: prevalence and trends, 1960-1994. *Int J Obes Relat Metab Disord* 22, 39-47.

Flegal, K. M., Carroll, M. D., Ogden, C. L. and Johnson, C. L. (2002). Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2000. *Jama* 288, 1723-7.

Foster, D. O. and Frydman, M. L. (1978). Nonshivering thermogenesis in the rat. II. Measurements of blood flow with microspheres point to brown adipose tissue as the dominant site of the calorogenesis induced by noradrenaline. *Can J Physiol Pharmacol* 56, 110-22.

Foster, D. O. and Frydman, M. L. (1979). Tissue distribution of cold-induced thermogenesis in conscious warm- or cold-acclimated rats reevaluated from changes in tissue blood flow: the dominant role of brown adipose tissue in the replacement of shivering by nonshivering thermogenesis. *Can J Physiol Pharmacol* 57, 257-70.

## G

Gabarrou, J. F., Duchamp, C., Williams, J. and Geraert, P. A. (1997a). A role for thyroid hormones in the regulation of diet-induced thermogenesis in birds. *Br J Nutr* 78, 963-73.

Gabarrou, J. F., Geraert, P. A., Picard, M. and Bordas, A. (1997b). Diet-induced thermogenesis in cockerels is modulated by genetic selection for high or low residual feed intake. *J Nutr* 127, 2371-6.

Gaesser, G. A. and Brooks, G. A. (1984). Metabolic bases of excess post-exercise oxygen consumption: a review. *Med Sci Sports Exerc* 16, 29-43.

Garait, B., Couturier, K., Servais, S., Letexier, D., Perrin, D., Batandier, C., Rouanet, J. L., Sibille, B., Rey, B., Leverve, X. et al. (2005). Fat intake reverses the beneficial effects of low caloric intake on skeletal muscle mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production. *Free Radic Biol Med* 39, 1249-61.

Garcia-Martinez, C., Sibille, B., Solanes, G., Darimont, C., Mace, K., Villarroya, F. and Gomez-Foix, A. M. (2001). Overexpression of UCP3 in cultured human muscle lowers mitochondrial membrane potential, raises ATP/ADP ratio, and favors fatty acid vs. glucose oxidation. *Faseb J* 15, 2033-5.

Garlid, K. D. (1994). Mitochondrial cation transport: a progress report. *J Bioenerg Biomembr* 26, 537-42.

Garlid, K. D., Jaburek, M., Jezek, P. and Varecha, M. (2000). How do uncoupling proteins uncouple? *Biochim Biophys Acta* 1459, 383-9.

Gaumont, N., Seibel, M. J., Braillon, P., Giry, J., Lebecque, P., Davicco, M. J., Coxam, V., Rouffet, J., Delmas, P. D. and Barlet, J. P. (1996). Influence of ovariectomy on bone metabolism in very old rats. *Calcif Tissue Int* 58, 256-62.

Girardier, L., Clark, M. G. and Seydoux, J. (1995). Thermogenesis associated with spontaneous activity: an important component of thermoregulatory needs in rats. *J Physiol* 488 ( Pt 3), 779-87.

Goglia, F., Liverini, G., Lanni, A., Iossa, S. and Barletta, A. (1988). Light mitochondria and cellular thermogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 151, 1241-9.

Goglia, F. and Skulachev, V. P. (2003). A function for novel uncoupling proteins: antioxidant defense of mitochondrial matrix by translocating fatty acid peroxides from the inner to the outer membrane leaflet. *Faseb J* 17, 1585-91.

Golozoubova, V., Hohtola, E., Matthias, A., Jacobsson, A., Cannon, B. and Nedergaard, J. (2001). Only UCP1 can mediate adaptive nonshivering thermogenesis in the cold. *Faseb J* 15, 2048-50.

Gomez-Ambrosi, J., Fruhbeck, G. and Martinez, J. A. (2001). Rapid in vivo PGC-1 mRNA upregulation in brown adipose tissue of Wistar rats by a beta(3)-adrenergic agonist and lack of effect of leptin. *Mol Cell Endocrinol* 176, 85-90.

Gong, D. W., Monemdjou, S., Gavrilo, O., Leon, L. R., Marcus-Samuels, B., Chou, C. J., Everett, C., Kozak, L. P., Li, C., Deng, C. et al. (2000). Lack of obesity a

normal response to fasting and thyroid hormone in mice lacking uncoupling protein-3. *J Biol Chem* 275, 16251-7.

Granneman, J. G., Burnazi, M., Zhu, Z. and Schwamb, L. A. (2003). White adipose tissue contributes to UCP1-independent thermogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285, E1230-6.

Greco-Perotto, R., Zaninetti, D., Assimacopoulos-Jeannet, F., Bobbioni, E. and Jeanrenaud, B. (1987). Stimulatory effect of cold adaptation on glucose utilization by brown adipose tissue. Relationship with changes in the glucose transporter system. *J Biol Chem* 262, 7732-6.

Griggio, M. A. (1982). The participation of shivering and nonshivering thermogenesis in warm and cold-acclimated rats. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 73, 481-4.

Groen, A. K., Sips, H. J., Vervoorn, R. C. and Tager, J. M. (1982). Intracellular compartmentation and control of alanine metabolism in rat liver parenchymal cells. *Eur J Biochem* 122, 87-93.

Guardiola-Diaz, H. M., Rehnmark, S., Usuda, N., Albrektsen, T., Feltkamp, D., Gustafsson, J. A. and Alexson, S. E. (1999). Rat peroxisome proliferator-activated receptors and brown adipose tissue function during cold acclimatization. *J Biol Chem* 274, 23368-77.

## H

Hammond, K. A., Szewczak, J. and Krol, E. (2001). Effects of altitude and temperature on organ phenotypic plasticity along an altitudinal gradient. *J Exp Biol* 204, 1991-2000.

Han, X. X., Chabowski, A., Tandon, N. N., Calles-Escandon, J., Glatz, J. F., Luiken, J. J. and Bonen, A. (2007). Metabolic challenges reveal impaired fatty acid metabolism and translocation of FAT/CD36 but not FABPpm in obese Zucker rat muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293, E566-75.

Haynes, W. G. (2000). Interaction between leptin and sympathetic nervous system in hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2, 311-8.

Hefco, E., Krulich, L., Illner, P. and Larsen, P. R. (1975). Effect of acute exposure to cold on the activity of the hypothalamic-pituitary-thyroid system. *Endocrinology* 97, 1185-95.

Heid, H. W., Moll, R., Schwetlick, I., Rackwitz, H. R. and Keenan, T. W. (1998). Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. *Cell Tissue Res* 294, 309-21.

Helies, J. M., Diane, A., Langlois, A., Larue-Achagiotis, C., Fromentin, G., Tome, D., Mormede, P. and Marissal-Arvy, N. (2005). Comparison of fat storage between Fischer 344 and obesity-resistant Lou/C rats fed different diets. *Obes Res* 13, 3-10.

Himms-Hagen, J. (1979). Obesity may be due to a malfunctioning of brown fat. *Can Med Assoc J* 121, 1361-4.

Himms-Hagen, J. (1983). Brown adipose tissue thermogenesis in obese animals. *Nutr Rev* 41, 261-7.

Himms-Hagen, J. (1990). Brown adipose tissue thermogenesis: interdisciplinary studies. *Faseb J* 4, 2890-8.

Hogeboom, G. H. and Kupp, E. L. (1955). Relation between cell structure and cell chemistry. *Fed Proc* 14, 633-8.

Holloszy, J. O. (1997). Mortality rate and longevity of food-restricted exercising male rats: a reevaluation. *J Appl Physiol* 82, 399-403.

Holloszy, J. O. and Schechtman, K. B. (1991). Interaction between exercise and food restriction: effects on longevity of male rats. *J Appl Physiol* 70, 1529-35.

Holloszy, J. O., Smith, E. K., Vining, M. and Adams, S. (1985). Effect of voluntary exercise on longevity of rats. *J Appl Physiol* 59, 826-31.

Holloway, G. P., Bezaire, V., Heigenhauser, G. J., Tandon, N. N., Glatz, J. F., Luiken, J. J., Bonen, A. and Spriet, L. L. (2006). Mitochondrial long chain fatty acid oxidation, fatty acid translocase/CD36 content and carnitine palmitoyltransferase I activity in human skeletal muscle during aerobic exercise. *J Physiol* 571, 201-10.

Holloway, G. P., Bonen, A. and Spriet, L. L. (2009). Regulation of skeletal muscle mitochondrial fatty acid metabolism in lean and obese individuals. *Am J Clin Nutr* 89, 455S-62S.

Holloway, G. P., Lally, J., Nickerson, J. G., Alkhateeb, H., Snook, L. A., Heigenhauser, G. J., Calles-Escandon, J., Glatz, J. F., Luiken, J. J., Spriet, L. L. et al. (2007). Fatty acid binding protein facilitates sarcolemmal fatty acid transport but not mitochondrial oxidation in rat and human skeletal muscle. *J Physiol* 582, 393-405.

Holloway, G. P., Luiken, J. J., Glatz, J. F., Spriet, L. L. and Bonen, A. (2008). Contribution of FAT/CD36 to the regulation of skeletal muscle fatty acid oxidation: an overview. *Acta Physiol (Oxf)* 194, 293-309.

Holt, S. and York, D. A. (1982). The effect of adrenalectomy on GDP binding to brown-adipose-tissue mitochondria of obese rat. *Biochem J* 208, 819-22.

Holzenberger, M., Dupont, J., Ducos, B., Leneuve, P., Geloën, A., Even, P. C., Cervera, P. and Le Bouc, Y. (2003). IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* 421, 182-7.

Hoppeler, H. (1986). Exercise-induced ultrastructural changes in skeletal muscle. *Int J Sports Med* 7, 187-204.

Horowitz, J. F. and Klein, S. (2000). Lipid metabolism during endurance exercise. *Am J Clin Nutr* 72, 558S-63S.

Horwitz, B. A. (1973). Ouabain-sensitive component of brown fat thermogenesis. *Am J Physiol* 224, 352-5.

## I

Ibrahimi, A., Sfeir, Z., Magharaie, H., Amri, E. Z., Grimaldi, P. and Abumrad, N. A. (1996). Expression of the CD36 homolog (FAT) in fibroblast cells: effects on fatty acid transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2646-51.

Iossa, S., Barletta, A. and Liverini, G. (1994). Different effects of cold exposure and cold acclimation on rat liver mitochondrial fatty acid oxidation and ketone bodies production. *Int J Biochem* 26, 425-31.

Isola, L. M., Zhou, S. L., Kiang, C. L., Stump, D. D., Bradbury, M. W. and Berk, P. D. (1995). 3T3 fibroblasts transfected with a cDNA for mitochondrial aspartate aminotransferase express plasma membrane fatty acid-binding protein and saturable fatty acid uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9866-70.

## J

Jacobsson, A., Muhleisen, M., Cannon, B. and Nedergaard, J. (1994). The uncoupling protein thermogenin during acclimation: indications for pretranslational control. *Am J Physiol* 267, R999-1007.

Jansky, L. (1973). Non-shivering thermogenesis and its thermoregulatory significance. *Biol Rev Camb Philos Soc* 48, 85-132.

Jansky, L. and Hart, J. S. (1963). Participation of skeletal muscle and kidney during nonshivering thermogenesis in cold-acclimated rats. *Can J Biochem Physiol* 41, 953-64.

Jequier, E., Acheson, K. and Schutz, Y. (1987). Assessment of energy expenditure and fuel utilization in man. *Annu Rev Nutr* 7, 187-208.

## K

Kahn, B. B. and Flier, J. S. (2000). Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 106, 473-81.

Kaplan, M. L. and Leveille, G. A. (1976). Calorigenic response in obese and nonobese women. *Am J Clin Nutr* 29, 1108-13.

Kappeler, L., Zizzari, P., Alliot, J., Epelbaum, J. and Bluet-Pajot, M. T. (2004). Delayed age-associated decrease in growth hormone pulsatile secretion and increased orexigenic peptide expression in the Lou C/JaLL rat. *Neuroendocrinology* 80, 273-83.

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, 4920-7.

Klingenberg, M. (1961). [On the reversibility of oxidative phosphorylation. IV. Relation between the redox state of cytochrome c and the phosphorylation potential of adenosine triphosphate.]. *Biochem Z* 335, 263-72.

Klingenspor, M. (2003). Cold-induced recruitment of brown adipose tissue thermogenesis. *Exp Physiol* 88, 141-8.

Koenig, S. M. (2001). Pulmonary complications of obesity. *Am J Med Sci* 321, 249-79.

Kopelman, P. G. (2000). Obesity as a medical problem. *Nature* 404, 635-43.

Kotz, C. M., Teske, J. A. and Billington, C. J. (2008). Neuroregulation of nonexercise activity thermogenesis and obesity resistance. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294, R699-710.

Krude, H., Biebermann, H., Luck, W., Horn, R., Brabant, G. and Gruters, A. (1998). Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet* 19, 155-7.

## L

Laaban, J. P., Orvoen-Frija, E., Cassuto, D., Pascal, S., Leger, D., Basdevant, A., Rochemaure, J. and Guy-Grand, B. (1996). [Mechanisms of diurnal hypercapnia in sleep apnea syndromes associated with morbid obesity]. *Presse Med* 25, 12-6.

Lacraz, G., Couturier, K., Taleux, N., Servais, S., Sibille, B., Letexier, D., Guigas, B., Dubouchaud, H., Leverve, X. and Favier, R. (2008). Liver mitochondrial properties from the obesity-resistant Lou/C rat. *Int J Obes (Lond)* 32, 629-38.

LaNoue, K. F. and Schoolwerth, A. C. (1979). Metabolite transport in mitochondria. *Annu Rev Biochem* 48, 871-922.

- Larue-Achagiotis, C. (1995). Exercise-training reduces BAT thermogenesis in rats. *Physiol Behav* Volume 57, 1013-1017
- Lawrence, V. J. and Kopelman, P. G. (2004). Medical consequences of obesity. *Clin Dermatol* 22, 296-302.
- Leblanc, J. and Pouliot, M. (1964). Importance of Noradrenaline in Cold Adaptation. *Am J Physiol* 207, 853-6.
- Leibowitz, S. F., Alexander, J., Dourmashkin, J. T., Hill, J. O., Gayles, E. C. and Chang, G. Q. (2005). Phenotypic profile of SWR/J and A/J mice compared to control strains: possible mechanisms underlying resistance to obesity on a high-fat diet. *Brain Res* 1047, 137-47.
- Levin, B. E., Finnegan, M. B., Marquet, E. and Sullivan, A. C. (1984). Defective brown adipose oxygen consumption in obese Zucker rats. *Am J Physiol* 247, E94-100.
- Levine, A. S. and Billington, C. J. (1998). Obesity: progress through genetic manipulation. *Curr Biol* 8, R251-2.
- Levine, J. A., Eberhardt, N. L. and Jensen, M. D. (1999). Role of nonexercise activity thermogenesis in resistance to fat gain in humans. *Science* 283, 212-4.
- Levine, J. A., Lanningham-Foster, L. M., McCrady, S. K., Krizan, A. C., Olson, L. R., Kane, P. H., Jensen, M. D. and Clark, M. M. (2005). Interindividual variation in posture allocation: possible role in human obesity. *Science* 307, 584-6.
- Ley, R. E., Backhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D. and Gordon, J. I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 11070-5.
- Li, H., Matheny, M., Nicolson, M., Tumer, N. and Scarpace, P. J. (1997). Leptin gene expression increases with age independent of increasing adiposity in rats. *Diabetes* 46, 2035-9.
- Linn, T. C. (1981). Purification and crystallization of rat liver fatty acid synthetase. *Arch Biochem Biophys* 209, 613-9.
- Liverini, G., Iossa, S. and Barletta, A. (1992). Rat liver response elicited by long-term cold exposure. *J Physiol Paris* 86, 195-200.
- Lombardi, A., Lanni, A., de Lange, P., Silvestri, E., Grasso, P., Senese, R., Goglia, F. and Moreno, M. (2007). Acute administration of 3,5-diiodo-L-thyronine to hypothyroid rats affects bioenergetic parameters in rat skeletal muscle mitochondria. *FEBS Lett* 581, 5911-6.
- Lowell, B. B. and Spiegelman, B. M. (2000). Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* 404, 652-60.
- Luvisetto, S., Pietrobon, D. and Azzone, G. F. (1987). Uncoupling of oxidative phosphorylation. 1. Protonophoric effects account only partially for uncoupling. *Biochemistry* 26, 7332-8.

# M

- Ma, S. W., Nadeau, B. E. and Foster, D. O. (1987). Evidence for liver as the major site of the diet-induced thermogenesis of rats fed a "cafeteria" diet. *Can J Physiol Pharmacol* 65, 1802-4.
- Makinen, T., Rintamaki, H., Hohtola, E. and Hissa, R. (1996). Energy cost and thermoregulation of unrestrained rats during exercise in the cold. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 114, 57-63.
- Marette, A., Mauriege, P., Marcotte, B., Atgie, C., Bouchard, C., Theriault, G., Bukowiecki, L. J., Marceau, P., Biron, S., Nadeau, A. et al. (1997). Regional variation in adipose tissue insulin action and GLUT4 glucose transporter expression in severely obese premenopausal women. *Diabetologia* 40, 590-8.

Marissal-Arvy, N., Gaumont, A., Langlois, A., Dabertrand, F., Bouchecareilh, M., Tridon, C. and Mormede, P. (2007). Strain differences in hypothalamic pituitary adrenocortical axis function and adipogenic effects of corticosterone in rats. *J Endocrinol* 195, 473-84.

Matsuno, K., Diaz-Ricart, M., Montgomery, R. R., Aster, R. H., Jamieson, G. A. and Tandon, N. N. (1996). Inhibition of platelet adhesion to collagen by monoclonal anti-CD36 antibodies. *Br J Haematol* 92, 960-7.

Matthias, A., Ohlson, K. B., Fredriksson, J. M., Jacobsson, A., Nedergaard, J. and Cannon, B. (2000). Thermogenic responses in brown fat cells are fully UCP1-dependent. UCP2 or UCP3 do not substitute for UCP1 in adrenergically or fatty acid-induced thermogenesis. *J Biol Chem* 275, 25073-81.

McCormack, J. G., Halestrap, A. P. and Denton, R. M. (1990). Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiol Rev* 70, 391-425.

McGarry, J. D., Woeltje, K. F., Kuwajima, M. and Foster, D. W. (1989). Regulation of ketogenesis and the renaissance of carnitine palmitoyltransferase. *Diabetes Metab Rev* 5, 271-84.

Mejsnar, J. and Jansky, L. (1971). Nonshivering thermogenesis and calorogenic action of catecholamines in the white mouse. *Physiol Bohemoslov* 20, 157-62.

Miller, M. W., Duhl, D. M., Vrieling, H., Cordes, S. P., Ollmann, M. M., Winkes, B. M. and Barsh, G. S. (1993). Cloning of the mouse agouti gene predicts a secreted protein ubiquitously expressed in mice carrying the lethal yellow mutation. *Genes Dev* 7, 454-67.

Milner, R. E. and Trayhurn, P. (1989). Cold-induced changes in uncoupling protein and GDP binding sites in brown fat of ob/ob mice. *Am J Physiol* 257, R292-9.

Mine, T., Kojima, I. and Ogata, E. (1988). Evidence of cyclic AMP-independent action of glucagon on calcium mobilization in rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 970, 166-71.

Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191, 144-8.

Mitchell, S. E., Nogueiras, R., Rance, K., Rayner, D. V., Wood, S., Dieguez, C. and Williams, L. M. (2006). Circulating hormones and hypothalamic energy balance: regulatory gene expression in the Lou/C and Wistar rats. *J Endocrinol* 190, 571-9.

Mokdad, A. H., Bowman, B. A., Ford, E. S., Vinicor, F., Marks, J. S. and Koplan, J. P. (2001). The continuing epidemics of obesity and diabetes in the United States. *Jama* 286, 1195-200.

Muller, A., van Hardeveld, C., Simonides, W. S. and van Rijn, J. (1991). The elevation of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>(+)-ATPase levels by thyroid hormone in the L6 muscle cell line is potentiated by insulin-like growth factor-I. *Biochem J* 275 ( Pt 1), 35-40.

Murphy, M. P. and Brand, M. D. (1987). Variable stoichiometry of proton pumping by the mitochondrial respiratory chain. *Nature* 329, 170-2.

## N

Navet, R., Mathy, G., Douette, P., Dobson, R. L., Leprince, P., De Pauw, E., Sluse-Goffart, C. and Sluse, F. E. (2007). Mitoproteome plasticity of rat brown adipocytes in response to cold acclimation. *J Proteome Res* 6, 25-33.

Nedergaard, J., Matthias, A., Golozoubova, V., Jacobsson, A. and Cannon, B. (1999). UCP1: the original uncoupling protein--and perhaps the only one? New perspectives on UCP1, UCP2, and UCP3 in the light of the bioenergetics of the UCP1-ablated mice. *J Bioenerg Biomembr* 31, 475-91.

Newby, F. D., DiGirolamo, M., Cotsonis, G. A. and Kutner, M. H. (1990). Model of spontaneous obesity in aging male Wistar rats. *Am J Physiol* 259, R1117-25.

Nicholls, D. G. (1974). The influence of respiration and ATP hydrolysis on the proton-electrochemical gradient across the inner membrane of rat-liver mitochondria as determined by ion distribution. *Eur J Biochem* 50, 305-15.

Nicholls, D. G. (1979). Brown adipose tissue mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 549, 1-29.

Nicholls, D. G. and Locke, R. M. (1984). Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev* 64, 1-64.

## O

Odland, L. M., Heigenhauser, G. J., Lopaschuk, G. D. and Spriet, L. L. (1996). Human skeletal muscle malonyl-CoA at rest and during prolonged submaximal exercise. *Am J Physiol* 270, E541-4.

Olichon-Berthe, C., Van Obberghen, E. and Le Marchand-Brustel, Y. (1992). Effect of cold acclimation on the expression of glucose transporter Glut 4. *Mol Cell Endocrinol* 89, 11-8.

Oufara, S., Barre, H., Rouanet, J. L. and Minaire, Y. (1988). Great adaptability of brown adipose tissue mitochondria to extreme ambient temperatures in control and cold-acclimated gerbils as compared with mice. *Comp Biochem Physiol B* 90, 209-14.

## P

Peachey, T., French, R. R. and York, D. A. (1988). Regulation of GDP binding and uncoupling-protein concentration in brown-adipose-tissue mitochondria. The effects of cold-acclimation, warm-reacclimation and noradrenaline. *Biochem J* 249, 451-7.

Perrin, D., Mamet, J., Geloën, A., Morel, G., Dalmaz, Y. and Pequignot, J. M. (2003a). Sympathetic and brain monoaminergic regulation of energy balance in obesity-resistant rats (Lou/C). *Auton Neurosci* 109, 1-9.

Perrin, D., Soulage, C., Pequignot, J. M. and Geloën, A. (2003b). Resistance to obesity in Lou/C rats prevents ageing-associated metabolic alterations. *Diabetologia* 46, 1489-96.

Pessayre, D., Mansouri, A. and Fromenty, B. (2002). Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. V. Mitochondrial dysfunction in steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282, G193-9.

Petrovic, V. M., Vrbaski, M., Rajcic, O. and Milic, B. (1978). Biosynthesis of mitochondrial protein components in the liver of cold exposed or adapted rats. *Pflugers Arch* 377, 181-3.

Phillips, M. S., Liu, Q., Hammond, H. A., Dugan, V., Hey, P. J., Caskey, C. J. and Hess, J. F. (1996). Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. *Nat Genet* 13, 18-9.

Pietrobon, D., Zoratti, M. and Azzone, G. F. (1983). Molecular slipping in redox and ATPase H<sup>+</sup> pumps. *Biochim Biophys Acta* 723, 317-21.

Piquet, M. A., Nogueira, V., Devin, A., Sibille, B., Filippi, C., Fontaine, E., Roulet, M., Rigoulet, M. and Leverve, X. M. (2000). Chronic ethanol ingestion increases efficiency of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. *FEBS Lett* 468, 239-42.



Puigserver, P., Adelmant, G., Wu, Z., Fan, M., Xu, J., O'Malley, B. and Spiegelman, B. M. (1999). Activation of PPAR $\gamma$  coactivator-1 through transcription factor docking. *Science* 286, 1368-71.

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, 829-39.

## R

Radomski, M. W. and Orme, T. (1971). Response of lipoprotein lipase in various tissues to cold exposure. *Am J Physiol* 220, 1852-6.

Ravussin, E., Lillioja, S., Anderson, T. E., Christin, L. and Bogardus, C. (1986). Determinants of 24-hour energy expenditure in man. Methods and results using a respiratory chamber. *J Clin Invest* 78, 1568-78.

Refinetti, R. (1989). Body size and metabolic rate in the laboratory rat. *Exp Biol* 48, 291-4.

Rehmark, S. and Nedergaard, J. (1989). DNA synthesis in mouse brown adipose tissue is under beta-adrenergic control. *Exp Cell Res* 180, 574-9.

Reidy, S. P. and Weber, J. M. (2002). Accelerated substrate cycling: a new energy-wasting role for leptin in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282, E312-7.

Ribeiro, M. O., Carvalho, S. D., Schultz, J. J., Chiellini, G., Scanlan, T. S., Bianco, A. C. and Brent, G. A. (2001). Thyroid hormone--sympathetic interaction and adaptive thermogenesis are thyroid hormone receptor isoform--specific. *J Clin Invest* 108, 97-105.

Ricquier, D. and Bouillaud, F. (2000). Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. *J Physiol* 529 Pt 1, 3-10.

Roberts, W. W., Mooney, R. D. and Martin, J. R. (1974). Thermoregulatory behaviors of laboratory rodents. *J Comp Physiol Psychol* 86, 693-9.

Roepstorff, C., Halberg, N., Hillig, T., Saha, A. K., Ruderman, N. B., Wojtaszewski, J. F., Richter, E. A. and Kiens, B. (2005). Malonyl-CoA and carnitine in regulation of fat oxidation in human skeletal muscle during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288, E133-42.

Rolfe, D. F. and Brand, M. D. (1996). Contribution of mitochondrial proton leak to skeletal muscle respiration and to standard metabolic rate. *Am J Physiol* 271, C1380-9.

Rolfe, D. F. and Brown, G. C. (1997). Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev* 77, 731-58.

Rolfe, D. F., Hulbert, A. J. and Brand, M. D. (1994). Characteristics of mitochondrial proton leak and control of oxidative phosphorylation in the major oxygen-consuming tissues of the rat. *Biochim Biophys Acta* 1188, 405-16.

Rolfe, D. F., Newman, J. M., Buckingham, J. A., Clark, M. G. and Brand, M. D. (1999). Contribution of mitochondrial proton leak to respiration rate in working skeletal muscle and liver and to SMR. *Am J Physiol* 276, C692-9.

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, 611-7.

Rothwell, N. J., Saville, M. E. and Stock, M. J. (1981). Acute effects of food, 2-deoxy-D-glucose and noradrenaline on metabolic rate and brown adipose tissue in normal and atropinised lean and obese (falfa) Zucker rats. *Pflugers Arch* 392, 172-7.

Rothwell, N. J. and Stock, M. J. (1979). A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Nature* 281, 31-5.

Rothwell, N. J. and Stock, M. J. (1981). Regulation of energy balance. *Annu Rev Nutr* 1, 235-56.

Rothwell, N. J. and Stock, M. J. (1982). Energy expenditure of 'cafeteria'-fed rats determined from measurements of energy balance and indirect calorimetry. *J Physiol* 328, 371-7.

Rothwell, N. J. and Stock, M. J. (1984). Energy balance, thermogenesis and brown adipose tissue activity in tube-fed rats. *J Nutr* 114, 1965-70.

Rothwell, N. J. and Stock, M. J. (1997). A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Obes Res* 5, 650-6.

Rothwell, N. J., Stock, M. J. and Tyzbir, R. S. (1982). Energy balance and mitochondrial function in liver and brown fat of rats fed "cafeteria" diets of varying protein content. *J Nutr* 112, 1663-72.

Roussel, D., Lhenry, F., Ecochard, L., Sempore, B., Rouanet, J. L. and Favier, R. (2000). Differential effects of endurance training and creatine depletion on regional mitochondrial adaptations in rat skeletal muscle. *Biochem J* 350 Pt 2, 547-53.

## S

Samec, S., Seydoux, J. and Dulloo, A. G. (1998). Role of UCP homologues in skeletal muscles and brown adipose tissue: mediators of thermogenesis or regulators of lipids as fuel substrate? *Faseb J* 12, 715-24.

Schemmel, R., Mickelsen, O. and Gill, J. L. (1970). Dietary obesity in rats: Body weight and body fat accretion in seven strains of rats. *J Nutr* 100, 1041-8.

Schenk, S. and Horowitz, J. F. (2006). Coimmunoprecipitation of FAT/CD36 and CPT I in skeletal muscle increases proportionally with fat oxidation after endurance exercise training. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291, E254-60.

Schmehl, I., Luvisetto, S., Canton, M., Gennari, F. and Azzone, G. F. (1995). Nature of respiratory stimulation in hyperthyroidism: the redox behaviour of cytochrome c. *FEBS Lett* 375, 206-10.

Schmidt-Nielsen, K. (1975). Scaling in biology: the consequences of size. *J Exp Zool* 194, 287-307.

Schunkert, H. (2002). Obesity and target organ damage: the heart. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26 Suppl 4, S15-20.

Servais, S., Couturier, K., Koubi, H., Rouanet, J. L., Desplanches, D., Sornay-Mayet, M. H., Sempore, B., Lavoie, J. M. and Favier, R. (2003). Effect of voluntary exercise on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release by subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria. *Free Radic Biol Med* 35, 24-32.

Shepherd, P. R., Gnudi, L., Tozzo, E., Yang, H., Leach, F. and Kahn, B. B. (1993). Adipose cell hyperplasia and enhanced glucose disposal in transgenic mice overexpressing GLUT4 selectively in adipose tissue. *J Biol Chem* 268, 22243-6.

Sherwin, C. M. (1998). Voluntary wheel running: a review and novel interpretation. *Anim Behav* 56, 11-27.

Shibata, H. and Bukowiecki, L. J. (1987). Regulatory alterations of daily energy expenditure induced by fasting or overfeeding in unrestrained rats. *J Appl Physiol* 63, 465-70.

Silva, J. E. and Rabelo, R. (1997). Regulation of the uncoupling protein gene expression. *Eur J Endocrinol* 136, 251-64.

Silvestri, E., Schiavo, L., Lombardi, A. and Goglia, F. (2005). Thyroid hormones as molecular determinants of thermogenesis. *Acta Physiol Scand* 184, 265-83.

Simonides, W. S., van der Linden, G. C. and van Hardeveld, C. (1990). Thyroid hormone differentially affects mRNA levels of Ca-ATPase isozymes of sarcoplasmic reticulum in fast and slow skeletal muscle. *FEBS Lett* 274, 73-6.

Skulachev, V. P. (1991). Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett* 294, 158-62.

Solinas, G., Summermatter, S., Mainieri, D., Gubler, M., Pirola, L., Wymann, M. P., Rusconi, S., Montani, J. P., Seydoux, J. and Dulloo, A. G. (2004). The direct effect of leptin on skeletal muscle thermogenesis is mediated by substrate cycling between de novo lipogenesis and lipid oxidation. *FEBS Lett* 577, 539-44.

Soulage C, Z. B., Soares AF, Lagarde M, Geloen A. (2008). Lou/C obesity-resistant rat exhibits hyperactivity, hypermetabolism, alterations in white adipose tissue cellularity, and lipid tissue profiles. *Endocrinology*. 149, 615-25.

Speakman, J. R. and Selman, C. (2003). Physical activity and resting metabolic rate. *Proc Nutr Soc* 62, 621-34.

Stamler, R., Stamler, J., Riedlinger, W. F., Algera, G. and Roberts, R. H. (1978). Weight and blood pressure. Findings in hypertension screening of 1 million Americans. *Jama* 240, 1607-10.

Steiner, G., Loveland, M. and Schonbaum, E. (1970). Effect of denervation on brown adipose tissue metabolism. *Am J Physiol* 218, 566-70.

Stoner, H. B. (1973). The role of the liver in non-shivering thermogenesis in the rat. *J Physiol* 232, 285-96.

Strieleman, P. J. and Shrago, E. (1985). Specific interaction of fatty acyl-CoA esters with brown adipose tissue mitochondria. *Am J Physiol* 248, E699-705.

Stuart, J. A., Cadenas, S., Jekabsons, M. B., Roussel, D. and Brand, M. D. (2001). Mitochondrial proton leak and the uncoupling protein 1 homologues. *Biochim Biophys Acta* 1504, 144-58.

Sullo, A., Brizzi, G. and Maffulli, N. (2004). Triiodothyronine deiodinating activity in brown adipose tissue after short cold stimulation test in trained and untrained rats. *Physiol Res* 53, 69-76.

## T

Tager, J. M., Wanders, R. J., Groen, A. K., Kunz, W., Bohnensack, R., Kuster, U., Letko, G., Bohme, G., Duszyński, J. and Wojtczak, L. (1983). Control of mitochondrial respiration. *FEBS Lett* 151, 1-9.

Taleux, N., De Potter, I., Deransart, C., Lacraz, G., Favier, R., Leverve, X. M., Hue, L. and Guigas, B. (2008). Lack of starvation-induced activation of AMP-activated protein kinase in the hypothalamus of the Lou/C rats resistant to obesity. *Int J Obes (Lond)* 32, 639-47.

Taleux, N., Guigas, B., Dubouchaud, H., Moreno, M., Weitzel, J. M., Goglia, F., Favier, R. and Leverve, X. M. (2009). High expression of thyroid hormone receptors and mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase in the liver is linked to enhanced fatty acid oxidation in Lou/C, a rat strain resistant to obesity. *J Biol Chem* 284, 4308-16.

Terblanche, S. E., Gohil, K., Packer, L., Henderson, S. and Brooks, G. A. (2001). The effects of endurance training and exhaustive exercise on mitochondrial enzymes in tissues of the rat (*Rattus norvegicus*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 128, 889-96.

Thompson, D., Edelsberg, J., Colditz, G. A., Bird, A. P. and Oster, G. (1999). Lifetime health and economic consequences of obesity. *Arch Intern Med* 159, 2177-83.

Triandafillou, J., Gwilliam, C. and Himms-Hagen, J. (1982). Role of thyroid hormone in cold-induced changes in rat brown adipose tissue mitochondria. *Can J Biochem* 60, 530-7.

## V

Veyrat-Durebex, C. and Alliot, J. (1997). Changes in pattern of macronutrient intake during aging in male and female rats. *Physiol Behav* 62, 1273-8.

Veyrat-Durebex, C., Alliot, J. and Gaudreau, P. (2005). Regulation of the pituitary growth hormone-releasing hormone receptor in ageing male and female LOU rats: new insights into healthy ageing. *J Neuroendocrinol* 17, 691-700.

Veyrat-Durebex, C., Montet, X., Vinciguerra, M., Gjinovci, A., Meda, P., Foti, M. and Rohner-Jeanrenaud, F. (2009). The Lou/C rat: a model of spontaneous food restriction associated with improved insulin sensitivity and decreased lipid storage in adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296, E1120-32.

Vidal-Puig, A. J., Grujic, D., Zhang, C. Y., Hagen, T., Boss, O., Ido, Y., Szczepanik, A., Wade, J., Mootha, V., Cortright, R. et al. (2000). Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. *J Biol Chem* 275, 16258-66.

## W

Whitaker, E. M., Hussain, S. H., Hervey, G. R., Tobin, G. and Rayfield, K. M. (1990). Is increased metabolism in rats in the cold mediated by the thyroid? *J Physiol* 431, 543-56.

White, C. R. and Seymour, R. S. (2003). Mammalian basal metabolic rate is proportional to body mass<sup>2/3</sup>. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4046-9.

Wijers, S. L., Saris, W. H. and van Marken Lichtenbelt, W. D. (2009). Recent advances in adaptive thermogenesis: potential implications for the treatment of obesity. *Obes Rev* 10, 218-26.

Williamson, D. F., Pamuk, E., Thun, M., Flanders, D., Byers, T. and Heath, C. (1999). Prospective study of intentional weight loss and mortality in overweight white men aged 40-64 years. *Am J Epidemiol* 149, 491-503.

Winder, W. W., Arogyasami, J., Elayan, I. M. and Cartmill, D. (1990). Time course of exercise-induced decline in malonyl-CoA in different muscle types. *Am J Physiol* 259, E266-71.

Winkler, E. and Klingenberg, M. (1994). Effect of fatty acids on H<sup>+</sup> transport activity of the reconstituted uncoupling protein. *J Biol Chem* 269, 2508-15.

Wu-Peng, X. S., Chua, S. C., Jr., Okada, N., Liu, S. M., Nicolson, M. and Leibel, R. L. (1997). Phenotype of the obese Koletsy (f) rat due to Tyr763Stop mutation in the extracellular domain of the leptin receptor (Lepr): evidence for deficient plasma-to-CSF transport of leptin in both the Zucker and Koletsy obese rat. *Diabetes* 46, 513-8.

## Y

Yazbeck, J., Gubern, M., Senault, C., Chapey, M. F. and Portet, R. (1989). The effects of essential fatty acid deficiency on brown adipose tissue activity in rats maintained at thermal neutrality. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 94, 273-6.

Young, P., Cawthorne, M. A. and Smith, S. A. (1985). Brown adipose tissue is a major site of glucose utilisation in C57Bl/6 ob/ob mice treated with a thermogenic beta-adrenoceptor agonist. *Biochem Biophys Res Commun* 130, 241-8.

# Z

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. and Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-32.

Zhao, J., Unelius, L., Bengtsson, T., Cannon, B. and Nedergaard, J. (1994). Coexisting beta-adrenoceptor subtypes: significance for thermogenic process in brown fat cells. *Am J Physiol* 267, C969-79.