

FRÉDÉRIC PICARD

**MODULATION DE LA LIPOPROTÉINE LIPASE DANS L'HYPERTRIGLYCÉRIDÉMIE:
CONTRIBUTION DE L'INSULINE, DU SYSTÈME BÊTA-ADRÉNERGIQUE
ET DU MONOXYDE D'AZOTE**

Thèse
présentée
à la Faculté des Études Supérieures
de l'Université Laval
pour l'obtention
du grade de Philosophæ Doctor (Ph.D.)

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

JUIN 2000

© Frédéric Picard, 2000



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-54028-6

Canada

À tous ceux qui ont cru en moi

RÉSUMÉ BREF

Les études rapportées dans la présente thèse avaient pour but d'évaluer les mécanismes de modulation de la lipoprotéine lipase (LPL) tissulaire pendant la prise alimentaire chez des animaux normaux et insulino-résistants et pendant l'infection afin de mieux définir l'origine des hypertriglycémies qui sont associées à ces deux conditions. Par des interventions altérant la sécrétion d'insuline en phase postprandiale, une première étude a démontré que l'élévation de l'insulinémie était responsable des changements tissu-spécifiques de la LPL après un repas. Les travaux effectués par la suite ont permis de constater que la LPL du tissu adipeux, mais non celle du muscle, pouvait devenir résistante à l'action stimulatrice de l'insuline dans les premières six heures de la prise alimentaire dans des modèles animaux de résistance à l'insuline d'origine génétique et nutritionnelle. Ces altérations dans la modulation de la LPL adipeuse étaient associées dans le temps à une hypertriglycémie exacerbée. Ces études ont aussi démontré que, en fonction de la durée du jeûne précédant la prise alimentaire, le système nerveux β -adrénergique peut contrecarrer les effets à court terme de l'insuline, mais pas dans les conditions de résistance à l'insuline. Dans une autre série d'études, l'infection avec le parasite *Toxoplasma gondii* a causé une chute chronique de l'activité de la LPL dans le muscle mais pas dans le tissu adipeux, suggérant ainsi des mécanismes de modulation favorisant l'apport de triglycérides au tissu adipeux pendant la cachexie. Chez ces animaux, l'injection aiguë de lipopolysaccharide n'a pas provoqué l'hypertriglycémie caractéristique des états d'endotoxémie en absence de changement dans l'activité de la LPL musculaire. Une dernière étude a démontré que, pendant l'endotoxémie à court terme, l'hypertriglycémie est causée par les effets diminutifs du monoxyde d'azote (NO), produit via l'activation de l'enzyme NO synthase inductible (iNOS), sur la LPL musculaire, tel que constaté suite à l'inhibition pharmacologique d'iNOS (avec aminoguanidine) ou génétique (invalidation du gène). Dans le tissu adipeux blanc, la baisse d'activité de LPL n'était pas causée par l'induction d'iNOS. Ces travaux ont donc permis (1) d'établir le rôle essentiel et suffisant de l'insuline dans la modulation postprandiale tissu-spécifique de la LPL; (2) de détailler les altérations temporelles dans la sensibilité de la LPL du tissu adipeux à l'insuline en phase postprandiale, et l'absence de telles altérations au niveau du muscle, dans l'insulino-résistance d'origine génétique et nutritionnelle; (3) d'imputer l'hypertriglycémie aiguë provoquée par l'endotoxémie à des altérations de la LPL du muscle squelettique; (4) de démontrer un nouveau rôle du monoxyde d'azote dans la modulation de la lipoprotéine lipase du muscle squelettique.

RÉSUMÉ

Les études rapportées dans la présente thèse avaient pour but d'évaluer les mécanismes de modulation de la lipoprotéine lipase (LPL) tissulaire pendant la prise alimentaire chez des animaux normaux et insulino-résistants et pendant l'infection afin de mieux définir l'origine des hypertriglycéridémies qui sont associées à ces deux conditions. Cette enzyme est responsable de l'élimination des triglycérides circulants et, de par la modulation tissu-spécifique de son activité, est directement liée à l'apport des triglycérides à ces tissus. Dans une première étude chez le rat, un inhibiteur de la sécrétion d'insuline administré pendant la prise alimentaire a empêché l'augmentation caractéristique de la LPL du tissu adipeux et sa diminution dans le muscle. Inversement, après une chirurgie gastrique qui permettait une sécrétion d'insuline d'origine nerveuse pendant la prise alimentaire sans absorption de nutriments, l'élévation de l'insulinémie a suffi à induire la réponse classique de la LPL. Ces résultats démontraient le rôle essentiel et suffisant de l'insuline dans la modulation de l'activité de la LPL suite à un repas. Dans une seconde étude, des rats résistants à l'insuline suite à un défaut génétique (rats Zucker obèses *fa/fa*) ont été utilisés pour vérifier une possible résistance de la LPL à l'action de l'insuline dans un protocole similaire de prise alimentaire. Les résultats ont montré que, chez ces rats, la LPL du tissu adipeux est momentanément résistante à l'insuline, contrairement à celle du muscle, qui elle demeure sensible à l'effet diminutif de l'hormone pendant le repas. La faible élévation de la LPL adipeuse était concomitante à l'hypertriglycéridémie observée. Cette étude a aussi démontré que les effets du système nerveux adrénergique sur la LPL, qui sont opposés à ceux de l'insuline, pouvaient être observés pendant la prise alimentaire en fonction de la durée du jeûne la précédant. Un protocole semblable chez des rats devenus résistants à l'insuline suite à l'ingestion chronique de nutriments gras et sucrés a aussi été réalisé. Les résultats montrent que la triglycéridémie et la LPL du tissu adipeux chez ces rats répondent à la prise alimentaire comme celles des Zucker *fa/fa*, suggérant qu'une altération dans la modulation de la LPL du tissu adipeux peut être induite par un régime alimentaire considéré comme pouvant exacerber le risque de maladies cardiovasculaires, et qu'une faible réponse de la LPL adipeuse à l'insuline peut exagérer la triglycéridémie postprandiale.

Dans une autre série d'études, l'infection avec les parasites *Toxoplasma gondii* (*ToxG*) et *Neospora caninum* a amené de profonds changements à long terme de la balance énergétique. L'activité de la LPL du muscle squelettique a été réduite de moitié chez les souris infectées avec *ToxG*, alors qu'aucun changement n'a été observé dans la LPL adipeuse. L'activité de la LPL des souris infectées avec *Neospora* n'a pas été altérée. Ces résultats suggèrent que la

modulation de la LPL tissulaire dans la cachexie à long terme favorise l'apport de triglycérides au tissu adipeux plutôt que vers le muscle. Chez ces animaux, l'injection aiguë de lipopolysaccharide (LPS, un agent qui induit une réponse immunitaire non spécifique) n'a pas provoqué l'hypertriglycéridémie caractéristique des états d'endotoxémie en absence de changement dans l'activité de la LPL musculaire, suggérant que la détermination des niveaux circulants de triglycérides dans ces conditions est, du moins en partie, sous l'influence de la LPL du muscle squelettique. Finalement, nous avons démontré que, dans l'endotoxémie à court terme, la LPL n'était pas modulée par l'insuline, mais par les concentrations de monoxyde d'azote (NO), qui est produit dans ces conditions par l'enzyme oxyde nitrique synthase inductible (iNOS). Chez le rat, l'injection d'un inhibiteur d'iNOS a prévenu la diminution de la LPL musculaire suite à l'injection de LPS, alors qu'il n'a pas eu d'effet sur la LPL adipeuse, dont l'activité a elle aussi été réduite par la LPS. Le rôle d'iNOS dans le muscle a été confirmé chez des souris déficientes en iNOS (-/-) traitées à la LPS. Dans ces deux modèles, l'inhibition pharmacologique ou génétique de iNOS a rétabli la triglycéridémie, ce qui suggère fortement que, pendant l'endotoxémie, la LPL du muscle, et non celle du tissu adipeux, module les niveaux sanguins de triglycérides.

Ces travaux ont donc permis (1) d'établir le rôle essentiel et suffisant de l'insuline dans la modulation postprandiale tissu-spécifique de la LPL; (2) de détailler les altérations temporelles dans la sensibilité de la LPL du tissu adipeux à l'insuline en phase postprandiale, et l'absence de telles altérations au niveau du muscle, dans l'insulino-résistance d'origine génétique et nutritionnelle; (3) d'imputer l'hypertriglycéridémie aiguë provoquée par l'endotoxémie à des altérations de la LPL du muscle squelettique; (4) de démontrer un nouveau rôle du monoxyde d'azote dans la modulation de la lipoprotéine lipase du muscle squelettique.

ABSTRACT

The aim of the studies reported in the present thesis was to evaluate the mechanisms implicated in the modulation of lipoprotein lipase (LPL) in normal and insulin resistant rats in the postprandial state and during infection in order to define the development of hypertriglyceridemia associated with these conditions. A first study demonstrated that, after a meal, insulin was a sufficient and necessary factor in the up-modulation of LPL in adipose tissue and the down-modulation of muscle LPL. In another study, obese, insulin resistant Zucker (*fa/fa*) rats were used to test whether LPL is resistant to the action of insulin upon meal intake after food deprivation. During the acute phase of refeeding (first three to six hours after the beginning of the meal), it was shown that adipose, but not muscle, LPL is resistant to insulin in the obese Zucker rat compared to its lean counterpart. This study also showed that the postprandial modulation of LPL by insulin could be counteracted by the β -adrenergic system during food intake after prolonged fasting, but that it was ineffective in insulin-resistant rats. The lack of adipose LPL stimulation by insulin coincided in time with peak postprandial triglyceridemia, strongly suggesting an important role of adipose LPL in determining plasma triglyceride levels after a meal. In a third study, chronic ingestion of a high-sucrose, high-fat diet for four weeks induced overt insulin resistance in rats. In these animals, the postprandial modulation of adipose tissue LPL by insulin was strongly impaired, which demonstrates that an atherogenic diet alters the acute modulation of adipose tissue by insulin.

Infection with *Toxoplasma gondii* (*ToxG*) leads to cachexia. On the other hand, infection with *Neospora caninum* blunts weight gain without eliciting weight loss. In *ToxG*-infected mice, LPL activity in skeletal muscle was reduced by 50%, whereas adipose LPL remained unaltered. *Neospora*-infected mice displayed normal activities of adipose and muscle LPL. These results suggest that modulation of tissue LPL favor the partitioning of circulating triglycerides towards adipose tissue in cachexia. Endotoxin administration to these infected mice failed to induce hypertriglyceridemia in absence of changes in muscle LPL activity, suggesting an important role of muscle LPL in the determination of triglyceridemia during acute endotoxemia. In endotoxin-treated rats, the LPS-induced reduction in muscle, but not adipose, LPL activity was mediated by nitric oxide (NO), which is overproduced by the inducible NO synthase (iNOS) during endotoxemia. Indeed, pharmacological (synthetic inhibitor) or genetic invalidation (gene knockout in mice) of iNOS completely blocked the effect of LPS on muscle LPL, and prevented hypertriglyceridemia, which confirms the central role of muscle LPL in the control of plasma TG levels in this condition.

These studies demonstrate the necessary and sufficient role of insulin in the tissue-specific response of LPL to a meal and the acute and temporary resistance of adipose, but not muscle, LPL to insulin in genetic and nutritional states of resistance of glucose metabolism to the action of insulin. The findings also show that endotoxin-induced hypertriglyceridemia is brought about by the reduction in muscle LPL activity. Finally, these studies demonstrate a new role for nitric oxide in the modulation of muscle LPL activity.

REMERCIEMENTS

Les travaux de cette thèse ont été réalisés dans le laboratoire du Dr Yves Deshaies à la Faculté de Médecine de l'Université Laval. Mon passage au laboratoire a été ponctué de nombreuses joies qui m'auront permis de mener à bien mes études. J'ai pu bénéficier d'un milieu de travail exceptionnel dans lequel il était aisé d'apprendre et de faire fructifier tout mon enthousiasme pour la recherche.

Je tiens premièrement à exprimer toute ma gratitude au Dr Deshaies. Son accueil chaleureux puis l'attention qu'il m'a prodiguée ont permis mon plein épanouissement. Il m'a enseigné la méthode scientifique et la rigueur qui l'accompagne avec tout l'amour qu'il porte à la recherche, sa vaste connaissance de la physiologie avec la patience d'un professeur affable, et la maîtrise de l'écriture scientifique avec le talent d'un écrivain friand des mots justes. Je lui suis reconnaissant de m'avoir laissé développer mon autonomie, mais aussi d'avoir su freiner mes élans en temps opportuns en m'indiquant la bonne voie à suivre. Il fut et demeurera à jamais plus qu'un directeur de recherche à mes yeux.

Je remercie vivement le Dr Denis Richard, mon co-directeur de thèse, de m'avoir insufflé le dynamisme et l'énergie qui le caractérisent. Je lui serai toujours reconnaissant de m'avoir impliqué avec autant de confiance et de fougue dans ses projets de recherche et de m'avoir fait découvrir et explorer de nouvelles voies prometteuses. De par les nombreuses heures passées en sa compagnie, il m'a aussi confié les mécanismes et les rouages de l'aspect politique de la recherche, et fait comprendre l'importance d'être fier du laboratoire et d'en faire la promotion. Qu'il trouve ici l'expression de ma plus vive amitié.

Je tiens aussi à remercier Madame Josée Lalonde de la générosité et tout l'amour qu'elle m'a prodigué lors de mon passage au laboratoire. Sa collaboration fut précise à la réalisation de la plupart de mes travaux, mais surtout, son dévouement chaleureux à mon égard fit en sorte que le laboratoire fut pour moi un oasis de bonheur (d'où ma propension à chanter!).

Je remercie le Dr André Marette de m'avoir ouvert les portes de son laboratoire. Les collaborations fructueuses auxquelles j'ai participé m'ont permis de constater son enthousiasme et sa rigueur pour la recherche, qu'il transmet avec facilité aux membres de son groupe. Je voudrais d'ailleurs les saluer pour m'avoir accueilli avec tant de bienveillance. Je retiens de mon passage à son laboratoire l'image d'une équipe joyeuse, dynamique, altruiste et performante.

Je remercie également le Dr Susan K. Fried, professeure au Département de Sciences nutritionnelles de l'Université Rutgers à Nouveau-Brunswick (New Jersey, États-Unis) et le Dr Jean-Pierre Després d'avoir examiné avec attention la présente thèse, et l'honneur qu'ils m'ont fait en ayant accepté de siéger parmi les membres du jury. Je tiens à exprimer ma gratitude au Dr Després pour l'amitié qu'il m'a portée et, sans que je le sache vraiment, les coups de pouce qu'il m'aura donnés.

Je voudrais aussi remercier tout particulièrement le Dr Jacques LeBlanc de m'avoir fait connaître le laboratoire, et de m'avoir fait partager ses connaissances lors de nos discussions toujours intéressantes. Je lui suis reconnaissant pour la confiance qu'il m'a également accordée en me faisant participer à ses protocoles de recherche.

J'aimerais exprimer ma gratitude et mon amitié à madame Qingling Huang. Elle fut une compagne de bureau d'une extrême gentillesse tout au long de mes études. De plus, grâce à ses conseils précieux sur la minutie à adopter dans les protocoles de recherche et sa patience extraordinaire, c'est en partie à elle que je dois mes premières réussites. Sa collaboration fut précieuse à bon nombre de mes expériences, et son enseignement a contribué grandement au développement de mon autonomie. Par ailleurs, la complicité qui nous unissait était gage de notre succès en tant qu'équipe de laboratoire. J'exprime ici mon plus grand respect à l'égard de cette femme qui aura su m'impressionner par ses connaissances et sa générosité.

Des remerciements amicaux vont aussi aux membres du département d'Anatomie et de physiologie de la Faculté de Médecine, notamment à Jean-Christophe Blachère et François D'Allaire pour les discussions sur tout, le poker animé, et les parties de squash que Jean-Christophe a eu l'amabilité de perdre. Je remercie Elena Timofeeva et le docteur (par deux fois) Naceur Naïmi pour leur collaboration à mes expériences, et l'enseignement de ce dernier sur la vie d'étudiant. Je salue également Antoine Labrie, les deux Julie et Yves Gélinas pour leur bonne humeur et leur camaraderie toujours appréciée, et les kilomètres de jogging pendant lesquels Antoine m'a épargné. Je tiens à remercier tout spécialement ces derniers pour m'avoir enseigné leurs techniques de laboratoire. Un clin-d'oeil particulier à Sébastien Clavel pour sa collaboration à la réalisation de la Journée Carrière, son amitié, et son écoute attentive à mes maigres conseils de fin de parcours. Enfin, je remercie aussi toutes les secrétaires qui ont travaillé au département pour leur aide et leur cordiale bienveillance à mon égard.

Finalelement, je tiens à remercier les membres de ma famille de tout l'appui qu'ils m'auront donné au cours de mon passage au laboratoire. D'abord ma compagne de vie, Mélanie, qui a su patienter de longues heures pendant les maintes fois où j'étais au laboratoire, m'encourager lors des déceptions amères, et célébrer avec brio les nombreux événements heureux. Sans nul doute, son sourire contagieux et sa compréhension furent essentiels à la bonne réalisation de cette thèse. Je voudrais aussi exprimer toute mon admiration à mes parents pour l'exemple qu'ils m'ont donné tout au long de leur vie: amour du travail bien fait, ardeur, intensité et dépassement de soi. Je tiens aussi à saluer ici mon frère Yann pour sa bonne humeur, l'amour qu'il me porte, et le simple fait d'être apparu dans ma vie. Il a su par sa présence redonner un sens à toutes mes aspirations. Il est et demeurera pour moi le symbole de l'espoir qu'il faut alimenter par l'amour et l'attention.

Enfin, je tiens à mentionner que le Conseil de recherches médicales du Canada m'a appuyé financièrement pendant toutes mes années de doctorat.

Longue vie au lab!

AVANT-PROPOS

La présente thèse est présentée à la Faculté des Études Supérieures de l'Université Laval pour l'obtention du diplôme de Philosophiae Doctor ès Sciences (Ph.D.). Elle traite des mécanismes de modulation de la LPL tissulaire pendant la prise alimentaire chez des animaux normaux et insulino-résistants et pendant l'infection, et du rôle de cette enzyme dans le développement des hypertriglycémies qui sont associées à ces deux conditions. La thèse contient une introduction générale rédigée en français sur le métabolisme des lipides et la biologie et la modulation de la lipoprotéine lipase. Les chapitres 1 à 5 constituent le corps de l'ouvrage et relatent en détail les travaux de recherche réalisés pour cette thèse. Ces chapitres sont rédigés en anglais sous forme d'articles scientifiques tels qu'ils ont été ou seront présentés aux éditeurs en vue de leur publication, selon les exigences éditoriales spécifiques des revues. Finalement, une conclusion termine cette thèse en résumant les principaux résultats obtenus et en discutant des voies futures à explorer susceptibles d'améliorer la compréhension des mécanismes impliqués dans la modulation de la lipoprotéine lipase.

ARTICLES PRÉSENTÉS

J'ai eu la chance de participer à la réalisation de nombreuses études dans le cadre de mon doctorat, et dont plusieurs se sont avérées fructueuses et susceptibles d'être publiées. La liste suivante contient les articles issus de mes trois années de doctorat qui ont été publiés ou seront soumis pour publication. Ceux qui sont précédés d'un astérisque sont présentés dans cette thèse.

- * **Picard F, Naïmi N, Richard D, Deshaies Y.** (1999) Response of adipose tissue lipoprotein lipase to the cephalic phase of insulin secretion. Diabetes 48: 452-459.

Timofeeva E, Deshaies Y, **Picard F**, Richard D. (1999) Corticotropin-releasing hormone-binding protein in the brain and pituitary of food-deprived obese (*fa/fa*) Zucker rats. American Journal of Physiology: Regulatory and Comparative Physiology 277: R1749-R1759.

- * **Picard F, Richard D, Timofeeva E, Deshaies Y.** (2000) Abnormal insulin and β -adrenergic modulation of lipoprotein lipase during refeeding after prolonged fasting in the Zucker rat. Diabetologia Sous presse.

Picard F, Deshaies Y, Lalonde J, Samson P, Labrie C, Bélanger A, Labrie F, Richard D. (2000) Effects of the estrogen antagonist EM-652.HCl on energy and lipid balance in ovariectomized rats. International Journal of Obesity. Sous presse.

Kapur S, **Picard F**, Perreault M, Deshaies Y, Marette A. (2000) Nitric oxide: a new player in the modulation of energy metabolism. International Journal of Obesity, compte-rendu de conférence, Symposium du CREME sur le tissu adipeux, Québec, Canada (19-20/11/99). *Sous presse.*

Picard F, Deshaies Y, Lalonde J, Samson P, Richard D. Topiramate reduces fat and energy gain in lean and obese Zucker rats. Soumis pour publication à Obesity Research. *En révision.*

-
- * **Picard F**, Richard D, Arsenijevic D, Deshaies Y. Response of adipose and muscle lipoprotein lipase to chronic infection and subsequent acute immune challenge. *En préparation.*

Huang Q, Rivest R, **Picard F**, Deshaies Y, Richard D. Effects of leptin on the expression of the genes encoding CRH and its receptors in the brain of stressed rats. *En préparation.*

- * **Picard F**, Boivin A, Lalonde J, Deshaies Y. Resistance of adipose tissue lipoprotein lipase to the postprandial action of insulin in high-sucrose, high-fat-fed rats. *Soumis à American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism.*

- * **Picard F**, Kapur S, Perreault M, Marette A, Deshaies Y. Nitric oxide mediates endotoxin-induced hypertriglyceridemia through its action on skeletal muscle lipoprotein lipase. *Soumis à Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology.*

Picard F, LeBlanc J, Deshaies Y. DHEA and its metabolite etiocholanedione acutely increase adipose tissue lipoprotein lipase in mice. *En préparation.*

Arsenijevic D, **Picard F**, Richard D. Hyperinduction of brain uncoupling protein-2 (UCP-2) mRNA by LPS in mice chronically infected with Toxoplasma Gondii. *En préparation.*

Arvaniti K, Deshaies Y, **Picard F**, Richard D. Effects of leptin and corticosterone on CRF, NPY, AGRP and peripheral lipid metabolism in the rat. *En préparation.*

Picard F, Richard D, Huang Q, Deshaies Y. Acute stimulation of glucose metabolism by leptin during exercise in lean rats. *En préparation.*

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ BREF	I
ABSTRACT	IV
REMERCIEMENTS	VI
AVANT-PROPOS	IX
ARTICLES PRÉSENTÉS	X
TABLE DES MATIÈRES	XII
LISTE DES TABLEAUX	XVIII
LISTE DES FIGURES	XX
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XXIV
INTRODUCTION	1
1. SURVOL DU MÉTABOLISME DES LIPIDES	2
1.1 Les lipoprotéines	2
1.2 Transport des lipides exogènes par les chylomicrons	2
1.3 Transport des lipides endogènes par les VLDL	3
1.4 Sort métabolique des lipoprotéines riches en triglycérides	4
1.5 Transport inverse du cholestérol	5
2. FONCTIONS DE LA LIPOPROTÉINE LIPASE	6
2.1 Hydrolyse des triglycérides circulants	6
2.2 Approvisionnement tissulaire en acides gras	7
2.3 Rétention des lipoprotéines à la paroi artérielle	7
2.4 Ligand pour le LRP	8
2.5 Modulation de la production hépatique de VLDL	8
2.6 Modulation de la sécrétion d'insuline par le pancréas	9
2.7 Contribution du débit sanguin	10

3. BIOLOGIE DE LA LIPOPROTÉINE LIPASE.....	11
3.1 Distribution tissulaire	11
3.2 Structure du gène et domaines fonctionnels.....	11
3.3 Promoteurs et facteurs de transcription.....	14
3.4 ARN messagers et traduction de la LPL.....	15
3.5 Glycosylation	16
3.6 Dimérisation.....	17
3.7 Dégradation	18
3.8 Transport intracellulaire, sécrétion, et ancrage à l'endothélium vasculaire	19
4. MODULATION DE LA LIPOPROTÉINE LIPASE.....	20
4.1 Spécificité tissulaire et considérations anatomiques	20
4.2 Transition jeûne – état postprandial	22
4.2.1 Tissu adipeux blanc.....	22
4.2.2 Muscle squelettique.....	23
4.2.3 Tissu adipeux brun	23
4.2.4 Coeur.....	23
4.3 Insuline	24
4.3.1 Tissu adipeux blanc.....	24
4.3.2 Muscle squelettique.....	25
4.3.3 Tissu adipeux brun	26
4.3.4 Coeur.....	26
4.4 Système nerveux adrénergique	27
4.4.1 Tissu adipeux blanc.....	27
4.4.2 Muscle squelettique.....	27
4.4.3 Tissu adipeux brun	28
4.5 Glucocorticoïdes.....	28
4.5.1 Tissu adipeux blanc.....	28
4.5.2 Muscle squelettique.....	29
4.5.3 Coeur.....	29
4.6 Modulation de la lipoprotéine lipase dans les macrophages	30

5. DYSLIPIDÉMIES ASSOCIÉES À LA RÉSISTANCE À L'INSULINE	31
5.1 Introduction	31
5.2 Mécanismes de la résistance à l'insuline	32
5.2.1 Transport du glucose et récepteur à l'insuline	32
5.2.2 Sécrétion d'insuline	33
5.3 Résistance à l'insuline d'origine alimentaire	35
5.3.1 Effets des graisses	35
5.3.2 Effets du sucrose	36
5.4 Endotoxémie	37
5.4.1 Introduction	37
5.4.2 Mécanismes de résistance à l'insuline dans l'endotoxémie	38
5.5 Hypertriglycémies	39
5.5.1 Résistance à l'insuline classique	39
5.5.2 Endotoxémie	40
5.6 Exagération de la triglycémie postprandiale: impacts physiologiques	41
6. MODULATION DE LA LIPOPROTÉINE LIPASE DANS L'HYPERTRIGLYCÉMIÉ	43
6.1 Résistance à l'insuline classique	43
6.1.1 Tissu adipeux blanc	43
6.1.2 Muscle squelettique	44
6.2 Endotoxémie	45
PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS DES TRAVAUX	47
PROBLÉMATIQUE	47
OBJECTIFS	49

CHAPITRE 1	50
-------------------------	----

RESPONSE OF ADIPOSE TISSUE LIPOPROTEIN LIPASE TO THE CEPHALIC PHASE OF INSULIN SECRETION

RÉSUMÉ	51
ABSTRACT	52
INTRODUCTION	53
EXPERIMENTAL DESIGNS AND METHODS.....	54
RESULTS	58
DISCUSSION.....	60
ACKNOWLEDGMENTS	66
REFERENCES.....	67
TABLES	73
FIGURE LEGENDS	75
FIGURES.....	77

CHAPITRE 2	83
-------------------------	----

ABNORMAL INSULIN AND β -ADRENERGIC MODULATION OF LIPOPROTEIN LIPASE DURING REFEEDING AFTER PROLONGED FASTING IN THE ZUCKER RAT

RÉSUMÉ	84
ABSTRACT	85
INTRODUCTION	86
MATERIALS AND METHODS	87
RESULTS	89
DISCUSSION.....	92
ACKNOWLEDGEMENTS.....	96
REFERENCES.....	97
TABLES	103
FIGURE LEGENDS	105
FIGURES.....	106

CHAPITRE 3 112

RESISTANCE OF ADIPOSE TISSUE LIPOPROTEIN LIPASE TO THE POSTPRANDIAL ACTION OF INSULIN IN HIGH-SUCROSE, HIGH-FAT-FED RATS

RÉSUMÉ	113
SUMMARY	114
INTRODUCTION	115
MATERIAL AND METHODS	116
RESULTS	119
DISCUSSION.....	121
ACKNOWLEDGMENTS	124
REFERENCES.....	125
TABLES	129
FIGURE LEGENDS	131
FIGURES.....	132

CHAPITRE 4 137

RESPONSE OF ADIPOSE TISSUE AND SKELETAL MUSCLE LIPOPROTEIN LIPASE TO CHRONIC INFECTION AND SUBSEQUENT ACUTE IMMUNE CHALLENGE

RÉSUMÉ	138
SUMMARY	139
INTRODUCTION	140
MATERIALS AND METHODS	141
RESULTS	143
DISCUSSION.....	145
ACKNOWLEDGMENTS	149
REFERENCES.....	150
TABLES	156
FIGURE LEGENDS	158
FIGURES.....	159

CHAPITRE 5	163
 <i>NITRIC OXIDE MEDIATES ENDOTOXIN-INDUCED HYPERTRIGLYCERIDEMIA THROUGH ITS ACTION ON SKELETAL MUSCLE LIPOPROTEIN LIPASE</i>	
RÉSUMÉ	164
SUMMARY	165
INTRODUCTION	166
EXPERIMENTAL PROCEDURES.....	167
RESULTS	171
DISCUSSION.....	173
ACKNOWLEDGMENTS	178
REFERENCES.....	179
TABLES	184
FIGURE LEGENDS	187
FIGURES.....	189
 DISCUSSION GÉNÉRALE, CONCLUSIONS, ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE	
	197
 BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE	
	210

LISTE DES TABLEAUX

Introduction

Tableau 1.	Comparaisons entre l'ADNc et les séquences d'acides aminés entre l'homme, la souris et le rat.....	13
------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Chapitre 1

Table 1.	Food intake during a 30-min, high-carbohydrate meal with or without diazoxide (150 mg/kg body weight) and plasma variables measured before, 1 h and 3 h after the onset of the meal.	73
Table 2.	Plasma and tissue variables in Zucker rats after 8 h of fasting or after 4 h of sham, intragastric or ad libitum refeeding with an energetic liquid diet following 8 h of fasting	74

Chapitre 2

Table 1.	Cumulative food consumption (g) during the last 24 h before death in lean and obese Zucker rats.....	103
Table 2.	Plasma glucose, insulin, nonesterified fatty acids (NEFA), and triglycerides in lean and obese Zucker rats killed either after a 24-h fast, or 1 h of subsequent refeeding with or without prior i.p. injection of propranolol (Prop).....	104

Chapitre 3

- Table 1. Body and white adipose tissue (WAT) weights of rats chronically fed either rodent chow or a high-sucrose, high-fat diet for four weeks. 129
- Table 2. Pelleted chow intake (g) during refeeding following a 24-h fast in rats chronically fed either rodent chow or a high-sucrose, high-fat diet for four weeks. 130

Chapitre 4

- Table 1. Body and tissue weights recorded in infected mice 28 days after i.p. injection of 10 cysts of either *Toxoplasma gondii* (*ToxG*) or *Neospora caninum*..... 156
- Table 2. Liver triglyceride content and plasma glucose, insulin and corticosterone levels 90 min after saline or lipopolysaccharide injection (LPS; from *E. coli*, 100 ng/kg, i.p.) to mice infected for 28 days with 10 cysts from either *Toxoplasma gondii* (*ToxG*) or *Neospora caninum*..... 157

Chapitre 5

- Table 1. Plasma variables six hours after LPS administration (15 mg/kg) in rats treated or not with aminoguanidine (100 mg/kg) 30 min prior to LPS injection. 184
- Table 2. Specific activity of lipoprotein lipase (μ U/g protein) in epididymal and perirenal white adipose tissue (WAT) and gastrocnemius muscle of rats injected with LPS (15 mg/kg) and subjected or not to a euglycemic-hyperinsulinemic clamp for 5 hours..... 185
- Table 3. Plasma variables in wild-type and iNOS knockout (-/-) mice six hours after administration of LPS (20 mg/kg). 186

LISTE DES FIGURES

Introduction

- Figure 1 Séquence des acides aminés qui font partie de la région responsable de l'interaction entre la LPL et les lipides des lipoprotéines. 13

Chapitre 1

- Figure 1 Time course of plasma glucose, insulin and nonesterified fatty acids (NEFA) in rats fed a 30-min, high-carbohydrate meal. 75
- Figure 2 Time course of lipoprotein lipase specific activity in three white (retroperitoneal, epididymal, inguinal), one brown (interscapular; BAT) adipose tissues, and in soleus muscle in normal rats fed a 30-min, high-carbohydrate meal. 75
- Figure 3 Postprandial time-course of insulinemia in lean (Fa/?) and obese (fa/fa) Zucker rats fed a 30-min, high-carbohydrate meal, with (white symbols) or without (black symbols) diazoxide (150 mg/kg body weight) mixed with the meal. 75
- Figure 4 Specific activity of adipose (panel A) and muscle (panel B) lipoprotein lipase in normal rats fed a 30-min, high-carbohydrate meal, with (white symbols) or without (black symbols) diazoxide (150 mg/kg body weight) mixed with the meal. 75
- Figure 5 Specific activity of adipose (panel A) and muscle (panel B) lipoprotein lipase in obese (fa/fa) Zucker rats in the fasted state or after 4 hours of refeeding with an energetic liquid diet in the following conditions: sham (orally, gastric cannula opened), intragastrically (into the stomach via the cannula), or ad libitum (orally, gastric cannula closed). 76

Chapitre 2

- Figure 1 Plasma insulin (A), glucose (B), nonesterified fatty acids (C), and triglycerides (D) in lean and obese Zucker rats killed either before (freely fed) or after a 24-h fast (0 h of refeeding) or at different times after subsequent refeeding. 105
- Figure 2 Specific activity of lipoprotein lipase in epididymal (A), inguinal (B) and retroperitoneal (C) white adipose depots, and in interscapular brown adipose tissue (D) of lean and obese Zucker rats killed either before (freely fed) or after a 24-h fast (0 h of refeeding), or at different times after subsequent refeeding. 105
- Figure 3 Specific activity of lipoprotein lipase in soleus (A) and vastus lateralis (B) skeletal muscles, and in the heart (C) of lean and obese Zucker rats killed either before (freely fed) or after a 24-h fast (0 h of refeeding), or at different times after subsequent refeeding..... 105
- Figure 4 Specific activity of lipoprotein lipase in epididymal (A) inguinal (B) and retroperitoneal (C) white adipose depots, and in interscapular brown adipose tissue (D) of lean and obese Zucker rats killed either after a 24-h fast or 1 h of subsequent refeeding with or without prior i.p. injection of propranolol (25 mg/kg)..... 105
- Figure 5 Specific activity of lipoprotein lipase in soleus (A) vastus lateralis (B) and gastrocnemius (C) skeletal muscles and in the heart (C) of lean and obese Zucker rats killed either after a 24-h fast, or 1 h of subsequent refeeding with or without prior i.p. injection of propranolol (25 mg/kg)..... 105

Chapitre 3

- Figure 1 Plasma insulin concentration (panel A) before and two hours after insulin infusion in rats chronically fed chow or a HSHF diet during two weeks, in which blood glucose (panel B) was kept constant with a variable glucose infusion (panel C). 131

- Figure 2 Plasma insulin, glucose, nonesterified fatty acids, and triglycerides in rats chronically fed chow or a HSHF diet during four weeks and killed after a 24-h fast, or at various times following subsequent refeeding with pelleted chow.. 131
- Figure 3 Specific activity of lipoprotein lipase in inguinal, retroperitoneal, and epididymal white adipose depots in rats chronically fed chow or a HSHF diet during four weeks and killed after a 24-h fast, or at various times following subsequent refeeding with pelleted chow. 131
- Figure 4 Correlations between mean specific activity of lipoprotein lipase (LPL) in the three depots mentioned in Fig 2 and mean depot weight as measured in chow- and HSHF rats killed at 3 h upon subsequent refeeding (panel A). Panel B: correlations between mean LPL activity and insulinemia at 3 h upon subsequent refeeding in rats chronically fed chow (white circles) or a HSHF diet (black circles) during four weeks..... 131

Chapitre 4

- Figure 1 Lipoprotein lipase specific activity in gastrocnemius (panel A) and vastus lateralis (panel B) skeletal muscle 90 min after saline or lipopolysaccharide injection (LPS; from *E. coli*, 100 ng/kg, i.p.) to mice infected for 28 days with either *Toxoplasma gondii* (*ToxG*) or *Neospora caninum*..... 158
- Figure 2 Lipoprotein lipase specific activity in epididymal (panel A) and inguinal (panel B) white adipose depots 90 min after saline or lipopolysaccharide injection (LPS; from *E. coli*, 100 ng/kg, i.p.) to mice infected for 28 days with either *Toxoplasma gondii* (*ToxG*) or *Neospora caninum*... 158
- Figure 3 Plasma triglyceride concentration 90 min after saline or lipopolysaccharide injection (LPS; from *E. coli*, 100 ng/kg, i.p.) to mice infected for 28 days with either *Toxoplasma gondii* (*ToxG*) or *Neospora caninum*..... 158

Chapitre 5

- Figure 1 Plasma triglyceride concentration six hours after LPS injection (15 mg/kg) in rats treated or not with aminoguanidine (AGN, 100 mg/kg) 30 min prior to LPS administration..... 187
- Figure 2 Lipoprotein lipase specific activity six hours after LPS injection (15 mg/kg) in rats treated or not with aminoguanidine (AGN, 100 mg/kg) 30 min prior to LPS administration..... 187
- Figure 3 Lipoprotein lipase (LPL) mRNA levels in skeletal muscle (panel A) and white adipose tissue (panel B) six hours after LPS injection (15 mg/kg) in rats treated or not with aminoguanidine (AGN, 100 mg/kg) 30 min prior to LPS administration. 187
- Figure 4 Lipoprotein lipase (LPL) protein levels in skeletal muscle (panel A) and white adipose tissue (panel B) six hours after LPS injection (15 mg/kg) in rats treated or not with aminoguanidine (AGN, 100 mg/kg) 30 min prior to LPS administration. 187
- Figure 5 Hepatic secretion of triglycerides (TG) six hours after LPS injection (15 mg/kg) in rats treated or not with aminoguanidine (AGN, 100 mg/kg) 30 min prior to LPS administration..... 188
- Figure 6 Plasma triglyceride concentration in wild-type and iNOS knockout (-/-) mice determined six hours after injection of LPS (20 mg/kg)..... 188
- Figure 7 Lipoprotein lipase specific activity in wild-type and iNOS knockout (-/-) mice injected with LPS (20 mg/kg). 188

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACTH	hormone adrénocorticotropine
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
AMPc	adénosine 3',5'-monophosphate cyclique
Apo	apolipoprotéine
ARNm	acide ribonucléique messenger
C/EBP	protéine de liaison au promoteur CCAAT (CCAAT-enhancer-binding protein)
CETP	protéine de transfert des esters de cholestérol (cholesterol ester transfer protein)
FABP	protéine de liaison des acides gras (fatty acid binding protein)
GLUT	transporteur de glucose
GR	récepteur des glucocorticoïdes
HDL	lipoprotéine de haute densité (high density lipoprotein)
IDL	lipoprotéine de densité intermédiaire (intermediate density lipoprotein)
IFN- γ	interféron-gamma
iNOS	oxyde nitrique synthase de type inductible
IL	interleukine
IP ₃	inositol 1,4,5 triphosphate
LCAT	lécithine:cholestérol acyltransférase
LDL	lipoprotéine de faible densité (low density lipoprotein)
LPL	lipoprotéine lipase
LPS	lipopolysaccharide
LRP	protéine associée au récepteur des LDL (LDL receptor-related protein)
MAP	mitogen-activated protein
NO	monoxyde d'azote (formule chimique)
Oct	facteur de transcription octamère
PC-1	plasma cell differentiation-1
PI-3 kinase	phosphatidyl-inositol (PI)-3 kinase
PLC	phospholipase C
TNF α	tumor-necrosis factor- α
VLDL	lipoprotéine de très faible densité (very low density lipoprotein)

INTRODUCTION

Les acides gras sont des substrats énergétiques prisés par l'organisme, notamment grâce à leur capacité à fournir aux cellules une grande quantité d'énergie lors de leur oxydation. Pour cette raison, les processus impliqués dans le métabolisme des acides gras se sont sophistiqués au fil de l'évolution, ce qui a entraîné une pléiade de mécanismes complémentaires régissant leur production, transport et utilisation intracellulaire.

1. Survol du métabolisme des lipides

1.1 Les lipoprotéines

Hydrophobes, les lipides doivent être transportés dans la circulation sanguine en association à d'autres molécules. Les acides gras non estérifiés (nommés aussi acides gras libres) sont véhiculés dans le sang liés à l'albumine. Les autres lipides sont transportés sous forme de complexes sphériques, les lipoprotéines. Dans ces particules, les acides gras sont estérifiés et liés par groupes de trois avec une molécule de glycérol (et donc nommés triacylglycérols, ou plus communément triglycérides). L'autre composante lipidique majeure des lipoprotéines, le cholestérol, est transporté au centre de la sphère sous forme estérifiée, ou à la surface des lipoprotéines sous forme nonestérifiée. À cette surface sont aussi retrouvés les phospholipides et des protéines spécifiques, les apolipoprotéines (apo), qui régissent en grande partie le sort métabolique et les modifications des lipoprotéines par des interactions complexes (comme cofacteurs ou ligands de récepteurs) avec d'autres protéines du métabolisme lipidique. De par la composition en triglycérides, cholestérol, phospholipides et apolipoprotéines, et la proportion variable que prend chacun de ces composés au sein de la lipoprotéine, au moins cinq différentes lipoprotéines ont été répertoriées et classées selon leurs propriétés physico-chimiques [chylomicrons, VLDL (de l'anglais "very low density lipoprotein"), IDL (de l'anglais "intermediate density lipoprotein"), LDL (de l'anglais "low density lipoprotein"), et HDL (de l'anglais "high density lipoprotein").

1.2 Transport des lipides exogènes par les chylomicrons

Les lipides alimentaires sont dégradés dans le tractus digestif grâce à l'action de différentes lipases (inguinale, stomacale, et pancréatique). Les acides gras, esters de cholestérol, et lysophospholipides ainsi formés et liés aux sels biliaires sont en mesure de passer la

membrane de l'entérocyte de l'intestin. Dans le cas des acides gras à chaîne courte, i.e. moins de 12 carbones, ceux-ci traversent l'entérocyte par diffusion passive, sont sécrétés dans la veine porte et se lient alors à l'albumine et sont mis en circulation (Pidlich et Gangl, 1989). Les acides gras de plus longue chaîne et le cholestérol sont de leur côté acheminés au réticulum de l'entérocyte où ils seront réestérifiés. Les acides gras sont transportés dans la cellule par la protéine de liaison des acides gras (FABP, de l'anglais, fatty acid binding protein). Un polymorphisme (substitution de l'alanine pour une thréonine) dans le gène de cette protéine affecte l'absorption intestinale des acides gras, ce qui a des répercussions sur l'oxydation subséquente des lipides (Tataranni *et al.*, 1996). Dans l'entérocyte, ces lipides estérifiés et, entre autres, les apo-B₄₈, A-I et A-IV sont alors assemblés en grosses particules sphériques qui sont excrétées dans la lymphe (ou chyle, d'où leur appellation de chylomicron). Il a été démontré que l'entrée des chylomicrons se déroulait de façon pulsatile et non continue (Cohen et Berger, 1990). Les chylomicrons sont très riches en triglycérides, qui constituent environ 90% de leur masse. Dans leur passage dans la lymphe puis dans le plasma, les chylomicrons acquièrent les apolipoprotéines C-II, C-III et E suite à des échanges avec les HDL. Ce n'est que suite à l'acquisition de l'apo C-II que les triglycérides du noyau interne peuvent être hydrolysés (voir la section sur leur sort métabolique).

1.3 Transport des lipides endogènes par les VLDL

Les VLDL sont presque en totalité produites par le foie (Olofsson *et al.*, 1999). Les acides gras qui arrivent au foie [provenant de la captation hépatique de différentes lipoprotéines circulantes ou d'acides gras non estérifiés libérés par le tissu adipeux (Lewis, 1997; Arner, 1993)] constituent la source principale de substrats pour la formation des triglycérides. Cependant, les hépatocytes peuvent aussi convertir certains glucides simples (glucose et fructose) en acides gras (Cianflone *et al.*, 1992; Herzberg et Rogerson, 1992). Ces glucides activent certains enzymes lipogéniques du foie, et leur effets peuvent aussi se faire sentir à plus long terme en augmentant la transcription de ces enzymes (Iritani *et al.*, 1992). Le fructose est rapidement métabolisé au foie et induit l'activation de la pyruvate déshydrogénase, résultant en une production accrue d'acides gras (Park *et al.*, 1992; Mayes, 1993). Ces derniers sont réestérifiés en triglycérides et gardés en réserve, ou, si besoin en est, sont réintroduits dans la circulation sanguine. Dans ce dernier cas, les triglycérides sont emballés dans les VLDL avec du cholestérol et les apos B₁₀₀ (une molécule par VLDL), C-II et C-III, et E (Sparks et Sparks, 1993). Il est à noter que, même si ces deux processus sont souvent proportionnels l'un par rapport à l'autre, une production hépatique de triglycérides accrue ne cause pas nécessairement

une augmentation de leur sécrétion dans les VLDL à cause des mécanismes indépendants qui les régissent (Sparks et Sparks, 1993). Cependant, lorsque les triglycérides sont produits en excès, les particules VLDL sécrétées ont tendance à être plus grosses (Porkka et Raitakari, 1996).

1.4 Sort métabolique des lipoprotéines riches en triglycérides

Les lipoprotéines subissent de nombreux changements de constitution et de conformation au fil de leurs interactions avec différentes enzymes et récepteurs dans la circulation sanguine. Ainsi, l'hydrolyse du noyau de triglycérides est une étape continue, qui a comme effet de diminuer la grosseur des particules et d'augmenter le contenu proportionnel en cholestérol. Pour maintenir la forme sphérique, des constituants de surface sont alors transférés aux HDL. L'hydrolyse des triglycérides est en grande partie causée par l'action de la lipoprotéine lipase (LPL, E.C. 3.1.1.34), enzyme située à la lumière des capillaires sanguins. La biologie de cette enzyme sera discutée à la section suivante. La LPL, active dans la plupart des lits capillaires des tissus extrahépatiques, dissocie les acides gras du glycérol, acides gras qui traverseront l'endothélium et seront ensuite captés par les cellules sous-jacentes.

Dans le cas des chylomicrons, le catabolisme de ces lipoprotéines est très rapide [demi-vie d'environ 30 minutes (Cryer, 1988; Thompson, 1989)]. Suite à l'interaction avec la LPL et le transfert de ses apolipoprotéines et phospholipides, il ne reste qu'un résidu de chylomicron, qui peut poursuivre son catabolisme en étant à son tour hydrolysé par une autre lipase, la lipase hépatique. Enfin, ce résidu est capté par le foie grâce à sa liaison avec le récepteur des LDL (qui fixe l'apo B et E) ou le LRP (de l'anglais LDL receptor-related protein, qui lui lie l'apo E), et est dégradé dans les hépatocytes. Les diverses composantes qui ne seront pas dégradées pourront être récupérées pour la formation ultérieure de lipoprotéines.

Les triglycérides des VLDL sont également susceptibles à l'hydrolyse par la LPL intravasculaire. En fait, la LPL peut interagir directement avec l'apo B (Choi *et al.*, 1995; Choi *et al.*, 1997; Carrero *et al.*, 1996). Une altération du ratio apolipoprotéines E:C peut aussi affecter le catabolisme des VLDL au foie (Hirano *et al.*, 1989). Les VLDL perdent plus de la moitié de leur volume après leurs multiples interactions avec la LPL (Zambon *et al.*, 1996; Thompson, 1989), produisant ainsi des résidus de VLDL qui sont alors captés par les récepteurs hépatiques des LDL et LRP (Salinelli *et al.*, 1996). Les particules restantes sont des lipoprotéines de densité plus élevée, les IDL, qui à leur tour se transforment en LDL suite à l'hydrolyse plus complète de leur noyau de triglycérides par la lipase hépatique. La majeure proportion des LDL en circulation

sont le résultat de l'action de la LPL sur les VLDL (Goldberg *et al.*, 1988). De par cette cascade, la taille des VLDL (et donc leur composition en triglycérides) a été reconnue comme ayant un effet majeur sur la taille des particules LDL (Lahdenperä *et al.*, 1996). Les LDL sont les principaux transporteurs et distributeurs du cholestérol vers les tissus (Shepherd, 1994; Glickman et Sabesin, 1994; Thompson, 1989).

1.5 Transport inverse du cholestérol

Les HDL sont fabriquées à partir d'un amalgame de divers constituants (notamment les apolipoprotéines A-I et A-II) assemblés suite 1) à leur sécrétion directe par le foie et l'intestin; 2) au transfert entre les lipoprotéines circulantes [à cet égard, certaines données récentes obtenues *in vivo* suggèrent plutôt que l'apo A-I demeure dans la même HDL et qu'un nombre très infime est sujet au transfert dans un espace extravasculaire (Colvins et Parks, 1999)]; 3) aux dons par les tissus périphériques (Shepherd, 1994). Les changements de conformation des lipoprotéines suite à leur hydrolyse par la LPL (tendance vers une forme sphérique) libèrent des constituants de surface qui peuvent aussi servir à la production de HDL (Murdoch et Breckenridge, 1996; Patsch *et al.*, 1987). Cette dernière situation doit avoir un rôle important dans la formation des HDL, puisqu'il existe une grande quantité d'études relatant la relation inverse entre l'activité de la LPL (ou le catabolisme des triglycérides en périphérie) et la formation de particules HDL (Ginsberg, 1994; Frayn, 1993; Johansson *et al.*, 1992; Goldberg, 1996; Després, 1994).

Les particules HDL naissantes (ou petites HDL) de forme discoïdale sont composées d'apo E et C, de phospholipides et cholestérol libre et de deux molécules d'apo A-I (Colvins et Parks, 1999; Glickman et Sabesin, 1994). Ces HDL ne sont pas confinées au compartiment vasculaire. Elles peuvent traverser l'endothélium, puisqu'elles sont retrouvées dans cet espace et aussi dans la lymphe. Ces particules peuvent accaparer du cholestérol libre à la surface des cellules par diffusion passive selon un gradient de concentration, mais aussi suite à une liaison avec un ou des récepteurs membranaires (Rothblat *et al.*, 1999). Des apo A-I sans ou pauvres en cholestérol libre pourraient aussi interagir avec la membrane cellulaire, accaparer un peu de cholestérol et fusionner avec les petites HDL. L'enzyme lécithine:cholestérol acyltransférase (LCAT) associée aux HDL estérifie le cholestérol libre à la surface de la HDL, qui migre vers l'intérieur de la particule suite à l'action de l'enzyme, ce qui laisse de l'espace pour accaparer d'autres molécules de cholestérol libre à la surface de la particule (Thompson, 1989). Ces processus mènent à la formation de HDL plus larges, qui contiennent une ou deux apo A-I supplémentaires et reviennent dans le plasma (Olofsson *et al.*, 1999). La protéine de transfert

d'esters de cholestérol (CETP), présente dans le plasma, catalyse l'échange d'un triglycéride contre une molécule de cholestérol entre les différentes lipoprotéines. L'interaction des HDL avec la CETP fait en sorte que les HDL acquièrent des triglycérides en échange de cholestérol estérifié et deviennent plus denses [HDL₂ puis HDL₃ (Shepherd, 1994)]. Enfin, les HDL relarguent leur cholestérol aux hépatocytes du foie par des processus de diffusion (ces HDL appauvries en cholestérol peuvent donc retourner en circulation) ou par internalisation des HDL. Les HDL transportent donc le cholestérol retrouvé en périphérie vers le foie. Cette fonction des HDL est en partie responsable du rôle protecteur de ces particules dans le développement de la maladie cardiovasculaire (Ginsberg, 1994; Reaven et Laws, 1994; Frayn, 1993; Després, 1994; Goldberg, 1996).

2. Fonctions de la lipoprotéine lipase

2.1 Hydrolyse des triglycérides circulants

La LPL participe au catabolisme des triglycérides d'origine endogène et exogène en les hydrolysant en position 1 et 3, et comme mentionné ci-haut, cette hydrolyse résulte en des changements importants dans la composition des lipoprotéines. Chez l'humain, il existe une pléiade de mutations pouvant affecter l'activité de la LPL (Murthy *et al.*, 1996; Kontula et Ehnholm, 1996). Les sujets homozygotes ou hétérozygotes pour ces mutations sont caractérisés par des hypertriglycéridémies franches ou moins sévères, respectivement. À l'opposé, lorsque la LPL est surexprimée chez la souris, des niveaux très bas de triglycérides sanguins ont été observés (Jensen *et al.*, 1997; Zechner, 1997).

Pour effectuer son activité catalytique, la LPL requiert un cofacteur retrouvé en surface des lipoprotéines et en excès dans le plasma, l'apo C-II (Olivecrona et Beisiegel, 1997; Eckel, 1989; Auwerx *et al.*, 1992). C'est en grande partie la présence de cette apo C-II [via une interaction directe, indépendante des lipides, avec la LPL (MacPhee *et al.*, 2000)] qui est responsable de l'hydrolyse de lipoprotéines spécifiquement par la LPL, permettant ainsi de contrer la similitude avec la lipase hépatique. L'apo C est aussi impliquée dans l'arrimage des lipoprotéines à la LPL (van Barlingen *et al.*, 1996). À l'opposé, l'apo C-III agit comme un inhibiteur de la LPL (Cardin *et al.*, 1982). Son activité inhibitrice a été illustrée chez des souris fortement hypertriglycéridémiques qui surexprimaient l'apo C-III (Ito *et al.*, 1990).

2.2 Approvisionnement tissulaire en acides gras

L'hydrolyse des triglycérides circulants dans les capillaires d'un tissu fait en sorte que ce tissu peut capter et utiliser les acides gras produits par l'action de la LPL. Par exemple, l'accumulation des triglycérides dans la glande mammaire en période de lactation est causée par une hausse d'activité de la LPL (Eckel, 1989). Par ailleurs, c'est dans les tissus où le flux d'acides gras est élevé que l'activité de la LPL est quantitativement (masse du tissu x activité) importante comme les muscles squelettique et cardiaque et les tissus adipeux blanc et brun (Zechner, 1997; Auwerx *et al.*, 1992). Ces acides gras peuvent être alors oxydés comme source d'énergie ou entreposés selon les besoins du tissu et le milieu hormonal dans lequel il se trouve (voir la section sur la modulation de la LPL).

Il a été suggéré que l'activité de la LPL était le facteur limitant de la captation tissulaire des acides gras (Greenwood, 1985; Enerbäck et Gimble, 1993), hypothèse qui n'est pas partagée par l'ensemble de la communauté scientifique (Frayn, 1998; Cianflone *et al.*, 1995; Baldo *et al.*, 1993). En effet, les individus déficients en LPL et hypertriglycéridémiques présentent des tissus adipeux de masse normale, suggérant que la LPL n'est pas nécessaire au maintien de la masse grasse (Murthy *et al.*, 1996; Baldo *et al.*, 1993). Cette situation est aussi illustrée chez des souris n'exprimant pas la LPL spécifiquement dans le tissu adipeux; la masse adipeuse est alors beaucoup plus sous le contrôle de la synthèse endogène des acides gras dans le tissu (Weinstock *et al.*, 1997).

2.3 Rétention des lipoprotéines à la paroi artérielle

La LPL peut aussi interagir avec les lipoprotéines sur une base très locale. À la paroi artérielle, la LPL augmente, par rapport à des protéoglycans sans LPL (van Barlingen *et al.*, 1996), la rétention des LDL, VLDL (Pentikainen *et al.*, 2000; Rutledge et Goldberg, 1994) et lipoprotéine (a) (Auerbach *et al.*, 1999) à la matrice subendothéliale. Cette rétention est dépendante de la présence de protéoglycans [notamment de type syndecan (Fuki *et al.*, 1997)] et implique le LRP et un domaine C-terminal fonctionnel (notamment les résidus situés entre 396 et 405) (Hendricks *et al.*, 1998; Krapp *et al.*, 1995). La forme monomérique (donc inactive) de la LPL lie les LDL normales, alors que la forme dimérique lie préférentiellement les LDL oxydées (Pentikainen *et al.*, 2000; Olin *et al.*, 1999). Cette condition pourrait être particulièrement importante pour la LPL des macrophages, qui s'attaquent à cette dernière forme de LDL (voir section 4.6). Une fois ces lipoprotéines retenues, la LPL pourrait aussi hydrolyser leur contenu

en triglycérides en ainsi participer à leur modification conformationnelle (Auwerx *et al.*, 1992; Havel, 1994). Cette fonction de la LPL pouvait ainsi potentialiser la conversion des lipoprotéines en des formes plus athérogéniques (Mead *et al.*, 1999; Saxena *et al.*, 1992; Plutzky, 1999; Ginsberg, 1994). À cet effet, il a aussi été démontré que l'hydrolyse des triglycérides par la LPL pouvait oxyder les LDL en favorisant l'acidification du milieu (Balagopalakrishna *et al.*, 1999). Ces observations suggèrent qu'à la paroi endothéliale, la LPL pourrait jouer plusieurs rôles. Ces particules altérées sont ultimement prises en charge par des cellules de l'environnement subendothélial comme les macrophages (Lindqvist *et al.*, 1983; Querfield *et al.*, 1990).

2.4 Ligand pour le LRP

La liaison entre la LPL et les lipoprotéines peut aussi s'effectuer à la surface de nombreuses autres cellules, comme les fibroblastes ou les hépatocytes, où la LPL sert de lien entre les protéoglycans de la membrane cellulaire et les lipoprotéines (Mulder *et al.*, 1992) après s'être libérée des capillaires par des mécanismes encore indéterminés. La liaison de la LPL aux lipoprotéines riches en triglycérides stimule un processus d'endocytose, à tout le moins dans les cellules HepG2 (Casaroli-Marano *et al.*, 1998). En fait, dans les cellules HepG2, la LPL stimule la captation des lipoprotéines possédant l'apo B (résidus de chylomicron ou VLDL) par un mécanisme indépendant du récepteur aux LDL (Beisiegel *et al.*, 1991). Les auteurs de cette étude ont suggéré que la LPL pouvait se lier de façon covalente avec le LRP, ce qui corroborait l'hypothèse déjà émise voulant que la LPL soit un ligand pour certains récepteurs (Felts *et al.*, 1975; Goldberg *et al.*, 1986).

2.5 Modulation de la production hépatique de VLDL

La LPL peut non seulement être impliquée dans la captation hépatique des lipoprotéines (Beisiegel *et al.*, 1991), mais également dans la sécrétion des VLDL (Williams *et al.*, 1991). Le mécanisme proposé est lié au fait que la recaptation hépatique des VLDL naissantes serait facilitée par la modification des lipoprotéines par la LPL en plus de la liaison de la LPL avec le LRP (Beisiegel *et al.*, 1991). De par ce fait, la LPL diminuerait indirectement la production de VLDL via l'inhibition de la production d'apo B [qui est une étape clé de la formation de ces particules (Lewis, 1997; Sparks et Sparks, 1993)], notamment par l'apport accru de cholestérol contenu dans les VLDL réinternalisées (Avramoglu *et al.*, 1996).

2.6 Modulation de la sécrétion d'insuline par le pancréas

Il a été observé que, chez des souris dont les deux allèles de la LPL étaient mutés (-/-), les niveaux plasmatiques de glucose étaient extrêmement faibles [15 mg/dl, ou 0.8 mmol/l, (Merkel *et al.*, 1998)]. Les causes de cette hypoglycémie n'ont pas été déterminées chez ces souris, notamment parce que les souris déficientes en LPL meurent peu après leur naissance (Weinstock *et al.*, 1995). Par ailleurs, chez une population d'hommes danois, une déficience partielle en LPL (+/-) est associée à une réduction de la glycémie (Nordestgaard *et al.*, 1997). Dans deux autres études indépendantes, cette association n'a pas été observée (Wilson *et al.*, 1990; Miesenbock *et al.*, 1993). Néanmoins, un groupe a récemment élucidé la relation entre la déficience en LPL et l'hypoglycémie (Marshall *et al.*, 1999). Comparées aux souris sauvages, des souris hétérozygotes pour la LPL (+/-) avaient une même sensibilité du métabolisme du glucose à l'insuline (tel que mesuré par test de tolérance au glucose et par clamp hyperinsulinémique). Cependant, leur niveaux plasmatiques basaux de glucose étaient plus bas et l'insulinémie plus élevée, suggérant que chez ces souris LPL +/-, l'hypoglycémie était secondaire à l'hyperinsulinémie. Cette hypothèse a été supportée par des expériences effectuées dans des îlots de Langerhans isolés de souris LPL +/+ et +/-, dans lesquelles la stimulation de la sécrétion d'insuline par le glucose était plus élevée chez les animaux hétérozygotes (Marshall *et al.*, 1999). Dans ces îlots LPL +/-, le contenu en triglycérides était de 80 ng/cellule bêta, alors qu'il est normalement de 300 à 900 ng/cellule (Sjostrom *et al.*, 1972; Fried et Kral, 1987). Finalement, dans des cellules productrices d'insuline (INS-1), l'augmentation de l'activité de la LPL (par surexpression du gène via un adénovirus) réduisait la sécrétion d'insuline, alors que la diminution de l'activité de l'enzyme (par transfection d'oligonucléotides antisens) augmentait la sécrétion de l'hormone (Marshall *et al.*, 1999). Ces résultats démontrent que la LPL est impliquée dans le processus de sécrétion d'insuline. Même si les mécanismes proposés demeurent incomplets, les acides gras apportés aux cellules bêta via l'action de la LPL semblent inhiber la production d'insuline, en apparence contradiction avec les concepts exposés dans des études indirectes où l'infusion d'acides gras stimulait la sécrétion de l'hormone (Warnotte *et al.*, 1994; Boden, 1996b; Vara et Tamarit-Rodriguez, 1989; Dobbins *et al.*, 1998). Il se peut donc que la LPL ait une fonction autre que celle d'amener les acides gras aux cellules dans le processus de sécrétion d'insuline.

2.7 Contribution du débit sanguin

Le catabolisme des triglycérides circulants via l'activité de la LPL est dépendant du débit sanguin après un repas (West *et al.*, 1989a), une infusion de lipides (Clerk *et al.*, 2000; Mackintosh *et al.*, 1996), et dans d'autres situations (Marotta *et al.*, 1995; West *et al.*, 1989b; Rosell et Belfrage, 1979). En fait, il a été suggéré que l'importance du débit sanguin dans le métabolisme tissulaire était fortement sous-estimée (Björntorp, 1996). Cette hypothèse est d'importance pour l'évaluation de l'hydrolyse des triglycérides par la LPL dans un tissu donné, notamment dans le muscle squelettique richement vascularisé (Nuutila *et al.*, 1996; Lash, 1996; Hespel *et al.*, 1995), où, malgré la faible activité spécifique de la LPL par rapport au tissu adipeux blanc par exemple (Deshaies et Belahsen, 1993), la masse totale du tissu et l'abondance de sites d'hydrolyse peut faire en sorte que ce tissu soit en grande partie responsable du catabolisme des triglycérides circulants (Mantha et Deshaies, 1998). L'évidence de cette situation est illustrée par l'exemple de la captation de glucose par le muscle squelettique (Rattigan *et al.*, 1995; Nuutila *et al.*, 1996; Lash, 1996; Hespel *et al.*, 1995). À cet égard, le monoxyde d'azote, notoire pour ses effets vasodilatateurs (Pohl et de Wit, 1999; Moncada *et al.*, 1988; Moncada *et al.*, 1991), médie l'effet stimulateur de l'insuline sur le transport du glucose dans le muscle et le tissu adipeux *in vivo* mais non *in vitro* (Roy *et al.*, 1998), suggérant un important rôle du débit sanguin dans le processus de transport du glucose (Baron, 1996). D'autre part, l'augmentation du débit sanguin (et donc de l'accessibilité des triglycérides aux sites d'hydrolyse) suite à une infusion d'adrénaline peut contrecarrer ou contrebalancer les effets diminutifs de l'hormone sur l'activité de la LPL (Ashby et Robinson, 1980). En effet, par différences artério-veineuses dans le tissu adipeux *in vivo*, une extraction nette de triglycérides du compartiment vasculaire vers le tissu adipeux a été observée suite à l'infusion d'adrénaline (Samra *et al.*, 1996b). Finalement, l'importance de la masse du tissu a été aussi illustrée chez des rats normaux étudiés en phase postprandiale dont les acides gras dérivés de l'hydrolyse des triglycérides étaient retrouvés en beaucoup plus grande quantité dans le muscle squelettique (Bessesen *et al.*, 1995), malgré la baisse relative de l'activité spécifique de la LPL musculaire et l'augmentation de la LPL du tissu adipeux.

3. Biologie de la lipoprotéine lipase

3.1 Distribution tissulaire

Les motifs d'expression tissulaire de la LPL chez les mammifères ont été déterminés par différentes méthodes d'immunohistochimie, de biologie moléculaire (Northern blots), d'activité enzymatique et de synthèse marquée (pulse-chase). La LPL est synthétisée dans les cellules parenchymateuses. Les plus hauts niveaux d'expression de LPL ont été observés dans le tissu adipeux, le coeur et les glandes mammaires de femelles en période de lactation (Enerbäck et Gimble, 1993; Eckel, 1989). À un plus faible degré, la LPL est aussi exprimée dans le muscle squelettique, le cerveau, les ovaires, le foie (à l'état néonatal), le rein, le cortex surrénalien (Staels *et al.*, 1996), l'oeil (Casaroli-Marano *et al.*, 1996) et les macrophages (Auwerx *et al.*, 1992; Braun et Severson, 1992a). Dans certaines études, les méthodes d'analyses par immunofluorescence ne corroboraient pas celles obtenues par hybridation *in situ*, suggérant que la LPL peut se retrouver dans la matrice extracellulaire de cellules n'exprimant pas l'enzyme. Plusieurs différences intra et inter-espèces ont été répertoriées au fil des ans quant à l'expression de la LPL tissulaire. Ainsi, on a démontré que les niveaux d'expression de LPL pouvaient varier de 3 (coeur) à 20 fois (tissu adipeux) dans une trentaine de souches de souris (Ben-Zeev *et al.*, 1983).

3.2 Structure du gène et domaines fonctionnels

Le gène de la LPL est situé sur le chromosome 8p22 (Enerbäck et Gimble, 1993). La structure du gène de la LPL a été examinée chez de nombreuses espèces, incluant le poulet, le boeuf, le cochon d'Inde, l'homme, la souris et le rat. Dans chacune de ces espèces, l'ADN complémentaire (ADNc) et la séquence des acides aminés ont été élucidés (tableau 1). D'après la structure de l'ADNc, il apparaît que le gène de la LPL chez les mammifères a été conservé de 77 à 82% (Enerbäck et Gimble, 1993). La conservation de la protéine en elle-même est d'au moins 90%. Chez l'homme, le gène de la LPL code pour 475 acides aminés répartis en 10 exons séparés par neuf introns (Brault *et al.*, 1992), desquels 27 (correspondant au dixième exon) sont écartés lors de la traduction (Arnault *et al.*, 1996), donnant ainsi un monomère mature de 448 résidus dont le poids approximatif est de 50 394 Da (Auwerx *et al.*, 1992). Toutes les espèces ont conservé la triade d'acides aminés (Ser-132, Asp-156 et His-241) responsable de l'activité

catalytique de la LPL (Ames, 1995). Le domaine de liaison entre la LPL et la surface lipidique des lipoprotéines (entre les résidus 125 à 142) est aussi très bien conservé entre les espèces (figure 1). À cet effet, il a été démontré que des résidus tryptophane entre les positions 390 et 394 (dans le domaine C-terminal) étaient aussi importants pour l'arrimage des lipoprotéines à la LPL (Lookene *et al.*, 1997). La LPL comporte également un pont disulfure (paire de cystéines) entre les acides aminés 216 et 239 qui servirait de structure en couvercle permettant l'accès au site catalytique de l'enzyme (Lo *et al.*, 1995; Auwerx *et al.*, 1992). Cette structure pourrait aussi servir de chaînon dans le lien entre les VLDL et les récepteurs aux LDL (Salinelli *et al.*, 1996). La région impliquée dans l'interaction avec l'apo C-II, cofacteur essentiel de la LPL, a été déterminée comme étant située dans les premiers 314 acides aminés de l'enzyme (Auwerx *et al.*, 1992). Une région riche en acides aminés lysine en position 148 et 149, et donc fortement chargée positivement, peut contribuer à l'interaction avec ce cofacteur (Yang *et al.*, 1989). Les propriétés de liaison avec l'héparine sont dépendantes de la structure tertiaire de la protéine, puisque trois laboratoires différents ont montré que la région impliquée dans cette liaison était soit située entre les résidus 290 et 300 (Enerback *et al.*, 1987), soit entre 312 et 448 pour le domaine de liaison carboxy-terminal (Davis *et al.*, 1992), et que certains acides aminés très éloignés de ces régions, comme Ala-176 et Gly-188, affectent aussi l'affinité à l'héparine (Auwerx *et al.*, 1992). Finalement, un résidu de 17 à 25 acides aminés (basiques et hydrophobes) est nécessaire au transport de la LPL au travers des membranes des différentes organelles impliquées dans sa production (Pfeffer et Rothman, 1987). Certains ont suggéré que ces différentes fonctions selon le domaine étaient associées à un exon bien précis, i.e. une fonction par exon (Braun et Severson, 1992a; Auwerx *et al.*, 1992). À cet effet, il est généralement admis que l'exon 5 code pour le site catalytique de la LPL (Tenkanen *et al.*, 1994).

Tableau 1 Comparaisons entre l'ADNc et les séquences d'acides aminés entre l'homme, la souris et le rat.

	Humain	Souris	Rat
Humain (AA -26, +448)	—	82.1 %	74.3 %
Souris (AA -19, +447)	95.9 % (94.7 %)	—	92.9 %
Rat (AA -27, +447)	96.0 % (93.7 %)	98.5 % (97.9 %)	—

La comparaison des ADNc se lit au dessus de la diagonale, celle des acides aminés se lit sous la diagonale. Entre parenthèses, pourcentage d'homologie entre les acides aminés. Tiré de (Enerbäck et Gimble, 1993).

Rat	LEEEFNYP LDNVHLLGSLGAHAAGVAGS
Souris	M.....
Homme	M.....I.....

Figure 1 Séquence des acides aminés qui font partie de la région responsable de l'interaction entre la LPL et les lipides des lipoprotéines. Les points représentent des acides aminés semblables à ceux du rat. Tiré de (Auwerx *et al.*, 1992).

Une impressionnante quantité de mutations ont été répertoriées dans la littérature au cours des dernières années (Hokanson, 1999; Murthy *et al.*, 1996; Santamarina-Fojo et Dugi, 1994; Bergeron *et al.*, 1996; Santamarina-Fojo et Brewer, 1994; Wang *et al.*, 1996), dont quelques-unes avaient une fréquence élevée dans la population québécoise (Bergeron *et al.*, 1996; Murthy *et al.*, 1996). L'effet de ces mutations est principalement de rendre la LPL inactive (Murthy *et al.*, 1996). Cependant, l'expression de l'hypertriglycémie chez les hétérozygotes est variable et dépendante de facteurs métaboliques tels que la résistance à l'insuline ou le degré de masse viscérale (Vohl *et al.*, 1995; Julien *et al.*, 1997; Jemaa *et al.*, 1995), suggérant que les mutations de la LPL augmentent la susceptibilité à l'hypertriglycémie et aux maladies cardiovasculaires qui en découlent (Wang *et al.*, 1996; Bouchard *et al.*, 1993).

3.3 Promoteurs et facteurs de transcription

Plusieurs sites de modulation situés en amont de la séquence initiatrice de la transcription ont été rapportés (Bey *et al.*, 1998; Auwerx *et al.*, 1992; Kirchgessner *et al.*, 1989a; Deeb et Peng, 1989; Previato *et al.*, 1991). D'abord, une boîte TATA a été identifiée à la position -30 (où 1 correspond au site d'initiation de la transcription). Deux motifs CAAT ont été observés en positions -65 et -506, qui pourraient potentiellement être des sites de liaison avec le facteur de transcription NF-Y (Gimble *et al.*, 1995). Deux sites C/EBP sont situés en position -68 et -509 (qui superposent donc les motifs CAAT). De plus, un site possiblement modulé par l'adénosine 3',5'-monophosphate cyclique (AMPC) a été trouvé en -306 (Staels *et al.*, 1996). Enfin, il existe trois sites potentiels de liaison pour les facteurs de transcription Octamères (Oct) aux positions -580, -186 et -46 (Gimble *et al.*, 1995). Le site Oct-1 est important notamment pour ce qui est de rendre accessible le gène de la LPL aux autres facteurs de transcription en altérant la conformation de la chromatine sur l'ADN (Hua *et al.*, 1991). Des éléments de réponse aux glucocorticoïdes (Kirchgessner *et al.*, 1989b; Cooper *et al.*, 1992) et aux œstrogènes (Homma *et al.*, 2000) ont aussi été observés dans le promoteur de la LPL. Ces sites retrouvés chez l'humain sont très semblables à ceux observés chez la souris (Hua *et al.*, 1991), démontrant qu'ils ont été conservés dans l'évolution, et suggérant ainsi un rôle important de ces séquences du promoteur de la LPL dans l'expression de l'enzyme.

En 1996 fut publié un article qui démontrait qu'en plus de ces éléments modulateurs de la transcription, qui, somme toute, affectaient principalement la transcription constitutive de la LPL, deux autres sites de modulation (en position -157 et -169) étaient présents dans le promoteur du gène de l'enzyme (Schoonjans *et al.*, 1996a). Ces éléments correspondaient à des sites de liaison (PPAR response element) pour des facteurs de transcription nommés PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) qui pouvaient induire la transcription du gène de la LPL de façon beaucoup plus sensible face aux changements hormonaux auxquels la cellule devait faire face (Vidal-Puig *et al.*, 1996). En fait, ces PPAR sont tellement puissants dans le contrôle de la transcription de la LPL que des agonistes pour les PPAR (tels que les fibrates) induisent l'expression de l'enzyme dans le foie, où la LPL est normalement absente (Schoonjans *et al.*, 1996b). L'effet positif d'agonistes PPAR de type gamma sur l'expression de la LPL dans l'adipocyte a aussi été démontré (Schoonjans *et al.*, 1996a; Brun *et al.*, 1997). À cet égard, l'augmentation de l'activité de la LPL du tissu adipeux provoquée par l'administration à long terme d'agonistes des PPAR gamma est causée par la stimulation continue de l'expression de l'enzyme (Auwerx, 1999), puisque ces mêmes agonistes peuvent inhiber de façon aiguë l'activité de la LPL même si sa transcription est induite (Ranganathan et Kern, 1998). Il est important de noter que l'induction de l'expression du gène de la LPL induite par les PPAR a de profondes répercussions sur la triglycémie (Auwerx *et al.*, 1996). Enfin, les PPAR semblent être impliqués de façon générale mais très importante dans la différenciation des adipocytes (Auwerx, 1999; Spiegelman et Flier, 1996; Brun *et al.*, 1997; Barak *et al.*, 1999), processus auquel la LPL pourrait contribuer (Brun *et al.*, 1997). Les différents types de PPAR (alpha et gamma, dans le foie et le tissu adipeux, respectivement) semblent être responsables de la modulation spécifique à ces tissus en réponse à un même stimulus hormonal (Previato *et al.*, 1991).

3.4 ARN messagers et traduction de la LPL

Il y a de 1 à 4 ARNm de la LPL selon les espèces. L'homme en possède deux (3.2 et 3.6 kb), la souris trois (1.7, 3.4 et 3.6 kb) et le rat un seul (3.6 kb) (Ranganathan *et al.*, 1995; Kirchgessner *et al.*, 1989b; Eckel, 1989; Auwerx *et al.*, 1992). Les différences dans la taille de l'ARNm sont causées par la présence d'une séquence de poly-adénylation plus ou moins longue (Wang *et al.*, 1992; Hua *et al.*, 1991), et l'ARNm de 3.6 kb est mieux traduit que son homologue de 3.2 kb, à tout le moins chez l'humain (Ranganathan *et al.*, 1995). La stabilité de l'ARNm peut constituer un facteur important pouvant affecter la production et l'activité de l'enzyme à long terme (Enerbäck et Gimble, 1993), hypothèse qui à première vue ne peut

expliquer les différences entre la traduction des formes d'ARNm de 3.2 et 3.6 kb (Ranganathan *et al.*, 1995). En fait, une protéine plutôt labile serait impliquée dans la stabilité de l'ARNm de la LPL (Auwerx *et al.*, 1989), comme c'est le cas pour la lipotransine qui interagit avec la lipase hormono-sensible (Syu et Saltiel, 1999).

Des études réalisées dans des adipocytes ont suggéré que la traduction de l'ARNm de la LPL était sous contrôle d'un facteur répresseur retrouvé dans le cytoplasme qui pourrait interagir avec la région 3' non traduite (Kern *et al.*, 1996). Par ailleurs, il a récemment été démontré que la protéine kinase C (PKC) jouait un rôle important dans la traduction de la LPL, mais qu'une augmentation de l'activité de la PKC n'était pas accompagnée d'une élévation de l'activité de la LPL (Ranganathan *et al.*, 1999). Ces résultats suggèrent que la traduction de la LPL est un processus dépendant de la PKC, et que l'activité de cette dernière n'est pas une étape limitante dans la maturation de la LPL.

3.5 Glycosylation

Dans les tissus où le gène de la LPL est exprimé, celle-ci se retrouve sous forme de proenzyme inactive dans le réticulum endoplasmique avant d'être activée par des processus de glycosylation (Simsolo *et al.*, 1992), qui comprennent des ajouts successifs de molécules de N-acétylglucosamine, mannose, glucose [qui est à la base du complexe d'oligosaccharides, mais finalement absent à la fin du processus, sinon il y a perte d'activité importante (Ben-Zeev *et al.*, 1992; Park *et al.*, 1995)], galactose, fucose, et acide sialique. Ces changements dans la conformation de l'enzyme se déroulent entre le réticulum endoplasmique et le compartiment *trans* de l'appareil de Golgi (Vannier *et al.*, 1985; Eckel, 1989; Ailhaud, 1990; Chajek-Shaul *et al.*, 1985; Amri *et al.*, 1986; Cupp *et al.*, 1987). Le transfert entre ces deux organelles est très rapide (10 minutes entre le réticulum et le cis-Golgi, et 20-30 minutes entre le cis et le trans-Golgi (Masuno et Okuda, 1995; Vannier et Ailhaud, 1989). La région C-terminale de la LPL est essentielle à la translocation de l'enzyme vers l'appareil de Golgi puisque une LPL tronquée dans cette région ne quitte pas le réticulum endoplasmique (Buscà *et al.*, 1998). Enfin, des études utilisant un marquage immuno-fluorescent ont montré que la LPL intracellulaire était en très large proportion confinée dans les compartiments de l'appareil de Golgi (Vannier *et al.*, 1986), dans un stade cryptique qui cependant demeure actif et prêt à répondre aux stimuli hormonaux (Vannier *et al.*, 1989).

Le monomère mature de la LPL contient approximativement 8% d'oligosaccharides (Iverius et Ostlund-Lindqvist, 1976; Iverius et Ostlund-Lindqvist, 1986), découlant principalement de la N-glycosylation en deux sites distincts (Vannier et Ailhaud, 1989; Yang *et al.*, 1989; Semb et Olivecrona, 1989b). Les deux sites de glycosylation correspondent aux résidus Asn-43 et Asn-359 chez le cochon d'Inde (Semb et Olivecrona, 1989b), Asn-44 et Asn-361 chez la vache (Yang *et al.*, 1989), et Asn-45 (second site indéterminé) chez le poulet (Hoogewerf et Bensadoun, 1991). Chez cette dernière espèce, la LPL contient également une portion sulfatée associée à un complexe d'oligosaccharides (Hoogewerf et Bensadoun, 1991). Chez l'humain, suite à la démonstration qu'une mutation dans l'acide aminé Asn-43 prévient l'activité intracellulaire et la sécrétion de la LPL (Semenkovich *et al.*, 1990; Buscà *et al.*, 1995), il est généralement admis que cet acide aminé est important dans la glycosylation de l'enzyme. Deux études supplémentaires ont souligné l'importance de la glycosylation dans la sécrétion d'une protéine LPL active. Dans la première, la LPL s'accumulait dans les adipocytes 3T3-L1 (Ailhaud, 1990; Masuno *et al.*, 1991b) ou Ob17 (Amri *et al.*, 1986) en culture quand ceux-ci étaient incubés en présence de tunicamycin, un inhibiteur de la glycosylation. De plus, les souris caractérisées par des mutations *cld/cld* possèdent une LPL inactive (non catalytique) parce que non glycosylée (Masuno *et al.*, 1991a). Dans ces conditions, la mutation affecterait la maturation de la LPL dans le réticulum endoplasmique (Briquet-Laugier *et al.*, 1999). La présence de glucose dans le milieu de culture cellulaire pour le processus de glycosylation est essentielle à l'activation de l'enzyme (Ong et Kern, 1989b; Buscà *et al.*, 1995; Olivecrona *et al.*, 1987b), mais il est important de noter que de fortes concentrations de glucose n'augmentent pas davantage l'activité de la LPL *in vitro* (Parkin *et al.*, 1980). Ceci pourrait être dû au fait que la glycosylation de la LPL augmente en même temps sa susceptibilité à la dégradation (Simsolo *et al.*, 1992). Fait intéressant, l'absence de glycosylation n'empêche pas la LPL des adipocytes Ob17 d'être sécrétée suite à un traitement à l'héparine à court terme (Amri *et al.*, 1986). Dans l'ensemble, ces études ont démontré que la glycosylation était une étape nécessaire pour que la LPL soit active de par son implication dans le processus d'assemblage ou de conformation de l'enzyme, ce qui est appuyé par le fait que la dimérisation des protéines est souvent associée à leur glycosylation (Pfeffer et Rothman, 1987).

3.6 Dimérisation

La dimérisation de la LPL est essentielle à l'activité catalytique de l'enzyme, puisque la LPL n'est active que sous sa forme dimérique (Bergeron *et al.*, 1996; Vannier et Ailhaud, 1989; Amri *et al.*, 1986; Olivecrona *et al.*, 1987a). L'enzyme active est un homodimère en structure de

tête-à-queue (Murthy *et al.*, 1996; Ailhaud, 1990). L'association entre les monomères (lien covalent) prend place dans le compartiment *trans* de l'appareil de Golgi (Vannier et Ailhaud, 1989). Ce phénomène réversible (Bergö *et al.*, 1996b; Ailhaud, 1990) semble être une étape importante de modulation de l'activité de la LPL sous plusieurs conditions physiologiques comme le jeûne (Bergö *et al.*, 1996b; Lee *et al.*, 1998), la prise alimentaire (Erskine *et al.*, 1994), ou l'infection (Gouni *et al.*, 1993).

3.7 Dégradation

La demi-vie de la LPL est d'environ une heure (Olivecrona *et al.*, 1987a). Un pré-traitement des cellules avec l'héparine réduit cette perte par 25% (Vannier et Ailhaud, 1989; Cupp *et al.*, 1987). Pour maintenir une activité tissulaire élevée, le taux de renouvellement de l'enzyme doit être important pour suppléer à la forte dégradation de l'enzyme. La dégradation intracellulaire de la LPL pourrait se dérouler dans des vésicules acidifiées (Nielsen *et al.*, 1999). Jusqu'à 70 à 80% de LPL nouvellement synthétisée peut être dégradée dans les lysosomes avant de pouvoir être sécrétée (Vannier et Ailhaud, 1989; Olivecrona *et al.*, 1987a). Une étude a démontré que l'ajout d'un inhibiteur des protéases des lysosomes provoquait l'accumulation de la LPL intracellulaire *in vitro* (Braun et Severson, 1992a). À cet effet, une mutation (gly142-glu) dans la LPL amène celle-ci vers les lysosomes pour sa dégradation (Buscà *et al.*, 1996). Ainsi, la voie de dégradation des lysosomes pourrait servir de contrôle interne pour s'assurer de la qualité de la LPL produite. La LPL peut aussi être réinternalisée et dégradée dans les lysosomes de la cellule qui l'a produite (Saxena *et al.*, 1990; Friedman *et al.*, 1982) par des mécanismes impliquant les protéoglycans héparan-sulfates attachés à la LPL (Obunike *et al.*, 1996; Sehayek *et al.*, 1996). L'endocytose est aussi associée à la liaison de la LPL avec le récepteur à la sortiline (Nielsen *et al.*, 1999). De plus, la LPL est dégradée dans le réticulum endoplasmique lorsque sa glycosylation est empêchée par un facteur externe (Semb et Olivecrona, 1987). Des études ont montré que dans des adipocytes Ob17 en culture, l'héparine inhibait la dégradation de la LPL (Vannier et Ailhaud, 1989). Enfin, une hypothèse a été posée selon laquelle une séquence riche en acides aminés PEST (proline, glutamate, serine, thréonine), particulièrement sensible aux protéases dépendantes du calcium intracellulaire (Rechsteiner, 1988) et retrouvée dans la LPL, pourrait être impliquée dans la dégradation de l'enzyme (Boivin et Deshaies, 1995). Cette hypothèse est appuyée indirectement par des études montrant que les effets stimulateurs de l'insuline sur la LPL d'adipocytes sont mimés par le A23187, un ionophore du Ca^{2+} , et que ces effets sont abolis par l'ajout d'EGTA, agent qui diminue la concentration

intracellulaire de Ca^{2+} (Draznin *et al.*, 1987). Le rôle du calcium dans l'activité de la LPL est aussi suggéré par le fait que la phospholipase C (PLC) active la LPL dans des cellules THP-1 en stimulant la protéine kinase C, qui elle-même augmente les niveaux intracellulaires de Ca^{2+} (Auwerx *et al.*, 1989). La protéase calmoduline, aussi dépendante du calcium, n'est pas impliquée à première vue dans le processus de dégradation de l'enzyme (Auwerx *et al.*, 1989), d'où la possible importance de la région riche en PEST de la LPL spécifique aux calpaïnes (Boivin et Deshaies, 1995). En fait, beaucoup de travaux sont nécessaires pour déterminer les mécanismes exacts de dégradation de la LPL. Quoiqu'il en soit, suite à la sécrétion de la LPL vers les capillaires, la très large proportion de LPL présente à l'endothélium est détachée de la paroi vasculaire et dégradée au foie (Eckel, 1989), possiblement via des mécanismes qui requièrent la présence des protéoglycans et la liaison au LRP hépatique (Obunike *et al.*, 1996).

3.8 Transport intracellulaire, sécrétion, et ancrage à l'endothélium vasculaire

La protéine LPL latente est entreposée dans des vésicules sécrétrices provenant du *trans*-Golgi (Vannier *et al.*, 1989; Pradines-Figuères *et al.*, 1990), transportée à la surface membranaire par un processus activé par l'AMPc (Friedman *et al.*, 1986; Motoyashiki *et al.*, 1996), et libérée dans l'espace extracellulaire (Ting et Pagano, 1990) par un mécanisme qui peut être potentialisé par l'héparine (Ailhaud, 1990). Dans des adipocytes Ob17, l'héparine peut stimuler la sécrétion de l'enzyme sans changer son taux de transfert à partir du réticulum endoplasmique (Vannier et Ailhaud, 1989). La glycosylation est essentielle au transport de la LPL, puisque la brefeldin A, un inhibiteur du transport des glycoprotéines, empêche la sécrétion de la LPL dans des adipocytes isolés (Masuno et Okuda, 1995). Une étude a proposé qu'une protéine devait chaperonner la LPL pour faciliter son transport intracellulaire vers la surface membranaire (Olivecrona *et al.*, 1996). Plus récemment, la protéine associée au récepteur du LRP (RAP; de l'anglais "receptor-associated protein") a été reliée à cette fonction (van Vlijmen *et al.*, 1999; Berryman et Bensadoun, 1995). La LPL peut être retenue à la surface externe de la membrane cellulaire (Auwerx *et al.*, 1992). Les phosphatidylinositols pourraient être impliqués dans cette rétention (Chan *et al.*, 1988; Chajek-Shaul *et al.*, 1989), via l'intermédiaire d'une protéine de 116 kDa qui servirait de chaînon entre les deux (Stins *et al.*, 1993). Dans des cellules en culture, la PLC peut activer la libération de la LPL liée à la surface cellulaire dans le milieu de culture soit par interaction directe avec les phosphatidylinositols qui ancrent la LPL (Chan *et al.*, 1988), ou soit par un effet sur les protéoglycans héparan-sulfates auxquels la LPL est liée (Chajek-Shaul *et al.*, 1989). Puisque l'activité de la PLC est en elle-même un mécanisme modulé (Ting et Pagano, 1990), ces conclusions peuvent expliquer, du moins en partie, comment la

libération de la LPL est modulée en réponse à des stimuli hormonaux comme l'insuline (Chan *et al.*, 1988; Eckel *et al.*, 1984) ou l'héparine (Severson *et al.*, 1988; Goldberg, 1996). De par sa grande affinité pour la LPL et sa structure semblable aux protéoglycans, l'héparine a été fréquemment utilisée pour détacher la LPL de son site d'ancrage, ce qui permet la mesure de la capacité hydrolytique globale de l'enzyme dans le compartiment vasculaire (Eckel, 1989; Auwerx *et al.*, 1992).

Il a été suggéré que la LPL atteignait son site actif (l'endothélium des capillaires sanguins) par des liaisons successives à des projections de protéoglycans présents à la surface externe des cellules parenchymateuses (Blanchette-Mackie *et al.*, 1989; Camps *et al.*, 1990). Cette hypothèse est appuyée par la forte affinité de la LPL pour ces molécules et le fait que la LPL est ancrée aux protéoglycans à l'endothélium (Shimada *et al.*, 1981; Saxena *et al.*, 1990). Ces glycosaminoglycans peuvent aussi servir au recyclage et à l'internalisation de la LPL (Saxena *et al.*, 1990).

4. Modulation de la lipoprotéine lipase

Plusieurs facteurs modulateurs peuvent, selon les conditions et le modèle étudié, affecter la LPL. La liste suivante donne un aperçu sommaire de ces facteurs: insuline, adrénaline, noradrénaline, glucocorticoïdes, glucagon, hormone de croissance, hormones thyroïdiennes, œstrogène, testostérone, hormone adrénocorticotropine (ACTH), le facteur de croissance associé à l'insuline-1 (insulin-like growth factor-1), somatotropine, interleukines, TNF (de l'anglais "tumor necrosis factor"), interféron. Certains de ces facteurs n'agissent seulement que dans certaines situations ou dans des tissus particuliers. L'effet de l'insuline, des catécholamines et des glucocorticoïdes seront revus plus en détail dans cette section puisque ces modulateurs sont les plus pertinents dans le cadre de la présente thèse.

4.1 Spécificité tissulaire et considérations anatomiques

La LPL tissulaire est modulée par l'interaction de plusieurs facteurs hormonaux en fonction des besoins spécifiques de chaque tissu (Eckel, 1989; Zechner, 1997). Ainsi, selon l'état dans lequel l'organisme se trouve, les acides gras sont dirigés vers les tissus où la demande en énergie se fait pressante (comme les muscles squelettiques ou le tissu adipeux brun thermogénique), ou sont entreposés (le meilleur exemple est le tissu adipeux blanc) pour pouvoir

être disponibles lors de situations futures. Ce concept physiologique est à la base des mécanismes proposés pour expliquer la modulation de la LPL tissulaire et les variations de son activité observées en diverses situations (Zechner, 1997).

L'expression de l'activité de la LPL en fonction des protéines tissulaires présente l'avantage de pouvoir évaluer l'effet d'un traitement sur la LPL en elle-même, et non sur les protéines en général, ce qui peut donner une fausse impression de la modulation de l'enzyme. Ainsi, le fait d'observer une élévation d'activité de la LPL alors que la masse protéique globale du tissu est augmentée du même facteur a peu d'intérêt à première vue puisque que cela tend à démontrer que toutes les protéines (LPL incluse) sont affectées dans une situation donnée. Par contre, il peut être utile d'apprécier la capacité globale d'un tissu à hydrolyser les triglycérides via la LPL. Par exemple, un tissu adipeux de masse importante ayant une activité spécifique de la LPL semblable à un autre tissu de moindre masse aura tendance à accaparer davantage d'acides gras dérivés de l'action catalytique de l'enzyme sur les triglycérides circulants.

Dans le muscle squelettique, l'activité spécifique (par gramme de protéines) de la LPL est dépendante du type de fibre musculaire (Ong *et al.*, 1994). Ainsi, les fibres de type I (prédominance de fibres rouges oxydatives) expriment davantage (jusqu'à 5 fois plus) de LPL que les fibres de type II (prédominance de fibres blanches). Cette situation a de profondes répercussions sur l'activité de l'enzyme, puisque celle-ci peut être jusqu'à 50 fois plus élevée dans les muscles rouges tels le soleus comparativement aux muscles blancs comme l'extensor digitorum longus (Ong *et al.*, 1994). Mentionnons finalement que l'absence de modèle musculaire *in vitro* pour l'étude de la LPL rend difficile l'interprétation de l'effet d'une hormone sur la LPL *in vivo* indépendamment de son impact sur les hormones contre-régulatrices qui pourraient aussi influencer la LPL.

La transition jeûne/état postprandial constitue un bon exemple de situation pendant laquelle les changements d'activité de la LPL sont modulés de façon spécifique à chaque tissu. La prise alimentaire augmente l'activité de la LPL dans les tissus adipeux blanc et brun, alors que celle du muscle squelettique et du cœur diminue en réponse au même stimulus (Olivecrona *et al.*, 1995; Benavides *et al.*, 1998; Bergö *et al.*, 1996a; Tan *et al.*, 1977). Une réciprocité semblable est observée en période de jeûne ou suite à un exercice physique intense. En accord avec cette vision d'une modulation tissu-spécifique, la présente section présentera les effets simultanés d'une hormone sur la LPL du tissu adipeux blanc et brun et des muscles squelettique et cardiaque pour avoir une meilleure vue d'ensemble sur la modulation tissulaire de la LPL lors de certaines situations où une hormone particulière est prédominante.

4.2 Transition jeûne – état postprandial

4.2.1 Tissu adipeux blanc

Après un jeûne de durée normale (c'est-à-dire qui peut correspondre à une période de sommeil d'environ 10 heures), l'activité de la LPL adipeuse est diminuée, en accord avec la mobilisation des lipides durant cette situation (Samra *et al.*, 1996a), sans qu'il y ait de changements dans la masse ou l'ARNm de la LPL (Doolittle *et al.*, 1990; Bergö *et al.*, 1996a; Semb et Olivecrona, 1986a). Il est important de noter que la réduction de l'activité de la LPL du tissu adipeux est beaucoup plus rapide et drastique que celle observée dans des préparations d'adipocytes isolés à partir de tissus appartenant aux mêmes animaux (Semb et Olivecrona, 1986b), suggérant que la LPL extracellulaire est modulée de façon importante dans la privation de nourriture [ce qui pourrait être causé par une altération dans la translocation de l'enzyme vers les sites fonctionnels à l'endothélium des capillaires du tissu (Braun et Severson, 1992a)]. À tout le moins, ces observations suggèrent que des mécanismes post-traductionnels sont recrutés pour réduire l'activité de l'enzyme. La privation de nourriture pourrait affecter la portion active de l'enzyme et augmenter la proportion relative d'enzyme inactive (Bergö *et al.*, 1996b). À plus long terme, la masse et l'ARNm de la LPL ne sont diminués que dans des périodes de jeûne de durée égale (Ladu *et al.*, 1991) ou plus élevée que 24 heures (Bergö *et al.*, 1996a; Lee *et al.*, 1998). Finalement, il a été proposé que jusqu'à 24 heures de jeûne, la dégradation de la LPL expliquait les changements d'activité dans la même période, alors qu'une privation de nourriture de plus longue durée affecte les mécanismes prétraductionnels de modulation (qui interviennent sur la masse) de l'enzyme (Lee *et al.*, 1998).

Suite à la privation de nourriture, la prise alimentaire augmente l'activité de la LPL par des processus associés à une activation de l'enzyme (Bergö *et al.*, 1996b) via des mécanismes en partie indéterminés mais qui demeurent dépendants de changements post-traductionnels (Doolittle *et al.*, 1990; Erskine *et al.*, 1994), à tout le moins pour les premières huit heures qui suivent le repas (Bergö *et al.*, 1996a; Erskine *et al.*, 1994). Il a été montré que la LPL adipeuse des cochons d'Inde âgés de 105 jours répondait moins bien (et dépendait de l'expression de l'enzyme) à la prise alimentaire que celle des animaux âgés de 40 jours (Semb et Olivecrona, 1989a). Les mêmes observations ont été obtenues chez le rat (Fried *et al.*, 1990b). Toutes ces études s'accordent pour dire que, dans le tissu adipeux blanc, l'augmentation de la LPL pendant la prise alimentaire est causée par l'élévation de l'insulinémie, quoique la réelle contribution de l'hormone à ce processus n'a jamais été évaluée systématiquement.

4.2.2 Muscle squelettique

Dans le muscle squelettique, l'activité de la LPL augmente suite à la privation de nourriture (Lopez-Soriano *et al.*, 1991; Benavides *et al.*, 1998; Quig *et al.*, 1983), et diminue (Benavides *et al.*, 1998; Quig *et al.*, 1983) ou demeure stable (Boivin *et al.*, 1994) pendant la prise alimentaire. Les mécanismes à la base de ces changements sont beaucoup moins bien connus que dans le cas du tissu adipeux. Par contre, la modulation de la LPL musculaire pourrait être en relation avec les taux d'entrée d'acides gras et de glucose dans le muscle et l'oxydation de ces substrats (Ferraro *et al.*, 1993). Ainsi, à jeun, la LPL du muscle, la concentration des acides gras en circulation ainsi que leur oxydation dans le muscle sont élevés, alors que le transport du glucose est faible. L'inverse est aussi vrai pendant la prise alimentaire. Il se peut que l'insuline module indirectement ces processus via son action sur le transport du glucose et la lipolyse du tissu adipeux pendant la transition jeûne/état postprandial (Pollare *et al.*, 1991; Gnudi *et al.*, 1996; Kiens *et al.*, 1989).

4.2.3 Tissu adipeux brun

Dans le tissu adipeux brun, il est généralement accepté que la modulation de la LPL est associée à un besoin accru du tissu en acides gras pour favoriser la thermogénèse. Ainsi, la thermogénèse stimulée par l'ingestion d'aliments est reliée à l'augmentation de la LPL du tissu adipeux brun pendant la phase postprandiale (Carneheim et Alexson, 1989). Il est important de noter cependant que, le tissu adipeux brun se retrouvant seulement chez les animaux hibernants et les rongeurs, ces associations n'ont pas été observées chez l'humain, même si une thermogénèse est manifeste en phase postprandiale chez ce dernier.

4.2.4 Coeur

L'activité de la LPL cardiaque peut être augmentée (Olivecrona *et al.*, 1995) ou demeurer constante (Howard, 1999) suite à la privation de nourriture. Cependant, lorsque mesurée dans les myocytes, la LPL est diminuée par le jeûne (Howard, 1999), appuyant les observations obtenues chez les rats diabétiques. Ces résultats suggèrent qu'une quantité importante de molécules de LPL libres en circulation dans cette situation se lient aux cellules cardiaques et que les niveaux de LPL du coeur sont fonction de l'arrimage de LPL libre à l'endothélium des capillaires du coeur (Olivecrona *et al.*, 1995). Il se peut que ce processus soit relié à un facteur présent dans les myocytes qui retient la LPL au coeur pendant la privation de nourriture

(Olivecrona *et al.*, 1995). Par rapport aux niveaux mesurés à jeun, il y a perte de 30 à 50% de l'ARNm, de la masse et de l'activité de la LPL cardiaque (tissu entier) en réponse à la prise alimentaire (Ong *et al.*, 1994). Ces observations suggèrent que la modulation de l'enzyme dans ces conditions ne repose pas entièrement sur des mécanismes post-traductionnels dans les myocytes du coeur.

4.3 Insuline

4.3.1 Tissu adipeux blanc

De nombreuses études *in vivo* chez l'homme (Farese *et al.*, 1991) comme chez le rat (Nomura *et al.*, 1984; Deshaies *et al.*, 1991a; Boivin et Deshaies, 2000; Boivin *et al.*, 1994) ont démontré l'effet stimulateur de l'insuline sur la LPL du tissu adipeux blanc. Dans ce tissu, il apparaît que l'insuline augmente à court terme l'activité de la LPL par des mécanismes indépendants de la transcription du gène (Eckel *et al.*, 1984; Terretaz *et al.*, 1994; Pradines-Figuères *et al.*, 1988; Semenkovich *et al.*, 1989). S'il en est de même quant à la traduction de l'ARNm de l'enzyme demeure controversé. Les travaux pionniers de Robinson *et al.* dont les études utilisaient l'inhibiteur de synthèse protéique cycloheximide tendent à montrer que la stimulation de l'activité de la LPL par l'insuline est indépendante de son taux de synthèse à court terme (Ashby et Robinson, 1980), ce qui a été appuyé par des résultats obtenus *in vivo* (Terretaz *et al.*, 1994). À l'opposé, d'autres études ont plutôt montré une augmentation de la synthèse de la LPL après traitement d'adipocytes à l'insuline (Ong *et al.*, 1988; Semenkovich *et al.*, 1989), et l'inhibition des effets de l'hormone par la cycloheximide (Eckel *et al.*, 1984). Cette augmentation de synthèse est peut-être la conséquence du fait que l'insuline augmente la stabilité de l'ARNm de la LPL (Raynolds *et al.*, 1990; Ong *et al.*, 1988), favorisant ainsi la traduction de l'enzyme. Quoiqu'il en soit, l'insuline affecte aussi la LPL par des mécanismes post-traductionnels (Semenkovich *et al.*, 1989; Terretaz *et al.*, 1994). L'augmentation de l'activité de la LPL par l'insuline dans les adipocytes est accompagnée d'une stimulation de sa sécrétion (Chiappe de Cingolani *et al.*, 1996; Chan *et al.*, 1988) ainsi que d'une réinternalisation de LPL inactive (Chiappe de Cingolani *et al.*, 1996). En fait, l'insuline active une certaine proportion intracellulaire de LPL inactive et prévient la dégradation de l'enzyme (Doolittle *et al.*, 1990; Semenkovich *et al.*, 1989). À plus long terme, l'insuline augmente l'expression et la masse de LPL *in vivo* (Terretaz *et al.*, 1994) comme *in vitro* (Semenkovich *et al.*, 1989). Ces changements d'expression sont peut-être indirectement causés par un effet stimulateur de l'insuline sur les PPAR γ (Auwerx, 1999).

Les intermédiaires métaboliques possiblement impliqués dans les effets stimulateurs de l'insuline sur la LPL du tissu adipeux sont multiples. Le vanadate (molécule synthétique qui mime les effets de l'insuline) stimule la sécrétion de LPL via un processus relié à l'AMPc (Motoyashiki *et al.*, 1996), à la phospholipase A2 et à la tyrosine kinase associée à la membrane plasmique (Morita *et al.*, 1995). L'AMPc, de concert avec l'inositol 1,4,5 triphosphate (IP₃), a aussi été impliqué dans l'augmentation d'activité intracellulaire de l'enzyme (Motoyashiki *et al.*, 1999). Cependant, la stimulation aiguë de l'activité de la LPL par l'insuline dans les adipocytes *in vitro* peut être inhibée par la wortmannin et la rapamycin (Kraemer *et al.*, 1998), suggérant que la voie d'activation de la LPL est dépendante de la phosphatidyl-inositol (PI)-3 kinase et du complexe p70s6k (phosphoprotéin 70 ribosomal protéin S6 kinase). Il est intéressant de noter que ces voies convergent vers une augmentation du Ca²⁺ intracellulaire. Finalement, il a été élégamment démontré dernièrement qu'un facteur produit par les cellules endothéliales pouvait augmenter la sécrétion de LPL par des adipocytes de façon proportionnelle à la dose d'insuline administrée aux cellules endothéliales, sans qu'il y ait de contact entre les deux types de cellules (Knutson, 2000). Ces résultats suggèrent qu'il y a un système de signalisation entre les cellules endothéliales et les cellules productrices de LPL.

4.3.2 Muscle squelettique

Les effets de l'insuline dans le muscle squelettique sont plus controversés. Dans le jeûne et l'exercice physique, l'activité de la LPL musculaire est élevée, alors que les niveaux circulants d'insuline sont faibles, suggérant que l'insuline pourrait avoir un rôle – direct ou non – sur la LPL du muscle. Chez l'humain, une infusion d'insuline dans des conditions euglycémiques diminue l'activité (Farese *et al.*, 1991) et l'expression (Laville *et al.*, 1996) de la LPL musculaire. De la même façon, lorsque comparés sur la base de l'insulinémie à jeun, plus les niveaux d'hormones sont faibles, plus l'activité de la LPL du muscle est élevée (Pollare *et al.*, 1991). Par ailleurs, chez le rat, une injection aiguë d'insuline a provoqué rapidement (trois heures) une chute drastique (-50 à 60%) de l'activité de l'enzyme, quel que soit le type de fibre musculaire (Gorski et Stankiewick-Choroszuca, 1982). Ces observations suggèrent que l'insuline diminue l'activité de la LPL musculaire, ce qui est en accord avec les effets de la prise alimentaire sur l'activité de l'enzyme. Par contre, l'activité de l'enzyme pourrait davantage être en relation avec le taux d'entrée du glucose dans le muscle (Kiens *et al.*, 1989; Richelsen *et al.*, 1993). Or, l'hyperinsulinémie et la prise alimentaire sont les deux conditions habituelles pendant lesquelles la LPL chute dans le muscle, alors que l'exercice et le jeûne sont caractérisés par une

forte élévation de LPL et des taux d'entrée d'acides gras importants qui freinent le transport du glucose (Randle *et al.*, 1988). Ces observations suggèrent que le type de substrat énergétique utilisé par le tissu musculaire pourrait avoir un impact sur l'activité de la LPL au même titre que l'insuline. Par ailleurs, l'insuline est essentielle à l'intégralité de l'activité constitutive de l'enzyme dans la fibre musculaire, puisque l'infusion d'insuline à des rats avec diabète de type I provoqué par la streptozotocine amène un gain d'activité important, apparemment de façon indépendante de la synthèse protéique globale du muscle (Deshaies *et al.*, 1991a). Aucune étude n'a relaté les mécanismes d'action cellulaires possiblement impliqués dans la modulation de la LPL dans le muscle.

4.3.3 Tissu adipeux brun

Dans le tissu adipeux brun, la prise alimentaire et l'insuline augmentent l'activité de la LPL (Carneheim et Alexson, 1989), suggérant que l'hormone médie l'action du repas sur la modulation de la LPL du tissu. Les mécanismes d'activation semblent requérir des changements dans l'expression (Carneheim et Alexson, 1989; Kuusela *et al.*, 1997b) et la glycolysation (Masuno *et al.*, 1991b) de l'enzyme. D'ailleurs, l'insuline est responsable de l'activité constitutive de la LPL du tissu adipeux brun (Deshaies *et al.*, 1991a), en partie attribuable à son effet sur la synthèse protéique globale.

4.3.4 Coeur

La modulation de la LPL cardiaque a été surtout étudiée en relation avec l'insuline. Dans des coeurs de rats diabétiques suite à l'injection de streptozotocine, l'activité de la LPL diminue chez les rats (Deshaies *et al.*, 1991a) en fonction de la durée du diabète (Rodrigues *et al.*, 1997). Ces effets du diabète sont médiés par des mécanismes post-traductionnels, puisque la diminution de l'activité de la LPL n'est pas accompagnée de changements proportionnels dans la masse et l'ARNm de l'enzyme (Carroll *et al.*, 1995). Cependant, cette réduction de la LPL fait aussi partie d'une diminution générale de synthèse protéique causée par l'absence d'insuline (Deshaies *et al.*, 1991a; Carroll *et al.*, 1995). Dans des myocytes isolés à partir de coeurs de rats diabétiques, la diminution de l'activité de la LPL n'est pas renversée par l'insuline (Braun et Severson, 1992b), ce qui suggère qu'un autre facteur est impliqué dans la modulation de l'enzyme *in vivo*. Ces résultats confirment aussi une étude qui a montré que l'infusion d'insuline à des rats diabétiques ne parvenait pas à rétablir à des niveaux normaux l'activité de la LPL, même après quatre jours d'infusion (Deshaies *et al.*, 1991a).

4.4 Système nerveux adrénergique

4.4.1 Tissu adipeux blanc

Une stimulation adrénergique peut diminuer très rapidement (en 15 minutes) l'activité de la LPL adipeuse (Raynolds *et al.*, 1990). Dans des adipocytes isolés, l'isoprotérénol, un agoniste β -adrénergique, réduit les niveaux d'ARNm de la LPL ainsi que l'expression de l'enzyme (Raynolds *et al.*, 1990). Or, des études ont aussi suggéré que l'adrénaline à forte dose, qui affecte donc les récepteurs β_3 -adrénergiques (D'Allaire *et al.*, 1995), diminuait la traduction de l'ARNm et augmentait la dégradation de la LPL (Ball *et al.*, 1986; Ashby et Robinson, 1980). À cet égard, l'adrénaline active un facteur qui serait capable d'agir avec la région située entre les nucléotides 1599 et 1638 de l'ARNm de la LPL (la partie 3' non codante, le dixième exon) et d'inhiber sa traduction (Yukht *et al.*, 1995). *In vivo*, l'effet du système nerveux sympathique, via sa composante β -adrénergique, exerce les mêmes actions qu'*in vitro*. Alors que chez l'humain les effets semblent plus modestes (Eckel *et al.*, 1996), l'injection chronique (une semaine) de clenbuterol, un agoniste β_2 -adrénergique, à des rats cause une diminution de 25% de l'activité de la LPL adipeuse (Belahsen et Deshaies, 1992).

4.4.2 Muscle squelettique

Dans le muscle squelettique, les effets d'une stimulation β -adrénergique sont beaucoup plus marqués. Ainsi, l'infusion d'adrénaline pendant une période de 2 et 6 heures augmente l'activité de la LPL musculaire de sujets sains de 22 et 55%, respectivement (Pedersen *et al.*, 1999; Eckel *et al.*, 1996). Chez le rat, l'adrénaline et la noradrénaline augmentent l'activité de la LPL musculaire telle que mesurée 3 heures après l'injection des catécholamines (Gorski et Stankiewick-Choroszuca, 1982). Enfin, le clenbutérol stimule l'activité de l'enzyme de façon plus marquée en période postprandiale qu'à jeun (Belahsen et Deshaies, 1992). Or, l'ingestion d'aliments active le système nerveux sympathique (Sakaguchi *et al.*, 1988; Young et Landsberg, 1977; Fagius et Berne, 1994). Ces observations suggèrent que le système β -adrénergique pourrait contribuer, même de façon minime, à la réponse postprandiale de la LPL. Cependant, aucune étude n'a jusqu'à maintenant vérifié l'hypothèse d'une interaction du système β -adrénergique avec les effets présumés de l'insuline après la prise alimentaire.

4.4.3 Tissu adipeux brun

La stimulation de l'activité de la LPL du tissu adipeux brun suite à l'exposition au froid est médiée par le système β -adrénergique (Carneheim *et al.*, 1984; Kuusela *et al.*, 1997a; Mantha et Deshaies, 1998), dont les effets surpassent en puissance ceux de l'insuline (Carneheim *et al.*, 1984). Les récepteurs β_3 - et α_1 -adrénergiques sont impliqués dans la stimulation de l'activité et de l'expression de la LPL par la noradrénaline (Kuusela *et al.*, 1997b; Belahsen et Deshaies, 1993); cependant d'autres ont aussi rapporté des changements importants dans l'activité de l'enzyme suite à un traitement chronique au clenbutérol, un agoniste β_2 -adrénergique (Belahsen et Deshaies, 1992). Ces divergences ont peut-être été causées par des différences dans la quantité d'agoniste administrée, puisque la liaison aux types de récepteurs β -adrénergiques est dépendante de la concentration d'agoniste (D'Allaire *et al.*, 1995). L'augmentation de l'activité de l'enzyme suite à l'exposition au froid de courte durée est dépendante de changements dans la synthèse de LPL plutôt que dans l'expression de l'enzyme (Klingenspor *et al.*, 1996). À plus long terme, des changements dans l'expression de la LPL ont été observés (Carneheim *et al.*, 1988; Klingenspor *et al.*, 1996). Enfin, une augmentation de la concentration d'AMPC intracellulaire mime les effets de la noradrénaline (Kuusela *et al.*, 1997b), suggérant que ce métabolite est impliqué dans la réponse de la LPL au froid.

Après un jeûne de courte durée (période de sommeil), l'activation de la LPL par la prise alimentaire n'est pas bloquée par le propranolol (Carneheim et Alexson, 1989), un bloqueur β -adrénergique, suggérant que le système nerveux sympathique n'est pas recruté dans la stimulation de l'enzyme en phase postprandiale ou que son effet est masqué par l'augmentation de l'insulinémie.

4.5 Glucocorticoïdes

4.5.1 Tissu adipeux blanc

Les glucocorticoïdes ont peu d'effet par eux-mêmes sur la LPL du tissu adipeux blanc lorsqu'étudiés *in vivo* (Cigolini et Smith, 1979) ou *in vitro* (Appel et Fried, 1992; Ashby et Robinson, 1980). Cependant, ils potentialisent de manière importante les effets stimulateurs de l'insuline sur l'activité de la LPL du tissu adipeux (Ashby et Robinson, 1980; Fried *et al.*, 1993; Ottosson *et al.*, 1994), possiblement en augmentant son expression (Fried *et al.*, 1993) et en

diminuant sa dégradation (Appel et Fried, 1992). Cette situation est particulièrement bien illustrée dans des conditions d'hyperinsulinémie chronique (Mantha *et al.*, 1999). Il a clairement été démontré, par l'inhibition du récepteur des glucocorticoïdes (GR) avec le RU 486, que les effets des corticostéroïdes sont médiés par ce récepteur. Or, comme des éléments de réponse aux glucocorticoïdes (Kirchgessner *et al.*, 1989b; Cooper *et al.*, 1992) sont présents dans le promoteur de la LPL (éléments qui sont liés par le GR), il se pourrait que les corticostéroïdes amplifient les effets de l'insuline sur l'activité de la LPL en augmentant l'expression de l'enzyme. Une étude a récemment rapporté que les adipocytes pouvaient produire et sécréter de l'IL-6 (Fried *et al.*, 1998). Or, cette production est freinée par les glucocorticoïdes *in vitro* (Fried *et al.*, 1998). Étant donné les forts niveaux de glucocorticoïdes circulants dans les états de résistance à l'insuline et d'obésité et le fait que IL-6 (et les cytokines en général, voir section 6.3) diminue l'activité de la LPL, il est possible que cette dernière fonction des glucocorticoïdes devienne importante pour maintenir des niveaux élevés d'activité de LPL dans le tissu adipeux en contrebalançant les effets des cytokines, elles aussi stimulées dans l'obésité (Sethi et Hotamisligil, 1999).

4.5.2 Muscle squelettique

Le rôle des glucocorticoïdes dans la modulation de la LPL du muscle reste à démontrer, même si, à première vue, il apparaît mineur (Mantha *et al.*, 1999; Gorski et Stankiewicz-Choroszuca, 1982).

4.5.3 Coeur

Une étude utilisant des cardiomyocytes isolés a démontré que, si l'insuline et les glucocorticoïdes n'avaient aucun effet lorsqu'administrés séparément, les deux hormones augmentaient l'activité de l'enzyme par un mécanisme post-traductionnel (Ewart *et al.*, 1997), en apparence indépendant de la PI-3 kinase, de la p70S6 kinase ou de la cascade MAP (de l'anglais mitogen-activated protein) kinase, mais qui pourrait impliquer des changements conformationnels du cytosquelette (Ewart et Severson, 1999).

4.6 Modulation de la lipoprotéine lipase dans les macrophages

Les macrophages sont des cellules fortement impliquées dans le développement de l'athérosclérose de par leur disposition à accumuler des lipides et à se transformer en cellules spumeuses (Lindqvist *et al.*, 1983; Querfield *et al.*, 1990; Plutzky, 1999), processus favorisé par la LPL (Babaev *et al.*, 1999; van Eck *et al.*, 2000). Il a d'ailleurs été suggéré suite à des études *in vitro* que la LPL pouvait agir comme une protéine d'adhésion des monocytes, précurseurs des macrophages, aux artères (Obunike *et al.*, 1997). Les macrophages différenciés synthétisent et sécrètent constitutivement la LPL (Wang *et al.*, 1999; Auwerx *et al.*, 1992), qui participe activement à la captation des lipides par ces cellules (Wang *et al.*, 1999; Renier *et al.*, 1993; Querfield *et al.*, 1990). La modulation de la LPL dans les macrophages est particulière et a été principalement étudiée en relation avec différentes cytokines, qui sont elles-mêmes produites par les macrophages (Kawakami et Cerami, 1981; Memon *et al.*, 1993; Feingold *et al.*, 1994). Dans des macrophages humains en culture, l'interféron-gamma (INF- γ), l'interleukine (IL)-1, l'IL-2, et l'IL-11 diminuent l'activité de la LPL de façon aiguë (Tengku-Muhammad *et al.*, 1999a) par des mécanismes post-traductionnels (la synthèse de LPL est alors presque totalement abolie) impliquant les signaux de transduction tyrosine kinase et PI-3 kinase (Tengku-Muhammad *et al.*, 1999b), mais peuvent aussi réduire son expression (d'environ 50%) suite à un traitement chronique (Querfield *et al.*, 1990). Cet effet à long terme pourrait être médié par une inhibition de la liaison de facteurs de transcription aux éléments de réponse octamères et à la boîte CAAT du promoteur du gène de la LPL (Hill *et al.*, 1995). D'autre part, l'insuline, le facteur de croissance associé à l'insuline-1 et la thyroxine n'ont aucun effet sur l'activité de la LPL dans des macrophages *in vitro* (Behr et Kraemer, 1986). Par contre, de courtes incubations (2 heures) avec la dexaméthasone (corticostéroïde synthétique), l'isoprotérénol (agoniste β -adrénergique non spécifique), et le dibutyryl AMPc diminuaient l'activité de l'enzyme de l'ordre de 45, 51 et 37%, respectivement (Behr et Kraemer, 1986). Une étude récente a quant à elle démontré que de fortes concentrations de glucose augmentaient l'expression et la synthèse de la LPL dans des macrophages de souris et de sujets humains (Sartippour *et al.*, 1998). De par l'implication des macrophages dans le développement de l'athérosclérose, ces résultats peuvent partiellement expliquer l'incidence de cette maladie chez les personnes diabétiques (Renier *et al.*, 1993; Lewis et Steiner, 1996; Fontbonne *et al.*, 1989). Finalement, une étude a aussi rapporté une forte stimulation de la synthèse de LPL dans des macrophages sous des conditions oxydatives (H_2O_2), induction qui était diminuée par des antioxydants (Renier *et al.*, 1996), ce qui est en accord avec l'effet des antioxydants sur la formation de la plaque athéromateuse.

Ces observations suggèrent que les mécanismes qui régissent à court terme l'activité de la LPL des macrophages mis en présence de cytokines sont post-traductionnels et impliquent l'inhibition de l'activation de la LPL plutôt que sa dégradation, quoique cette dernière alternative doive être vérifiée expérimentalement. Ces études suggèrent aussi que le glucose, le système β -adrénergique (qui affecte les niveaux intracellulaires d'AMPc), les corticostéroïdes (stimulés pour freiner la réponse inflammatoire) et les conditions oxydatives peuvent affecter la LPL des macrophages de façon aiguë.

5. Dyslipidémies associées à la résistance à l'insuline

5.1 Introduction

L'effet primaire de l'insuline est de stimuler le transport et le métabolisme du glucose. Dans le tissu adipeux et le muscle, l'insuline, suite à sa liaison avec son récepteur, stimule la translocation du transporteur de glucose GLUT-4 vers la membrane plasmique, mais aussi active une série d'enzymes et de facteurs impliqués dans le métabolisme cellulaire. L'efficacité de l'insuline est dépendante de l'intégrité des mécanismes qui sont reliés à ces voies métaboliques. À cet effet, la résistance à l'insuline a été définie comme étant un état où, pour une quantité d'insuline donnée, le transport du glucose est moins stimulé que dans une condition témoin, le corollaire étant qu'il faut plus d'insuline pour qu'une quantité donnée de glucose pénètre dans une cellule ou un tissu (Reaven, 1988; DeFronzo et Ferrannini, 1991). Le terme résistance à l'insuline s'applique donc à l'action de l'insuline sur le métabolisme du glucose. Cependant, depuis sa découverte en 1922, une pléiade de rôles ont été conférés à cette hormone, non seulement dans le métabolisme du glucose, mais aussi dans celui des lipides et des protéines. Ainsi, le terme de résistance à l'insuline s'applique aussi pour n'importe quel mécanisme qui n'est pas activé de façon maximale en réponse à une concentration d'insuline donnée (Brown *et al.*, 1987; Reaven et Laws, 1994; Moller et Flier, 1991). Si la résistance à l'insuline peut en théorie être présente dans tous les tissus où l'hormone possède une action quelconque, elle affecte en particulier le foie, le muscle squelettique, le tissu adipeux et le pancréas (DeFronzo, 1988).

5.2 Mécanismes de la résistance à l'insuline

Même si nos connaissances sur le sujet se sont accrues au cours des dernières années, les mécanismes pouvant mener à l'état de résistance à l'insuline sont très nombreux et partiellement indéterminés. Plusieurs hypothèses ont été avancées. Il apparaît comme étant très possible que plusieurs mécanismes agissent de concert entre eux et que d'autres viennent se rajouter dans le développement de la pathologie, le tout étant sujet à la susceptibilité génétique particulière à chaque individu.

Cette section donne un aperçu évidemment très sommaire de quelques mécanismes pouvant mener à la résistance à l'insuline. Le lecteur est invité à consulter les nombreuses revues de littérature qui ont été publiées sur le sujet au cours des dernières années (Reaven, 1988; DeFronzo, 1988; DeFronzo et Ferrannini, 1991; Moller et Flier, 1991; Clauser *et al.*, 1992; Felber *et al.*, 1993; Després et Marette, 1994; Björntorp, 1995; Brindley, 1995; Bouchard, 1995; Reaven *et al.*, 1996; Saloranta et Groop, 1996; Després, 1998; McGarry, 1998; Virkamäki *et al.*, 1999).

5.2.1 Transport du glucose et récepteur à l'insuline

Il a été démontré que, pendant un clamp euglycémique hyperinsulinémique, une infusion de lipides en émulsion additionnée d'héparine faisait en sorte que les acides gras remplaçaient rapidement le glucose à titre de substrats énergétiques dans le muscle, et empêchaient à plus long terme (3-4 heures) la stimulation du transport du glucose (Boden, 1996a) via une interaction avec le processus de formation du glycogène (Boden *et al.*, 1991). Ces résultats suggéraient qu'une compétition entre les substrats énergétiques est susceptible de se produire lorsque les acides gras circulants sont en excès (Mingrone *et al.*, 1997; Groop *et al.*, 1991) et corroborent une étude qui montre une corrélation inverse entre le contenu du muscle soleus en triglycérides (même cas pour le quadriceps rouge) et le taux d'entrée du glucose stimulée par l'insuline (Storlien *et al.*, 1993). La même association a été observée chez l'humain (Jacob *et al.*, 1999). Ces observations tendent ainsi à appuyer l'hypothèse du cycle glucose/acides gras émise en 1963 par J.P. Randle (Randle *et al.*, 1963; Randle *et al.*, 1988; Randle *et al.*, 1965). Il est intéressant de noter que des souris transgéniques surexprimant l'apo C-III et hypertriglycéridémiques (Ito *et al.*, 1990; Reaven *et al.*, 1994) ne développent pas de résistance à l'insuline (Reaven *et al.*, 1994), suggérant que l'action de la LPL, qui est inhibée par l'apo C-III, est requise pour que ce cycle soit mis en branle. Ainsi, l'hypertriglycéridémie n'est pas une cause de la résistance à l'insuline

mais plutôt une conséquence des altérations métaboliques associées à cet état (Boivin et Deshaies, 1996; Reaven *et al.*, 1994).

D'autre part, les lipides (acides gras et cholestérol) peuvent, en plus d'interférer sur l'oxydation du glucose, diminuer l'activité tyrosine kinase du récepteur à l'insuline (Crémel *et al.*, 1993), ce qui altère la transmission du signal pour une quantité donnée d'insuline, et donc pourrait contribuer à la résistance à l'insuline. À cet égard, plusieurs mutations dans le récepteur de l'insuline ont été répertoriées et leurs conséquences sur l'activité du récepteur sont multiples: transport du récepteur à la membrane, altérations de la liaison avec l'insuline, activité tyrosine kinase, etc. (Clauser *et al.*, 1992). Une grande quantité de défauts dans la machinerie impliquée dans la cascade de signaux envoyés suite à l'activation du récepteur à l'insuline ont aussi été remarqués (Després et Marette, 1994). Mentionnons rapidement les protéines IRS (de l'anglais insulin receptor substrate), Rad, PI-3 kinase (qui apparaît comme une enzyme critique dans le processus de transport de glucose), PC-1 (de l'anglais plasma cell differentiation-1), et PKC (Virkamäki *et al.*, 1999). D'autres protéines, comme la tyrosine phosphatase-1B, peuvent aussi influencer négativement le signal de l'insuline (Elchebly *et al.*, 1999). La quantité et la phosphorylation (ou l'activité) de ces protéines peuvent être altérées dans la résistance à l'insuline (Virkamäki *et al.*, 1999), ce qui indique que le cycle de Randle n'est qu'une des nombreuses causes pouvant mener à cette condition.

5.2.2 Sécrétion d'insuline

Pour contrer la résistance du métabolisme du glucose à l'action de l'insuline, le pancréas est mis à contribution et doit sécréter davantage d'insuline (DeFronzo, 1988). Ainsi, l'hyperinsulinémie chronique (mesurée à jeun) constitue un marqueur du syndrome d'insulino-résistance (Reaven, 1988; Després *et al.*, 1996). Il a aussi été démontré que des niveaux plasmatiques d'insuline constamment élevés contribuent au développement de la résistance à l'insuline en désensibilisant le récepteur de l'hormone (Virkamäki *et al.*, 1999). Par ailleurs, l'augmentation du contenu hépatique en lipides peut contribuer à l'hyperinsulinémie en diminuant le taux d'élimination et de dégradation de l'insuline chez l'humain (Goto *et al.*, 1995). Certains pensent que, via ces mécanismes et une sécrétion anormalement élevée d'insuline par le pancréas, l'hyperinsulinémie est le facteur primaire qui mène à l'apparition de la résistance à l'insuline (Wencel *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1995), avis qui n'est pas partagé par tous (Reaven et Laws, 1994; Marshall *et al.*, 1999).

La sécrétion d'insuline peut provenir d'un signal d'origine céphalique. En effet, en réponse à la vue, l'odeur, et le goût de la nourriture (Proietto *et al.*, 1987) – et même à l'attente d'un repas particulièrement espéré (Strubbe, 1992) – le pancréas sécrète une quantité significative d'insuline sans qu'il y ait eu pour autant d'augmentation antérieure de la glycémie (Berthoud *et al.*, 1980; Powley et Berthoud, 1985; Berthoud *et al.*, 1981). L'élévation de l'insulinémie s'observe dès la deuxième minute après l'ingestion d'une solution sucrée (Berthoud *et al.*, 1980; Strubbe, 1992), et peut être bloquée par dénervation du pancréas (Diamond et LeBlanc, 1988; Berthoud *et al.*, 1980) ou inhibition pharmacologique avec administration d'atropine (Strubbe, 1992), ce qui démontre l'origine nerveuse du processus, notamment l'implication du nerf vague. L'ingestion d'une solution contenant de la saccharine, molécule synthétique qui n'est pas métabolisée, provoque aussi une phase céphalique de sécrétion d'insuline (Park *et al.*, 1995; Proietto *et al.*, 1987). La phase céphalique de sécrétion d'insuline pourrait être un processus mis en place pour préparer l'organisme à une entrée de substrats énergétiques d'origine alimentaire. À cet égard, une étude effectuée chez le chien a démontré que la phase céphalique de sécrétion d'insuline était impliquée dans la thermogénèse stimulée par l'ingestion d'un repas (Diamond et LeBlanc, 1988).

L'amplitude de la phase céphalique de sécrétion est associée au poids corporel. Ainsi, les individus obèses sont caractérisés par une phase céphalique de sécrétion d'insuline plus prononcée que celle observée chez les sujets maigres (Sjöstrom *et al.*, 1980; Simon *et al.*, 1986), situation qui a aussi été remarquée chez le rat obèse Zucker (Ionescu *et al.*, 1988). Une réponse exagérée de la phase céphalique de sécrétion d'insuline permettrait, du moins en partie, d'empêcher une trop grande élévation de la glycémie causée par l'état de résistance à l'insuline présent chez les obèses (Ionescu *et al.*, 1988; Powley et Berthoud, 1985). D'autre part, des rats normaux dont la phase céphalique de sécrétion d'insuline est amplifiée gagnent plus de poids que ceux dont la phase céphalique est faible sur une période de deux semaines (Berthoud *et al.*, 1981). Ces observations suggèrent que l'accumulation de masse grasse est associée à un dérèglement de la phase céphalique de sécrétion d'insuline.

D'autre part, la résistance à l'insuline mène au diabète de type non-insulino-dépendant lorsque l'hyperinsulinémie chronique ne suffit plus à garder la glycémie à des niveaux normaux. À cet effet, l'épuisement du pancréas qui ne parvient plus à produire de l'insuline en quantité importante pourrait contribuer de façon très significative à l'apparition de la maladie. Au nombre des mécanismes ayant été mis de l'avant pour expliquer cet épuisement du pancréas, notons brièvement les suivants: déficit en transporteur pancréatique de glucose (GLUT-2), défaut de phosphorylation du glucose par la glucokinase, activité excessive de la glucose-6-phosphatase,

altérations dans l'enzyme glycérophosphate déshydrogénase mitochondriale, et accumulation de glycogène tissulaire (Malaisse, 1995).

Finalement, des études épidémiologiques ont montré que les associations entre l'obésité, les dyslipidémies et la résistance à l'insuline, typiques chez l'adulte, sont aussi présentes chez l'enfant en bas âge, suggérant que la résistance à l'insuline est un phénomène continu qui peut apparaître tôt dans le développement (Porkka et Raitakari, 1996).

5.3 Résistance à l'insuline d'origine alimentaire

5.3.1 Effets des graisses

L'interaction acides gras-glucose dans le développement de la résistance à l'insuline (Randle *et al.*, 1963) a été illustré maintes fois par les effets d'une composition alimentaire riche en graisses sur le métabolisme du glucose (Purnell et Brunzell, 1997; Smith, 1994) et celui des lipides (Grundy et Denke, 1990). En effet, l'ingestion chronique d'un régime riche en gras (dont environ 40% des calories proviennent des graisses) conduit invariablement à la résistance à l'insuline (Boivin et Deshaies, 1996; Storlien *et al.*, 1986; Zierath *et al.*, 1997; Kraegen *et al.*, 1991; Kahn et Pedersen, 1993; Kubota *et al.*, 1999). Cependant, des travaux récents ont montré que la nature des lipides ingérés pouvait avoir un effet très important sur le développement de la pathologie, les lipides provenant des poissons étant notamment bénéfiques plutôt que délétères comme ceux d'origine bovine (Klimes *et al.*, 1993; Zak *et al.*, 1993; Hainault *et al.*, 1993).

De façon très sommaire, il peut être affirmé qu'une diète riche en graisses affecte la translocation du GLUT-4 vers la membrane plasmique (Kahn et Pedersen, 1993) via des altérations dans l'activation de la phosphatidylinositol 3-kinase (Zierath *et al.*, 1997), et possiblement en aval de cette enzyme dans la voie de signalisation de l'insuline. Enfin, les PPAR γ jouent un rôle crucial dans le développement de la résistance à l'insuline, puisque des souris hétérozygotes pour le gène PPAR γ ne développent ni d'hypertrophie adipocytaire ni de résistance à l'insuline en réponse à une diète riche en graisses (Kubota *et al.*, 1999), ce qui est en apparente contradiction avec les effets des agonistes PPAR γ utilisés dans le traitement du diabète (Auwerx, 1999; Brun *et al.*, 1997).

Chez le rat, l'ingestion chronique d'une alimentation riche en gras diminue la captation du glucose de 50% (notamment dans le muscle et les tissus adipeux blanc et brun) en réponse à

un clamp euglycémique-hyperinsulinémique (Storlien *et al.*, 1986), induit l'hyperinsulinémie (Boivin *et al.*, 1994), et altère l'effet inhibiteur de l'insuline sur la production et sécrétion hépatique de glucose (Kraegen *et al.*, 1991; Storlien *et al.*, 1986). Des études ont montré que la détérioration du transport musculaire du glucose stimulé par l'insuline (apparue après trois semaines d'ingestion chronique d'une alimentation grasse à 60%) survenait après les altérations dans l'inhibition de la sécrétion hépatique de glucose par l'insuline (observées après seulement trois jours de régime). Le transport de glucose dans le tissu adipeux blanc induit par l'infusion d'insuline était lui aussi diminué après trois jours d'alimentation riche en graisses, mais l'accumulation de triglycérides dans le muscle n'était remarquée qu'après trois semaines d'alimentation avec une telle diète (Kraegen *et al.*, 1991). Ces résultats tendent à supporter l'hypothèse voulant que l'hyperinsulinémie (consécutive à la production exagérée de glucose hépatique) précède la résistance à l'insuline dans le muscle. À cet égard, le développement de la résistance à l'insuline chez le rat (mesurée par des tests intraveineux de tolérance au glucose) est dépendant du taux d'absorption du glucose à partir de la nourriture (Higgins *et al.*, 1996), mais non relié au poids corporel, ce qui suggère que les pics d'hyperinsulinémie en phase postprandiale sont un facteur important dans l'apparition du syndrome. Cependant, il semble que si le transport du glucose dans le muscle n'est pas altéré tôt dans le développement de la résistance à l'insuline, d'autres voies impliquées dans le métabolisme du glucose (glycolyse, synthèse du glycogène) pourraient possiblement l'être (Kim *et al.*, 1996), ce qui suggère que la résistance à l'insuline affecte plusieurs étapes du métabolisme à des moments qui peuvent varier.

5.3.2 Effets du sucrose

Même si l'ingestion chronique de sucrose peut en elle-même affecter la sensibilité du métabolisme du glucose à l'insuline (Toida *et al.*, 1996; Hallfrisch *et al.*, 1979; Nara *et al.*, 1997), il est généralement admis que le sucrose potentialise les effets délétères d'un régime riche en graisses (Hallfrisch *et al.*, 1981; Reaven *et al.*, 1979), non seulement dans le cas de la résistance à l'insuline, mais aussi dans le développement de l'obésité (Rattigan *et al.*, 1986; Fajardo et Deshaies, 1998).

Le sucrose est composé de deux sucres simples, le glucose et le fructose, qui sont absorbés ensemble dans l'intestin (Fujisawa *et al.*, 1991). L'ingestion massive de sucrose amène un apport externe en glucose important. Cependant, une alimentation dont la seule source de sucre est l'amidon (long glucide composé d'un enchaînement de molécules de glucose) n'a que peu d'impact sur la sensibilité du métabolisme du glucose à l'insuline (Martineau et

Deshaies, 1990; Hallfrisch *et al.*, 1979). En conséquence, il est donc fort probable que l'effet du sucrose soit causé par sa moitié fructose, notamment par sa capacité à induire une élévation des niveaux circulants de triglycérides (Kazumi *et al.*, 1986).

Le fructose, rapidement métabolisé au foie parce que capté par les tissus périphériques en très faibles quantités, induit une augmentation de la production et de la sécrétion hépatique des triglycérides (Matsuo *et al.*, 1995; Kazumi *et al.*, 1986; Martineau et Deshaies, 1990). Par des voies de transformation biochimiques, il augmente la synthèse d'acides gras, et stimule la production d'apolipoprotéines (Boogaerts *et al.*, 1984). En somme, le fructose induit la sécrétion d'un plus grand nombre de particules VLDL qui ont aussi tendance à être plus grosses (Kazumi *et al.*, 1985; Deshaies *et al.*, 1991b). Les effets du fructose sur la production hépatique de triglycérides deviennent plus marqués à long terme (Bernal *et al.*, 1995).

D'autres études ont plutôt démontré que l'hypertriglycéridémie induite par le fructose était causée par une diminution du catabolisme intravasculaire des triglycérides via la LPL (Kazumi *et al.*, 1986; Kazumi *et al.*, 1991; Matsuo *et al.*, 1995). Dans ces études, la faible augmentation (de l'ordre de 20-40%) de sécrétion hépatique de triglycérides ne pouvait expliquer en totalité l'élévation de 120% de la triglycéridémie. Il est donc possible que le fructose agisse aussi en périphérie pour freiner l'hydrolyse des triglycérides (Hirano *et al.*, 1989).

5.4 Endotoxinémie

5.4.1 Introduction

L'endotoxinémie est une condition expérimentale utilisée pour simuler l'infection ou la septicémie à court terme, parce que qu'elle est capable d'induire une réponse immunitaire non spécifique. Cette condition peut être amenée par l'administration de lipopolysaccharide (LPS), un constituant de la membrane plasmique interne des bactéries gram-négatives. L'injection de LPS à des rongeurs induit la production de plusieurs cytokines par les macrophages, incluant l'IFN- γ , le TNF α (de l'anglais, "tumor-necrosis factor- α "), l'IL-1 β , l'IL-4, l'IL-6 et l'IL-10 pour ne nommer que celles-ci (Arsenijevic *et al.*, 1998; Feingold *et al.*, 1992). Ce sont les cytokines qui médient la réponse de l'hôte face à l'intrusion d'un corps étranger comme la LPS, les bactéries ou les parasites, tel qu'illustré par une absence de réponse métabolique après traitement à la LPS chez des souris (C3H/HeJ) dont les macrophages ne produisent pas de cytokines (Kawakami et Cerami, 1981; Memon *et al.*, 1993; Feingold *et al.*, 1994)

Rapidement après un traitement à la LPS, la prise alimentaire cesse (Plata-Salaman, 1998) et la dépense énergétique augmente (ce qui peut être perçu comme étant de la fièvre), conduisant ainsi à la cachexie (Arsenijevic *et al.*, 1998). Par ailleurs, le métabolisme énergétique est dans son ensemble très fortement affecté en réponse à l'administration de LPS. À cet égard, les changements observés dans le métabolisme des lipides sera discuté à la section 5.5.2.

5.4.2 Mécanismes de résistance à l'insuline dans l'endotoxémie

Le traitement à la LPS amène une résistance périphérique prononcée du métabolisme du glucose à l'action de l'insuline. Des études récentes ont montré que la stimulation du transport du glucose par l'insuline pouvait diminuer de près de 40% dans des muscles isolés et étudiés *ex vivo* huit heures après l'injection de LPS à des rats (Kapur *et al.*, 1997), méthodologie qui permettait de ne pas tenir compte des changements hémodynamiques qui auraient pu survenir. Le monoxyde d'azote (NO), un gaz produit en grande quantité dans l'endotoxémie par l'enzyme oxyde nitrique synthase de type inductible (iNOS) dans le muscle squelettique et le tissu adipeux blanc (Kapur *et al.*, 1999), médiait l'inhibition du transport musculaire du glucose par les cytokines (Kapur *et al.*, 1997; Bédard *et al.*, 1997), tel que démontré dans ces muscles *ex vivo* et dans des myocytes L6 en culture. Par ailleurs, dans des adipocytes fraîchement isolés de rat incubés pendant 24 heures avec du TNF- α , l'expression de GLUT-4 est fortement réduite, ce qui suggère que la faible expression de GLUT-4 pourrait contribuer à diminuer le transport du glucose en présence d'insuline (Tanaka *et al.*, 1999). Les effets de l'induction d'iNOS dans le tissu adipeux sur le métabolisme du glucose n'ont pas encore été étudiés (Kapur *et al.*, 1999). Cependant, il est intéressant de noter que le NO peut affecter la lipolyse, du moins dans des cellules isolées (Gaudiot *et al.*, 1998).

Dans un autre modèle de résistance à l'insuline (la dystrophie musculaire), le TNF- α joue aussi un rôle important (Fernandez-Real *et al.*, 1999). D'ailleurs, le TNF- α est fortement exprimé dans tous les modèles animaux d'obésité et de résistance à l'insuline (Hotamisligil et Spiegelman, 1994), ce qui pousse certains à croire qu'il pourrait faire le lien entre le développement de concert de ces deux pathologies (Hotamisligil et Spiegelman, 1993; Hotamisligil et Spiegelman, 1994; Sethi et Hotamisligil, 1999).

5.5 Hypertriglycéridémies

5.5.1 Résistance à l'insuline classique

Trois altérations majeures des lipoprotéines plasmatiques sont observées dans la résistance à l'insuline: l'augmentation des niveaux de triglycérides circulants, la diminution de la concentration plasmatique de HDL, et les changements de composition dans les LDL (Garg, 1996; Després et Marette, 1994; Després, 1994). Il est possible qu'un défaut commun soit à la base de ces altérations puisqu'il est rare qu'on les retrouve séparément chez des sujets insulino-résistants (Frayn, 1993). De plus, par le fait même que les métabolismes des différentes lipoprotéines sont interreliés, il est probable qu'un changement marqué dans l'une ou l'autre composante de ces métabolismes puisse en affecter plusieurs autres (Garg, 1996; Howard, 1999).

L'élévation des niveaux de triglycérides sanguins est associée à une sécrétion hépatique accrue de VLDL dans la circulation. Cette augmentation dans la production de particules VLDL fait suite à un apport très important d'acides gras jouant le rôle de précurseurs (Després et Marette, 1994). En effet, il a été observé que la lipolyse du tissu adipeux, normalement inhibée par l'insuline chez des sujets normaux, demeurerait activée de façon permanente même en présence d'hyperinsulinémie (Stolba *et al.*, 1993; Groop *et al.*, 1991; Boden, 1996a). À cet égard, la proximité du tissu adipeux viscéral serait beaucoup plus délétère par rapport au tissu adipeux sous-cutané puisqu'il est directement drainé par la veine porte (Després, 1991; Després, 1998). La dégradation de l'apo B est aussi freinée par l'augmentation du contenu hépatique en triglycérides suite à la réestérification des acides gras (Sniderman et Cianflone, 1995; Lewis *et al.*, 1993; Lewis, 1997). Ces mécanismes, exposés très sommairement, font en sorte que la production et la sécrétion de VLDL est augmentée de façon chronique dans la résistance à l'insuline. Fait à noter, l'insuline ne parvient pas à inhiber la sécrétion de VLDL dans ces conditions comme elle le fait dans un foie sensible à l'hormone (Lewis *et al.*, 1993; Ferraro *et al.*, 1993)

Dans la résistance à l'insuline, la capacité globale d'hydrolyse intravasculaire des triglycérides est réduite, puisque plusieurs études ont remarqué une corrélation négative entre l'activité de la LPL dans le plasma post-hépariné et des indices de résistance à l'insuline comme une faible quantité de glucose infusée pendant un clamp euglycémique-hyperinsulinémique ou la glycémie mesurée suite à une infusion d'insuline et de glucose à des taux constants (Maheux *et*

al., 1997). Ces observations indiquent qu'en présence d'une augmentation de la sécrétion de triglycérides contenus dans les VLDL, une baisse de l'activité intravasculaire globale de la LPL dans des états de résistance à l'insuline pourrait contribuer à l'hypertriglycéridémie en affectant le catabolisme des triglycérides associés aux VLDL.

L'élévation du nombre de particules VLDL favorise l'échange de cholestérol contre des triglycérides avec les LDL et les HDL (voir section 5.6), faisant en sorte que ces lipoprotéines sont enrichies et forment des substrats potentiels pour la lipase hépatique. L'insuline affecte aussi la lipase hépatique, dont l'activité est normalement réduite après administration de l'hormone. Cette diminution n'est pas observée chez les sujets insulino-résistants; au contraire, l'activité de l'enzyme est augmentée après infusion d'insuline (Baynes *et al.*, 1991). Cette lipase est responsable du catabolisme des triglycérides des résidus VLDL, mais peut aussi hydrolyser ceux contenus dans les LDL et les HDL₂ enrichies en triglycérides, causant la production de LDL petites et denses (Austin *et al.*, 1990; Austin et Edwards, 1996). La réduction de l'activité de la LPL adipeuse, de concert avec l'augmentation de la lipase hépatique, font en sorte que moins de particules HDL₂ sont produites et que davantage sont transformées en HDL₃, type qui est moins actif dans le transport inverse du cholestérol (Howard, 1999; Després et Marette, 1994; Garg, 1996).

5.5.2 Endotoxinémie

L'élévation marquée des niveaux circulants de triglycérides fait partie des changements majeurs du métabolisme en réponse à l'administration d'endotoxines (Hardardottir *et al.*, 1994), de bactéries (Lanza-Jacoby *et al.*, 1992), ou de parasites (Grunfeld *et al.*, 1992). L'hypertriglycéridémie fait partie des mécanismes de défense de l'hôte (Grunfeld et Feingold, 1992): elle tend à neutraliser les endotoxines, qui peuvent se lier aux lipoprotéines circulantes (Warren *et al.*, 1988), et elle diminue la production de cytokines par les macrophages, ce qui contribue à atténuer la réponse immunitaire inflammatoire (Harris *et al.*, 1993). L'insulino-résistance et l'hypertriglycéridémie, tout en étant associées dans ces conditions, ne sont pas reliées de façon causale.

Pendant l'endotoxinémie, l'hypertriglycéridémie est causée par l'augmentation de la sécrétion de particules VLDL (Lanza-Jacoby *et al.*, 1992; Lanza-Jacoby *et al.*, 1998) de concert avec une diminution du catabolisme des triglycérides en périphérie (Lanza-Jacoby *et al.*, 1997; Bagby *et al.*, 1987). Les effets de l'endotoxinémie sur la LPL (Bagby et Pekala, 1987;

Hardardottir *et al.*, 1994) seront revus dans la section 6.3. Notons simplement ici que les contributions respectives de ces deux processus sont dépendantes de la dose d'endotoxine administrées aux animaux. En effet, les faibles doses de LPS affectent la sécrétion de VLDL sans altérer le catabolisme intravasculaire des triglycérides, alors que l'inverse est observé lorsque de fortes doses sont données (Feingold *et al.*, 1992).

Les cytokines induisent la sécrétion d'un plus grand nombre de particules de VLDL, dont la composition est normale (Krauss *et al.*, 1990). Le TNF- α , l'INF- γ ainsi que l'IL-1, parmi d'autres, sont capables d'augmenter la synthèse hépatique de triglycérides (Feingold *et al.*, 1989), mais le TNF- α semble jouer un rôle prépondérant dans la réponse des triglycérides d'origine hépatique à l'endotoxémie (Memon *et al.*, 1993). Enfin, la sécrétion des VLDL suite à l'injection de LPS peut être freinée par l'administration simultanée de prazosin, un bloqueur α_1 -adrénergique (Nonogaki *et al.*, 1994), démontrant que le système nerveux sympathique médie les effets de l'endotoxémie sur la sécrétion de triglycérides.

5.6 Exagération de la triglycéridémie postprandiale: impacts physiologiques

De nombreuses études épidémiologiques ont suggéré un impact important d'une élévation excessive de la concentration plasmatique des triglycérides sur l'incidence du développement de l'athérosclérose (Durrington, 1998; Zilversmit, 1995) et de la maladie cardiovasculaire [entre autres chez les diabétiques (Lewis et Steiner, 1996; Fontbonne *et al.*, 1989)], notamment dans la période suivant un repas (Zilversmit, 1979; Bittner, 1994; Cohn, 1994; Zilversmit, 1995; Mamo, 1995). Une étude a même démontré que la concentration plasmatique de triglycérides pendant la phase postprandiale était un facteur de risque indépendant du développement des maladies cardiovasculaires (Patsch *et al.*, 1992).

Les mécanismes à la base de ce processus sont encore mal connus. Cependant, il apparaît de plus en plus clairement que les échanges de lipides entre les lipoprotéines riches en triglycérides (retrouvées en concentration élevée après un repas) et les LDL auraient un effet néfaste sur l'accumulation de petites particules de LDL denses hautement athérogéniques (Bittner, 1994; Austin *et al.*, 1990; Austin et Selby, 1995). En présence de fortes concentrations de triglycérides (comme en phase postprandiale), la CETP catalyse l'échange de triglycérides contre du cholestérol, ce qui favorise l'enrichissement en cholestérol des VLDL et chylomicrons, alors que les LDL acquièrent plus de triglycérides. Ces derniers sont alors hydrolysés par la

lipase hépatique, ce qui résulte en des lipoprotéines LDL petites et denses (Austin *et al.*, 1990; Austin et Edwards, 1996). Ce mécanisme est d'autant plus important si l'élimination des triglycérides dans les VLDL et les chylomicrons est retardée ou altérée, puisqu'il permet une période prolongée pour l'échange des lipides par la CETP et l'augmentation de la concentration des résidus de chylomicrons et de VLDL qui peuvent être captés par les vaisseaux artériels.

Il a aussi été démontré que les lipoprotéines riches en triglycérides pouvaient être cytotoxiques (Chung *et al.*, 1989; Speidel *et al.*, 1990). Non seulement ces lipoprotéines peuvent être captées par les macrophages et les cellules endothéliales, mais, de plus, du sérum de sujets hypertriglycéridémiques prélevé en phase posprandiale est cytotoxique pour les deux types cellulaires *in vitro*. Cette cytotoxicité n'était pas observée lorsque les cellules étaient mises en présence de sérum prélevé chez des patients à jeun, ou chez des sujets dont la réponse des triglycérides après un repas était normale. Ces résultats suggèrent donc qu'un facteur cytotoxique additionnel est présent dans le sérum de patients ayant une réponse postprandiale exagérée.

Chez des sujets obèses et insulino-résistants, une réponse postprandiale exagérée des triglycérides a été maintes fois remarquée (Lewis *et al.*, 1990; Schrezenmeir *et al.*, 1993; Couillard *et al.*, 1998; Weber *et al.*, 1993), ainsi que chez des fumeurs résistants à l'insuline mais non obèses (Eliasson *et al.*, 1997), ou même chez des hommes en santé et montrant des niveaux différents de sensibilité à l'insuline (Jeppesen *et al.*, 1995). Ces observations suggèrent que la résistance à l'insuline serait la pierre angulaire dans l'exacerbation de l'hypertriglycéridémie postprandiale (Zavaroni *et al.*, 1994). Dans la plupart des cas, il était difficile de discerner les effets indépendants du repas sur la triglycéridémie puisque les niveaux à jeun étaient différents des sujets normaux. Or, l'amplitude de l'élévation de la triglycéridémie est reliée à la concentration initiale de triglycérides (Schrezenmeir *et al.*, 1993; Cohn, 1994). De plus, la production (Couillard *et al.*, 1998; Bourgeois *et al.*, 1995; Weber *et al.*, 1993) et la sécrétion (Soria *et al.*, 1996; Zammit, 1996) des VLDL ne sont pas inhibées par l'insuline chez des sujets insulino-résistants. Par ailleurs, de par son affinité plus grande pour les lipoprotéines de grande taille (Xiang *et al.*, 1999; Fisher *et al.*, 1995), la LPL hydrolyse préférentiellement les triglycérides contenus dans les chylomicrons par rapport à ceux des VLDL (van Beek *et al.*, 1998; Hultin *et al.*, 1995; Xiang *et al.*, 1999). En raison du fait que la LPL peut devenir saturée en phase postprandiale (Lewis *et al.*, 1990; O'Meara *et al.*, 1992), ces observations appuient l'hypothèse que les chylomicrons compétitionnent avec les VLDL pour l'hydrolyse de leur triglycérides par la LPL (Cohn, 1994), et suggèrent que la triglycéridémie postprandiale est

fortement déterminée par le taux d'élimination des triglycérides (Jeppesen *et al.*, 1995; Reaven, 1997; Jensen *et al.*, 1998).

Il est important de noter que l'enzyme CETP n'est pas présente chez le rat (Oschry et Eisenberg, 1982). En conséquence, aucun transfert de cholestérol estérifié en échange d'un triglycéride n'est possible entre lipoprotéines, ce qui fait en sorte que, étant donné les faibles quantités de LDL en circulation chez cette espèce, les HDL sont les transporteurs majeurs de cholestérol. Aussi, les hypertriglycéridémies observées chez l'homme n'ont pas le même impact athérogénique chez le rat, puisqu'en absence d'échange avec les LDL, ces dernières sont beaucoup moins enclines à devenir petites et denses. Soulignons cependant que la majorité des hypertriglycéridémies humaines sont reproductibles chez le rat, qui constitue donc un modèle valable pour en étudier les mécanismes.

6. Modulation de la lipoprotéine lipase dans l'hypertriglycéridémie

6.1 Résistance à l'insuline classique

6.1.1 Tissu adipeux blanc

L'obésité est associée à des niveaux très élevés d'activité de la LPL dans le tissu adipeux blanc (Nilsson-Ehle, 1981; Fried *et al.*, 1993; Bessesen *et al.*, 1991). Il a été démontré récemment que cette condition était directement reliée à l'hyperinsulinémie chronique qui prévaut chez les obèses (Boivin et Deshaies, 2000), en accord avec les effets chroniques de l'insuline sur l'expression et la synthèse de la LPL. À l'opposé, l'effet stimulateur de l'insuline semble être perdu dans l'obésité lorsque la modulation de la LPL est étudiée à court terme. Ainsi, quelques études ont suggéré que la LPL du tissu adipeux chez les obèses devenait résistante à l'action de l'insuline. À cet égard, la courbe de réponse de la LPL à un clamp euglycémique-hyperinsulinémique est déplacée vers des doses plus élevées d'insuline comparativement à des sujets normaux (Eckel, 1987), suggérant que l'activation maximale de la LPL chez des femmes obèses requiert davantage d'insuline. Dans une autre étude, la réponse de la LPL à l'infusion d'insuline est même inexistante (Eckel et Yost, 1987). En accord avec la contribution présumée de l'insuline dans la modulation postprandiale de la LPL adipeuse, une étude effectuée chez l'humain a démontré que l'activité spécifique de la LPL suite à un repas était significativement

plus faible chez les sujets obèses insulino-résistants que chez les sujets sains de poids normal (Ong et Kern, 1989a). L'activation de la LPL en phase postprandiale pourrait aussi être altérée chez le rat obèse Zucker, un modèle animal d'obésité et de résistance à l'insuline, malgré une insulïnémie 18 fois supérieure à celle des rats maigres (Boivin et Deshaies, 2000).

Il semble que la condition de résistance à l'insuline induite par une alimentation riche en graisses et en sucre soit aussi associée à une diminution de l'activité de la LPL adipeuse en phase postprandiale (Fajardo et Deshaies, 1998). Cette hypothèse est appuyée par une étude montrant que l'activité postprandiale de la LPL du tissu adipeux blanc était réduite de 70% chez des rats insulino-résistants suite à l'ingestion d'une solution de fructose en plus de la nourriture solide (Soria *et al.*, 1996). Ces observations suggèrent donc que, à l'instar du métabolisme du glucose, la modulation de la LPL du tissu adipeux puisse devenir résistante à l'action de l'insuline lorsqu'étudiée dans des conditions de modulation à court terme. Par contre, une autre étude a rapporté que la LPL adipeuse demeurait sensible à la prise alimentaire chez des rats nourris avec une diète riche en graisses (Boivin *et al.*, 1994). Cette divergence a peut-être été causée par une insulino-résistance moins prononcée due à une période d'ingestion chronique du régime alimentaire de trop courte durée. D'autre part, des résultats similaires ont été obtenus chez le rat Zucker obèse, dont la stimulation de l'activité de la LPL adipeuse semblait tout à fait normale, voire exagérée (Bessesen *et al.*, 1991). Cependant, dans cette dernière étude, les niveaux de LPL à jeun étaient beaucoup plus élevés que chez les rats maigres témoins. Or, l'activation de la LPL en phase postprandiale est un processus qui comporte plusieurs étapes consécutives (voir sections 4.2 et 4.3), et la résistance à l'insuline pourrait affecter une de ces étapes. Ainsi, la possible résistance de la LPL adipeuse à l'insuline pendant la prise alimentaire reste à vérifier dans des conditions précises où les activités de base sont standardisées et où les étapes séquentielles où la résistance à l'insuline pourrait altérer la modulation de la LPL sont toutes sollicitées lors de la prise alimentaire.

6.1.2 Muscle squelettique

L'infusion d'insuline en présence d'euglycémie diminue l'activité de la LPL musculaire chez des individus obèses insulino-résistants (Richelsen *et al.*, 1993), et cette dernière est négativement corrélée avec le taux d'entrée du glucose dans le muscle (Yost *et al.*, 1995; Richelsen *et al.*, 1993; Eckel *et al.*, 1995b). En fait, l'hyperinsulïnémie induite par la résistance à l'insuline pourrait directement être responsable de la faible activité de LPL musculaire observée

chez les humains (Pollare *et al.*, 1991) et les modèles animaux (Bessesen *et al.*, 1991) de résistance à l'insuline. Ainsi, telle que mesurée à jeun, l'activité de la LPL est aussi négativement corrélée avec l'insulinémie (Pollare *et al.*, 1991). Ces observations suggèrent que la LPL musculaire demeure sensible à l'effet diminutif de l'insuline dans des états de résistance à l'insuline. Cette hypothèse est appuyée par deux études dans lesquelles les changements d'activité de la LPL pendant la phase postprandiale n'étaient pas altérés par la présence de résistance à l'insuline (Fajardo et Deshaies, 1998; Boivin *et al.*, 1994).

6.2 Endotoxinémie

Une diminution du catabolisme intravasculaire des triglycérides est observée dans tous les modèles animaux de septicémie (Bagby et Pekala, 1987; Lanza-Jacoby *et al.*, 1998) et d'endotoxinémie (Hardardottir *et al.*, 1994). Cependant, dans cette dernière condition, de fortes doses de LPS [doses considérées comme étant élevées: 0.5 mg/kg chez le rat (Feingold *et al.*, 1992; Nonogaki *et al.*, 1994), et 0.4 mg/kg chez la souris (Feingold *et al.*, 1994; Memon *et al.*, 1993)] sont requises pour qu'il y ait altération de l'élimination périphérique des triglycérides (Feingold *et al.*, 1992). À ces doses, l'hypertriglycéridémie induite par administration de LPS était totalement indépendante de la sécrétion des VLDL (Feingold *et al.*, 1992), suggérant que la LPL jouait un rôle crucial dans l'apparition de la dyslipidémie (Hardardottir *et al.*, 1994). En effet, l'endotoxinémie est une des rares conditions dans lesquelles l'activité de la LPL est diminuée dans presque tous les tissus, à tout le moins le coeur, le tissu adipeux et le muscle squelettique (Bagby et Pekala, 1987), ce qui est reflété par la réduction drastique de l'activité LPL post-héparine dans le compartiment vasculaire (Feingold *et al.*, 1992).

Les mécanismes impliqués dans la diminution de la LPL tissulaire suite à l'administration de LPS demeurent peu connus. L'injection aiguë de LPS chez des rats à des doses aussi fortes que 30 mg/kg diminue l'activité de la LPL sans affecter son ARNm ni sa masse dans le coeur et le tissu adipeux tel que mesuré sept heures après le traitement (Gouni *et al.*, 1993), ce qui suggère que des mécanismes post-traductionnels sont recrutés dans la réponse à court terme de la LPL à la LPS. Des changements dans la masse et l'expression (ARNm) de la LPL dans le muscle soleus et le tissu adipeux blanc ne sont observés que 24 heures après l'injection de LPS chez le rat (Lanza-Jacoby *et al.*, 1997), ce qui corrobore une étude qui a montré une diminution de l'ARNm de la LPL suite à l'incubation d'adipocytes en culture avec le TNF- α pour une période de durée similaire (20-24 h) (Zechner *et al.*, 1988; Fried et Zechner, 1989). Le TNF- α diminue l'expression du gène de la LPL par l'inhibition des facteurs de transcription NF- κ B et une

protéine liante aux octamères sur les éléments de réponse du promoteur (Hauner *et al.*, 1995). Chez la souris, une réduction concomitante de l'expression de PPAR γ dans le tissu adipeux a été remarquée après 18 heures d'endotoxémie (Hill *et al.*, 1997). Puisque la transcription du gène de la LPL est sous le contrôle des PPAR γ dans le tissu adipeux (Schoonjans *et al.*, 1996a), il peut être suggéré que la réduction de l'expression de la LPL 24 heures après l'injection de LPS est causée par une diminution antérieure de PPAR γ . Enfin, il se pourrait que ce mécanisme soit aussi impliqué dans le regain d'activité et l'augmentation de l'ARMm de la LPL suite au traitement prolongé (24 heures) de cellules endotoxiques avec l'insuline puisque l'hormone augmente l'expression du PPAR γ à long terme (Auwerx, 1999).

La diminution de l'activité de la LPL pendant l'endotoxémie est médiée par les cytokines (Memon *et al.*, 1993; Feingold *et al.*, 1994). Parmi celles-ci, le TNF- α joue un rôle important, à tout le moins dans le tissu adipeux (Feingold *et al.*, 1994; Lopez-Soriano *et al.*, 1997; Kern *et al.*, 1995). Dans ce tissu, l'activité de la LPL est résistante à l'action stimulatrice de l'insuline chez des rats ayant une tumeur, altération qui est aussi observée *in vitro* dans les adipocytes isolés de ces rats (Noguchi *et al.*, 1996). Ces résultats suggèrent que la diminution aiguë de la LPL dans le tissu adipeux est causée par la résistance à l'insuline induite par les cytokines (Hauner *et al.*, 1995), plutôt que par les cytokines en elles-mêmes, puisqu'elles étaient absentes du milieu d'incubation *in vitro*. Dans le muscle squelettique, il apparaît que l'IL-1 et l'IFN- γ sont plus puissants que le TNF- α pour ce qui est de leur capacité à induire une réduction de la LPL *in vivo* (Feingold *et al.*, 1994). Il a également été démontré que suite à l'administration d'une forte dose (0.5 mg/kg) de LPS à des rats, la diminution de l'activité post-héparine de la LPL pouvait être empêchée par l'administration de yohimbine, un bloqueur α_2 -adrénergique (Nonogaki *et al.*, 1994), ce qui suggère que le système nerveux sympathique est activé et contribue à la modulation à la baisse de l'activité de la LPL pendant l'endotoxémie. Jusqu'à ce jour, aucune évidence n'a été mise de l'avant pour décrire le médiateur ultime des cytokines à l'intérieur des tissus. Cependant, il a récemment été démontré dans des adipocytes bruns en culture que l'effet du TNF- α sur l'activité de la LPL était médié par la surproduction de NO induite par la cytokine (Uchida *et al.*, 1997a; Uchida *et al.*, 1997b). Par contre, ces études n'ont pas été appuyées par des expériences réalisées *in vivo*, et le rôle du NO dans la diminution de la LPL tissulaire demeure indéterminé dans ces conditions.

PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS DES TRAVAUX

Problématique

De par son action hydrolytique sur les triglycérides circulants, la LPL joue un rôle central dans la détermination de la triglycéridémie, alors que sa modulation tissu-spécifique fait en sorte que les acides gras issus du catabolisme des triglycérides peuvent être dirigés selon les besoins respectifs des tissus et le contexte énergétique de l'organisme. Or, ces processus semblent être altérés de façon importante dans l'hypertriglycéridémie associée aux états pathologiques que sont l'obésité et l'infection. Il est donc nécessaire de mieux caractériser les facteurs qui pourraient influencer l'activité de la LPL tissulaire dans ces deux conditions.

Parce que l'insuline et la prise alimentaire ont les mêmes effets sur la stimulation de l'activité de la LPL dans le tissu adipeux et sa diminution dans le muscle, il est généralement accepté que l'insuline joue le rôle de médiateur dans cette situation. Malgré tout, la contribution réelle de l'insuline dans la réponse de la LPL tissulaire à la prise alimentaire est indéterminée à l'heure actuelle. Cette vérification est cruciale parce qu'elle sert de base aux concepts ébauchés actuellement pour expliquer la possible résistance de la LPL à l'action de l'insuline en phase postprandiale. Or, pour conclure sur cette hypothèse, il faut d'abord s'assurer que l'insuline est bien le principal modulateur de la LPL dans ces conditions.

Si la modulation de l'activité de la LPL est bien caractérisée dans des conditions normales (Braun et Severson, 1992a), il n'en est pas de même pour l'insulino-résistance associée à l'obésité (Eckel *et al.*, 1995a). Puisque l'insuline est un modulateur important de la LPL du tissu adipeux, il se pourrait que l'enzyme devienne, comme le fait le métabolisme du glucose, résistante à l'action de l'hormone. Il semble que la LPL du tissu adipeux blanc réponde normalement à l'hyperinsulinémie chronique observée chez les obèses. Par contre, il pourrait en être tout autrement dans des situations à court terme, pendant lesquelles la stimulation de la LPL par l'insuline apparaît soit normale ou soit altérée, selon le modèle étudié. Cette situation pourrait avoir des conséquences importantes, surtout en phase postprandiale, où un défaut d'activation de la LPL serait à même d'exacerber la triglycéridémie. Les études qui ont vérifié la possible résistance de la LPL à l'insuline après un repas n'ont pas tenu compte des niveaux d'activité de

base, pouvant ainsi fausser l'interprétation des différentes stimulations observées. Ainsi, la possible résistance de la LPL adipeuse à l'insuline pendant la prise alimentaire reste à vérifier dans des conditions précises où les activités de base sont standardisées et où les étapes séquentielles où la résistance à l'insuline pourrait altérer la modulation de la LPL sont toutes sollicitées lors de la prise alimentaire.

Dans le muscle squelettique, les mécanismes responsables de la modulation de la LPL en phase postprandiale ne semblent pas, à première vue, être résistants à l'insuline. Par ailleurs, des études ont suggéré que dans des conditions autres que postprandiales, la LPL musculaire est impliquée de façon très importante dans la détermination de la triglycéridémie (Schaefer et Eckel, 1999) et le partage des triglycérides circulants vers le muscle (Jensen *et al.*, 1997), prévenant ainsi leur accumulation dans le tissu adipeux. Les facteurs modulateurs de la LPL musculaire qui sont prédominants dans ces conditions (comme le système sympatho-adrénergique) sont peut-être masqués par l'hyperinsulinémie qui prévaut dans la phase postprandiale et l'obésité, hypothèse reste à être vérifiée.

L'infection est caractérisée par de profonds changements dans la balance énergétique qui amènent la cachexie à long terme. De par le rôle central de la LPL dans l'apport de triglycérides aux tissus, l'évaluation des facteurs qui peuvent influencer l'activité de l'enzyme dans l'infection est essentielle pour mieux comprendre les phénomènes impliqués dans la diminution de masse tissulaire. Par ailleurs, l'hypertriglycéridémie est une manifestation courante de l'infection et de l'endotoxémie qui est causée par une réduction importante de l'activité de la LPL tissulaire. Or, les mécanismes qui sont à la base de cette modulation à la baisse de l'enzyme sont peu connus. Deux études ont suggéré que le monoxyde d'azote médiait la diminution de la LPL dans des adipocytes bruns *in vitro*. Comme l'activité de l'enzyme *in vivo* est sous l'influence de plusieurs facteurs qui affectent la LPL de façon tissu-spécifique, il est nécessaire de vérifier la contribution du monoxyde d'azote dans la diminution de la LPL adipeuse et musculaire chez des modèles animaux d'endotoxémie afin de mieux cerner les mécanismes menant à l'hypertriglycéridémie qui est associée à cette condition.

Objectifs

Considérant la problématique résumée ci-haut, les travaux décrits dans la présente thèse avaient pour but d'évaluer les mécanismes de modulation de la LPL tissulaire pendant la prise alimentaire chez des animaux normaux et insulino-résistants et pendant l'infection afin de mieux définir le rôle de l'enzyme dans les hypertriglycémies qui sont associées à ces deux conditions. Les objectifs spécifiques de ces travaux se résument comme suit:

- 1- définir le rôle de l'insuline dans la réponse de la LPL tissulaire à la prise alimentaire;
- 2- déterminer si, dans un modèle génétique de résistance du métabolisme du glucose à l'insuline, la LPL tissulaire peut elle aussi devenir résistante à l'action de l'hormone pendant la phase postprandiale;
- 3- évaluer l'interaction entre le système nerveux adrénergique et l'insuline dans les changements postprandiaux d'activité de la LPL tissulaire;
- 4- vérifier si la résistance de la LPL à l'insuline en phase postprandiale peut être induite dans un modèle alimentaire se rapprochant du type de consommation nord-américain;
- 5- caractériser la modulation de la LPL tissulaire dans l'infection chronique et l'endotoxémie aiguë en relation avec la composition corporelle et le rôle de la LPL dans la partition tissulaire des acides gras dérivés de l'hydrolyse des triglycérides;
- 6- déterminer le rôle du monoxyde d'azote dans la modulation de la LPL tissulaire dans l'endotoxémie
- 7- évaluer la contribution relative de la LPL musculaire et adipeuse dans l'hypertriglycémie observée pendant l'endotoxémie.

CHAPITRE 1

RESPONSE OF ADIPOSE TISSUE LIPOPROTEIN LIPASE TO THE CEPHALIC PHASE OF INSULIN SECRETION

F. PICARD, N. NAÏMI, D. RICHARD and Y. DESHAIES

Center for Research on Energy Metabolism, and
Department of Physiology, School of Medicine
Laval University, Québec, QC, Canada G1K 7P4

Diabetes 48: 452-459, 1999

RÉSUMÉ

La modulation de la lipoprotéine lipase (LPL) après un repas est spécifique à chaque tissu. Ainsi, dans les tissus adipeux, la prise alimentaire augmente l'activité de la LPL, alors qu'elle la diminue dans les muscles squelettiques et le coeur. Il a été suggéré que l'élévation des niveaux plasmatiques d'insuline pouvait médier l'effet de la prise alimentaire sur la LPL. Cette étude avait pour objectif de vérifier cette hypothèse en intervenant sur la sécrétion d'insuline en phase postprandiale et de déterminer les conséquences sur l'activité de la LPL tissulaire. Dans une première étude, des rats à jeun depuis la veille ont été nourris pendant 30 minutes avec un repas insulino-génique. L'activité de la LPL des tissus adipeux blancs épидидymaire et rétro-péritonéal a augmenté de 65% dès la première heure après le début du repas, et un deuxième pic d'activité a été observé une heure plus tard. Dans le muscle soleus, le repas a induit une baisse d'activité de la LPL de 25% par rapport aux niveaux mesurés à jeun. Dans une deuxième étude, le diazoxide (150 mg/kg), un inhibiteur de la sécrétion d'insuline, a été administré en même temps que le repas. La modulation habituelle de la LPL a été empêchée par l'absence d'augmentation de l'insulinémie. Cependant, l'augmentation rapide (1 h) de la LPL n'a pas été inhibée par le diazoxide, possiblement à cause d'une sécrétion d'insuline d'origine céphalique maintenue. Pour vérifier cette hypothèse, des rates obèses Zucker caractérisées par une phase céphalique de sécrétion d'insuline intense ont subi une canulation gastrique, permettant le découplage de la sécrétion d'insuline d'origine céphalique de celle provenant de l'absorption des nutriments. Les résultats de cette dernière étude ont démontré que la phase céphalique de sécrétion d'insuline stimulait la LPL du tissu adipeux en absence de changement dans les concentrations de glucose, triglycérides et acides gras libres sanguins. Ces résultats démontrent que l'élévation d'insuline pendant la prise alimentaire est une condition nécessaire et suffisante à la modulation tissu-spécifique de la LPL en phase postprandiale.

ABSTRACT

Modulation of lipoprotein lipase (LPL) allows a tissue-specific partitioning of triglyceride-derived fatty acids, and insulin is a major modulator of its activity. The present studies aimed to assess in rats the contribution of insulin to the response of adipose tissue and muscle LPL to food intake. Epididymal and retroperitoneal adipose LPL rose 65% above fasting values as early as 1 h after the onset of a 30-min, high-carbohydrate meal, with a second activity peak 1 h later which was maintained for an additional 2 h. Soleus muscle LPL was decreased by 25% between 0.5 and 4 h after meal intake. The essential contribution of insulin to the LPL response to food intake was determined by preventing the full insulin response to meal intake by administration of diazoxide (150 mg/kg body weight, in the meal). The usual postprandial changes in adipose and muscle LPL did not occur in absence of an increase in insulinemia. However, the early (60 min) increase in adipose tissue LPL was not prevented by the drug, likely because of the maintenance of the early, centrally mediated phase of insulin secretion. In a subsequent study, rats chronically implanted with a gastric cannula were used to demonstrate that the postprandial rise in adipose LPL is independent of nutrient absorption and can be elicited by the cephalic (pre-absorptive) phase of insulin secretion. Obese Zucker rats were used because of their strong cephalic insulin response. After an 8-h fast, rats were fed a liquid diet ad libitum (orally, cannula closed), sham fed (orally, cannula opened), or fed directly into the stomach via the cannula during 4 h. Insulinemia increased 10-fold over fasting levels in ad libitum- and intragastric-fed rats, and 3-fold in sham-fed rats. Changes in adipose tissue LPL were proportional to the elevation in plasma insulin levels, demonstrating that the cephalic-mediated rise in insulinemia, in absence of nutrient absorption, stimulates adipose LPL. These results demonstrate the central role of insulin in the postprandial response of tissue LPL, and show that cephalically-mediated insulin secretion is able to stimulate adipose LPL.

INTRODUCTION

Lipoprotein lipase (LPL; EC 3.1.1.34) is a glycoprotein produced by several extrahepatic tissues, notably adipose tissue and muscle. Anchored at the luminal surface of capillary endothelial cells, the enzyme hydrolyzes the triglyceride component of circulating lipoproteins, releasing nonesterified fatty acids (NEFA) which are then stored or oxidized by tissues. By virtue of its tissue-specific modulation (1), LPL takes part in the energy partitioning processes, and the enzyme has been suggested as a candidate gene implicated in the etiology of obesity (2,3) and non-insulin dependent diabetes (NIDDM) (4). The activity of the enzyme is modulated by several endocrine factors in congruence with the state of energy balance of the organism. For instance, LPL activity is chronically elevated in adipose tissue (5-7) and low in skeletal muscle (8) of obese humans. On the other hand, overexpression of LPL in skeletal muscle was shown to prevent diet-induced obesity in mice (9).

In addition to long-term changes in basal LPL activity observed in conditions such as obesity and NIDDM, the enzyme is subject to acute modulation. Specifically, LPL is strongly influenced by the nutritional status. In the postprandial state, adipose tissue LPL is increased relative to fasting levels, whereas muscle LPL tends to be reduced [reviewed in (10)]. Alterations in these acute, tissue-specific changes in LPL may impact upon the long-term distribution of lipid substrates among storage and oxidizing tissues, and therefore influence the development of obesity.

Insulin is a major modulator of LPL. Studies in isolated and cultured adipocytes have determined that the hormone acutely increases LPL activity (11,12) and secretion (12,13), which is mostly attributable to positive effects of insulin on mRNA stability (14) and changes at the posttranslational level (15), but not to an acute increase in LPL gene expression (14,16). In vivo, adipose tissue LPL is markedly decreased in streptozotocin-induced diabetes (17,18), an effect that is reversed by insulin treatment (18,19), and it is increased during a euglycemic-hyperinsulinemic clamp in rats (20) and humans (21). The modulatory effects of insulin on LPL activity in muscle tissues are less well characterized. A short-term lowering of insulinemia such as after fasting (22) or physical exercise (23,24) is usually accompanied by an increase in muscle enzyme activity, whereas acute insulin administration to normal rats (25) and humans (21,26) has the opposite effect. Long-term (4 days) insulin depletion decreases LPL in both heart and skeletal muscle (19), suggesting that maintenance of normal muscle LPL requires the presence of the insulin-mediated modulation of protein turnover. Finally, previous studies have

suggested that skeletal muscle LPL activity may be more closely related to insulin action on glucose uptake (27) or lipid metabolism (28) than to insulinemia per se, and that the presence of other factors is needed for insulin to alter LPL in isolated cardiomyocytes (29). These studies suggest that, unlike adipose LPL, muscle LPL may be modulated by insulin through indirect pathways.

Given the nature of the tissue-specific modulation of LPL by food intake and insulin, it is likely that insulinemia participates in the response of LPL to changes in the nutritional status. However, factors other than insulin which are affected by food intake may conceivably influence LPL. Although the response of LPL to food intake as well as the acute and long-term modulation of the enzyme by insulin have been studied extensively, the quantitative contribution of insulin to the acute consequences of food intake on tissue LPL activity has not yet been evaluated systematically. The present studies were therefore designed to better characterize such a contribution. The first aim of the studies was to determine the time course of the tissue-specific response of LPL to acute food intake under well-defined feeding conditions, and to relate enzyme activity to postprandial insulinemia. The second aim was to test the hypothesis that postprandial changes in LPL are dependent upon the insulin response to food intake. This was achieved by administering diazoxide, an inhibitor of insulin secretion, along with the food. Finally, since the onset of feeding elicits a very rapid, pre-absorptive (cephalic) phase of insulin secretion which results from oro-pharyngeal and other stimuli (30-34), a third aim was to verify whether, in a feeding paradigm, the cephalic phase of insulin secretion could influence tissue LPL activity. To this end, rats were fitted with gastric cannulae and fed either orally, with or without nutrient absorption, or intragastrically to compare the consequences of cephalic- and nutrient-mediated insulin secretion on tissue LPL activity.

EXPERIMENTAL DESIGNS AND METHODS

Study 1. Postprandial time course of insulin and LPL : Sixty-four male Sprague-Dawley rats initially weighing 225-250 g were purchased from Charles River Laboratories (St-Constant, Canada) and housed individually in stainless steel cages in a room kept at $23 \pm 1^\circ\text{C}$ with a 12:12 h light-dark cycle (lights on at 20:00). The animals were cared for and handled in conformance with the Canadian Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the protocols were approved by our institutional animal care committee. Rats initially had ad libitum access to tap water and to a purified high-carbohydrate diet consisting of 65% energy as carbohydrate (equal proportions of cornstarch and dextrose), 14% as corn oil, and 21% as protein (casein). The

high-carbohydrate diet was chosen to intensify postprandial insulin secretion. After the initial 1-week period of acclimation, the rats were subjected for a total of 5 days to a meal intake protocol with the same diet, in which food was removed during the lighted period (22h00) and a 30-min meal was provided 30 min after the onset of the dark period. Ad libitum access to food was restored 3 h after meal intake except on the day of the experiment. On that day, rats were divided into 8 groups of 8 rats each. Groups were killed by decapitation either before (fasted) or 30, 60, 90, 120, 180, 240, and 360 min after the beginning of the meal, and blood, three white adipose tissue (WAT) depots (retroperitoneal, epididymal, inguinal), interscapular brown adipose tissue (BAT), and the soleus muscle were harvested to delineate the postprandial time course of tissue LPL and plasma insulin.

Study 2. Food intake with inhibition of insulin secretion on LPL : A pilot study was first conducted to evaluate the ability of diazoxide to inhibit insulin secretion (35) after a feeding protocol similar to that used in Study 1 described above. Twelve lean (*Fa/?*) and 12 obese (*fa/fa*) Zucker rats, 5-6 weeks of age, were handled in the same conditions as in the time-course experiment (Study 1). Rats were fitted with a permanent polyethylene cannula in the left jugular vein under isoflurane anesthesia, and were allowed to recover from surgery for three days. Thereafter, following an overnight fast, rats were fed a high-carbohydrate meal for 30 min. Powdered diazoxide was mixed to the meal of half of the rats in order to provide a final concentration of 150 mg diazoxide per kg of body weight. Diazoxide could not be given prior to the meal as the drug reduces subsequent food intake (data not shown). Plasma insulin was quantitated in serial blood samples taken through the venous catheter in the fasted state, at the earliest time after meal intake (30 min), and 30 and 90 min later. For the main protocol, a cohort of 40 male Sprague-Dawley rats initially weighing 225-250 g were accustomed to the high-carbohydrate diet and to the meal intake protocol described in Study 1. On the day of the experiment, rats were divided into 5 groups of 7 rats each. Four groups were fed the 30-min, high-carbohydrate meal, with (2 groups) or without (2 groups) diazoxide (150 mg/kg body weight), and were compared to a fasted control group that was sacrificed before the meal. Rats were killed by decapitation 60 and 180 min after the beginning of the meal, according to the two postprandial peaks in adipose tissue LPL activity that have been observed in the time-course experiment.

Study 3. Cephalic- versus nutrient-mediated insulin secretion on LPL : Sixteen female obese (*fa/fa*) Zucker rats aged 5-6 weeks (Canadian Breeding Laboratories, St-Constant, Canada) were housed individually under controlled temperature ($23\pm 1^\circ\text{C}$) and lighting (lights off between 03:00 and 17:00), and had ad libitum access to food (14.4 kJ/g, pelleted stock diet, Charles

River Rodent Animal Diet, distributed by Ralston Products, Woodstock, ONT, Canada) and tap water. Genetically obese Zucker rats were used because they exhibit a strong cephalic phase of insulin secretion (36). One week after their arrival, rats were chronically implanted with a gastric cannula and allowed to recover for 1 week. During the last 4 days of the recovery period, rats were fed ad libitum the stock diet along with an energetic (420 kJ/100 ml), high-carbohydrate liquid diet (Boost™, MeadJohnson, Belleville, Canada) consisting of 15.57 g carbohydrate, 2.30 g fat, and 4.25 g protein per 100 ml. On the day of experiment, all rats were fasted for 8 h (from 05:00), and 4 animals were killed after that period. The remaining rats were then refed for 4 h with the liquid diet alone under one of the following conditions: ad libitum oral feeding (gastric cannula closed), sham oral feeding (gastric cannula opened) and gastric feeding (via the gastric cannula). A 4-h feeding period was chosen to allow the evaluation of cephalically-mediated insulin secretion on maximal postprandial LPL activity (end of the 2-4-h plateau determined in Study 1, taking into account a possible delay in adipose LPL activation in obese rats). Sham- and gastric-fed rats were pair-fed to the ad libitum group, which ingested approximately 40 ml of the liquid diet during the 4-h period. Sham- and gastric-fed rats were given the food with an infusion pump, which allowed a constant delivery rate to both groups. The liquid diet was drip-added to the drinking bottle of the sham-fed animals to avoid overconsumption of the liquid diet and to expose the animals to food for the same period of time as the other groups. At the end of the feeding period, rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of 0.4 ml/100 g of body weight of a mixture containing 20 mg/ml of ketamine and 2.5 mg/ml of xylazine, and blood and tissues were harvested immediately thereafter.

Implantation of gastric cannula : The technique for implanting the gastric cannula has been detailed elsewhere (37). Prior to the surgery, rats were food-deprived for 24 h in order to ensure a complete gastric emptying. Rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of 0.4 ml/100 g of body weight of the ketamine-xylazine solution mentioned above. A small incision was made in the abdomen starting 4-5 mm lateral to the mid-line and 3-4 mm caudal to the sternum. The stomach was exposed through the incision and gently pulled out of the abdominal cavity while being kept moist with isotonic saline. A purse-string suture, approximately 2 cm in diameter, was secured to the anterior part of the stomach without completely perforating its wall. An incision was made and the stainless steel cannula was implanted in the anterior wall. The cannula was positioned with the flange inside the stomach and a polypropylene mesh was used on the outside surface of the stomach. This knitted polypropylene mesh, by promoting growth of scar tissue, allowed a firm and leakproof seal around the cannula. The stomach was then returned to its normal position. Incisions of both abdominal muscles and skin were closed with

interrupted sutures. The gastric cannula was plugged with a screw, which allowed for easy ad libitum, sham or gastric feeding.

Plasma and tissue sampling : Immediately after sacrifice, blood was collected, centrifuged (1500 g, 15 min at 4 °C), and the separated plasma was stored at -70°C until later biochemical measurements. In Study 3, a piece of liver was also harvested, quickly frozen on dry ice, and stored at -70 °C. Inguinal, epididymal (or parametrial), retroperitoneal WAT, interscapular BAT, soleus and heart (in Studies 2 and 3) muscles were excised, and approximately 50 mg from each tissue were homogenized with all-glass tissue grinders (Kontes, Vineland, NJ, USA). Adipose tissue samples were homogenized in 1 ml of a solution containing 0.25 mol/l sucrose, 1 mmol/l EDTA, 10 mmol/l Tris-HCl, and 12 mmol/l deoxycholate, pH 7.4. Muscle samples were homogenized in 1 ml of a solution containing 1 mol/l ethylene glycol, 50 mmol/l Tris-HCl, 3 mmol/l deoxycholate, 10 IU/ml heparin and 5% (v/v) aprotinin (Trasylol, Miles Pharmaceuticals, Rexdale, Canada), pH 7.4. Muscle homogenates were quickly frozen at -70 °C. Adipose tissue homogenates were centrifuged (12000 g, 20 min at 4°C), and the fraction between the upper fat layer and the bottom sediment was removed, diluted with 4 volumes of the homogenization solution without deoxycholate, and stored at -70°C until lipoprotein lipase activity measurement.

Plasma determinations : Plasma glucose concentrations were measured with the Beckman glucose analyzer. Insulin was determined by RIA using a reagent kit from Linco Research (St. Charles, MO, USA) with rat insulin as standard. Plasma triglycerides were measured by an enzymatic method using a reagent kit from Boehringer Mannheim (Montréal, Canada) which allowed correction for free glycerol. Plasma nonesterified fatty acids (NEFA) were also determined by an enzymatic colorimetric technique (Wako Pure Chemical Industries, Richmond, VA).

Tissue measurements : Frozen liver samples were thawed, and total lipids were extracted according to the method of Folch *et al.* (38) and solubilized in isopropanol. Triglycerides in the lipid extracts were then quantitated using the above-mentioned reagent kit. For the measurement of LPL activity, 100 µl of thawed tissue homogenates were incubated under gentle agitation for 1 h at 28°C with 100 µl of a substrate mixture consisting of 0.2 mol/l Tris-HCl buffer, pH 8.6, which contained 10 MBq/l [*carboxyl*-¹⁴C]triolein (Amersham, Oakville, Canada) and 2.52 mmol/l cold triolein emulsified in 50 g/l gum arabic, as well as 20 g/l fatty acid free bovine serum albumin, 10% human serum as a source of apolipoprotein C-II, and either 0.2 or 2 mol/l NaCl. Free oleate released by LPL was then separated from intact triolein and mixed with

Universol (NEN, Montréal, Canada), and sample radioactivity was determined in a scintillation counter. LPL activity was calculated by subtracting lipolytic activity determined in a final NaCl concentration of 1 mol/l (non-LPL activity) from total lipolytic activity measured in a final NaCl concentration of 0.1 mol/l. LPL activity was expressed as microunits ($1\mu\text{U} = 1\ \mu\text{mol}$ nonesterified fatty acids released per hour of incubation at 28°C). The interassay coefficient of variation was 3.2%, and was determined using bovine skim milk as a standard source of LPL. Protein content of the tissue extracts was measured by the method of Lowry *et al.* (39). Data are expressed as specific activity of LPL (microunits/ g tissue protein).

Statistical analysis : Data are presented as means \pm S.E.M. Differences between individual group means were analyzed by Fisher's protected least squares difference (PLSD) test. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Study 1. Postprandial time course of insulin and LPL

Rats voluntarily ingested approximately 5 g of the high-carbohydrate diet during the 30-min meal. The meal resulted in a significant increase in glycemia, which began 60 min after the onset of the meal (figure 1). Glycemia was then briefly reduced at 90 min, increased thereafter until 240 min, and had returned to fasting levels at 360 min. Insulin levels were elevated above fasting levels 30 min after the onset of the meal, remained high until 180 min, and had returned to baseline values at 360 min. Plasma NEFA concentrations decreased by half as early as 30 min after the onset of the meal, remained low until 240 min, and had returned to fasting levels at 360 min. Plasma triglycerides were increased (from 1.2 to up to 2.0 mmol/l) from 90 to 180 min after the beginning of the meal (data not shown).

The postprandial time course of LPL specific activity in three WAT depots, interscapular BAT, and soleus muscle are depicted in figure 2. In WAT, a first peak was measured as early as 60 min after the onset of the meal, and a second peak was observed between 120 and 240 min. Ninety min after the beginning of the meal, LPL specific activity was reduced to levels that were not significantly different from fasting values. Although LPL activity in all three WAT depots responded to meal ingestion in a similar pattern, the inguinal response was somewhat less marked compared to the other two studies reported below and did not reach statistical significance ($P = 0.17$ between times 0 and 60 min). In BAT, the first peak of LPL activity was

delayed to 90 min but the second peak remained at 180 min. After ingestion of the meal, LPL activity in soleus muscle decreased significantly by an average of 19% from 30 min until 240 min, and had returned to fasting values at 360 min.

Study 2. Food intake with inhibition of insulin secretion on LPL

The findings of the pilot study aimed at verifying the efficacy of diazoxide to blunt the postprandial rise in insulinemia in lean and obese Zucker rats are depicted in figure 3. Insulinemia increased at least as early as 30 min after the onset of the meal in both lean (4-fold) and obese (2.5-fold) animals ($P < 0.05$ compared to fasting), regardless of the presence or absence of diazoxide. In contrast, the presence of diazoxide in the meal resulted in a marked decrease in plasma insulin concentrations in both lean and obese rats 60 and 120 min after the onset of the meal, to levels that were no longer different from that measured in the fasted state.

As determined in the main diazoxide protocol aimed at quantitating the LPL response to a meal, rats ingested approximately 5 g of the high-carbohydrate diet, and no significant difference was observed between groups (table 1). Confirming the observations of Study 1, plasma glucose and insulin concentrations in the control group were increased 1 h after the onset of the meal, and remained high at least for an additional 2 h. Inhibition of insulin secretion by diazoxide (postprandial insulinemia similar to fasting values) resulted in a marked elevation in glycemia at both time points. Plasma triglyceride levels were increased in both control and diazoxide-treated rats 3 h after the beginning of meal intake, whereas plasma NEFA concentrations were reduced 1 and 3 h after the meal only in the control group. Diazoxide blocked the basal insulin-mediated inhibition of lipolysis, as postprandial NEFA levels in treated rats were even higher than in fasted animals.

As was the case in Study 1, LPL specific activity in the retroperitoneal ($p=0.03$), epididymal ($p=0.005$) and inguinal ($p=0.002$) WAT of control animals was significantly increased as early as 1 h after the onset of the meal (figure 4A), and was further elevated 2 h later ($P < 0.05$ compared to 1-hr values for each depot). In contrast, LPL activity in diazoxide-treated rats was also increased 1 h after the meal in the three depots, but then decreased 2 h later to levels that were not significantly different from those of fasted animals. In BAT, the first postprandial peak of LPL activity was not observed, probably because it was delayed to 90 min after the onset of the meal as observed in Study 1. However, a significant increase ($p=0.001$) in LPL activity was measured 2 h later in the control group, whereas diazoxide blocked this elevation, as enzyme activity levels were similar to those of fasted animals.

In the control group, food intake resulted in a significant reduction in soleus muscle LPL activity 1 ($p=0.001$) and 3 ($p=0.003$) h after the beginning of the meal (figure 4B). In the same group, cardiac LPL specific activity was decreased after 3 h only ($p=0.01$). In all cases, diazoxide prevented the reduction in LPL activity.

Study 3. Cephalic- versus nutrient-mediated insulin secretion on LPL

After a 4-h refeeding subsequent to an 8-h fasting, plasma glucose and triglycerides as well as liver triglyceride content were significantly higher than fasting levels in ad libitum- and intragastric-fed animals only (table 2). At that time, plasma NEFA concentrations were 3- to 6-fold lower than fasting levels in these two groups. In sham-fed rats, no significant change in these variables occurred after feeding, confirming that the nutrients of the liquid diet did not reach the intestinal tract and were not absorbed. Whereas insulin levels increased 10-fold in ad libitum- and intragastric-fed rats, insulinemia in sham-fed animals was 3-fold higher than that of fasted rats at the end of the feeding period.

Ad libitum and intragastric feeding of rats resulted in a marked increase in LPL activity ($P < 0.01$ in each of the three depots) in all WAT harvested (figure 5A). In sham-fed rats, LPL activity was higher in parametrial ($p=0.04$) and retroperitoneal ($p=0.05$) tissues compared to that of fasted animals, but parametrial LPL was slightly lower than that of the ad libitum- and intragastric-fed groups. Although changes in LPL activity in sham-fed rats did not reach significance in the inguinal depot ($p=0.14$), a similar tendency was observed.

In skeletal and cardiac muscles, refeeding led to a decrease in LPL activity ($P < 0.01$ in both muscles; figure 5B) in the ad libitum group only. Rats fed intragastrically had lower LPL activity than fasted rats, but means of the two groups were not significantly different from each other ($P < 0.10$ in both muscles). Soleus and heart LPL activity in the sham-fed group remained unaltered.

DISCUSSION

The studies described herein were designed to characterize the contribution of insulin to the response of tissue LPL to acute food intake. The results show that acute food intake brings about a synchronized increase in LPL activity of several WAT depots and in BAT as well as a

decrease in muscle LPL which quickly follow the postprandial increase in insulinemia. The studies also demonstrate that an increase in insulinemia is a necessary condition for the full expression of the tissue-specific response of LPL to acute food intake. The present findings further show that the centrally mediated secretion of insulin can be of sufficient magnitude to elicit an LPL response to food intake, and that this action is independent of nutrient absorption.

Meal intake was followed by a rapid increase in plasma insulin levels that reached a maximum at the earliest (30 min) investigated time point after the onset of food intake. The present protocol did not allow for blood sampling during the meal itself, as pilot studies have shown that the procedure disturbs the ingestive behavior of the animals. Previous studies using different feeding methods have however demonstrated that the increase in plasma insulin occurs at the very beginning of food ingestion (30,34). This early phase of insulin secretion, termed the cephalic phase, is independent from nutrient absorption and is elicited by olfactory, visual, gustatory and oro-pharyngeal reflexes that act centrally to stimulate insulin secretion via the vagus nerve (30). Because of the methodological constraints of the present feeding protocol, it was not possible in the first study to distinguish the cephalic phase of insulin secretion from that elicited by nutrient absorption, and the overall response of insulin to food intake appeared as a single, prolonged peak which lasted from 30 to 240 min after the onset of the 30-min meal. As to nutrient absorption, glycemia displayed a two-phase increase after meal intake. After a short elevation between 30 and 60 min, which may correspond to an initial, rapid absorptive phase, glucose decreased at 90 min, probably in response to the high levels of insulin present at that time. Subsequent stabilization of insulinemia at levels lower than the peak 60-min concentration allowed for a gradual increase in plasma glucose, which corresponded to the late absorptive phase. Finally, the strong antilipolytic action of insulin was reflected by a very rapid fall in plasma NEFA levels, which was maintained as long as insulin remained above fasting levels.

Determination of the time course of the acute adipose LPL response to food intake revealed two peaks of activity, the first 1 h (delayed to 1.5 h in BAT) and the other 3 h after the onset of the meal. Earlier studies also described increased LPL activity in rat epididymal fat depot (40) and isolated adipocytes (41) after 1 h of high-carbohydrate feeding and incubation with insulin, respectively. The slight delay between the insulin and the LPL response to food intake probably reflects the time needed for the hormone to activate LPL intracellularly. Studies conducted in rats (40,42) and humans (43) have shown that the elevation in adipose LPL activity after food intake is modulated by as yet poorly defined posttranslational mechanisms, which remain independent of transcriptional events (42,44) for at least several hours (40). This modulation probably involves the release of active LPL as well as the activation of an inactive

pool of enzyme present in the fasted state (45). Similar mechanisms may operate in BAT, since refeeding and insulin increase LPL in this tissue (46). However, modulation of BAT LPL activity apparently involves pathways that require some changes in mRNA levels (46), possibly mediated by the adrenergic nervous system (47-49), which may explain the slightly longer delay for the appearance of the first peak in BAT LPL. The reason for the presence of two activity peaks in adipose LPL is unknown, but may conceivably reflect a first activation of LPL by the early, cephalic release of insulin, followed by a more prolonged activation by insulin secreted in response to nutrient absorption. Alternatively, the peaks may correspond to the early release of active LPL, followed by a later secretion of additional LPL following its activation. In contrast to adipose tissues, soleus LPL activity was decreased after food intake, confirming earlier findings (49,50). Muscle LPL did not display two activity waves as did WAT and BAT, suggesting distinct pathways for enzyme inactivation in muscle. It is however noteworthy that changes in LPL after the onset of the meal was quite rapid (within 1 h of onset of meal) and remarkably well synchronized in all WAT depots as well as in muscle.

The study in which the inhibitor of insulin secretion diazoxide was given along with the meal demonstrates that insulin secretion is necessary for the full expression of the response of LPL to food intake. Diazoxide inhibits insulin secretion by opening ATP-dependent K^+ channels in β -cell membranes (35) and by lowering intracellular Ca^{++} concentration. A previous study has shown that streptozotocin-induced insulin withdrawal prevented the normal elevation in adipose LPL activity during the fasted-fed transition (18). However, streptozotocin must be administered several days in advance and has effects other than the destruction of pancreatic islets of Langerhans (51). Therefore, the present study confirms in more physiological and acute conditions the critical role played by insulin in the response of adipose LPL to food intake, and it extends the concept to muscle tissues. In addition, the fact that plasma glucose and NEFA were much higher in the diazoxide-treated than in the control animals, as was expected under low insulinemia, indicates that the absolute circulating levels of the substrates are not determinants of the LPL response to food intake in normal rats.

In WAT, LPL activity was increased 1 h after the onset of the meal whether diazoxide was present or not, but the further increase noted 3 h after the meal did not occur in the presence of diazoxide. In fact, LPL tended to return towards fasting values at that time point in diazoxide treated animals. In preliminary experiments, it was shown that when the drug is administered at any time prior to the meal, subsequent food intake is significantly reduced. In addition, since the goal of the studies was to assess the contribution of insulin to the LPL response to voluntary food intake, gavage could obviously not be used. Thus diazoxide had to be given mixed with

the food. The procedure allowed for the fulfillment of the necessary condition of equal food intake in treated and untreated animals. However, it resulted in the maintenance of the cephalic phase of insulin secretion, which began within the first few minutes after meal presentation to rats (30), and thus prior to the intestinal absorption of the drug. As confirmed in the pilot study (figure 3), diazoxide was indeed unable to prevent the elevation in insulinemia measured 30 min after the onset of the meal. The lack of elevation in glycemia at that time (figure 1) strongly suggests the cephalic origin of this early increase in insulinemia. However, 1 h after the onset of the meal, diazoxide had completely abolished insulin secretion and its hypoglycemic and antilipolytic actions, as shown in the main diazoxide study (table 1). Taking into account the delay in the LPL response to food intake, it is therefore reasonable to suggest that the cephalic phase of insulin secretion, perhaps combined with the very beginning of the absorptive phase, was responsible for the increase in WAT LPL at that time point. This is consistent with a previous study in which acarbose, an intestinal glucosidase inhibitor which delay the absorption of glucose, when given along with a meal, lowered plasma insulin levels by 50% 1 h after meal intake, but did not affect retroperitoneal adipose LPL activity compared to controls (52). Finally, it should be noted that the postprandial decrease in soleus and heart LPL activity was totally abolished by diazoxide. This finding demonstrates that the postprandial increase in insulinemia not only mediates the increase in adipose LPL, but is also involved, either directly or indirectly through its action on muscle glucose (27) or fatty acid metabolism (28), in the response of muscle LPL to acute food intake. Lastly, it may be suggested that the maintenance of high postprandial LPL activity in muscle of diazoxide-treated rats may have compensated for its decreased activity in WAT and BAT, resulting in the maintenance of the global intravascular capacity to hydrolyze triglycerides, the levels of which remained unaffected by diazoxide treatment.

Earlier studies of the cephalic phase of insulin secretion in rats have used feeding stimuli of very short duration (30,34) and reported an insulin response lasting for a few minutes. In the present study, it was established that sham feeding of obese Zucker rats at a low rate in order to match the feeding pattern of ad libitum-fed animals resulted in an increase in insulinemia that lasted for at least 4 h. At the end of this period, insulinemia was 3-fold higher in sham-fed than in fasted rats, but 3-fold lower than in ad libitum-fed rats. Although the experimental protocol did not allow for repeated blood sampling, the possibility that insulinemia may have been higher at the beginning than at the end of the sham-feeding period cannot be dismissed. In any case, sham feeding for several hours effectively resulted in a sustained insulin secretion in the obese Zucker rats. The latter are particularly sensitive to food deprivation (53), and whether a response

comparable in magnitude and duration would be found in lean animals remains to be determined experimentally.

The observation of a significant stimulation of LPL activity in adipose tissue in animals fed orally with an open gastric cannula (sham fed) constitutes the first report of an association between adipose LPL and the cephalic phase of insulin secretion. Since nutrient-related variables were not increased in sham-fed rats, confirming the effective prevention of nutrient absorption, the 3-fold elevation in plasma insulin levels observed 4 h into the feeding period could not have been elicited by nutrients. The findings rather indicate that ingestion of the diet induced a prolonged insulin response of cephalic origin, which led to an elevation in adipose LPL activity. It could be argued that the increase in adipose LPL observed in sham-fed rats might have been elicited by factors, other than insulin itself, which would have been altered as part of the reflex response to the initiation of food intake. However, the study with diazoxide, a compound that acts specifically on insulin secretion, strongly suggests that centrally mediated insulin secretion was indeed responsible for the modulation of tissue LPL in sham-fed animals. The roughly proportional response of LPL to insulinemia under the various means of feeding further underlines the key role played by insulin in the tissue-specific postprandial modulation of LPL. Four h of intragastric feeding resulted in an insulinemia comparable to that elicited by ad libitum feeding, and LPL activity in all tissues was comparable in ad libitum- and gastric-fed animals, whereas enzyme activity tended to be less stimulated by the smaller increase in insulinemia achieved in the sham-fed animals at that time. In fact, despite comparable trends, the latter appeared to be too weak to significantly increase LPL in the inguinal adipose depot or to decrease enzyme activity in muscle tissues. This may reflect a tissue-specific degree of sensitivity of LPL to insulin. It should also be noted that the responsiveness of LPL to insulin might be affected by the state of resistance of glucose metabolism to the action of insulin that characterizes the Zucker rat (54). This is suggested by several human studies that have reported a shift in the dose-response curve of adipose LPL to insulin in massively obese subjects (7), a divergent response of muscle LPL to insulin infusion in normal and insulin-resistant subjects (21,26,55), and a closer relationship of muscle LPL with muscle glucose uptake than with insulinemia per se (8,27).

In summary, the present studies have demonstrated the key role of insulin in the response of adipose tissue and muscle lipoprotein lipase to food intake. Diazoxide administration and consequent inhibition of insulin secretion prevented the increase in LPL activity in all adipose depots studied, whereas a feeding-induced, centrally mediated elevation in insulinemia without any nutrient absorption increased adipose tissue LPL activity. The feeding-

induced decrease in muscle LPL was also abolished by inhibition of insulin secretion in normal rats, but cephalic-phase insulin release did not greatly alter muscle LPL in obese rats as it did in their adipose tissues, likely because of the insufficient magnitude of the insulin response. The present findings indicate that the postprandial increase in insulinemia is a requisite for a proper response of tissue LPL to food intake, and suggest that it may be a condition sufficient for such a response.

ACKNOWLEDGMENTS

Frédéric Picard is the recipient of a fellowship from the Medical Research Council of Canada. We thank Ms. Josée Lalonde for her professional technical assistance. This work was supported by grants from the Medical Research Council of Canada and by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada.

REFERENCES

1. Zechner R: The tissue-specific expression of lipoprotein lipase: implications for energy and lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol* 8:77-88, 1997
2. Pérusse L, Chagnon YC, Dionne FT, Bouchard C: The human obesity gene map: the 1996 update. *Obes Res* 5:49-61, 1997
3. Kern PA: Potential role of TNF α and lipoprotein lipase as candidate genes for obesity. *J Nutr* 127:1917S-1922S, 1997
4. Wang XL, McCredie RM, Wilcken DEL: Common DNA polymorphisms at the lipoprotein lipase gene: association with severity of coronary artery disease and diabetes. *Circulation* 93:1339-1345, 1996
5. Nilsson-Ehle P: Impaired regulation of adipocyte tissue lipoprotein lipase in obesity. *Int J Obesity* 5:695-699, 1981
6. Eckel RH: Lipoprotein lipase: a multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases. *N Engl J Med* 320:1060-1068, 1989
7. Eckel RH, Yost TJ, Jensen DR: Alterations in lipoprotein lipase in insulin resistance. *Int J Obesity* 19 (suppl. 1):S16-S21, 1995
8. Richelsen B, Pedersen SB, Møller-Pedersen T, Schmitz O, Møller N, Børglum JD: Lipoprotein lipase activity in muscle tissue influenced by fatness, fat distribution and insulin in obese females. *Eur J Clin Invest* 23:226-233, 1993
9. Jensen DR, Schlaepfer IR, Morin CL, Pennington DS, Marcell T, Ammon SM, Gutierrez-Hartmann A, Eckel RH: Prevention of diet-induced obesity in transgenic mice overexpressing skeletal muscle lipoprotein lipase. *Am J Physiol* 273:R683-R689, 1997
10. Cryer A: Comparative biochemistry and physiology of lipoprotein lipase. In *Lipoprotein Lipase*. Borensztajn J, Ed. Chicago, Evener, 1987, p. 277-327

11. Ashby P, Robinson DS: Effects of insulin, glucocorticoids and adrenaline on the activity of rat adipose-tissue lipoprotein lipase. *Biochem J* 188:185-192, 1980
12. Chiappe de Cingolani GE, Goers JWF, Giannotti M, Caldiz CI: Comparative effects of insulin and isoproterenol on lipoprotein lipase in rat adipose cells. *Am J Physiol* 270:C1461-C1467, 1996
13. Pradines-Figueres A, Vannier C, Ailhaud G: Short-term stimulation by insulin of lipoprotein lipase secretion in adipose cell. *Biochem Biophys Res Com* 154:982-990, 1988
14. Raynolds MV, Awald PD, Gordon DF, Gutierrez-Hartmann A, Rule DC, Wood WM, Eckel RH: Lipoprotein lipase gene expression in rat adipocytes is regulated by isoproterenol and insulin through different mechanisms. *Mol Endocrinol* 4:1416-1422, 1990
15. Semenkovich CF, Wims M, Noe L, Etienne J, Chan L: Insulin regulation of lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes is mediated at posttranscriptional and posttranslational levels. *J Biol Chem* 264:9030-9038, 1989
16. Vydelingum N, Drake RL, Etienne J, Kissebah AH: Insulin regulation of fat cell ribosomes, protein synthesis, and lipoprotein lipase. *Am J Physiol* 245:E121-E131, 1983
17. Chen YD, Howard J, Huang V, Kraemer FB, Reaven GM: Dissociation between plasma triglyceride concentration and tissue lipoprotein lipase deficiency in insulin-deficient rats. *Diabetes* 29:643-647, 1980
18. Nomura T, Hagino Y, Gotoh M, Iguchi A: The effects of streptozotocin diabetes on tissue specific lipase activities in the rat. *Lipids* 19:594-599, 1984
19. Deshaies Y, Gélouën A, Paulin A, Bukowiecki LJ: Restoration of lipoprotein lipase activity in insulin-deficient rats by insulin infusion is tissue-specific. *Can J Physiol Pharmacol* 69:746-751, 1991

20. Terretaz J, Cusin I, Etienne J, Jeanrenaud B: *In vivo* regulation of adipose tissue lipoprotein lipase in normal rats made hyperinsulinemic and in hyperinsulinemic genetically-obese (*fa/fa*) rats. *Int J Obesity* 18:9-15, 1994
21. Farese RV, Yost TJ, Eckel RH: Tissue-specific regulation of lipoprotein lipase activity by insulin/glucose in normal-weight humans. *Metabolism* 40:214-216, 1991
22. Ladu MJ, Kapsas H, Palmer WK: Regulation of lipoprotein lipase in adipose and muscle tissues during fasting. *Am J Physiol* 260:R953-R959, 1991
23. Seip RL, Angelopoulos TJ, Semenkovich CF: Exercise induces human lipoprotein lipase gene expression in skeletal muscle but not adipose tissue. *Am J Physiol* 268:E229-E236, 1995
24. Ladu MJ, Kapsas H, Palmer WK: Regulation of lipoprotein lipase in muscle and adipose tissue during exercise. *J Appl Physiol* 71:404-409, 1991
25. Gorski J, Stankiewick-Choroszuca B: The effect of hormones on lipoprotein lipase activity in skeletal muscles of the rat. *Horm Metab Res* 14:189-191, 1982
26. Laville M, Auboeuf D, Khalfallah Y, Vega N, Riou JP, Vidal H: Acute regulation by insulin of phosphatidylinositol-3-kinase, Rad, Glut4, and lipoprotein lipase mRNA levels in human muscle. *J Clin Invest* 98:43-49, 1996
27. Pollare T, Vessby B, Lithell H: Lipoprotein lipase activity in skeletal muscle is related to insulin sensitivity. *Arterioscler Thromb* 11:1192-1203, 1991
28. Ferraro RT, Eckel RH, Larson DE, Fontvieille A-M, Rising R, Jensen DR, Ravussin E: Relationship between skeletal muscle lipoprotein lipase activity and 24-hour macronutrient oxidation. *J Clin Invest* 92:441-445, 1993
29. Ewart HS, Carroll R, Severson DL: Lipoprotein lipase activity in rat cardiomyocytes is stimulated by insulin and dexamethasone. *Biochem J* 327:439-442, 1997
30. Strubbe JH: Parasympathetic involvement in rapid meal-associated conditioned insulin secretion in the rat. *Am J Physiol* 263:R615-R618, 1992

31. Proietto J, Rohner-Jeanrenaud F, Ionescu E, Jeanrenaud B: Role of the oropharynx in regulation of glycemia. *Diabetes* 36:791-795, 1987
32. Sjöström L, Garellick G, Krotkiewski M, Luyckx A: Peripheral insulin in response to the sight and smell of food. *Metabolism* 29:901-909, 1980
33. Simon C, Schlienger JL, Sapin R, Imler M: Cephalic phase insulin secretion in relation to food presentation in normal and overweight subjects. *Physiol Behav* 36:465-469, 1986
34. Berthoud H-R, Bereiter DA, Trimble ER, Siegel EG, Jeanrenaud B: Cephalic phase, reflex insulin secretion: neuroanatomical and physiological characterization. *Diabetologia* 20:393-401, 1981
35. Mariot P, Gilon P, Nenquin M, Henquin J-C: Tolbutamide and diazoxide influence insulin secretion by changing the concentration but not the action of cytoplasmic Ca^{2+} in β -cells. *Diabetes* 47:365-373, 1998
36. Ionescu E, Rohner-Jeanrenaud F, Proietto J, Rivest RW, Jeanrenaud B: Taste-induced changes in plasma insulin and glucose turnover in lean and genetically obese rats. *Diabetes* 37:773-779, 1988
37. Waynforth, H.B. *Experimental and surgical technique in the rat*. London:Academic Press, 1980.
38. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226:497-509, 1957
39. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275, 1951
40. Erskine JM, Jensen DR, Eckel RH: Macronutrient regulation of lipoprotein lipase is posttranscriptional. *J Nutr* 124:500-507, 1994

41. Ong JM, Kirchgessner TG, Schotz MC, Kern PA: Insulin increases the synthetic rate and messenger RNA level of lipoprotein lipase in isolated rat adipocytes. *J Biol Chem* 263:12933-12938, 1988
42. Doolittle MH, Ben-Zeev O, Elovson J, Martin D, Kirchgessner TG: The response of lipoprotein lipase to feeding and fasting. Evidence for posttranslational regulation. *J Biol Chem* 265:4570-4577, 1990
43. Ong JM, Kern PA: Effect of feeding and obesity on lipoprotein lipase activity, immunoreactive protein, and messenger RNA levels in human adipose tissue. *J Clin Invest* 84:305-311, 1989
44. Semb H, Olivecrona T: Lipoprotein lipase in guinea pig tissues: molecular size and rate of synthesis. *Biochem Biophys Acta* 878:330-337, 1986
45. Bergö M, Olivecrona G, Olivecrona T: Forms of lipoprotein lipase in rat tissues: in adipose tissue the proportion of inactive lipase increases on fasting. *Biochem J* 313:893-898, 1996
46. Carneheim CMH, Alexson SEH: Refeeding and insulin increase lipoprotein lipase activity in rat brown adipose tissue. *Am J Physiol* 256:E645-E650, 1989
47. Carneheim C, Nedergaard J, Cannon B: β -adrenergic stimulation of lipoprotein lipase in rat brown adipose tissue during acclimatation to cold. *Am J Physiol* 246:E327-E333, 1984
48. Deshaies Y, G elo en A, Paulin A, Marette A, Bukowiecki LJ: Tissue-specific alterations in lipoprotein lipase activity in the rat after chronic infusion of isoproterenol. *Horm Metab Res* 25:13-16, 1993
49. Belahsen R, Deshaies Y: Modulation of lipoprotein lipase activity in the rat by the β 2-adrenergic agonist clenbuterol. *Can J Physiol Pharmacol* 70:1555-1562, 1992
50. Boivin A, Montplaisir I, Deshaies Y: Postprandial modulation of lipoprotein lipase in rats with insulin resistance. *Am J Physiol* 267:E620-E627, 1994

-
51. Lisato G, Cusin I, Tiengo A, del Prato S, Jeanrenaud B: The contribution of hyperglycaemia and hypoinsulinaemia to the insulin resistance of streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 35:310-315, 1992
 52. Picard F, Deshaies Y: Postprandial serum lipids and tissue lipoprotein lipase are acutely altered in rats by the α -glucosidase inhibitor acarbose. *Horm Metab Res* 28:377-380, 1996
 53. Timofeeva E, Richard D: Functional activation of CRH neurons and expression of the genes encoding CRH and its receptors in food-deprived lean (*Fa/?*) and obese (*fa/fa*) Zucker rats. *Neuroendocrinology* 66:327-340, 1997
 54. Czech MP, Richardson DK, Becker SG, Walters CG, Gitomer W, Heinrich J: Insulin response in skeletal muscle and fat cells of the genetically obese Zucker rat. *Metabolism* 27 (suppl. 2):1967-1981, 1978
 55. Yost TJ, Froyd KK, Jensen DR, Eckel RH: Change in skeletal muscle lipoprotein lipase activity in response to insulin/glucose in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 44:786-790, 1995

TABLES

Table 1. Food intake during a 30-min, high-carbohydrate meal with or without diazoxide (150 mg/kg body weight) and plasma variables measured before, 1 h and 3 h after the onset of the meal.

	FASTING	1h AFTER MEAL		3 h AFTER MEAL	
		Control	Diazoxide	Control	Diazoxide
Food intake (g)		5.3 ± 1.0	5.03 ± 0.6	6.2 ± 1.0	4.9 ± 0.3
Glucose (mM)	8.1 ± 0.3	9.1 ± 0.2	15.4 ± 0.7 †	9.8 ± 0.4 *	13.2 ± 0.6 *†
Insulin (nM)	0.31 ± 0.04	0.95 ± 0.10 *	0.22 ± 0.02 †	0.68 ± 0.08 *	0.25 ± 0.02 †
NEFA (mM)	0.35 ± 0.07	0.10 ± 0.01 *	0.60 ± 0.06 *†	0.21 ± 0.05	0.84 ± 0.04 *†
Triglycerides (mM)	0.96 ± 0.15	1.14 ± 0.13	1.13 ± 0.12	1.77 ± 0.14 *	1.77 ± 0.16*

Values are means ± S.E.M. of 7 rats. * Different from fasting ($P < 0.05$); † Different from control group at that time point ($P < 0.05$).

Table 2. Plasma and tissue variables in Zucker rats after 8 h of fasting or after 4 h of sham, intragastric or ad libitum refeeding with an energetic liquid diet following 8 h of fasting

	FASTING	REFEEDING		
		Sham	Intragastric	Ad libitum
Glucose (mmol/l)	8.5 ± 0.7 a	8.8 ± 1.0 a	14.9 ± 2.4 b	11.5 ± 0.4 ab
Insulin (nmol/l)	0.40 ± 0.07 a	1.23 ± 0.22 b	5.02 ± 0.94 c	4.04 ± 0.39 c
NEFA (mmol/l)	0.68 ± 0.06 a	0.51 ± 0.05 b	0.15 ± 0.06 c	0.05 ± 0.05 c
Triglycerides (mmol/l)	1.73 ± 0.05 a	1.23 ± 0.17 b	2.35 ± 0.16 c	2.91 ± 0.09 d
Liver triglycerides (mmol/g)	1.22 ± 0.22 a	1.07 ± 0.34 a	1.72 ± 0.27 a	1.75 ± 0.31 a

Values are means ± S.E.M. of 4 animals. Means not sharing the same superscript are significantly different from each other ($P < 0.05$).

FIGURE LEGENDS

- Figure 1 Time course of plasma glucose, insulin and nonesterified fatty acids (NEFA) in rats fed a 30-min, high-carbohydrate meal. The meal was started at 0 min after an overnight fast. Symbols represent means \pm S.E.M. of 8 animals. * Different from time 0 ($P < 0.05$).
- Figure 2 Time course of lipoprotein lipase specific activity in three white (retroperitoneal, epididymal, inguinal), one brown (interscapular; BAT) adipose tissues, and in soleus muscle in normal rats fed a 30-min, high-carbohydrate meal. The meal was started at 0 min after an overnight fast. Symbols represent means \pm S.E.M. of 8 animals. * Different from time 0 ($P < 0.05$).
- Figure 3 Postprandial time-course of insulinemia in lean ($Fa/?$) and obese (fa/fa) Zucker rats fed a 30-min, high-carbohydrate meal, with (white symbols) or without (black symbols) diazoxide (150 mg/kg body weight) mixed with the meal. The meal was started at 0 min after an overnight fast. Symbols represent means \pm S.E.M. of 6 animals. Note that right scale (obese rats) is 3-fold that of left scale (lean rats). * Different from time 0; † different from group without diazoxide at the same time point ($P < 0.05$).
- Figure 4 Specific activity of adipose (panel A) and muscle (panel B) lipoprotein lipase in normal rats fed a 30-min, high-carbohydrate meal, with (white symbols) or without (black symbols) diazoxide (150 mg/kg body weight) mixed with the meal. The meal was started at 0 min after an overnight fast. Symbols represent means \pm S.E.M. of 7 animals. * Different from time 0 ($P < 0.05$, which is the case for all white adipose depots in both groups at 60 min); † different from group without diazoxide ($P < 0.05$).

Figure 5 Specific activity of adipose (panel A) and muscle (panel B) lipoprotein lipase in obese (fa/fa) Zucker rats in the fasted state or after 4 hours of refeeding with an energetic liquid diet in the following conditions: sham (orally, gastric cannula opened), intragastrically (into the stomach via the cannula), or ad libitum (orally, gastric cannula closed). Refeeding occurred after 8 hours of fasting. Symbols represent means \pm S.E.M. of 4 animals. Means not sharing a common superscript are different from each other ($P < 0.05$).

FIGURES

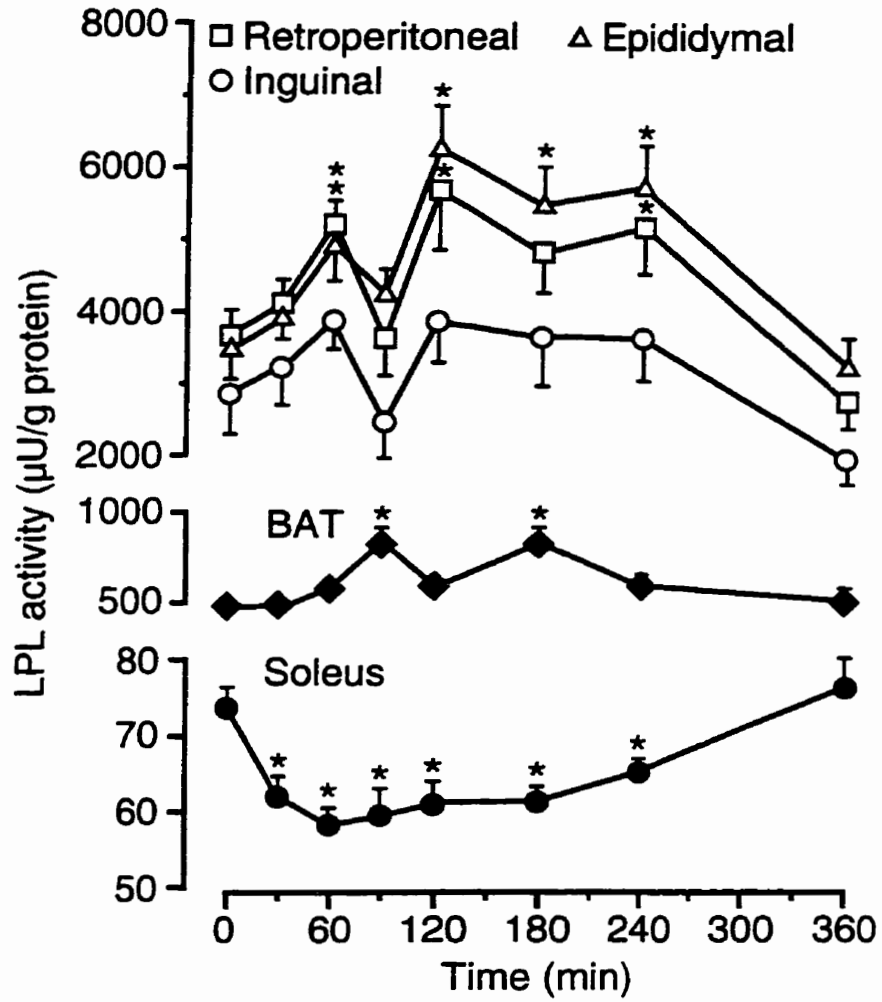


Figure 1

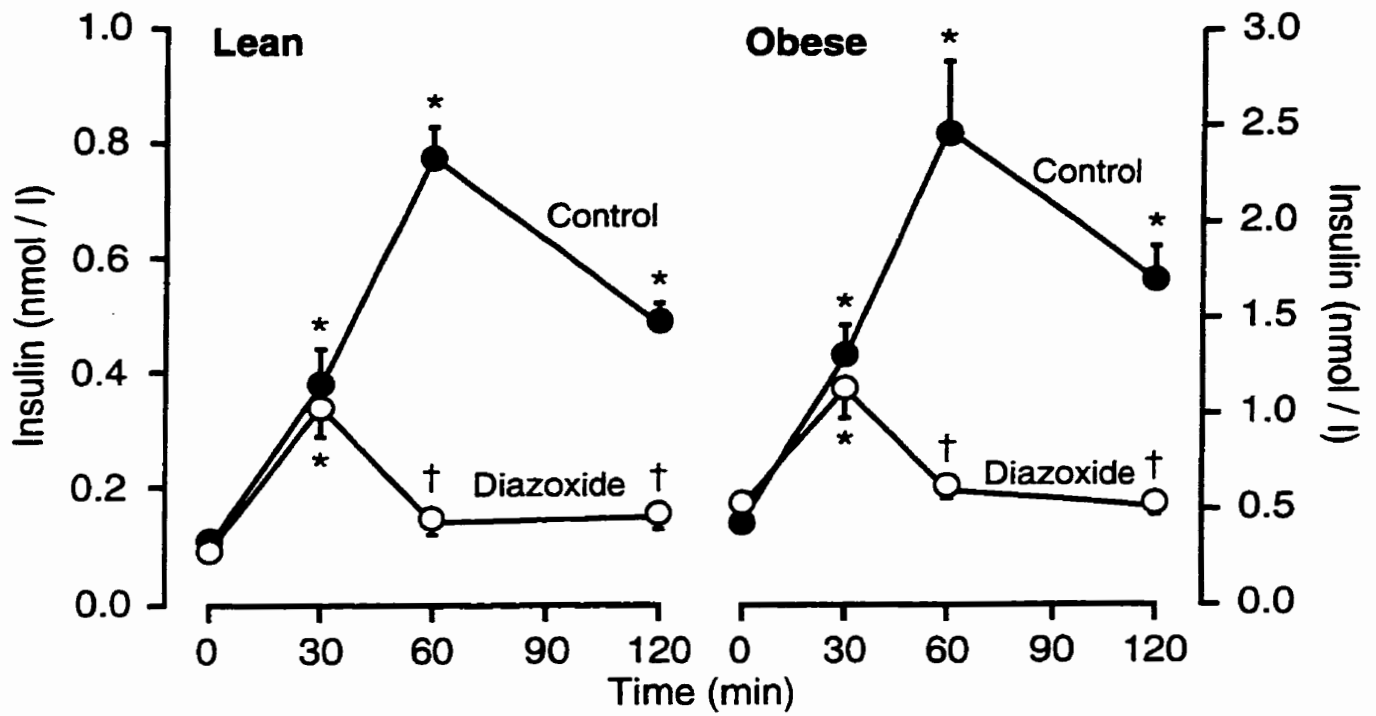
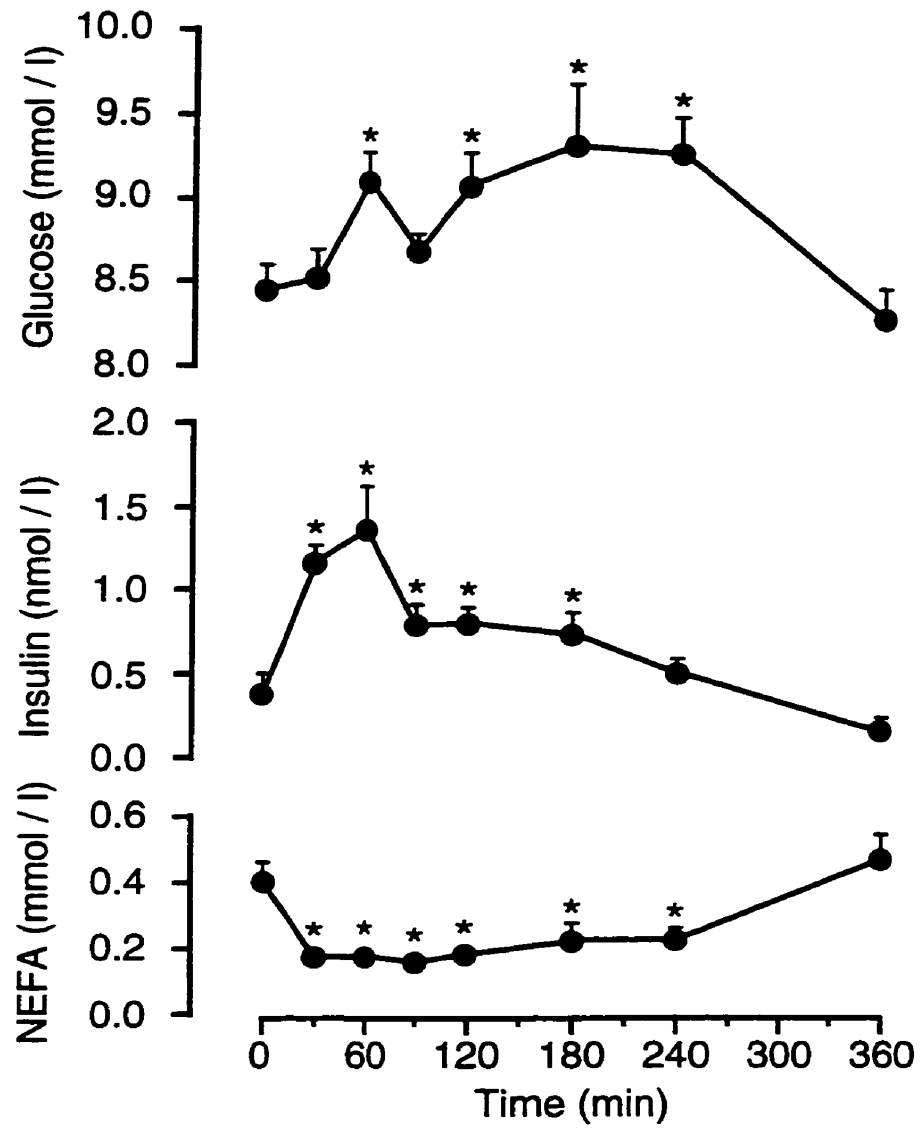


Figure 2

*Figure 3*

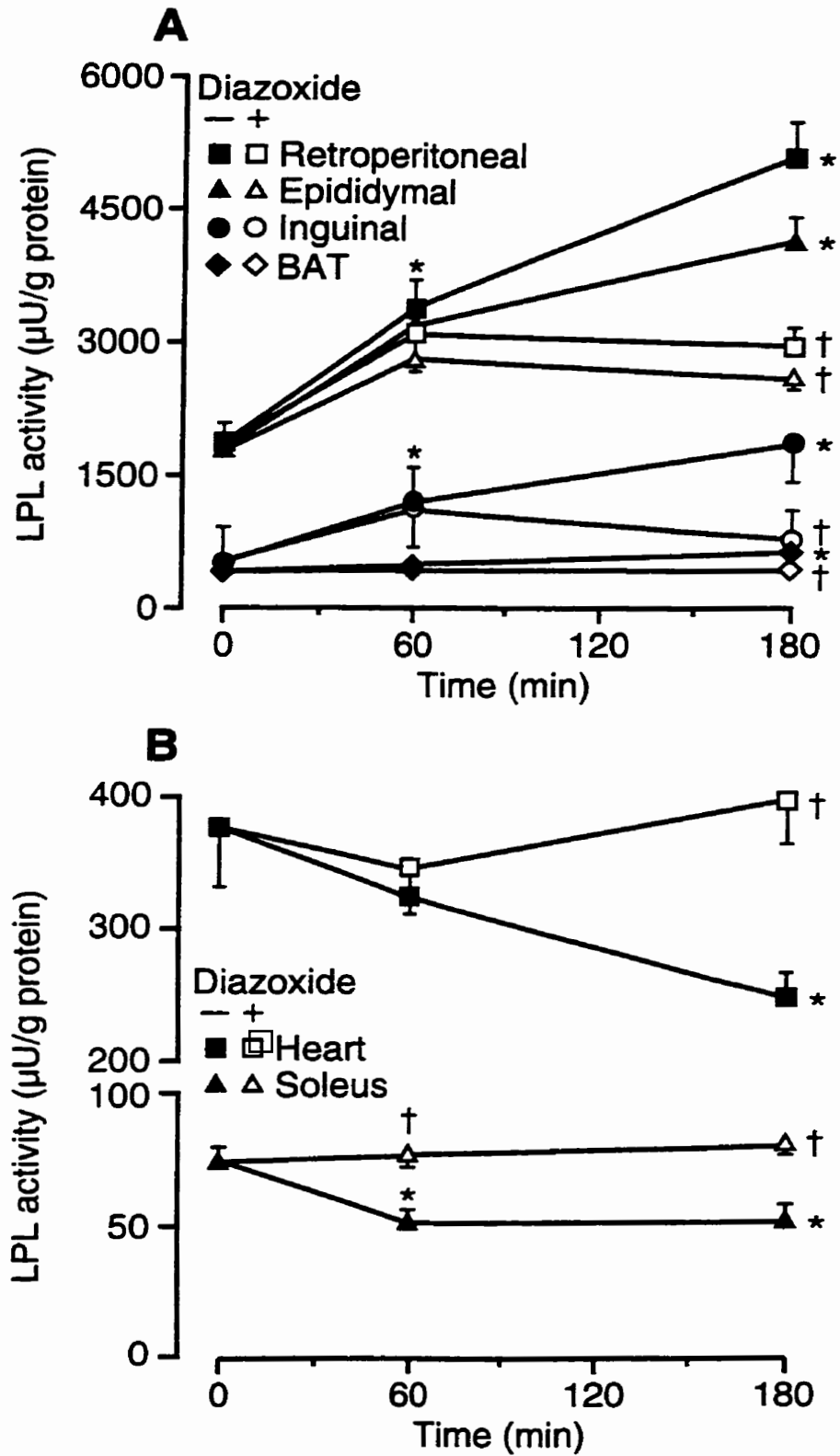


Figure 4

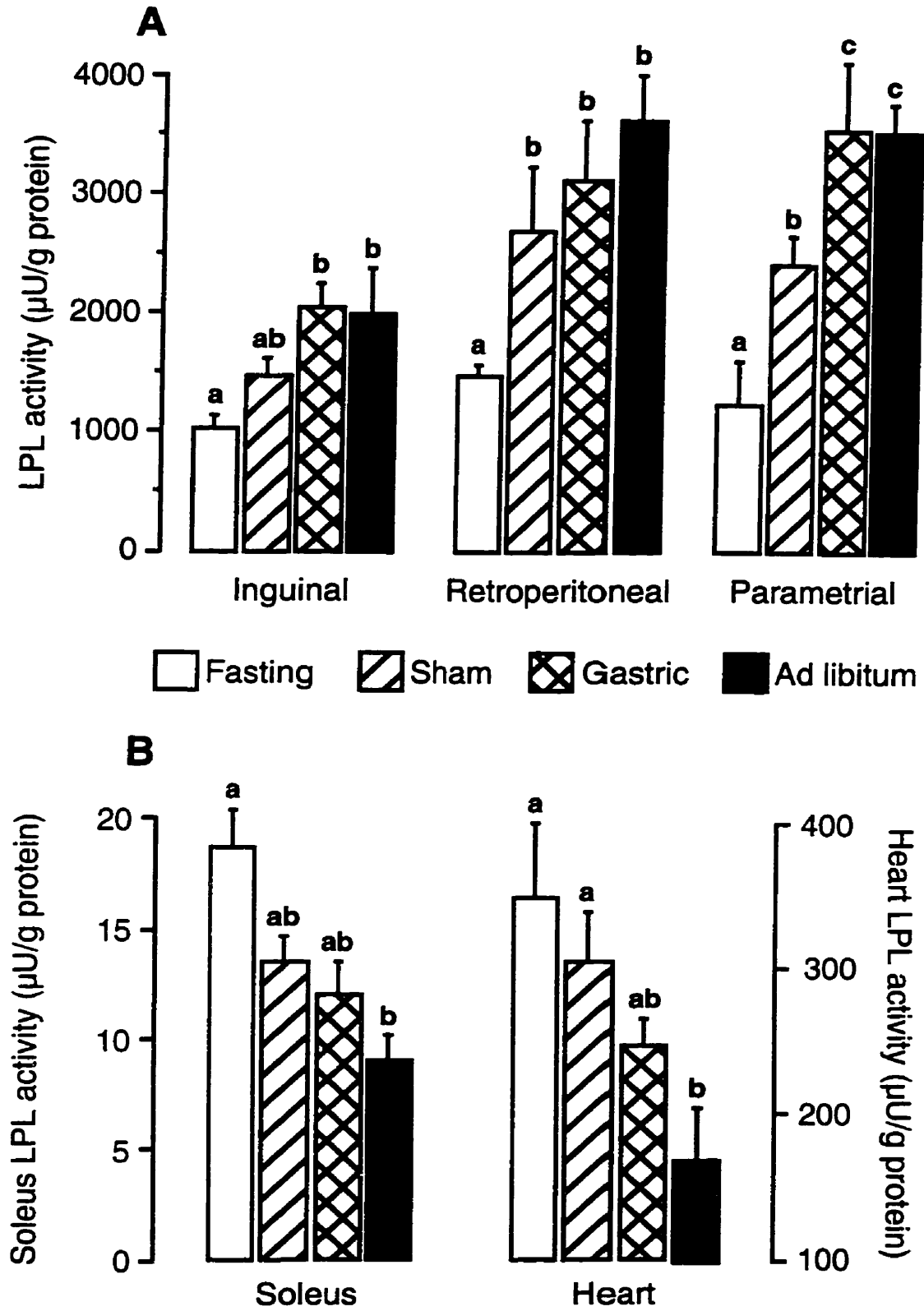


Figure 5

CHAPITRE 2

ABNORMAL INSULIN AND β -ADRENERGIC MODULATION OF LIPOPROTEIN LIPASE DURING REFEEDING AFTER PROLONGED FASTING IN THE ZUCKER RAT

Frédéric PICARD, Denis RICHARD, Elena TIMOFEEVA, and Yves DESHAIES

Center for Research on Energy Metabolism and Department of Anatomy & Physiology,
School of Medicine, Laval University, Québec, QC, Canada G1K 7P4

Diabetologia. Sous presse

RÉSUMÉ

Le but de cette étude était de vérifier si la modulation de la lipoprotéine lipase pendant la prise alimentaire est résistante à l'action de l'insuline dans un modèle animal de résistance du métabolisme du glucose à l'insuline, le rat obèse Zucker (fa/fa). Parce que la résistance à l'insuline pourrait se manifester pendant une ou plusieurs étapes de l'activation de la LPL en phase postprandiale, les rats ont été mis à jeun pendant 24 h pour que la LPL du tissu adipeux des rats obèses soit au même niveau que celle des rats maigres (Fa/?). Cette manipulation a aussi permis d'obtenir des niveaux d'insulinémie à jeun semblables chez les deux groupes. Chez les rats obèses, l'activation de la LPL du tissu adipeux semblait normale (augmentation du double) à la première heure de prise alimentaire subséquente, mais a atteint un plateau jusqu'à la sixième heure. Chez les rats maigres, aucune activation de la LPL adipeuse n'a été observée 1 h après la prise alimentaire. Cependant, à 6 h, la LPL du tissu adipeux a augmenté de 600% par rapport aux niveaux à jeun chez ces mêmes rats. Dans le muscle des rats maigres, l'activité de la LPL a augmenté à 1h puis a diminué progressivement. La LPL musculaire des rats obèses, quant à elle, a été diminuée normalement suite à la prise alimentaire. Ces résultats suggèrent que, chez les rats obèses, la LPL du tissu adipeux, mais non celle du muscle, est résistante à l'action de l'insuline pendant les six premières heures de prise alimentaire. Dans une deuxième étude, le bloqueur β -adrénergique propranolol a été injecté une heure avant le début de la prise alimentaire chez des rats maigres et obèses privés de nourriture pendant 24 h. Une heure après le début de la prise alimentaire, la modulation atypique de la LPL adipeuse et musculaire des rats maigres a été corrigée par le propranolol, alors que chez les rats obèses, le bloqueur n'a eu aucun effet. Les résultats de cette deuxième étude démontrent que, suite à un jeûne de 24 h, le système β -adrénergique est activé pendant la prise alimentaire, et que cette activation empêche les effets habituels de l'insuline. Chez les rats obèses, il semble que ce système soit défectueux ou inactif, non seulement dans le tissu adipeux, mais aussi dans le muscle, permettant ainsi la modulation de la LPL tissulaire par l'insuline.

ABSTRACT

Aims/hypothesis. To characterise the response of tissue lipoprotein lipase to refeeding after prolonged (24 h) fasting in lean and obese Zucker rats, and to verify whether lipoprotein lipase in obese rats is resistant to the short-term action of insulin and escapes modulation by the β -adrenergic pathway.

Methods. Lean Fa/? and obese fa/fa male Zucker rats fasted for 24 h and refed at will. Lipoprotein lipase activity in adipose and muscle tissues was assessed in the freely-fed and fasted states, and at various times during refeeding, with or without β -adrenergic blockade (propranolol).

Results. The 24-h fast erased the phenotype-related difference in insulinaemia and adipose lipoprotein lipase activity present in freely-fed rats. Adipose lipoprotein lipase increased twofold in obese rats 1h after refeeding, whereas no change occurred at that time in lean rats. Activity remained at that level for at least 6 h after refeeding in obese rats, whereas in lean animals it was increased fivefold after 6 h of refeeding. In muscle of obese rats, lipoprotein lipase decreased in response to refeeding but paradoxically increased twofold in lean animals. Giving propranolol to lean rats before refeeding abolished the atypical response of muscle lipoprotein lipase to food intake and restored the early (1 h after refeeding) increase in adipose lipoprotein lipase but had no effect in obese rats.

Conclusion/interpretation. Refeeding after prolonged fasting activates the β -adrenergic pathway in lean rats, which transiently counteracts insulin-mediated modulation of lipoprotein lipase. The β -adrenergic pathway is not activated by refeeding in adipose tissue and muscle of the obese Zucker rat. In the obese Zucker rat, the early modulation of adipose lipoprotein lipase activity is abnormal upon refeeding after prolonged fasting, suggesting short-term resistance to the action of insulin.

Keywords: lipoprotein lipase, obesity, Zucker rat, food deprivation, food intake, insulin, insulin resistance, β -adrenergic pathway, adipose tissue, skeletal muscle

INTRODUCTION

Lipoprotein lipase (LPL, EC 3.1.1.34), the enzyme that hydrolyses triglycerides carried within the vascular compartment by triglyceride-rich lipoproteins, is modulated by several hormones in a tissue-specific manner. In the food intake-induced increase in adipose tissue and decrease in muscle LPL activity [1-4], insulin has recently been shown to constitute a necessary and sufficient modulator [5]. When solicited, other endocrine factors such as the β -adrenergic component of the sympathetic efferent pathways (SEP) also modulate LPL in a tissue-specific fashion, in exact opposition to insulin action [6-8]. By virtue of its function and modulation, LPL plays an important part in the determination of triglyceridaemia, particularly in the postprandial state, as well as in the partitioning of triglyceride-derived fatty acids among storage and oxidative tissues.

Obesity is typically associated with resistance of glucose metabolism to the action of insulin [9-11]. Other insulin-sensitive metabolic events such as vasodilation [12, 13] and adipose lipolysis [14] can become progressively insulin resistant as well. Whether this is the case for LPL remains a matter of debate. On the one hand, that adipose LPL is high and muscle LPL is low in obesity-associated insulin resistance with compensatory hyperinsulinaemia [15-17] argues in favour of an intact sensitivity of LPL to insulin. On the other hand, several lines of evidence suggest that, under short-term modulation, LPL seems resistant to insulin in concomitance with glucose resistance to the hormone. In fasted obese subjects, the dose-response curve of adipose LPL to insulin infusion was reported to be shifted towards higher insulin concentrations [18]. The relative increase in adipose LPL activity above fasting levels 4 h after the beginning of a high-carbohydrate, insulinogenic meal was also found to be lower in obese than in lean subjects [19]. Taken together, the above observations suggest that chronic hyperinsulinaemia does bring about high adipose and low muscle LPL, as assessed in free feeding or fasting conditions but that there exists some degree of resistance of LPL to short-term changes in insulin, such as those elicited by meal intake or insulin infusion.

In the present series of studies, the responsiveness of LPL to food intake was explored in the Zucker rat, a genetic model of obesity with severe resistance of glucose metabolism to insulin and compensatory hyperinsulinaemia [20, 21]. The fasting-refeeding protocol aimed to deprive the animals of food for sufficient time for insulinaemia and adipose LPL of obese animals to be lowered to lean levels, such that similar basal conditions would be present upon refeeding. In a preliminary study carried out to determine such a time point, insulinaemia and adipose tissue LPL in obese Zucker rats were found to reach lean levels after 24 h of fasting. In

lean rats refed after the 24-h fast, a lack of increase in adipose tissue LPL, which occurs within 1 h of refeeding after a short-term (8-10 h) fast [5], was noted. Long-term food deprivation can result in the activation of the SEP upon refeeding [22], which could conceivably counteract the insulin-mediated modulation of LPL by decreasing white adipose tissue (WAT) and increasing muscle LPL activity [6]. Sympathetic activity is, however, impaired in obese rodent models of obesity, at least in brown adipose tissue [23-26]. Given the above findings, the first aim of the present studies was to determine in lean and obese Zucker rats the time course of the tissue-specific changes in LPL activity in response to food intake, after the establishment of similar fasting insulinaemia and LPL activity in both phenotypes. The second aim was to verify the hypothesis that the β -adrenergic component of the SEP contributes to the tissue-specific modulation of LPL upon refeeding after long-term fasting. Finally, the third aim was to test the hypothesis that such postprandial modulation of LPL by the SEP does not occur in the obese Zucker rat.

MATERIALS AND METHODS

Animals and feeding protocol: We purchased two cohorts of lean (*Fa/?*) and obese (*fa/fa*) male Zucker rats, aged 5-6 weeks, from Charles River Canada (St-Constant, Québec, Canada). Rats were cared for and handled in accordance with the Canadian Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, and protocols were approved by the Laval University Animal Care Committee. Rats were housed individually in stainless steel cages under controlled temperature ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) and lighting (14h dark; 10:h light cycle). Rats had free access to tap water and a stock diet (Charles River Rodent Diet No 5075, Ralston Products, Woodstock, Canada). A week after their arrival, rats of the first cohort were killed either after free overnight access to food, after a 24-h period of food deprivation, or after 1, 3, 6, 12, and 24 h of free refeeding following the 24-h fast (four animals per time point). The onset of refeeding was adjusted so that all rats were killed 1 h after the beginning of the lighted period to allow comparison of groups at the same period of the circadian glucocorticoid rhythm.

Involvement of the β -adrenergic component of the SEP: A nutritional protocol similar to that described above was used to assess the involvement of the β -adrenergic component of the SEP in the second cohort of rats. In this case, rats were killed either after a 24-h period of food deprivation, or after 1 h of free refeeding following the 24-h fast. Refed rats were injected i.p. with either DL-propranolol (25 mg/kg) or saline 1 h before refeeding (five animals per group). The β -adrenergic pathway is the predominant component of the SEP that modulates LPL in

WAT [7], brown adipose tissue (BAT) [27] and muscle [28]. Propranolol was selected as the β -adrenergic antagonist because it has the widest affinity towards β -adrenergic receptor subtypes [29]. In the rat, three receptor subtypes (β 1, β 2, and β 3) are found in WAT and BAT, β 2 receptors and possibly an additional, atypical β receptor predominate in skeletal muscle [30], whereas β 1 and β 2 receptors are found in the heart. The respective involvement of various subtypes of β -adrenergic receptors in the modulation of LPL in specific tissues has not been clearly established. Hence the selection of the non-specific β -adrenergic antagonist propranolol, which is able to antagonise actions mediated by β 1, β 2, as well as β 3 [29, 30]. Propranolol at the dose used here has been shown to prevent in vivo the exercise-induced increase in plasma NEFA [31] and to antagonise the alterations in tissue LPL brought by short-term cold exposure [32].

Plasma and tissue sampling: In both protocols, rats were anaesthetized with an i.p. injection of 4 ml/kg of a ketamine (20 mg/ml)–xylazine (2.5 mg/ml) solution and blood and tissues were harvested immediately thereafter. Immediately after the opening of the thoracic cage, blood was collected by cardiac puncture, centrifuged (1 500 g, 15 min at 4 °C) and the separated plasma was stored at minus 70 °C until later biochemical measurements. Inguinal, epididymal, retroperitoneal WAT, interscapular BAT, soleus, vastus lateralis, gastrocnemius (in the second protocol) and heart muscles were excised, approximately 50 mg from each tissue were homogenised and processed exactly as described earlier [3, 6] and stored at -70°C until LPL activity measurement.

Plasma measurements: Plasma glucose concentrations were measured with an automated glucose oxidase method using a Beckman glucose analyser. Insulin was measured by RIA using a reagent kit from Linco Research (St. Charles, Mo, USA) with rat insulin as standard. Plasma triglycerides were measured by an enzymatic method using a reagent kit from Boehringer Mannheim (Montréal, Québec, Canada) which allowed correction for free glycerol. Plasma NEFA were also measured by an enzymatic colorimetric technique (Wako Pure Chemical Industries, Richmond, Va, USA).

Lipoprotein lipase activity: Enzyme activity was quantified in tissue homogenates exactly as described earlier [3, 6]. Thawed tissue homogenates (100 μ l) were incubated under gentle agitation for 1 h at 28°C with 100 μ l of a substrate mixture consisting of 0.2 mol/l Tris-HCl buffer, pH 8.6, which contained 10 MBq/l [carboxyl- ^{14}C]triolein (Amersham, Oakville, Canada) and 2.52 mmol/l cold triolein emulsified in 50 g/l gum arabic, as well as 20 g/l fatty acid free bovine serum albumin, 10% human serum as a source of apolipoprotein C-II, and

either 0.2 or 2 mol/l NaCl. Free oleate released by LPL was then separated from intact triolein and mixed with Universol (NEN, Montréal, Canada), and sample radioactivity was quantified in a scintillation counter. The activity of LPL was calculated by subtracting lipolytic activity determined in a final NaCl concentration of 1 mol/l (non-LPL activity) from total lipolytic activity measured in a final NaCl concentration of 0.1 mol/l. The activity of LPL was expressed as microunits ($1\mu\text{U} = 1\ \mu\text{mol NEFA}$ released per hour of incubation at 28°C). The interassay coefficient of variation was 3.2% and was measured using bovine skim milk as a standard source of LPL. Protein content of the tissue extracts was measured by the method described previously [33]. To account for large lean-obese differences in triglyceride content per unit weight of adipose and other tissues, LPL activity was expressed as specific activity ($\mu\text{U}/\text{g}$ tissue protein).

Statistical analysis: Data are presented as means \pm SEM. Differences between individual group means were analysed by Fisher's protected least squares difference test. Differences were considered statistically significant at p less than 0.05.

RESULTS

Response of LPL activity and plasma variables to refeeding after 24 h of food deprivation

Cumulative food intake of lean and obese Zucker rats upon refeeding after a 24-h fast is summarised in Table 1. Lean and obese animals ingested food to the same extent during the first 12 h of refeeding. Thereafter, obese animals ingested more food than the lean animals. In the freely-fed state, obese Zucker rats were hyperinsulinaemic compared with their lean counterparts (Fig. 1). Food deprivation for 24 h induced a pronounced reduction in insulinaemia in obese rats, to levels that were not statistically different from those of fasted lean animals. In lean rats, refeeding induced a rise in plasma insulin concentrations within the first h, which was maintained until the sixth h. In obese animals, refeeding also led to a rapid increase in plasma insulin concentrations within 1 h, which then decreased to stable concentrations that were similar to those measured in the freely-fed state. Glycaemia was similar in lean and obese rats both in the freely-fed and the fasted states (Fig. 1). Glycaemia was not significantly affected by refeeding in lean rats, whereas in the obese strain glycaemia increased progressively until the sixth h of refeeding. Obese rats remained hyperglycemic compared with their lean counterparts throughout the 24-h refeeding period. In the freely-fed state, plasma NEFA were similar in both

strains (Fig. 1). The 24-h fast induced a sixfold increase in plasma NEFA in lean and obese rats, the latter showing NEFA concentrations that were twofold higher than those of their lean counterparts. In both lean and obese animals, refeeding abolished the fasting-induced increase in plasma NEFA concentrations, which remained stable and similar in both strains throughout the refeeding period. Obese Zucker rats were hypertriglyceridaemic compared with their lean counterparts at all times studied (Fig. 1). Triglyceridaemia was reduced by fasting and increased progressively with refeeding in both strains. By 24 h after the beginning of refeeding, all plasma variables had returned to levels observed in the freely-fed state in both lean and obese rats.

In all three WAT depots harvested in the freely-fed state, LPL activity of obese rats was at least twice as high as that of lean rats (Fig. 2). At 24 h after food removal, LPL activity was similar in both strains in the retroperitoneal depot (Fig. 2), whereas in the epididymal and inguinal depots, LPL was modestly but significantly higher in obese than in lean animals (Fig. 2). After the 24-h fasting period, refeeding resulted in a rapid (within 1 h) increase in LPL activity in all adipose depots of obese rats ($p < 0.0001$ compared with fasting values in all depots) and enzyme activity remained relatively constant until 6 h after the onset of refeeding. After 12 h of refeeding, LPL activity in WAT of obese rats had returned to that of freely-fed state in the inguinal and retroperitoneal depots, whereas longer than 12 h of refeeding was necessary for epididymal LPL to reach values measured in the freely-fed state. In lean animals, WAT LPL activity after 1 h of refeeding was similar to fasting values. By 3 h after the beginning of refeeding, a large increase was observed in the epididymal depot, and LPL activity peaked at 6 h in all three depots. At this time point, LPL activity was at least 500% higher than that observed after 24 h of food deprivation and at least twofold larger than that measured in the freely-fed state. In WAT, LPL activity decreased progressively after the sixth h of refeeding, to reach freely-fed values after 24 h of refeeding. In BAT, LPL activity responded to the feeding status similarly in both lean and obese animals, in the face of an overall lower enzyme activity in obese than in lean rats (Fig. 2). The BAT LPL was twofold higher in lean than in obese rats in the freely-fed and fasted states as well as after 24 h of refeeding. Within the first h of the refeeding period, BAT LPL increased by 60 % in lean and 160 % in obese animals. During the course of the refeeding period, no difference between strains was observed in BAT LPL activity until the 24th h of refeeding.

In the soleus, vastus lateralis and heart muscles, LPL activity was 1.5 to 2-fold lower in obese than in lean rats as measured in the freely-fed state (Fig. 3). Fasting for 24 h increased LPL activity in the soleus and the heart of both strains ($p < 0.03$), whereas a similar but non statistically significant tendency was noted in the vastus lateralis muscle. Fasting LPL activity

remained generally higher in muscles of lean animals than in those of obese rats. In soleus and vastus lateralis muscles, 1 h of refeeding resulted in rapid, opposite changes according to phenotype. Lipoprotein lipase activity of lean animals increased more than 50% in both skeletal muscles ($p < 0.0001$), whereas that of obese rats decreased by 50% ($p < 0.02$), to levels that were not different from those observed in the freely-fed state. In lean rats, LPL activity decreased progressively from 3 h after the beginning of refeeding, but did not reach freely-fed levels until the 12th h of refeeding. Skeletal muscle LPL activity in obese animals remained at low levels throughout the refeeding period. In the heart, food intake decreased LPL activity of both lean and obese rats in a similar pattern, although slightly more so in lean than in obese animals (Fig. 3).

Effects of the β -adrenergic antagonist propranolol on the LPL response to refeeding after 24 h of food deprivation

During the 1-h refeeding period, lean and obese rats spontaneously ingested approximately 5 g of food, and prior administration of propranolol had no effect on food intake in either strain (data not shown). As in the first study described above, 1 h of refeeding resulted in a larger increase in insulinaemia in obese than in lean rats and in a pronounced decrease in plasma NEFA concentrations in both lean and obese animals (Table 2). Glucose concentrations of lean and obese rats were unchanged after 1 h of refeeding. In lean rats, refeeding had no effect on triglyceridaemia, whereas the latter was decreased in obese animals. Glycaemia was the only plasma variable to be significantly altered by propranolol treatment, which increased blood glucose in both lean and obese animals.

After 24 h of fasting, WAT LPL activity of lean and obese rats was not significantly different from each other in the epididymal and the retroperitoneal depots (Fig. 4). In the subcutaneous inguinal depot, LPL activity of obese rats remained significantly higher ($p < 0.003$) than that of lean animals (Fig. 4). As in the time-course study described above, 1 h of refeeding increased WAT LPL in obese rats in the three depots studied ($p < 0.0001$), whereas it had no effect on WAT LPL of lean animals. In the latter group, propranolol injection resulted in a pronounced increase in LPL activity in the epididymal (+140%), retroperitoneal (+80%), and inguinal (+106%) depots, whereas WAT LPL of obese rats was not altered by the treatment. After 24 h of food deprivation, BAT LPL activity was lower ($p < 0.05$) in obese than in lean rats (Fig. 4). Refeeding increased LPL activity of BAT in both lean and obese animals, although slightly more so in the latter group. Propranolol abolished the food intake-induced increase in BAT LPL in lean rats but had no effect in the obese animals.

LPL activity in soleus, vastus lateralis, and gastrocnemius was similar in lean and obese rats after food deprivation (Fig. 5). As seen in the time-course study described above, 1 h of refeeding lean rats resulted in a strong increase in LPL specific activity in the soleus (+ 31%, $p < 0.03$), vastus lateralis (+ 123%, $p < 0.0001$), and gastrocnemius (+ 44%, $p < 0.001$). In contrast, 1 h of refeeding obese rats induced a reduction in LPL activity in the three skeletal muscles harvested (-30 to -50%, $p < 0.01$ in soleus and gastrocnemius, $p < 0.04$ in vastus lateralis). Giving propranolol to lean rats totally prevented the food intake-mediated increase in LPL activity in all skeletal muscles, whereas it had no effect in obese animals. In the heart, LPL specific activity of lean rats was higher ($p < 0.003$) than that of obese animals after 24 h of fasting (Fig. 5). Refeeding decreased heart LPL activity in lean rats only and this reduction was not affected by propranolol. Neither did the drug exert any notable effect on heart LPL in obese animals.

DISCUSSION

The present studies led to the identification in the Zucker rat of three novel characteristics of the response of LPL to food intake after prolonged fasting, which differ from the classic postprandial behaviour of the enzyme. Firstly, the early postprandial modulation of adipose and muscle LPL by insulin is transiently counteracted in lean rats by the activation of the SEP, the magnitude of which could be related to the duration of food deprivation that precedes refeeding. Secondly, in obese rats, the β -adrenergic pathway is defective in WAT as well as in muscle, allowing the typical, tissue-specific postprandial modulation of LPL by insulin. Thirdly, the early modulation upon refeeding of LPL activity in WAT of the obese Zucker rat is transiently resistant to the action of insulin.

Food deprivation and refeeding induce large tissue-specific changes in the availability of active LPL. Studies in rodents have shown that, in WAT, fasting reduces the active portion of LPL without affecting the synthesis or total mass of the protein, and that feeding is associated with the activation of an inactive LPL pool [34]. In congruence with the effects of fasting and feeding, insulin increases WAT LPL through post-translational mechanisms that are incompletely defined, but which are independent of transcriptional events [19, 35] for at least 8 h after exposure to insulin [36-38]. In WAT, it is thought that insulin participates in the release of active LPL, the activation of an inactive pool of enzyme present in the fasted state, and the prevention of LPL degradation [34, 39, 40]. The activity of LPL assessed here therefore

constitutes the major modulated variable in the present conditions. The similarity between the effects of the nutritional status and insulin on LPL modulation is not coincidental because we have shown that the tissue-specific changes in LPL activity brought by acute food intake after a 12-h fast are entirely dependent upon the postprandial excursions of insulinaemia [5]. In muscle tissues, fasting results in increased LPL activity [4, 41], as confirmed here, through mechanisms that are still not clear [42, 43]. Because insulin plays a critical part in the decrease in muscle LPL in response to food intake after a short-term fast [5], it can be suggested that increased muscle LPL activity in the fasted state is a consequence of the low prevailing insulinaemia.

In lean rats subjected to a mild fasting protocol such as food deprivation for 12 h during the lighted period, refeeding induces within 1 h an insulin-dependent increase in WAT and BAT LPL activity and a decrease in muscle LPL [5]. In the present study, despite an increase in insulinaemia that was similar to that in other studies conducted in the fasting-feeding transition [3, 5], WAT LPL in lean rats subjected to a 24-h fast remained unaltered after 1 h of refeeding. Such a lack of an early response under similar conditions has been reported previously [44], and it contrasts with the very early stimulation of WAT LPL after shorter-term fasting [5]. Propranolol, a non-specific β -adrenergic antagonist, restored the habitual increase in WAT LPL activity 1 h after refeeding. It is well established that in lean rats long-term treatment with β -adrenergic agonists such as isoproterenol lowers adipose and increases muscle LPL activity [6, 8]. The present findings extend the physiological significance of these effects by showing the existence of a short-term role of the SEP in the tissue-specific postprandial response of LPL to food intake after a relatively long period of food deprivation. The effect of the SEP on adipose LPL in lean rats was probably short-lived, as it seemed to be no longer present after 3 h of refeeding and beyond, at least in WAT. By 6 h into refeeding, WAT LPL activity actually increased beyond levels measured in free feeding conditions, perhaps because of the recruitment of a larger inactive enzyme pool that had accumulated during long-term fasting.

Muscle LPL activity in lean rats rapidly increased with refeeding after 24 h of food deprivation, in contrast with the reduction in LPL activity brought by food intake after a shorter-term fast [5, 41]. A similar observation has been reported previously [43] but the mechanisms of this response were not explored. Disappearance of the feeding-induced rise in muscle LPL by propranolol observed here shows that activation of the SEP was responsible for the increase in skeletal muscle LPL of lean rats to refeeding after prolonged food deprivation. This finding is consistent with food intake increasing sympathetic activity in muscle [45], and treatment of lean rats with β -adrenergic agonists increasing muscle LPL [6, 8]. It can therefore be concluded that,

as in WAT, refeeding after prolonged fasting is associated with a strong activation of the sympathetic drive to skeletal muscle, which transiently overwhelms the action of insulin on muscle LPL. As to BAT, giving propranolol to lean rats showed that the early increase in LPL was partly mediated by the β -adrenergic component of the SEP. Because both the SEP and insulin increase BAT LPL activity [46, 47], the LPL increase upon refeeding in lean rats was the result of the combined effects of β -adrenergic stimulation and high insulinaemia. Also of note is that heart LPL seemed not to be modulated short-term by the SEP in either lean or obese rats, in agreement with earlier findings in lean rats [6] and its decrease following refeeding was probably due to the concomitant rise in insulinaemia [5].

The response of tissue LPL to refeeding in obese rats differed from that of their lean counterparts in two major ways. Firstly, adipose and muscle LPL of obese animals did not respond to β -adrenergic blockade. The SEP has been reported to be defective in obese humans [48] and in genetic models of obesity [26, 49]. Given that obese Zucker rats produce less catecholamines in response to stress [23, 50], whereas their adipose tissues are able to respond to β -adrenergic agonists [51], it is likely that the absence of effect of propranolol in the obese group was due to an impaired activation of the SEP upon refeeding. Subnormal sympathetic activity has been described in BAT of obese animals [26], which is supported by the lack of effect of propranolol on BAT LPL in our study. The present findings constitute direct evidence that such a defect extends to WAT and skeletal muscle. In the absence of the influence of the SEP in obese animals, the early (1 h) increase in WAT and BAT LPL and the decrease in muscle LPL activity in response to refeeding was probably the consequence of insulin action, as is the case in lean animals refed after short-term fasting [5].

The presence of a transient resistance to the short-term action of insulin constitutes the second germane characteristic of the adipose LPL response to refeeding that distinguishes obese Zucker rats from their lean counterparts. The present findings suggest that the early postprandial modulation of adipose tissue LPL activity by insulin occurs in sequential steps, of which some appear to be insulin resistant in obese rats. An initial, rapid (within 1 h) increase in adipose LPL activity was observed with refeeding in all three WAT depots of obese rats. Adipose LPL activity in obese rats then remained at that level over 6 h after the onset of food intake and reached pre-fasting levels not earlier than 12 h after the onset of refeeding. This contrasts with the considerable increase in WAT LPL observed during this period in lean rats (500% in lean vs 200% in obese above fasting at 6 h). Although the exact nature of the post-translational events that lead to such an LPL activity profile are still to be established, it is clear that some insulin-modulated process of recruitment of active LPL in response to food intake is defective in obese

Zucker rats. Worthy of note is that a similarly abnormal postprandial modulation of tissue LPL has been observed in preliminary studies with Sprague Dawley rats with diet-induced insulin resistance (Picard F, Deshaies Y, unpublished observations). Therefore, the abnormalities of LPL modulation observed here are not specific to the Zucker rat, but appear instead to be more generally characteristic of an insulin-resistant state. Two studies in obese humans have reported such an altered modulation of adipose LPL in response to insulin infusion [18] or to a high-carbohydrate, insulinogenic meal [19]. In the obese Zucker rat, other adipose enzymes such as hormone-sensitive lipase seemed to remain sensitive to the postprandial rise in insulin, as witnessed by the large postprandial decrease in plasma NEFA. It is also important to note that adipose LPL of obese Zucker rats had nearly returned to the freely-fed levels after 12 h of refeeding, which confirms that the enzyme retains the capacity to respond to long-term hyperinsulinaemia [52], albeit in a delayed fashion.

Muscle LPL in the obese rats seemed to remain sensitive to insulin, because in absence of activation of the SEP it decreased in response to refeeding. Whether full sensitivity to insulin was maintained could not be established in the present conditions. In the heart, in which the β -component of the SEP did not modulate LPL activity, the initial decrease in LPL upon refeeding was however somewhat less pronounced in obese than in lean animals, suggesting a less efficient response to increased insulinaemia. Finally, in BAT, given the lack of effect of propranolol in obese rats, postprandial hyperinsulinaemia was probably the sole modulator of the increase in LPL activity.

The abnormalities in the modulation of LPL observed in the obese, insulin-resistant Zucker rats have potential implications in lipid metabolism. Transient resistance to the insulin-mediated postprandial activation of adipose LPL would tend to impair the clearance of plasma triglycerides [53, 54] and to contribute to the atherogenic potential of postprandial lipaemia [55], particularly in the face of the persistence of a postprandial decrease in muscle LPL activity. In addition, an insulin resistance-related defect in the activation of the β -adrenergic component of the SEP in adipose tissue and muscle could profoundly affect lipid trafficking and metabolism in conditions such as stress and exercise, which normally solicit the SEP for extended periods of time.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Ms. J. Lalonde for her expert professional assistance.

This work was supported by grants from the Medical Research Council of Canada and by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. F. Picard is the recipient of a studentship from the Medical Research Council of Canada.

REFERENCES

1. Cryer A (1987) Comparative biochemistry and physiology of lipoprotein lipase. In: Borensztajn J (ed) Lipoprotein Lipase. Evener, Chicago, pp 277-327
2. Zechner R (1997) The tissue-specific expression of lipoprotein lipase: implications for energy and lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol* 8: 77-88
3. Boivin A, Montplaisir I, Deshaies Y (1994) Postprandial modulation of lipoprotein lipase in rats with insulin resistance. *Am J Physiol* 267: E620-E627
4. Olivecrona T, Bergö M, Hultin M, Olivecrona G (1995) Nutritional regulation of lipoprotein lipase. *Can J Cardiol* 11 [suppl G]: G73-G78
5. Picard F, Naïmi N, Richard D, Deshaies Y (1999) Response of adipose tissue lipoprotein lipase to the cephalic phase of insulin secretion. *Diabetes* 48: 452-459
6. Deshaies Y, Gélóën A, Paulin A, Marette A, Bukowiecki LJ (1993) Tissue-specific alterations in lipoprotein lipase activity in the rat after chronic infusion of isoproterenol. *Horm Metab Res* 25: 13-16
7. Raynolds MV, Awald PD, Gordon DF et al. (1990) Lipoprotein lipase gene expression in rat adipocytes is regulated by isoproterenol and insulin through different mechanisms. *Mol Endocrinol* 4: 1416-1422
8. Belahsen R, Deshaies Y (1992) Modulation of lipoprotein lipase activity in the rat by the β_2 -adrenergic agonist clenbuterol. *Can J Physiol Pharmacol* 70: 1555-1562
9. Després J-P (1998) The insulin resistance-dyslipidemic syndrome of visceral obesity: effect on patients' risk. *Obes Res* 6 [Suppl. 1]: S8-S17
10. Howard B (1987) Lipoprotein metabolism in diabetes mellitus. *J Lipid Res* 28: 613-628

11. Laakso M (1996) Insulin resistance and coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol* 7: 217-226
12. Nuutila P, Raitakari M, Laine H, et al. (1996) Role of blood flow in regulating insulin-stimulated glucose uptake in humans (studies using bradykinin [^{15}O]water and [^{18}F]fluoro-deoxy-glucose and positron emission tomography). *J Clin Invest* 97: 1741-1747
13. Laine H, Knuuti MJ, Ruotsalainen U et al. (1998) Insulin resistance in essential hypertension is characterized by impaired insulin stimulation of blood flow in skeletal muscle. *J Hypertens* 16: 211-219
14. Laws A, Hoen HM, Selby JV, Saad MF, Haffner SM, Howard BV (1997) Differences in insulin suppression of free fatty acid levels by gender and glucose tolerance status. Relation to plasma triglyceride and apolipoprotein B concentrations. Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS) Investigators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 64-71
15. Terretaz J, Cusin I, Etienne J, Jeanrenaud B (1994) *In vivo* regulation of adipose tissue lipoprotein lipase in normal rats made hyperinsulinemic and in hyperinsulinemic genetically-obese (*fa/fa*) rats. *Int J Obes* 18: 9-15
16. Murthy V, Julien P, Gagné C (1996) Molecular pathobiology of the human lipoprotein lipase gene. *Pharmacol Ther* 70: 101-105
17. Després J-P (1994) Dyslipidaemia and obesity. *Baillière Clin Endocrinol Metab* 8: 629-660
18. Eckel RH (1987) Adipose tissue lipoprotein lipase. In: Borensztajn J (ed) *Lipoprotein lipase*. Evener, Chicago, pp 79-132
19. Ong JM, Kern PA (1989) Effect of feeding and obesity on lipoprotein lipase activity, immunoreactive protein, and messenger RNA levels in human adipose tissue. *J Clin Invest* 84: 305-311
20. Campfield LA, Smith FJ, Mackie G et al. (1995) Insulin normalization as an approach to the pharmacological treatment of obesity. *Obes Res* 3: S591-S603

21. Johnson PR, Greenwood MRC, Horwitz BA, Stern JS (1991) Animal models of obesity: genetics aspects. *Annu Rev Nutr* 11: 325-352
22. Sakaguchi T, Arase K, Fisler JS, Bray GA (1988) Effect of starvation and food intake on sympathetic activity. *Am J Physiol* 255: R284-R288
23. Pacak K, McCarty R, Palkovits M, et al (1995) Decreased central and peripheral catecholaminergic activation in obese Zucker rats. *Endocrinology* 136: 4360-4367
24. Scheurink AJW, Balkan B, Nyakas C, van Dijk G, Steffens AB, Bohus B (1995) Energy homeostasis, autonomic activity and obesity. *Obes Res* 3 [suppl. 5]: S721-S727
25. Bray GA (1990) Obesity: a state of reduced sympathetic activity and normal or high adrenal activity (the autonomic and adrenal hypothesis revisited). *Int J Obes* 14: 77-92
26. Dulloo AG, Miller DS (1987) Obesity: a disorder of the sympathetic nervous system. *Wld Rev Nutr Diet* 50: 1-56
27. Carneheim C, Nedergaard J, Cannon B (1988) Cold-induced β -adrenergic recruitment of lipoprotein lipase in brown fat is due to increased transcription. *Am J Physiol* 254: E155-E161
28. Eckel RH, Jensen DR, Schlaepfer IR, Yost TJ (1996) Tissue-specific regulation of lipoprotein lipase by isoproterenol in normal-weight humans. *Am J Physiol* 271: R1280-R1286
29. Mauriège P, De Pergola G, Berlan M, Lafontan M (1988) Human fat cell beta-adrenergic receptors: beta-agonist-dependent lipolytic responses and characterization of beta-adrenergic binding sites on human fat cell membranes with highly selective beta 1- antagonists. *J Lipid Res* 29: 587-601
30. Lafontan M, Berlan M (1993) Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *J Lipid Res* 34: 1057-1091
31. Paulin A, Deshaies Y (1992) Serum free fatty acids are not involved in acute exercise-induced reduction of LPL in rat tissues. *Am J Physiol* 262: E377-E382

-
32. Mantha L, Deshaies Y (1998) β -Adrenergic modulation of triglyceridemia under increased energy expenditure. *Am J Physiol* 274: R1769-R1776
 33. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275
 34. Bergö M, Olivecrona G, Olivecrona T (1996) Forms of lipoprotein lipase in rat tissues: in adipose tissue the proportion of inactive lipase increases on fasting. *Biochem J* 313: 893-898
 35. Ong JM, Kirchgessner TG, Schotz MC, Kern PA (1988) Insulin increases the synthetic rate and messenger RNA level of lipoprotein lipase in isolated rat adipocytes. *J Biol Chem* 263: 12933-12938
 36. Doolittle MH, Ben-Zeev O, Elovson J, Martin D, Kirchgessner TG (1990) The response of lipoprotein lipase to feeding and fasting. Evidence for posttranslational regulation. *J Biol Chem* 265: 4570-4577
 37. Erskine JM, Jensen DR, Eckel RH (1994) Macronutrient regulation of lipoprotein lipase is posttranscriptional. *J Nutr* 124: 500-507
 38. Semenkovich CF, Wims M, Noe L, Etienne J, Chan L (1989) Insulin regulation of lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes is mediated at posttranscriptional and posttranslational levels. *J Biol Chem* 264: 9030-9038
 39. Chan BL, Lisanti MP, Rodriguez-Boulan E, Saltiel AR (1988) Insulin-stimulated release of lipoprotein lipase by metabolism of its phosphatidylinositol anchor. *Science* 241: 1670-1672
 40. Braun JEA, Severson DL (1992) Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase. *Biochem J* 287: 337-347
 41. Borensztajn J (1987) Heart and skeletal muscle lipoprotein lipase. In: Borensztajn J (ed) *Lipoprotein Lipase*. Evener, Chicago, pp 133-148
 42. Nomura T, Hagino Y, Gotoh M, Iguchi A (1984) The effects of streptozotocin diabetes on tissue specific lipase activities in the rat. *Lipids* 19: 594-599

43. Sugden MC, Howard RM, Munday MR, Holness MJ (1993) Mechanisms involved in the coordinate regulation of strategic enzymes of glucose metabolism. *Adv Enzyme Regul* 33: 71-95
44. Bergö M, Olivecrona G, Olivecrona T (1996) Diurnal rhythms and effects of fasting and refeeding on rat adipose tissue lipoprotein lipase. *Am J Physiol* 271: E1092-E1097
45. Fagius J, Berne C (1994) Increase in muscle nerve sympathetic activity in humans after food intake. *Clin Sci* 86: 159-167
46. Carneheim C, Nedergaard J, Cannon B (1984) β -Adrenergic stimulation of lipoprotein lipase in rat brown adipose tissue during acclimation to cold. *Am J Physiol* 246: E327-E333
47. Carneheim CMH, Alexson SEH (1989) Refeeding and insulin increase lipoprotein lipase activity in rat brown adipose tissue. *Am J Physiol* 256: E645-E650
48. MacDonald IA (1995) Advances in our understanding of the role of the sympathetic nervous system in obesity. *Int J Obes* 19 [Suppl 7]: S2-S7
49. Krief S, Bazin R (1991) Genetic obesity: is the defect in the sympathetic nervous system? A review through developmental studies in the preobese Zucker rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 198: 528-538
50. Rosenthal M, Roth J, Störr B, Zeisberger E (1996) Fever response in lean (*Fa*⁻) and obese (*fa/fa*) Zucker rats and its lack to repeated injections of LPS. *Physiol Behav* 59: 787-793
51. Marie V, Dupuy F, Bazin R (1994) Acute injection of β -adrenoceptor agonist BRL 35135 corrects both impaired uncoupling protein and lipoprotein lipase gene expression but not hypercapacity of lipogenesis in brown adipose tissue of suckling *fa/fa* rats. *Int J Obes* 18: 273-279
52. Fried SK, Turkenkopf IJ, Goldberg IJ et al. (1991) Mechanisms of increased lipoprotein lipase in fat cells of obese Zucker rats. *Am J Physiol* 261: E653-E660

53. Potts JL, Coppack SW, Fisher RM, Humphreys SM, Gibbons GF, Frayn KN (1995) Impaired postprandial clearance of triglycerol-rich lipoproteins in adipose tissue in obese subjects. *Am J Physiol* 268: E588-E594
54. Coppack SW, Evans RD, Fisher RM et al. (1992) Adipose tissue metabolism in obesity: lipase action in vivo before and after a mixed meal. *Metabolism* 41: 264-272
55. Zilversmit DB (1995) Atherogenic nature of triglycerides, postprandial lipemia, and triglyceride-rich remnant lipoproteins. *Clin Chem* 41: 153-158

TABLES

Table 1. Cumulative food consumption (g) during the last 24 h before death in lean and obese Zucker rats.

	Lean (<i>Fa/?</i>)	Obese (<i>fa/fa</i>)
Freely fed	18.5 ± 0.3	32.0 ± 3.1*
Food deprived 24h (FD24)	—	—
FD24 + 1h refeeding	3.2 ± 0.6	3.8 ± 0.6
FD24 + 3h refeeding	5.2 ± 0.2	5.5 ± 0.7
FD24 + 6h refeeding	9.2 ± 0.2	11.3 ± 1.0
FD24 + 12h refeeding	14.3 ± 0.7	16.7 ± 1.6
FD24 + 24h refeeding	19.7 ± 0.6	27.7 ± 1.4 *

The freely fed group was not food deprived.

* Different from lean animals, $p < 0.05$. Values are means ± SEM (n = 4).

Table 2. Plasma glucose, insulin, nonesterified fatty acids (NEFA), and triglycerides in lean and obese Zucker rats killed either after a 24-h fast, or 1 h of subsequent refeeding with or without prior i.p. injection of propranolol (Prop).

	Lean <i>Fa/?</i>			Obese <i>fa/fa</i>		
	Fasted	Refed + Saline	Refed + Prop	Fasted	Refed + Saline	Refed + Prop
Glucose (mmol/l)	6.6 ± 0.9 ^a	7.0 ± 0.2 ^a	8.2 ± 0.4 ^a	10.9 ± 0.8 ^b	12.1 ± 1.1 ^b	15.7 ± 1.0 ^c
Insulin (nmol/l)	0.07 ± 0.02 ^a	0.41 ± 0.10 ^b	0.57 ± 0.13 ^b	0.33 ± 0.02 ^b	2.61 ± 0.57 ^c	2.75 ± 0.60 ^c
NEFA (mmol/l)	0.37 ± 0.02 ^a	0.06 ± 0.01 ^b	0.10 ± 0.02 ^b	0.67 ± 0.03 ^c	0.10 ± 0.01 ^b	0.11 ± 0.01 ^b
Triglycerides (mmol/l)	0.48 ± 0.06 ^a	0.47 ± 0.08 ^a	0.78 ± 0.25 ^a	1.83 ± 0.34 ^b	0.87 ± 0.07 ^c	1.10 ± 0.17 ^c

Values are means ± SEM of five animals. Means not sharing a common superscript are different from each other ($p < 0.05$).

FIGURE LEGENDS

- Figure 1 Plasma insulin (A), glucose (B), nonesterified fatty acids (C), and triglycerides (D) in lean and obese Zucker rats killed either before (freely fed) or after a 24-h fast (0 h of refeeding) or at different times after subsequent refeeding. Symbols represent means \pm SEM of four animals. * Different from lean rats ($p < 0.05$).
- Figure 2 Specific activity of lipoprotein lipase in epididymal (A), inguinal (B) and retroperitoneal (C) white adipose depots, and in interscapular brown adipose tissue (D) of lean and obese Zucker rats killed either before (freely fed) or after a 24-h fast (0 h of refeeding), or at different times after subsequent refeeding. Symbols represent means \pm SEM of four animals. * Different from lean rats ($p < 0.05$).
- Figure 3 Specific activity of lipoprotein lipase in soleus (A) and vastus lateralis (B) skeletal muscles, and in the heart (C) of lean and obese Zucker rats killed either before (freely fed) or after a 24-h fast (0 h of refeeding), or at different times after subsequent refeeding. Symbols represent means \pm SEM of four animals. * Different from lean rats ($P < 0.05$).
- Figure 4 Specific activity of lipoprotein lipase in epididymal (A) inguinal (B) and retroperitoneal (C) white adipose depots, and in interscapular brown adipose tissue (D) of lean and obese Zucker rats killed either after a 24-h fast or 1 h of subsequent refeeding with or without prior i.p. injection of propranolol (25 mg/kg). Bars represent means \pm SEM of five animals. Bars not sharing a common symbol are significantly different from each other at $p < 0.05$.
- Figure 5 Specific activity of lipoprotein lipase in soleus (A) vastus lateralis (B) and gastrocnemius (C) skeletal muscles and in the heart (C) of lean and obese Zucker rats killed either after a 24-h fast, or 1 h of subsequent refeeding with or without prior i.p. injection of propranolol (25 mg/kg). Bars represent means \pm SEM of five animals. Bars not sharing a common symbol are significantly different from each other at $p < 0.05$.

FIGURES

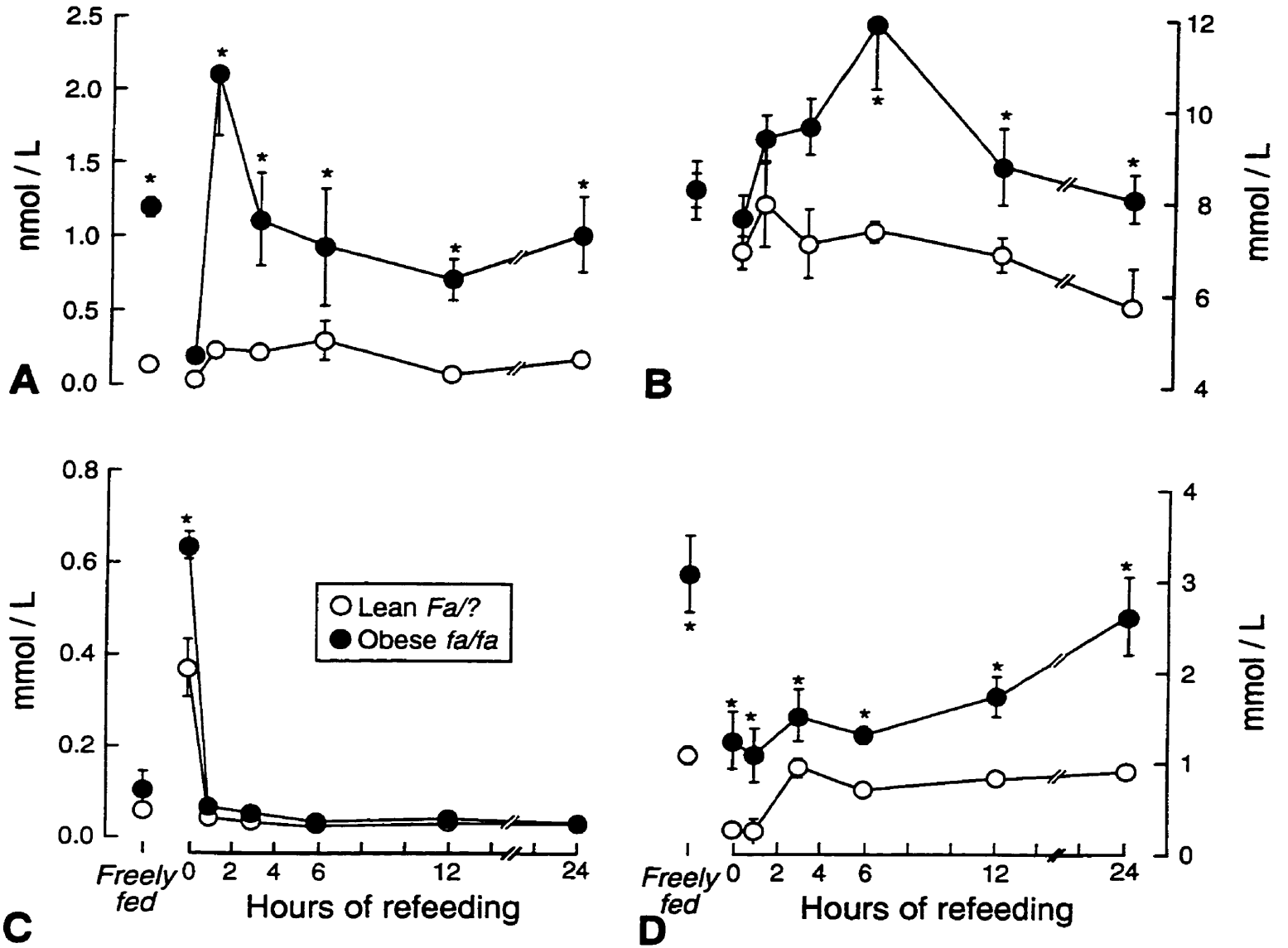


Figure 1

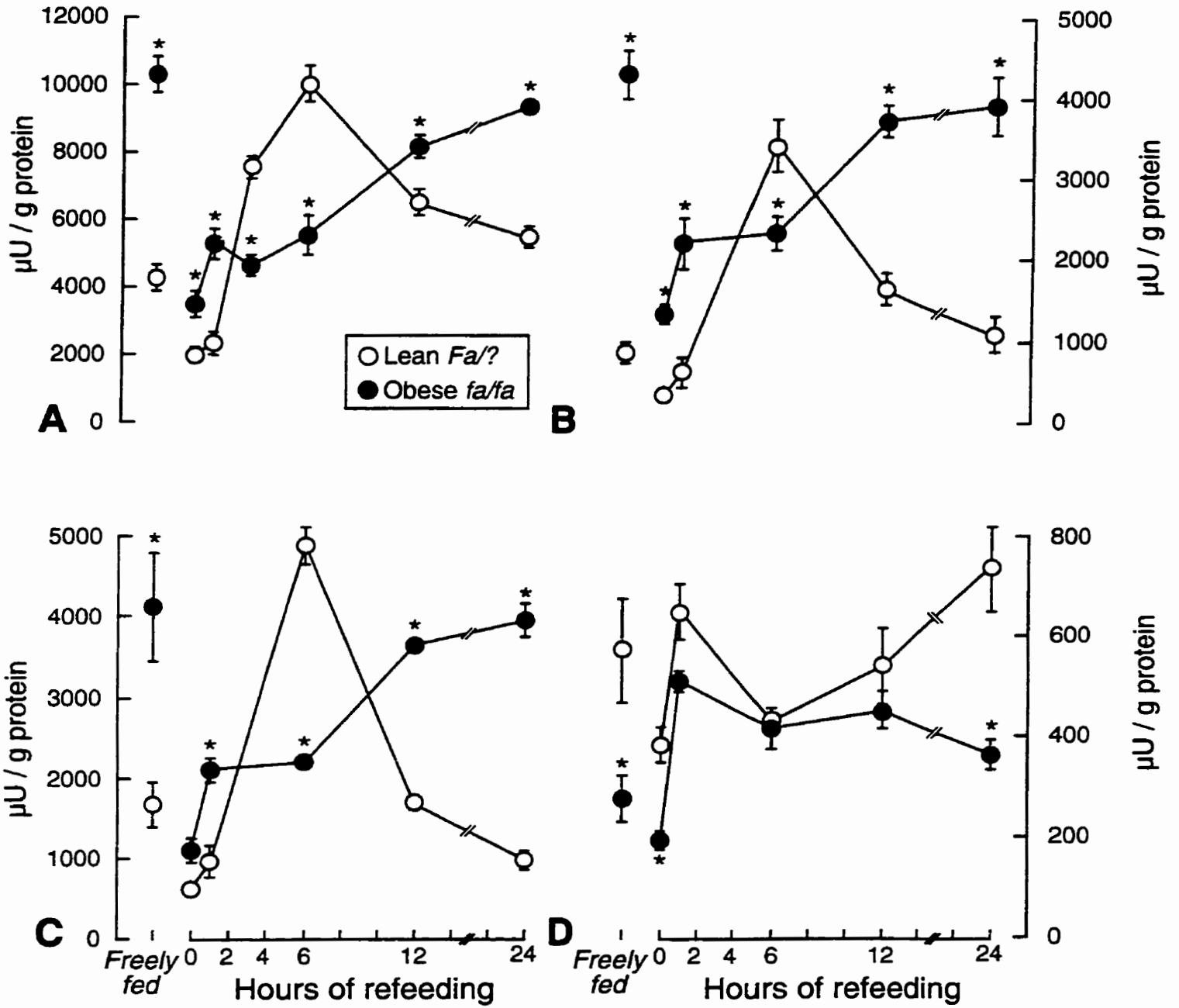


Figure 2

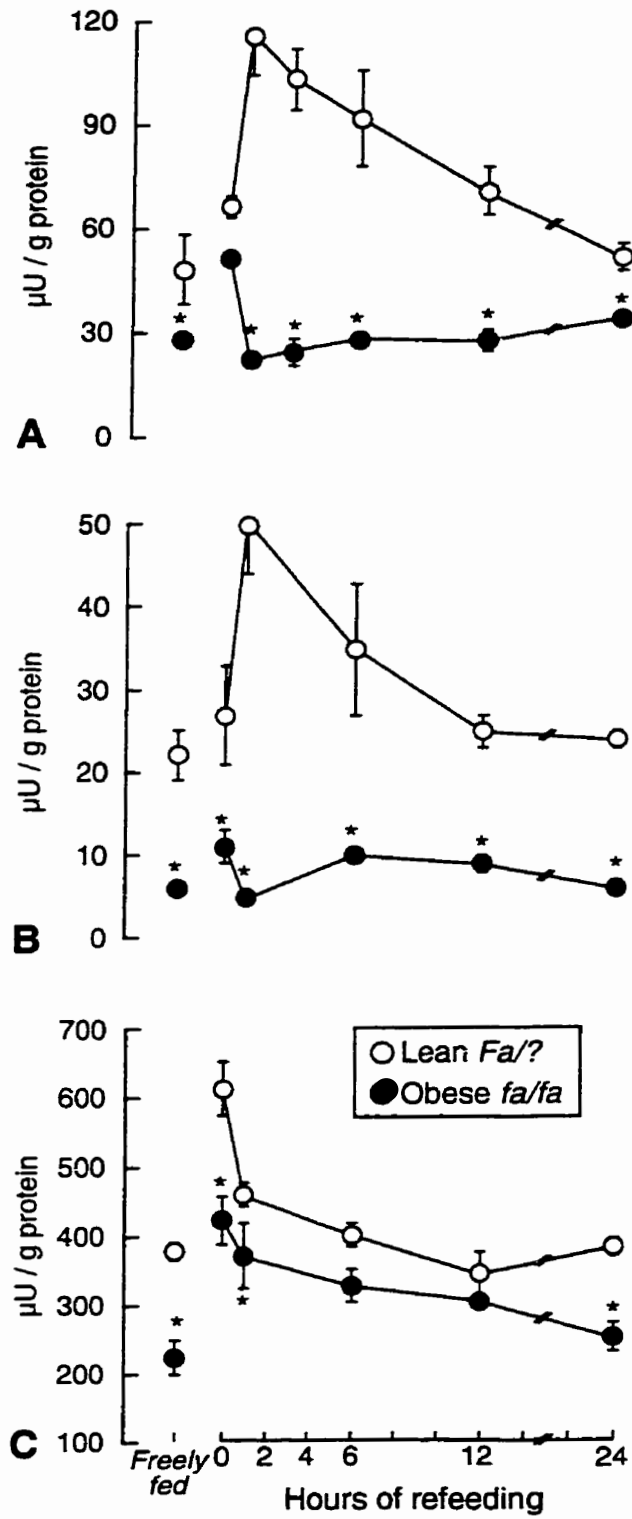


Figure 3

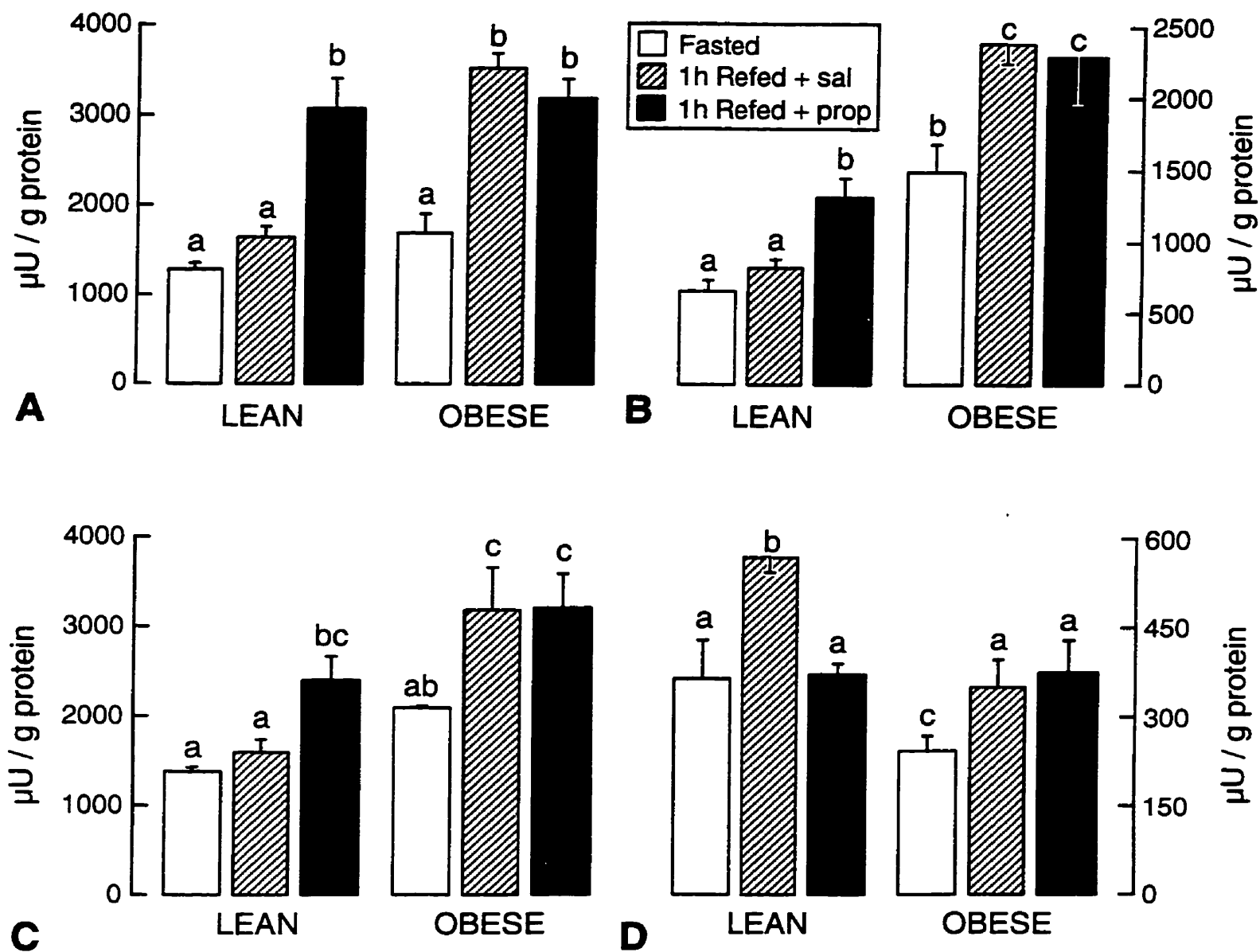


Figure 4

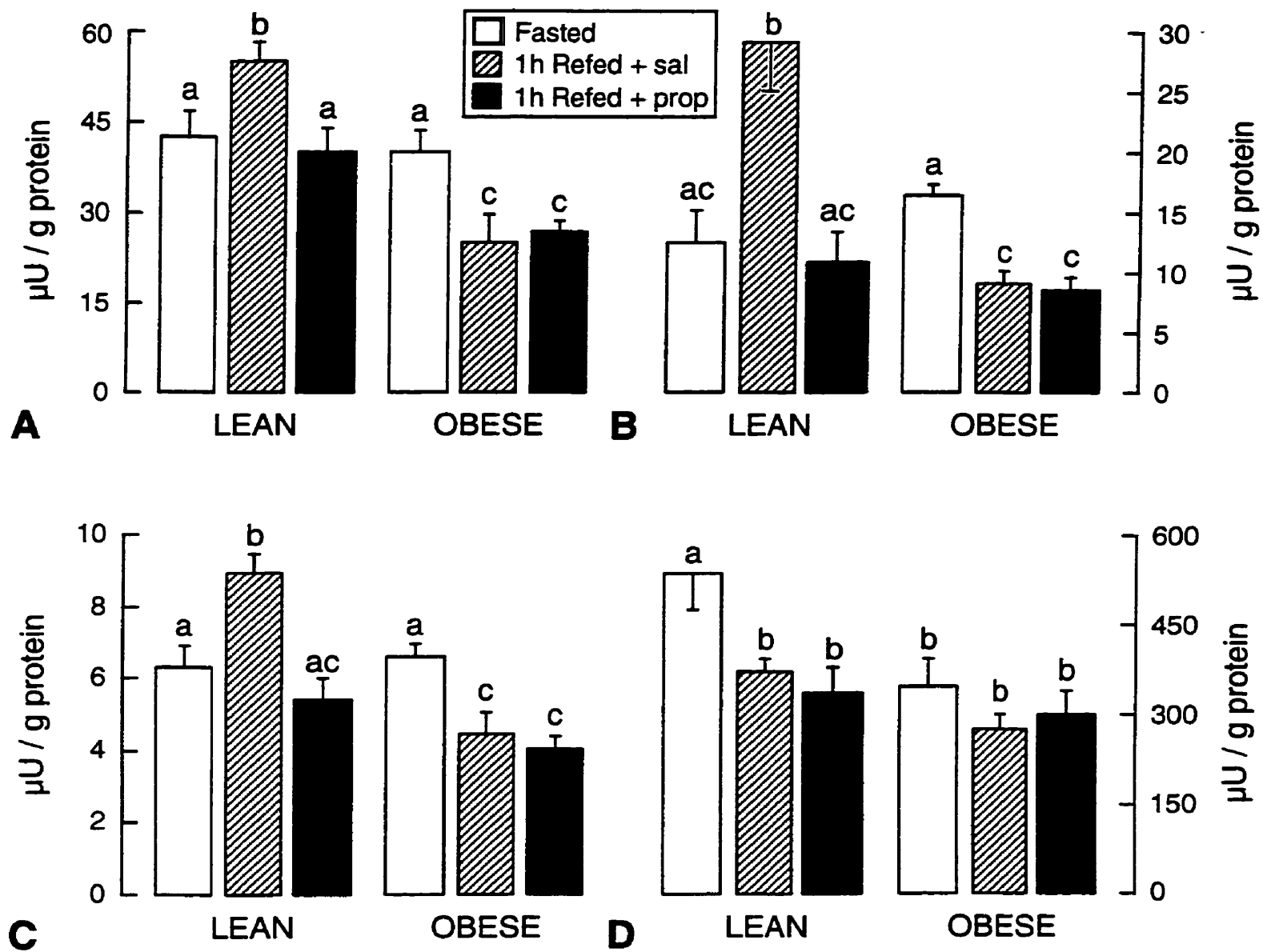


Figure 5

CHAPITRE 3

RESISTANCE OF ADIPOSE TISSUE LIPOPROTEIN LIPASE TO THE POSTPRANDIAL ACTION OF INSULIN IN HIGH-SUCROSE, HIGH-FAT-FED RATS

Frédéric PICARD, André BOIVIN, Josée LALONDE and Yves DESHAIES

Center for Research on Energy Metabolism, and
Department of Physiology, School of Medicine
Laval University, Québec, QC, Canada G1K 7P4

Soumis à American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism

RÉSUMÉ

La lipoprotéine lipase (LPL), située à la surface luminale des capillaires, est l'enzyme responsable de l'hydrolyse et de l'élimination des triglycérides circulants. La stimulation de l'activité de la LPL en phase postprandiale est médiée par l'augmentation concomitante de l'insulinémie. Il a été démontré que l'élimination des triglycérides par le tissu adipeux est altérée chez les individus obèses dont le métabolisme du glucose est résistant à l'action de l'insuline (résistance à l'insuline). L'objectif de la présente étude était de vérifier si la LPL du tissu adipeux pouvait aussi devenir résistante à l'action de l'insuline dans un modèle nutritionnel de résistance à l'insuline. Des rats Sprague-Dawley ont été nourris pendant quatre semaines avec un régime riche en sucrose et en graisses (RSG) (40% de l'énergie chacun), et comparés avec des rats témoins nourris avec de la moulée moulue pendant la même période. Le RSG a fortement altéré la sensibilité du métabolisme du glucose à l'insuline, tel que déterminé par clamp euglycémique-hyperinsulinémique (réduction de 59% du taux d'infusion de glucose par rapport aux rats témoins). Les rats des deux groupes ont été privés de nourriture pendant 24 heures de façon à ce que l'activité de la LPL adipeuse et l'insulinémie soient semblables entre les deux groupes. Les rats ont ensuite été renourris avec de la moulée en croquettes pendant 1, 3, 6, 12 et 24 heures. L'insulinémie postprandiale était similaire chez les deux groupes d'animaux jusqu'à la deuxième heure d'alimentation, alors que la glycémie était plus élevée chez les rats chroniquement nourris au RSG, ce qui indique une intolérance au glucose et une résistance à l'insuline chez ce dernier groupe de rats. Chez les rats témoins, l'activité de la LPL a presque doublé entre la troisième et la sixième heure d'alimentation dans les dépôts adipeux inguinal, rétropéritonéal et épидидymaire. À l'opposé, la LPL adipeuse chez les rats nourris au RSG a été augmentée d'un maximum de 30% pendant cette période, même si leur insulinémie était semblable à celle des rats témoins. La triglycéridémie postprandiale était significativement plus élevée chez les rats insulino-résistants que chez les animaux témoins trois heures après le début de l'alimentation. Ces résultats démontrent que la stimulation de la LPL adipeuse en phase postprandiale peut devenir, à l'instar du métabolisme du glucose, résistante à l'action de l'insuline suite à l'ingestion chronique d'un régime riche en sucre et en graisses. Ils suggèrent aussi que des altérations dans la modulation de la LPL peuvent exacerber l'hypertriglycéridémie postprandiale en diminuant l'élimination intravasculaire des triglycérides.

SUMMARY

Lipoprotein lipase (LPL) is an endothelium-bound enzyme responsible for the peripheral hydrolysis and clearance of circulating triglycerides. The stimulation of its activity in adipose tissue during refeeding is brought about by the concomitant rise in plasma insulin. Since impaired clearance of plasma triglycerides in adipose tissue has been described in obese subjects with resistance of glucose metabolism to insulin (insulin resistance), the present study was aimed at assessing whether adipose LPL also becomes resistant to insulin in a nutritional model of insulin resistance. Sprague-Dawley rats were fed for 4 weeks a non-purified diet (ground chow) or a purified high-sucrose, high-fat (HSHF) diet (40% of total caloric energy each), which induced overt insulin resistance, as measured by the euglycemic-hyperinsulinemic clamp (59% reduction in glucose infusion rate compared to controls). Both groups were fasted for 24 h so as to bring insulinemia and adipose LPL to similar levels in normal and insulin-resistant animals. They were then refed for 1, 3, 6, 12, or 24 h with pelleted chow. Until the 12th h of refeeding, the rise in plasma insulin levels was similar in both groups, although glycemia was higher in HSHF-fed rats than in control animals, indicating glucose intolerance and insulin resistance. In control rats, LPL specific activity at least doubled between the third and the sixth h of refeeding in inguinal, retroperitoneal and epididymal white adipose depots. In diet-induced insulin-resistant rats, LPL increased during that same period to a maximum of 30% despite insulinemia similar to that of control rats. Postprandial triglyceridemia at 3 h post-refeeding was significantly higher in insulin-resistant than in control rats. These results demonstrate that adipose LPL becomes resistant to the action of insulin as glucose metabolism does, and that chronic HSHF feeding alters the postprandial modulation of adipose LPL by insulin. The findings further suggest that modifications in adipose LPL modulation could heighten postprandial hypertriglyceridemia through attenuated triglyceride clearance.

INTRODUCTION

Elevated postprandial triglyceridemia is considered to be a condition of high atherogenic potential (21,38). It has been suggested that the modulation of plasma triglyceride (TG) levels after a meal may be more closely related to the rate of TG clearance than to that of TG secretion (9,10,28,30). Lipoprotein lipase (LPL, EC 3.1.1.34), bound to the vascular endothelium of capillaries, is the key enzyme responsible for the hydrolysis of circulating TG (36). Therefore, postprandial LPL activity is likely to be an important factor in the modulation of plasma TG levels after a meal (8).

The postprandial modulation of LPL activity is tissue-specific (36). Meal intake increases LPL activity in adipose tissue by as yet incompletely defined post-translational mechanisms (14), whereas it decreases enzyme activity in muscles (26). We have recently shown that the rise in insulin was a necessary and sufficient determinant of the meal-induced changes in LPL in both adipose and muscle tissues (26).

Recent observations indicate that resistance of glucose metabolism to the action of insulin is associated with abnormal rates of TG clearance in the postprandial state (10,28). Muscle LPL activity appears to respond normally to food intake or insulin in obese and/or insulin-resistant rats (5,15,26,29), suggesting that in this tissue, LPL does not become resistant to the action of insulin. On the other hand, impaired stimulation of adipose tissue LPL activity has been reported in insulin-resistant obese humans compared to lean subjects 4 h after ingestion of a high-carbohydrate meal (24) or 6 h after an euglycemic-hyperinsulinemic clamp (13). However, another study showed that adipose LPL activity was similarly increased in lean and obese Zucker rats after an insulinogenic meal (2). In the latter study, LPL activity was measured after an overnight fast, which was not sufficient to decrease adipose LPL activity to that of controls, which could have partially affected the subsequent response to feeding (23). Indeed, postprandial activation of adipose LPL involves several consecutive steps (1), and it is possible that insulin resistance affects one or more of these particular steps. This supports the assumption that the optimal conditions for assessing the LPL response to feeding in insulin sensitive and insulin resistant models should include similar pre-feeding enzyme activity. Because of these considerations, whether adipose LPL modulation becomes resistant to the action of insulin during the postprandial state remains unclear. This issue could be critical to explain the higher circulating TG levels (11) and impaired TG clearance seen in insulin-resistant individuals during feeding (10,28), particularly in the face of a persistent decrease in muscle LPL activity.

This study was aimed at assessing the response of adipose tissue LPL to refeeding in 24-h fasted control, insulin-sensitive rats and overweight animals made insulin resistant by chronic (4 weeks) ingestion of a high-sucrose, high-fat diet. The diet has been previously used by us (15) and others (17) and is a strong inducer of insulin resistance in rats. The length of fasting was chosen for its ability to reduce both insulinemia and adipose LPL activity of obese rats to that of control, insulin-sensitive rats (27), since insulin levels remain higher in insulin resistant rats than in controls after an overnight fast (4,15). Finally, chow was given to both groups of rats during refeeding to allow comparison of LPL responses to a meal similar in size and nutrient composition.

MATERIAL AND METHODS

Animals and treatments

One hundred and twenty male Sprague-Dawley rats initially weighing 175-200 g were purchased from Charles River Laboratories (St-Constant, Canada) and housed individually in stainless steel cages in a room kept at $23 \pm 1^\circ\text{C}$ with a 12:12 h light-dark cycle (lights on at 20:00). The animals were cared for and handled in conformance with the Canadian Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the protocols were approved by our institutional animal care committee. Rats had free access to tap water and a stock diet (Charles River Rodent Diet # 5075, Ralston Products, Woodstock, Canada). Two days after their arrival, half of the rats were given the ground stock diet, whereas the other half were fed a purified diet consisting of 41% energy as carbohydrate, 39% as fat, and 20% as protein. The composition of the diet was the following (in $\text{g}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ diet): sucrose, 45.0; corn oil, 10.0; lard, 10.0; casein, 22.5; DL-methionine, 0.3; vitamin mix (Teklad n° 40060, Teklad Test Diets, Madison WI), 1.2; mineral mix (AIN-76, ICN Biochemicals, Montréal, QC, Canada), 5.5; Alphacel, 5.5. This high-sucrose, high-fat diet (HSHF) has been shown to rapidly induce insulin resistance in peripheral tissues, including adipose tissues and muscles (15,17). A subgroup of 36 rats was used after two weeks of feeding to perform euglycemic-hyperinsulinemic clamps (see below). Two weeks later (i.e. after a total period of 4 weeks), the remaining 84 rats were killed one h after the beginning of the lighted period, either after a 24-h fast or after 1, 3, 6, 12, and 24 h of refeeding following 24 h of food deprivation. This period of fasting was chosen because of its ability to decrease both insulinemia and adipose LPL of insulin resistant rats to levels observed in insulin sensitive animals (4,15,27). During the refeeding period, both chow and HSHF-fed rats were given pelleted rodent chow, as a preliminary study indicated that this procedure temporarily

limited food intake of chow-fed rats to that of HSHF-fed rats, whose food intake was otherwise reduced because of the change in diet. This allowed comparison of changes in LPL activity independently of meal size. The protocol also allowed comparison of groups at the same time of the circadian glucocorticoid rhythm. Rats were anesthetized with an i.p. injection of 0.4 ml/kg of a ketamine (20 mg/ml): xylazine (2.5 mg/ml) solution, and blood and tissues were harvested immediately thereafter (see below).

Hyperinsulinemic-euglycemic clamp

Thirty-six rats were cannulated into the right jugular vein and left carotid artery under isoflurane anesthesia. Two days after surgery, food was removed at 22:00. The next day, following a 12-h fast, nine rats from each of the two dietary cohorts were infused for two hr with the carrier solution (0.1% albumin [Fraction V, fatty acid free, Sigma, St.Louis, MO] dissolved in 0.9% NaCl), whereas the remaining nine animals from both cohorts were subjected to a two-hr euglycemic-hyperinsulinemic clamp. The clamp was performed essentially as described by Kraegen et al. (19). Rats were allowed to rest for 20 minutes after having been fitted for the infusions. Insulin ($150 \text{ mU}\cdot\text{mL}^{-1}$) dissolved in the carrier solution was infused at a rate of $4.1 \text{ mU}\cdot\text{kg body weight}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ into the jugular vein. Every five minutes, 20 μL of blood were taken from the carotid cannula to measure glycemia. The cannula was then flushed of blood with 3% Na citrate dissolved in 0.9% NaCl. A 25% glucose solution dissolved in 0.9% NaCl was infused into the jugular vein from the beginning of the clamp and was adjusted thereafter to maintain glycemia near the fasting level. Sham infusions were performed similarly, except that no insulin was present in the NaCl/albumin solution and that no glucose was infused. Blood was also collected before and after the clamp and kept on ice until centrifuged (1500 g, 4°C, 15 min). The separated plasma was stored at -70°C until later insulin measurement.

Plasma and tissue sampling

Immediately after the opening of the thoracic cage, blood was collected by cardiac puncture, centrifuged (1,500g, 15 min at 4 °C), and the separated plasma was stored at -70 °C until later biochemical measurements. Inguinal, epididymal and retroperitoneal white adipose tissues were excised, and approximately 50 mg from each tissue were homogenized with all-glass tissue grinders (Kontes, Vineland, NJ, USA). Adipose tissue samples were homogenized in 1 ml of a solution containing 0.25 mol/L sucrose, 1 mmol/L EDTA, 10 mmol/L Tris-HCl, and 12 mmol/L deoxycholate, pH 7.4. Homogenates were centrifuged (12,000 g, 20 min at 4°C), and the fraction between the upper fat layer and the bottom sediment was removed, diluted

with 4 volumes of the homogenization solution without deoxycholate, and stored at -70°C until lipoprotein lipase activity measurement.

Plasma determinations

Plasma glucose concentrations were measured by the glucose oxidase method with the Beckman glucose analyzer. Insulin was determined by RIA using a reagent kit from Linco Research (St. Charles, MO, USA) with rat insulin as standard. Plasma triglycerides were measured by an enzymatic method using a reagent kit from Boehringer Mannheim (Montréal, Canada) which allowed correction for free glycerol. Plasma nonesterified fatty acids (NEFA) were also determined by an enzymatic colorimetric technique (Wako Pure Chemical Industries, Richmond, VA).

Measurement of tissue LPL activity

Thawed tissue homogenates (100 μl) were incubated under gentle agitation for 1 h at 28°C with 100 μL of a substrate mixture consisting of 0.2 mol/L Tris-HCl buffer, pH 8.6, which contained 10 MBq/L [carboxyl- ^{14}C]triolein (Amersham, Oakville, Canada) and 2.52 mmol/L cold triolein emulsified in 50 g/L gum arabic, as well as 20 g/L fatty acid free bovine serum albumin, 10% human serum as a source of apolipoprotein C-II, and either 0.2 or 2 mol/L NaCl. Free oleate released by LPL was then separated from intact triolein and mixed with Universol (NEN, Montréal, Canada), and sample radioactivity was determined in a scintillation counter. LPL activity was calculated by subtracting lipolytic activity determined in a final NaCl concentration of 1 mol/L (non-LPL activity) from total lipolytic activity measured in a final NaCl concentration of 0.1 mol/L. LPL activity was expressed as microunits ($1\mu\text{U} = 1\mu\text{mol}$ nonesterified fatty acids released per h of incubation at 28°C). The interassay coefficient of variation was 4.1%, and was determined using bovine skim milk as a standard source of LPL. Protein content of the tissue extracts was measured by the method of Lowry et al. (20). Data are expressed as specific activity of LPL ($\mu\text{U}/\text{g}$ tissue protein).

Statistical analysis

Data are presented as means \pm S.E.M. The clamp data were analyzed by factorial ANOVA. For the postprandial study, differences between individual group means were analyzed by Fisher's protected least squares difference (PLSD) test. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Hyperinsulinemic-euglycemic clamp

Diet and time (before versus after insulin infusion) interacted significantly on plasma insulin concentrations (Fig. 1, panel A). HSHF-fed rats were hyperinsulinemic (+103%) compared to their chow fed counterparts prior to the onset of insulin infusion, whereas insulinemia was comparable in both cohorts at the end of the 2-h infusion. Plasma insulin was increased significantly by exogenous insulin infusion to approximately 4 nM in both dietary groups. Although glycemia achieved during insulin infusion was comparable in the chow and HSHF-fed rats (Fig. 1, panel B), pre-infusion glucose levels were slightly higher in the HSHF than in the chow fed group (+14%, $P < 0.05$ when compared at this single time point). The coefficient of variation of glucose during the infusions never exceeded 10%. The sham infusion did not alter plasma glycemia (data not shown). The steady state glucose infusion rate needed to maintain euglycemia (Fig. 1, panel C) in the HSHF-fed rats was 41% of that in the chow cohort (average between 60 and 120 min: 9.28 ± 0.03 vs 22.47 ± 0.02 $\text{mg}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, $P < 0.0001$, $n=8$ and 9, respectively).

Postprandial time course of adipose LPL

Compared to chow, chronic ingestion for four weeks of the HSHF diet resulted in larger increases in body weight ($P < 0.004$) and adipose tissue weight ($P < 0.0001$) for all depots studied (Table 1), which reflected larger energy intake (average: 413 ± 11 vs 258 ± 14 kJ/day, $P < 0.0001$) as previously reported (15,22).

Pelleted chow intake in 24-h fasted rats was similar in both chow and HSHF-fed animals until the 12th h of refeeding (Table 2). Food intake thereafter (from 12 to 24 h) was larger in chow-fed animals than in HSHF-fed rats, possibly because of the novelty of the chow diet, which may have reduced appetite in rats chronically fed the HSHF diet.

At the end of the fasting period, no difference in plasma insulin, glucose, triglyceride or nonesterified fatty acid (NEFA) concentrations was observed between chow and HSHF-fed rats (Figure 1). As expected, food intake increased glycemia and insulinemia of both groups. However, despite similar plasma insulin concentrations, HSHF-fed rats had higher levels of glucose than chow-fed animals at 3 and 6 h after the beginning of the refeeding period ($P <$

0.0001), which indicates resistance of glucose metabolism to the action of insulin in the former group. The reduction in plasma NEFA was slower in HSHF-fed animals than in chow-fed rats ($P = 0.003$ between groups at 1 h), however NEFA concentrations had reached *ad libitum* values (not shown) from the 3rd h of refeeding in both groups. Triglyceridemia was significantly higher in HSHF-fed rats than in controls at 3 h upon refeeding ($P < 0.01$). Most likely because of a reduced food intake in HSHF-fed animals compared to chow-fed rats from the 12th h upon refeeding, triglyceride levels were lower than in their chow-fed counterparts at 12 and 24 h after the beginning of food intake.

In the three depots studied (retroperitoneal, epididymal and subcutaneous inguinal), LPL specific activity ($\mu\text{U/g}$ tissue protein) was not significantly different between the two groups after the 24-h fast. Refeeding increased LPL activity in all the depots studied in chow-fed animals ($P < 0.0001$), which peaked at 3 h in the inguinal and epididymal depots, and further increased at 6 h in retroperitoneal white adipose tissue ($P < 0.05$). LPL remained elevated in the epididymal depot until the 24th h of refeeding, whereas LPL had returned to pre-fasting levels by the 6th or the 12th h in the inguinal and retroperitoneal depots, respectively (data not shown). In HSHF-fed animals, food intake significantly increased LPL activity in the inguinal depot only after 12 h of refeeding ($P = 0.02$) and not before the 24th h upon refeeding in the other two depots ($P < 0.05$). Three h after the beginning of the refeeding period, LPL activity was at least twofold higher in chow-fed rats than in HSHF-fed animals ($P < 0.003$ for all depots studied), which coincided with the time point where triglyceridemia was different between the two groups.

Since insulin resistance, fat mass accretion and adipose LPL are often associated, mean LPL activity of the three depots was plotted against mean adipose depot weight (Figure 3). When plotted at the third h of refeeding, mean LPL activity was negatively correlated with the mean of the three adipose depot weights (panel A, $r = 0.743$, $P < 0.01$). At this time point, mean LPL activity was positively correlated with insulinemia for both chow-fed (panel B, $r = 0.807$, $P < 0.05$) and HSHF-fed animals ($r = 0.869$, $P < 0.05$). However, the slope of the fitted curve for the HSHF-fed group was significantly lower ($P < 0.05$) than that for the chow-fed group (panel B).

DISCUSSION

The studies described herein were designed to determine whether after a meal adipose tissue LPL stimulation becomes resistant to the postprandial action of insulin in diet-induced insulin resistant rats. The results demonstrate that, after 24 h of food deprivation, the short-term activation of adipose tissue LPL upon refeeding is impaired in insulin-resistant rats compared to control animals, and that a HSHF diet alters the postprandial modulation of LPL by insulin. The findings further support the hypothesis that modifications in adipose LPL modulation may exacerbate postprandial triglyceridemia through attenuated clearance.

The nutritional paradigm of the present study has been previously used by us and others for the induction of insulin resistance in rats (15,31). It has been determined that the sucrose component of the diet potentiates the effects of high-fat diets on insulin-stimulated glucose uptake (17,18,37). In rats fed during two weeks the HSHF diet, pre-clamp hyperinsulinemia confirmed the well-established consequences of such diets on glucose and insulin homeostasis (17,18). Plasma steady state insulin levels at the end of the clamp were similar in both dietary cohorts. During the steady state portion of the clamp (60 to 120 min), the glucose infusion rate necessary to maintain euglycemia was 59% lower in the HSHF than in the chow fed rats, suggesting whole body insulin resistance of glucose metabolism in the HSHF cohort. Defective glucose uptake in rats fed a HSHF diet for three weeks has been localized to skeletal muscle, white adipose tissue and the liver in studies performed with glucose tracers and an insulin infusion rate similar to that used herein (35). Insulin suppression of hepatic glucose output might have been reduced in the HSHF cohort in comparison to chow fed rats, and consequently the difference in glucose disposal might have been smaller than that in the glucose infusion rate. However, previous studies agree that reduced peripheral glucose disposal contributes significantly to the impairment of glucose metabolism in the dietary model of insulin resistance used herein (18,35).

The length of fasting (24 h) was chosen because of its ability to decrease both insulinemia and adipose LPL of insulin resistant rats to levels observed in insulin sensitive animals (27). In diet-induced insulin resistant (15) rats and in obese Zucker rats (4), hyperinsulinemia persists after overnight (12 h) food deprivation, which was also demonstrated in the present study (see pre-clamp insulinemia, figure 1A). Therefore, fasting insulinemia cannot be taken as an index of insulin resistance after a 24-h fast in the present conditions, as insulin sensitive (chow-fed) rats and insulin resistant (HSHF-fed) animals had similar plasma insulin levels before the refeeding period. Although direct measurement of insulin resistance was

not performed in rats fed during four weeks, the higher postprandial glycemia in HSHF-fed rats is an indication of glucose intolerance and insulin resistance, and corroborates the clamp studies performed two weeks earlier. Indeed, it is likely that the effects of the HSHF diet on insulin resistance persisted, if not increased, during the last two weeks of HSHF diet ingestion. The larger postprandial excursion of glucose in HSHF-fed rats could not have been caused by differences in acute food consumption since both groups had similar pelleted chow intake upon refeeding, at least until the 12th h.

The postprandial modulation of LPL is mediated by insulin (26). The rise in insulinemia upon feeding is a sufficient and necessary condition to stimulate LPL activity in adipose tissue and to decrease it in muscle (26). In adipose tissue, the increase in LPL activity is induced by as yet poorly understood mechanisms, which do not involve changes in LPL mRNA or total mass during at least the first eight h following food intake (1,12,14,24,25,33). The activity of LPL assessed here therefore constitutes the major modulated variable in the present conditions. This modulation probably involves several steps, including the release of active LPL as well as the activation of an inactive pool present in the fasted state (1,7), and possibly a reduced rate of LPL degradation (3,34).

The present findings clearly demonstrate that, in diet-induced insulin-resistant rats, the postprandial modulation of LPL in adipose tissue is impaired. Indeed, acute food intake resulted in at least a 100% increase in adipose LPL specific activity in chow-fed rats during the first 6 h upon refeeding, as opposed to a small (less than 30%), non-significant LPL elevation in animals chronically fed the HSHF diet. These differences were associated with similar increases in insulinemia until the 12th h upon refeeding. Thus, it can be argued that insulin resistance brought about by chronic ingestion of a HSHF diet affects at least one step of LPL activation in adipose tissue during the first hours of food intake.

The correlations between adipose tissue mass, insulin, and LPL activity agree with the above conclusions. It is well established that, in normal, non-fasted animals (27) and humans (13,23), LPL activity in adipose tissue is positively related to adipose tissue mass. On the other hand, the present findings show that, when measured 3 h after the beginning of refeeding that follows a prolonged fast, this correlation is completely reversed, that is larger fat depots have less adipose LPL activity. Even though LPL from both insulin resistant and insulin sensitive animals was positively correlated with postprandial (3 h) insulinemia, the regression slopes were clearly different from each other, which provides further evidence for resistance of adipose tissue LPL to the action of insulin during food intake after a 24-h fast.

Previous studies have suggested that, in the presence of resistance of glucose metabolism to insulin, the modulation of adipose LPL by insulin is transiently impaired, which contrasts with the chronic condition of hyperinsulinemia and high adipose LPL usually observed in obese subjects. In overnight-fasted humans, the dose-response curve of insulin infusion to adipose tissue LPL was shown to be shifted to higher insulin concentrations in obese subjects compared to lean individuals (13). Furthermore, the stimulation of LPL specific activity as measured 4 h after an insulinogenic meal was partially blunted in obese men compared to their lean counterparts (24). In addition, we have recently shown that the postprandial activation of adipose LPL is delayed in obese Zucker rats (27). Finally, it has been reported that stimulation of adipose LPL activity in older, less insulin-sensitive guinea pigs relied on slow mRNA changes, whereas that of young animals occurred quickly (about 1 h) after food intake (32). The present findings extend these studies by demonstrating that a defect in the postprandial activation of LPL develops in response to a diet which deteriorates insulin action on glucose metabolism.

In two of the three depots studied, the largest differences in LPL activation between insulin resistant and insulin sensitive animals were observed 3 h after the beginning of food intake, which coincided in time with higher postprandial triglyceridemia in the former group. Differences in triglyceride levels between the two cohorts beyond the 6th h of refeeding reflected higher food consumption in rats chronically fed the chow diet. It is likely that, in the presence of exogenous triglycerides and decreased LPL activity in muscle, an impaired stimulation of adipose LPL by insulin during the feeding period heightened postprandial (3 h) triglyceridemia through attenuated clearance. Such a hypothesis is supported by arteriovenous perfusion studies in insulin-resistant obese humans, in which lower triglyceride clearance rates by adipose tissue were associated with exacerbated postprandial triglyceridemia (10,28). In addition, relatively less LPL is released from larger adipocytes in response to secretagogues such as heparin (16), which is likely to affect its availability at the vascular endothelium. However, the role of adipose tissue LPL in postprandial hypertriglyceridemia in obese, insulin-resistant subjects remains to be determined independently of the contribution of triglyceride secretion by the liver, which is not blunted postprandially by insulin in insulin-resistant individuals (6,11).

In conclusion, this study demonstrates that adipose LPL becomes resistant to the stimulatory effects of insulin during refeeding in rats in which glucose metabolism is impaired by a high-sucrose, high-fat diet. The findings also suggest that a blunted response of adipose LPL to refeeding in insulin-resistant animals may exacerbate postprandial triglyceridemia through attenuated clearance.

ACKNOWLEDGMENTS

F. Picard is a recipient of a Ph.D. fellowship from the Medical Research Council of Canada. This study was supported by a grant from the Medical Research Council of Canada.

REFERENCES

1. **Bergö, M., G. Olivecrona, and T. Olivecrona.** Forms of lipoprotein lipase in rat tissues: in adipose tissue the proportion of inactive lipase increases on fasting. *Biochem. J.* 313: 893-898, 1996.
2. **Bessesen, D. H., A. D. Robertson, and R. H. Eckel.** Weight reduction increases adipose but decreases cardiac LPL in reduced-obese Zucker rats. *Am. J. Physiol.* 261: E246-E251, 1991.
3. **Boivin, A. and Y. Deshaies.** Hypothesis: an amino acid sequence in lipoprotein lipase codes for its degradation by Ca²⁺-dependent proteases. *Lipids* 30: 95-97, 1995.
4. **Boivin, A. and Y. Deshaies.** Contribution of hyperinsulinemia to modulation of lipoprotein lipase activity in the obese Zucker rat. *Metabolism* 49: 134-140, 2000.
5. **Boivin, A., I. Montplaisir, and Y. Deshaies.** Postprandial modulation of lipoprotein lipase in rats with insulin resistance. *Am. J. Physiol.* 267: E620-E627, 1994.
6. **Bourgeois, C. S., D. Wiggins, R. Hems, and G. F. Gibbons.** VLDL output by hepatocytes from obese Zucker rats is resistant to the inhibitory effect of insulin. *Am. J. Physiol.* 269: E208-E215, 1995.
7. **Chan, B. L., M. P. Lisanti, E. Rodriguez-Boulan, and A. R. Saltiel.** Insulin-stimulated release of lipoprotein lipase by metabolism of its phosphatidylinositol anchor. *Science* 241: 1670-1672, 1988.
8. **Cohen, J. C. and G. M. Berger.** Effects of glucose ingestion on postprandial lipemia and triglyceride clearance in humans. *J. Lipid Res.* 31: 597-602, 1990.
9. **Cohn, J. S., J. R. McNarama, S. D. Krasinski, R. M. Russel, and E. J. Schaefer.** Role of triglyceride-rich lipoproteins from the liver and intestine in the etiology of postprandial peaks in plasma triglyceride concentration. *Metabolism* 38: 484-490, 1989.

10. **Coppack, S. W., R. D. Evans, R. M. Fisher, K. N. Frayn, G. F. Gibbons, S. M. Humphreys, M. L. Kirk, J. L. Potts, and T. D. R. Hockaday.** Adipose tissue metabolism in obesity: lipase action in vivo before and after a mixed meal. *Metabolism* 41: 264-272, 1992.
11. **Couillard, C., N. Bergeron, D. Prud'homme, J. Bergeron, A. Tremblay, C. Bouchard, P. Mauriège, and J. -P. Després.** Postprandial triglyceride response in visceral obesity in men. *Diabetes* 47: 953-960, 1998.
12. **Doolittle, M. H., O. Ben-Zeev, J. . Elovson, D. . Martin, and T. G. Kirchgessner.** The response of lipoprotein lipase to feeding and fasting. Evidence for posttranslational regulation. *J. Biol. Chem.* 265: 4570-4577, 1990.
13. **Eckel, R. H., T. J. Yost, and D. R. Jensen.** Alterations in lipoprotein lipase in insulin resistance. *Int. J. Obes.* 19 (suppl. 1): S16-S21, 1995.
14. **Erskine, J. M., D. R. Jensen, and R. H. Eckel.** Macronutrient regulation of lipoprotein lipase is posttranslational. *J. Nutr.* 124: 500-507, 1994.
15. **Fajardo, N. and Y. Deshaies.** Long-term α 1-adrenergic blockade attenuates diet-induced dyslipidemia and hyperinsulinemia in the rat. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 913: 919, 1998.
16. **Fried, S. K. and M. DiGirolamo.** Lipoprotein lipase secretion from isolated rat fat cells of different size. *Life Sci.* 39: 2111-2119, 1986.
17. **Hallfrisch, J., L. Cohen, and S. Reiser.** Effects of feeding rats sucrose in a high fat diet. *J. Nutr.* 111: 531-536, 1981.
18. **Kraegen, E. W., P. W. Clark, A. B. Jenkins, E. A. Daley, D. J. Chisholm, and L. H. Storlien.** Development of muscle insulin resistance after liver insulin resistance in high-fat-fed rats. *Diabetes* 40: 1397-1403, 1991.
19. **Kraegen, E. W., D. E. James, S. P. Bennett, and D. J. Chisholm.** In vivo insulin sensitivity in the rat determined by the euglycemic clamp. *Am. J. Physiol.* 245: E1-E7, 1983.

20. **Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951.
21. **Mamo, J. C. L.** Atherosclerosis as a post-prandial disease. *Endocrinol. Metab.* 2: 229-244, 1995.
22. **Mantha, L., E. Palacios, and Y. Deshaies.** Modulation of triglyceride metabolism by glucocorticoids in diet-induced obesity. *Am. J. Physiol.* 277: R455-R464, 1999.
23. **Nilsson-Ehle, P.** Impaired regulation of adipose tissue lipoprotein lipase in obesity. *Int. J. Obes.* 5: 695-699, 1981.
24. **Ong, J. M. and P. A. Kern.** Effect of feeding and obesity on lipoprotein lipase activity, immunoreactive protein, and messenger RNA levels in human adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 84: 305-311, 1989.
25. **Ong, J. M., T. G. Kirchgessner, M. C. Schotz, and P. A. Kern.** Insulin increases the synthetic rate and messenger RNA level of lipoprotein lipase in isolated rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* 263: 12933-12938, 1988.
26. **Picard, F., N. Naïmi, D. Richard, and Y. Deshaies.** Response of adipose tissue lipoprotein lipase to the cephalic phase of insulin secretion. *Diabetes* 48: 452-459, 1999.
27. **Picard, F., D. Richard, E. Timofeeva, and Y. Deshaies.** Abnormal postprandial modulation by insulin and the β -adrenergic system in the Zucker rat after prolonged fasting. *Diabetologia* 2000.(In Press)
28. **Potts, J. L., S. W. Coppack, R. M. Fisher, S. M. Humphreys, G. F. Gibbons, and K. N. Frayn.** Impaired postprandial clearance of triglycerol-rich lipoproteins in adipose tissue in obese subjects. *Am. J. Physiol.* 268: E588-E594, 1995.
29. **Quig, D. W., D. K. Layman, P. J. Bechtel, and L. R. Hackler.** The influence of starvation and refeeding on the lipoprotein lipase activity of skeletal muscle and adipose tissue of lean and obese Zucker rats. *J. Nutr.* 113: 1150-1156, 1983.

-
30. **Reaven, G. M.** Do high carbohydrate diets prevent the development or attenuate the manifestations (or both) of syndrome X? A viewpoint strongly against. *Curr. Opinion Lipidol.* 8: 23-27, 1997.
 31. **Reaven, G. M., T. R. Risser, Y. -D. I. Chen, and E. P. Reaven.** Characterization of a model of dietary-induced hypertriglyceridemia in young, non-obese rats. *J. Lipid Res.* 20: 371-378, 1979.
 32. **Semb, H. and T. Olivecrona.** Two different mechanisms are involved in nutritional regulation of lipoprotein lipase in guinea-pig adipose tissue. *Biochem. J.* 262: 505-511, 1989.
 33. **Semenkovich, C. F., M. Wims, L. Noe, J. Etienne, and L. Chan.** Insulin regulation of lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes is mediated at posttranscriptional and posttranslational levels. *J. Biol. Chem.* 264: 9030-9038, 1989.
 34. **Simsolo, R. B., J. M. Ong, and P. A. Kern.** Characterization of lipoprotein lipase activity, secretion, and degradation at different sites of post-translational processing in primary cultures of rat adipocytes. *J. Lipid Res.* 33: 1777-1784, 1992.
 35. **Storlien, L. H., D. E. James, K. M. Burleigh, D. J. Chisholm, and E. W. Kraegen.** Fat feeding causes widespread in vivo insulin resistance, decreased energy expenditure, and obesity in rats. *Am. J. Physiol.* 251: E576-E583, 1986.
 36. **Zechner, R.** The tissue-specific expression of lipoprotein lipase: implications for energy and lipoprotein metabolism. *Curr. Opinion Lipidol.* 8: 77-88, 1997.
 37. **Zierath, J. R., K. L. Houseknecht, L. Gnudi, and B. B. Kahn.** High-fat feeding impairs insulin-stimulated GLUT4 recruitment via an early insulin-signaling defect. *Diabetes* 46: 215-223, 1997.
 38. **Zilversmit, D. B.** Atherogenic nature of triglycerides, postprandial lipidemia, and triglyceride-rich remnant lipoproteins. *Clin. Chem.* 41: 153-158, 1995.

TABLES

Table 1. Body and white adipose tissue (WAT) weights of rats chronically fed either rodent chow or a high-sucrose, high-fat diet for four weeks.

	Chow diet	High-sucrose, high-fat diet
Initial body weight (g)	184.1 ± 1.0	183.4 ± 1.1
Final body weight (g)	361.5 ± 4.3	379.1 ± 3.9 *
Inguinal WAT (g)	1.93 ± 0.08	3.06 ± 0.17 *
Epididymal WAT (g)	2.27 ± 0.10	3.37 ± 0.16 *
Retroperitoneal WAT (g)	1.90 ± 0.13	3.22 ± 0.16 *

Values are means ± S.E.M. of 42 (chow) or 37 (HSHF) animals. * Different from chow-fed rats at $P < 0.05$.

Table 2. Pelleted chow intake (g) during refeeding following a 24-h fast in rats chronically fed either rodent chow or a high-sucrose, high-fat diet for four weeks.

Hours of refeeding	Chow diet	High-sucrose, high-fat diet
1 h	5.6 ± 0.5	6.2 ± 0.4
3 h	7.6 ± 0.7	8.0 ± 0.6
6 h	11.3 ± 1.3	11.0 ± 1.6
12 h	24.1 ± 1.9	18.6 ± 1.5 *
24 h	34.9 ± 1.0	24.6 ± 2.3 *

Values are means ± S.E.M. of 4-6 animals. * Different from chow-fed rats at $P < 0.05$.

FIGURE LEGENDS

- Figure 1 Plasma insulin concentration (panel A) before and two hours after insulin infusion in rats chronically fed chow or a HSHF diet during two weeks, in which blood glucose (panel B) was kept constant with a variable glucose infusion (panel C). Each column and time point represents the mean \pm S.E.M. of 7-9 animals. * Different from chow fed animals ($P < 0.05$). Plasma glucose was comparable in both dietary cohorts throughout the clamp. Glucose infusion rate was significantly higher ($P < 0.0001$) in the chow-fed than in the HSHF-fed group at all time points during the infusion.
- Figure 2 Plasma insulin, glucose, nonesterified fatty acids, and triglycerides in rats chronically fed chow or a HSHF diet during four weeks and killed after a 24-h fast, or at various times following subsequent refeeding with pelleted chow. Symbols represent means \pm S.E.M. of 6 animals. * Different from chow-fed rats ($P < 0.05$).
- Figure 3 Specific activity of lipoprotein lipase in inguinal, retroperitoneal, and epididymal white adipose depots in rats chronically fed chow or a HSHF diet during four weeks and killed after a 24-h fast, or at various times following subsequent refeeding with pelleted chow. Symbols represent means \pm S.E.M. of 6 animals. * Different from chow-fed rats ($P < 0.05$).
- Figure 4 Correlations between mean specific activity of lipoprotein lipase (LPL) in the three depots mentioned in Fig 2 and mean depot weight as measured in chow- and HSHF rats killed at 3 h upon subsequent refeeding (panel A). Panel B: correlations between mean LPL activity and insulinemia at 3 h upon subsequent refeeding in rats chronically fed chow (white circles) or a HSHF diet (black circles) during four weeks. Each symbol represents one animal. * Slope of the fitted curve of HSHF-fed rats is different from that of chow-fed animals ($P < 0.05$).

FIGURES

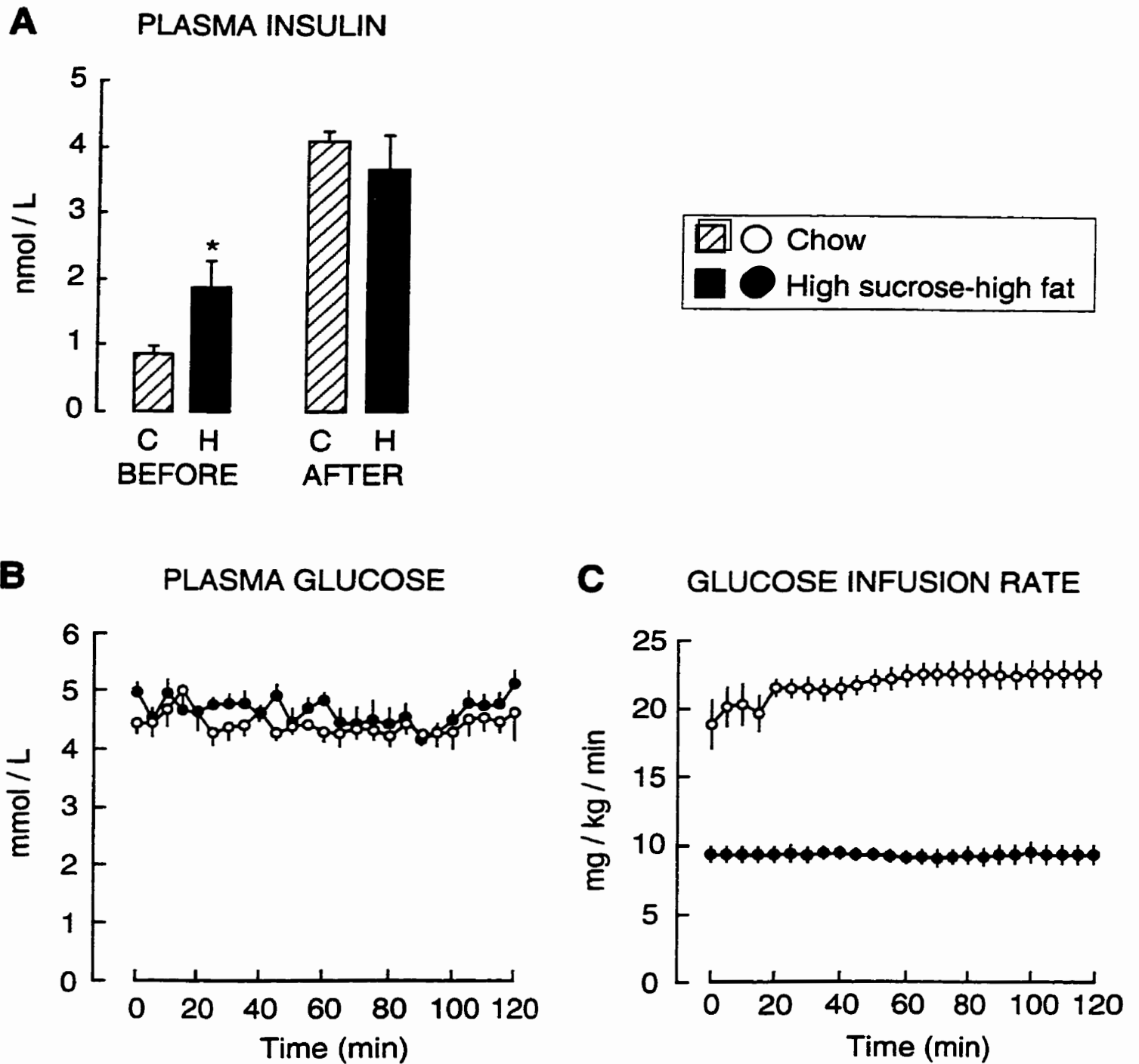


Figure 1

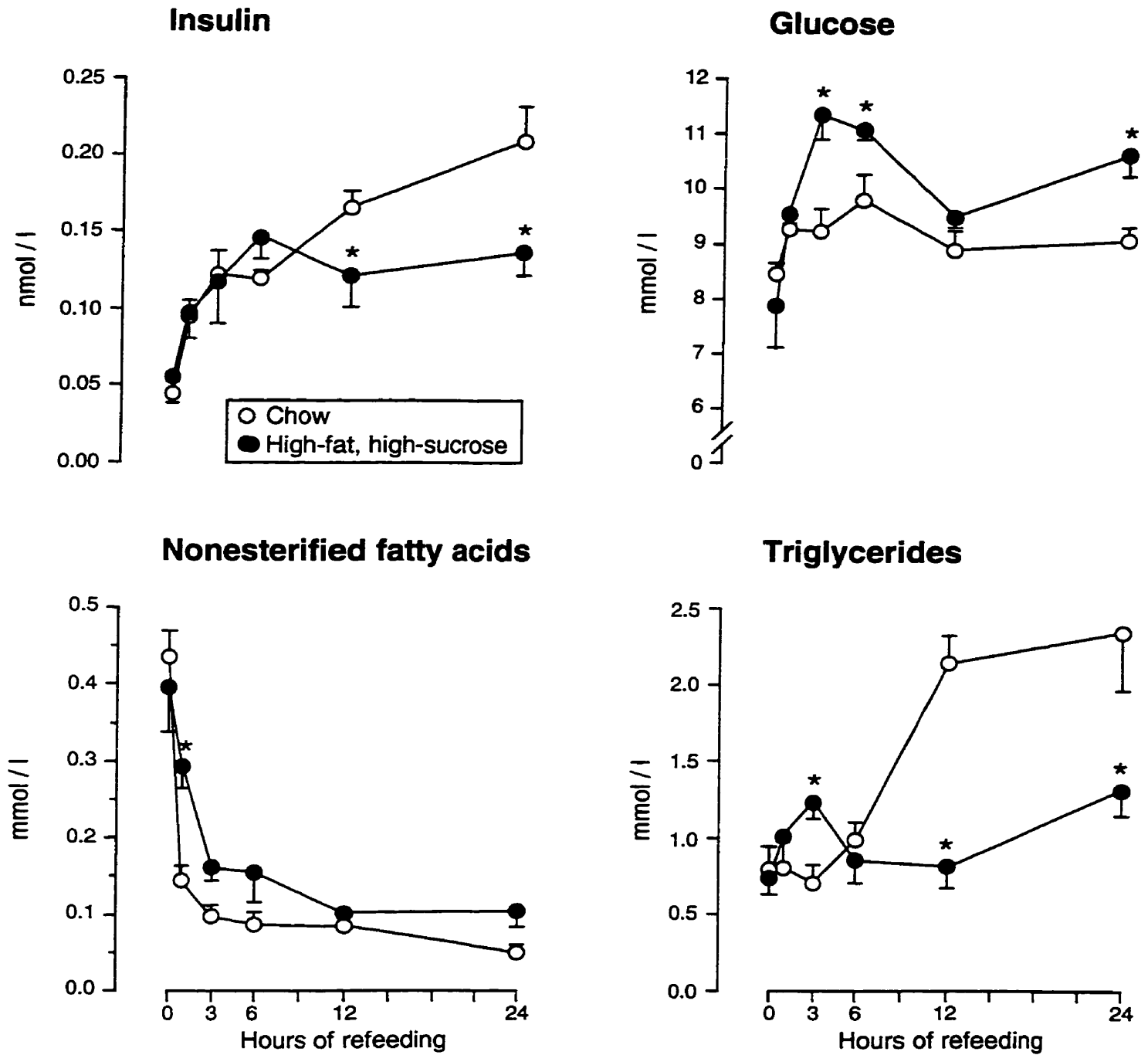


Figure 2

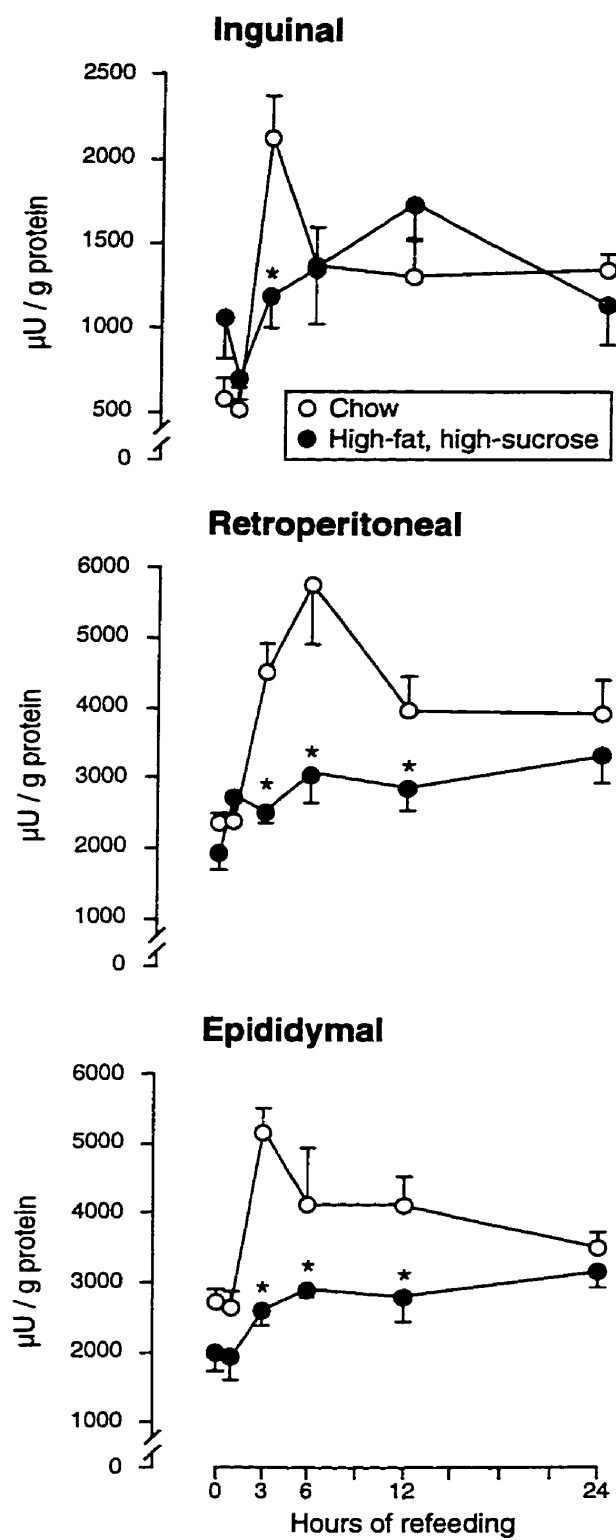


Figure 3

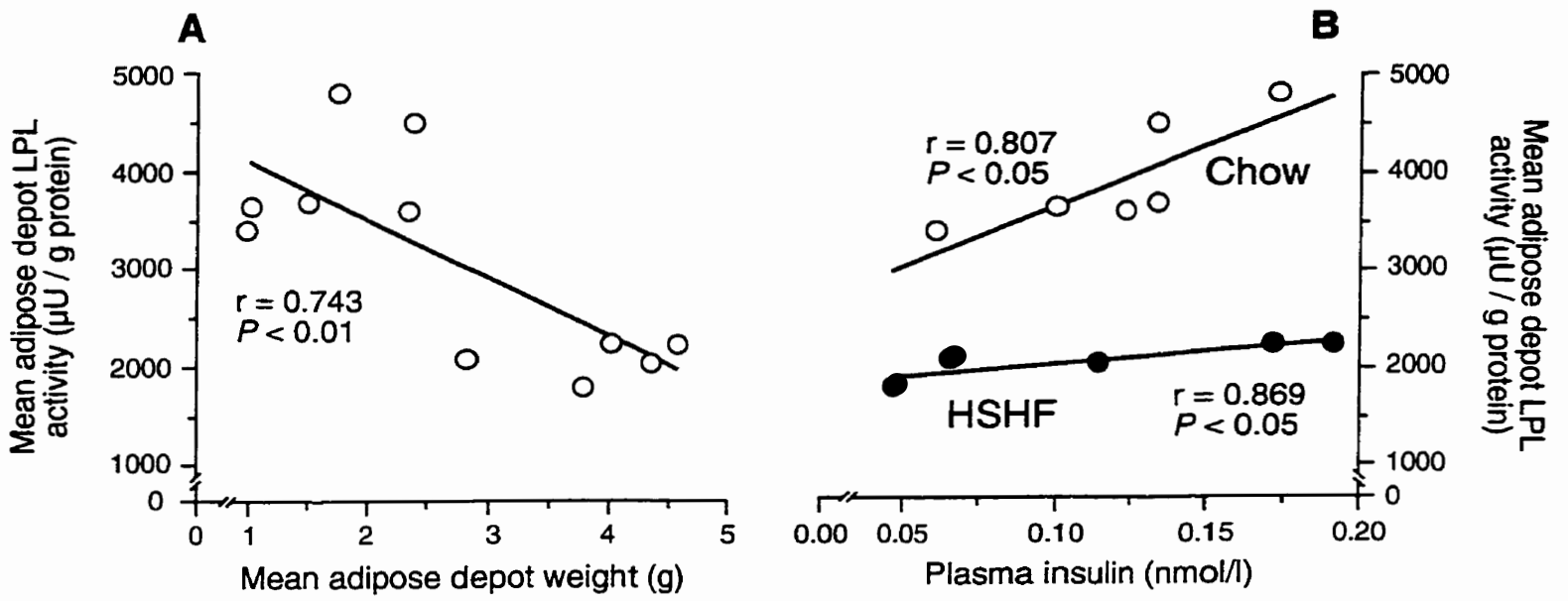


Figure 4

CHAPITRE 4

RESPONSE OF ADIPOSE TISSUE AND SKELETAL MUSCLE LIPOPROTEIN LIPASE TO CHRONIC INFECTION AND SUBSEQUENT ACUTE IMMUNE CHALLENGE

Frédéric PICARD, Denis ARSENJEVIC, Denis RICHARD and Yves DESHAIES

Center for Research on Energy Metabolism, and
Department of Physiology, School of Medicine
Laval University, Québec, QC, Canada G1K 7P4

Article en préparation

RÉSUMÉ

L'infection de souris avec les parasites *Toxoplasma gondii* (*ToxG*) ou *Neospora caninum* mène à des altérations importantes de la balance énergétique. Suite à une perte de poids de 20 à 30% pendant les deux premières semaines d'infection avec *ToxG*, environ la moitié des souris survivantes regagnent partiellement le poids perdu, alors que l'autre moitié demeure indéfiniment à un poids réduit. À l'opposé, l'infection avec *Neospora* réduit le gain de poids sans qu'il y ait de perte initiale de masse corporelle. La lipoprotéine lipase (LPL), enzyme clé responsable du catabolisme et de la distribution tissulaire des triglycérides intravasculaires, est fortement impliquée dans l'hypertriglycémie induite par l'infection. L'objectif de la présente étude était d'évaluer la modulation chronique de la LPL du tissu adipeux et du muscle squelettique chez des souris infectées avec *ToxG* ou *Neospora* (10 cystes/souris), et de déterminer la réponse à court terme de l'enzyme à une injection de lipopolysaccharide (LPS, 100 ng/kg), un agent qui stimule le système immunologique non spécifique. Vingt-huit jours après l'infection, l'activité de la LPL du muscle squelettique (gastrocnemius et vastus lateralis) était réduite de 40 à 50% chez les souris infectées avec *ToxG*, alors que celle du tissu adipeux (épididymaire et inguinal) était semblable à celle des souris non infectées. L'infection avec *Neospora* n'a pas altéré l'activité de l'enzyme dans les tissus étudiés. Les niveaux basaux de triglycérides dans le plasma étaient semblables chez tous les groupes d'animaux, alors que ceux contenus dans le foie (ces derniers étant utilisés comme un indice de production hépatique de triglycérides) était positivement corrélés avec la masse corporelle. L'injection de LPS a diminué l'activité de la LPL musculaire chez les souris témoins et infectées avec *Neospora*, alors que celle des souris infectées avec *ToxG* n'a pas été diminuée en deçà des bas niveaux d'avant l'injection de LPS. À l'opposé, l'activité de la LPL du tissu adipeux a été réduite par l'injection de la LPS dans tous les groupes, à des degrés variables toutefois. L'hypertriglycémie induite par l'injection de LPS a été observée chez les animaux non infectés ou infectés avec *Neospora*, alors qu'aucune augmentation des triglycérides sanguins n'a été remarquée chez les souris infectées avec *ToxG*. Le contenu du foie en triglycérides a été augmenté par la LPS de la même amplitude chez tous les groupes d'animaux. Ces résultats montrent que 1) l'infection chronique avec *ToxG* diminue l'activité de la LPL musculaire, laquelle ne répond plus à une injection de LPS; 2) la modulation de la LPL tissulaire dans des états chroniques d'infection avec *ToxG* favorise le partage des triglycérides circulants vers le tissu adipeux plutôt que vers le muscle; 3) la LPL musculaire est un modulateur important de la réponse aiguë de la triglycémie à la lipopolysaccharide.

SUMMARY

Infection of mice with *Toxoplasma gondii* (*ToxG*) or *Neospora caninum* leads to long-term alterations in energy balance. Following an initial 20-30% weight loss in all *ToxG*-infected mice, half of the animals regain most of the lost weight (gainers), whereas the others maintain their low body weight (non-gainers). Infection with *Neospora* blunts weight gain without eliciting weight loss. Lipoprotein lipase (LPL), the enzyme responsible for plasma triglyceride (TG) clearance and partitioning among tissues, is a major determinant of infection-induced hypertriglyceridemia. This study assessed the long-term modulation of adipose and muscle LPL activity in mice infected with *ToxG*- or *Neospora* (each 10 cysts/mouse), and evaluated the effects of a second acute immuno-challenge (endotoxin) on LPL and plasma TG. Twenty-eight days after cyst administration, LPL activity in gastrocnemius and vastus lateralis of both gainer and non-gainer mice was reduced by 50 and 38%, respectively, compared with controls or *Neospora*-infected mice, whereas LPL activity in epididymal and inguinal white adipose depots remained unchanged in all infected groups compared to controls. Endotoxin injection (lipopolysaccharide, [LPS] from *E. Coli*, 100 ng/kg) induced a global reduction in adipose tissue LPL in all groups as assessed 90 min later. In both *ToxG*-infected groups, muscle LPL was not further reduced by LPS treatment, whereas it decreased enzyme activity by 50% (gastrocnemius) and 40% (vastus lateralis) in control and *Neospora*-infected mice. Basal plasma triglyceride levels in plasma were similar in all groups, whereas those in the liver (taken as an index of hepatic TG production) were positively correlated with body weight. LPS greatly increased plasma TG levels in both control and *Neospora*-infected animals, whereas it did not change those of *ToxG* gainer and non-gainer animals. Liver TG content was increased by LPS to the same extent in all groups. These results show that 1) long-term infection with *ToxG* reduces muscle LPL, which becomes unresponsive to acute endotoxemia; 2) modulation of tissue LPL activity during chronic *ToxG* infection favors triglyceride partitioning towards adipose tissue; 3) skeletal muscle LPL is a key determinant of the acute response of triglyceridemia to an immune challenge.

INTRODUCTION

Infection with parasites results in profound alterations in host energy metabolism which leads to cachexia. One of the major and early responses of host metabolism to infection is the increase in circulating triglyceride concentration (1). Hypertriglyceridemia is due to both increases in hepatic secretion of very low density lipoproteins (2,3) and alterations in the rate of clearance of triglycerides (4,5), which is brought about by the cytokine-mediated reduction in lipoprotein lipase (LPL, EC 3.1.1.34) activity in almost every tissue (6), thus decreasing overall triglyceride clearance in the vascular compartment (7). Recently, two studies reported the beneficial effects of LPL activators on cachexia and triglyceridemia (8,9), suggesting that modulation of the activity of the enzyme during infection may also affect energy partitioning among tissues.

Lipoprotein lipase is the rate-limiting enzyme for the hydrolysis of triglycerides within circulating lipoproteins (10). LPL is also implicated in lipid partitioning, as it is usually modulated in a reciprocal fashion in storage and oxidative tissues (11). One exception to the tissue-specific modulation of LPL is sepsis (which is also mimicked by infection and endotoxemia). The acute decrease in LPL activity in adipose tissue and skeletal muscle during these conditions is caused by the action of several cytokines, and is dependent upon post-translational mechanisms (12). Whereas interleukin (IL)-1 and interferon (IFN)- γ have been shown to affect muscle LPL activity *in vivo* (6,13), tumor necrosis-factor- α (TNF- α) appears to be an important mediator of the effects of endotoxemia on adipose tissue LPL *in vivo* (6,14) as well as in cultured adipocytes (15,16).

Besides their role in host defense, cytokines interact with factors implicated in body weight regulation and energy metabolism (17,18). Arsenijevic *et al.* have described a model (19,20) in which mice infected with *Toxoplasma gondii* (*ToxG*) lose weight (20-30%) during the first 14 days of infection, and of those surviving (>75%), some regain weight (gainers) whereas other infected mice remain at their reduced body weight indefinitely (non-gainers). On the other hand, infection with *Neospora caninum* blunts weight gain without eliciting an initial weight loss (21,22).

Since tissue-specific modulation of LPL activity in adipose and muscle tissues is likely to affect lipid partitioning as well as triglyceridemia during infection-induced cachexia in a way that can relate to energy balance, the aim of the present experiment was to evaluate the effects of

these two parasites on lipid metabolism, and especially on variables influencing triglyceridemia, i.e. liver triglyceride production and peripheral triglyceride clearance through adipose and muscle LPL activity. Infection profoundly alters the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (23,24) as well as insulin homeostasis (25,26). Plasma levels of corticosterone and insulin were therefore assessed because of their involvement in energy balance (27) and because they constitute important modulators of tissue LPL activity (10). A subsequent acute immunological challenge with lipopolysaccharide was performed to determine the responsiveness of lipid metabolism in mice infected long term with either *ToxG* or *Neospora*.

MATERIALS AND METHODS

Mice and diet

Specific pathogen-free female Swiss Webster mice (BRL, Füllinsdorf, Switzerland) of approximately 1 month of age were housed individually in plastic cages with wood shaving, under controlled temperature ($25\pm 1^\circ\text{C}$) and lighting (lights on between 07.00 h and 19.00 h), and had ad libitum access to food (4.5% fat, 14.4 kJ/g, pelleted stock diet, Charles River Rodent Animal Diet, Ralston Products, Woodstock, ONT, Canada) and tap water. All mice were cared for and handled in conformance with the Canadian Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. One week after their arrival, mice were injected intraperitoneally with either 10 cysts of the Me49 strain of *Toxoplasma gondii* or 10 cysts of *Neospora caninum*. Cysts were obtained from isolated brain homogenates of infected mice, purified by Percoll centrifugation (28), and diluted in phosphate-buffered saline (PBS). Control mice were injected with 0.5 ml of PBS. Twenty-eight days after cyst administration, mice were injected with either saline or lipopolysaccharide (100 ng/kg, from *Escherichia coli*, serotype 055:B5, Sigma, St-Louis, MO). Ninety minutes later, blood was taken from the retro-orbital sinus. Mice were then killed by neck dislocation, and white adipose tissues (epididymal, inguinal), skeletal muscles (gastrocnemius, quadriceps) as well as the liver were harvested immediately thereafter.

Plasma and tissue sampling

Blood was kept on ice until centrifugation (1500 g, 15 min at 4°C), and the separated plasma was stored at -70°C until later biochemical measurements. Pieces of liver were quickly frozen on dry ice, and stored at -70°C . Approximately 50 mg from adipose tissue and muscles were homogenized with all-glass tissue grinders (Kontes, Vineland, NJ, USA). Adipose tissue samples were homogenized in 1 ml of a solution containing 0.25 mol/l sucrose, 1 mmol/l

EDTA, 10 mmol/l Tris-HCl, and 12 mmol/l deoxycholate, pH 7.4. Muscle samples were homogenized in 1 ml of a solution containing 1 mol/l ethylene glycol, 50 mmol/l Tris-HCl, 3 mmol/l deoxycholate, 10 IU/ml heparin and 5% (v/v) aprotinin (Trasylol, Miles Pharmaceuticals, Rexdale, Canada), pH 7.4. Muscle homogenates were quickly frozen at -70°C . Adipose tissue homogenates were centrifuged (12000 g, 20 min at 4°C), and the fraction between the upper fat layer and the bottom sediment was removed, diluted with 4 volumes of the homogenization solution without deoxycholate, and stored at -70°C until lipoprotein lipase activity measurement.

Plasma determinations

Plasma glucose concentrations were measured by the glucose oxidase method with the Beckman glucose analyzer. Insulin was determined by RIA using a reagent kit from Linco Research (St. Charles, MO) with rat insulin as standard. Plasma triglycerides were measured by an enzymatic method using a reagent kit from Boehringer Mannheim (Montréal, Canada) which allowed correction for free glycerol. Corticosterone concentrations were determined by RIA (ICN Pharmaceuticals Inc, Orangeburg, NY).

Tissue measurements

Frozen liver samples were thawed, and total lipids were extracted according to the method of Folch *et al.* (29) and solubilized in isopropanol. Triglycerides in the lipid extracts were then quantitated using the above-mentioned reagent kit. For the measurement of LPL activity, 100 μl of thawed tissue homogenates were incubated under gentle agitation for 1 h at 28°C with 100 μl of a substrate mixture consisting of 0.2 mol/l Tris-HCl buffer, pH 8.6, which contained 10 MBq/l [carboxyl- ^{14}C]triolein (Amersham, Oakville, Canada) and 2.52 mmol/l cold triolein emulsified in 50 g/l gum arabic, as well as 20 g/l fatty acid free bovine serum albumin, 10% human serum as a source of apolipoprotein C-II, and either 0.2 or 2 mol/l NaCl. Free oleate released by LPL was then separated from intact triolein and mixed with Universol (NEN, Montréal, Canada), and sample radioactivity was determined in a scintillation counter. LPL activity was calculated by subtracting lipolytic activity determined in a final NaCl concentration of 1 mol/l (non-LPL activity) from total lipolytic activity measured in a final NaCl concentration of 0.1 mol/l. LPL activity was expressed as microunits ($1\mu\text{U} = 1\mu\text{mol}$ nonesterified fatty acids released per hour of incubation at 28°C). The interassay coefficient of variation was 4.6%, and was determined using bovine skim milk as a standard source of LPL. Protein content of the tissue extracts was measured by the method of Lowry *et al.* (30) Data are expressed as specific activity of LPL ($\mu\text{U}/\text{g}$ tissue protein).

Statistical analysis

Data are presented as means \pm S.E.M. Group means were compared using a 4 x 2 factorial analysis of variance (ANOVA) to determine main effects of Infection status (control or infected mice), LPS (saline or LPS), and their interactions. Differences between individual group means were analyzed by Fisher's protected least squares difference test to evaluate the effects of LPS in *ToxG*- and *Neospora*-infected mice separately. Pearson's correlation coefficients were calculated to determine statistical relationships between variables. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Twenty-eight days after cyst administration, mice infected with *Toxoplasma gondii* (*ToxG*) had lower body weight than control animals ($P < 0.002$, Table 1). After having lost 28% of their body weight during the first 14 days of infection (not shown), *ToxG*-infected mice showed a bimodal pattern of body weight regulation, as approximately half of the animals regained an average of 62% of the lost weight (gainers), whereas the other half did not (non-gainers, $P < 0.05$ between gainers and non-gainers). Mice infected with *Neospora* did not lose weight, but displayed a blunted weight gain (Table 1). At the end of the experiment, *Neospora*-treated mice had a body weight similar to that of *ToxG*-infected gainer animals. Changes in body weight were more closely related to fat than to lean mass accretion (Table 1), in proportion with the respective effects of infection on body weight. It is noteworthy that, despite similar body weight between *ToxG*-gainer mice and *Neospora*-infected animals, mice that previously lost weight had heavier epididymal fat pads than infected mice that did not lose weight (514 versus 314 mg respectively, $P < 0.05$). This association was not found in the subcutaneous inguinal adipose depot.

Compared to that of control mice, gastrocnemius LPL activity of *ToxG*-infected animals, whether gainers or non-gainers, was reduced by at least 50% ($P < 0.03$, Figure 1A). On the other hand, no difference in muscle LPL activity was observed between *Neospora*-treated mice and controls. Acute lipopolysaccharide (LPS) injection resulted in a 48% reduction in gastrocnemius muscle LPL activity in control mice ($P < 0.05$), and a 51% decrease in *Neospora*-infected animals ($P < 0.04$). LPS did not further reduce the already low gastrocnemius LPL levels in either group of *ToxG*-infected mice as measured 90 min after the injection (Infection status-LPS interaction: $P < 0.01$). Modulation of LPL in vastus lateralis muscle (VLM)

displayed a similar pattern of response to long-term infection and acute LPS (Figure 1B). Infection with *ToxG* decreased VLM LPL by 36% ($P < 0.05$), whereas infection with *Neospora* did not alter VLM LPL activity. In both control and *Neospora*-infected mice, LPS injection reduced LPL activity in vastus lateralis muscle by 40% ($P < 0.0052$). On the other hand, LPS failed to significantly change VLM LPL activity in both groups of *ToxG*-infected mice.

Long-term infection (either with *ToxG* or *Neospora*) did not significantly alter the activity of LPL either in the epididymal (Figure 2A) or inguinal (Figure 2B) white adipose depots, although in the latter depot, LPL activity tended to be decreased by infection with *Neospora*. Ninety minutes after LPS injection, adipose LPL activity in the epididymal depot was decreased in all groups (LPS overall effect: $P < 0.005$, no interaction with Infection status). In the subcutaneous inguinal depot (Figure 2B), although LPL activity tended to be lower in *Neospora*-infected mice than in the control group, no statistical difference in LPL activity was observed after 28 days of infection. LPS decreased LPL activity in all groups (LPS overall effect: $P < 0.01$, no interaction with Infection status), an effect that was of larger magnitude in control and *ToxG*-gainer animals.

Plasma triglyceride levels were not different between control and infected mice (Figure 3). Acute LPS administration doubled triglyceride concentration in controls (from 1.35 to 2.73 mmol/l, $P < 0.02$) and increased plasma TG in *Neospora*-infected mice (+ 43%, $P < 0.05$). However, LPS did not alter triglyceridemia in animals infected with *Toxoplasma gondii* (Infection status-LPS interaction: $P < 0.05$).

Liver triglyceride content, which is an index of hepatic TG production, was strongly affected by infection. *ToxG*-infected gainers had decreased triglycerides per g of hepatic tissue, but more than their non-gainer counterparts (-45%, $P < 0.02$, and -71%, $P < 0.001$ compared to controls, respectively, Table 2). *Neospora*-infected mice had a liver TG content similar to that of control animals. The strongest correlate of final body weight was liver triglyceride content ($r = 0.719$, $P = 0.0084$). Acute LPS injection resulted in an elevation in liver triglyceride content (Table 2), which was similar in absolute terms in all groups ($P < 0.0002$).

Plasma glucose levels were similar between groups as measured 90 min after the injection of saline (Table 2). LPS treatment resulted in an increase in glycemia in non-infected controls and in *Neospora*-infected mice ($P < 0.05$) and in a decrease in plasma glucose in *ToxG*-non gainer animals ($P < 0.03$). LPS did not affect glycemia in *ToxG* gainer mice. Long-term infection or acute LPS injection had no effect on insulinemia, except in *Neospora*-infected

animals, in which LPS strongly increased plasma insulin levels ($P < 0.05$). LPS also increased plasma corticosterone concentration ($P < 0.05$), independently of the infection status.

DISCUSSION

The present studies were aimed at assessing the effects of chronic and acute immunological challenges on lipid metabolism, with special emphasis on triglyceride production and clearance, in mice with varying responses of energy balance to infection with the parasites *Toxoplasma gondii* (*ToxG*) and *Neospora caninum*. The findings show that 1) long-term infection with *ToxG* reduces muscle LPL activity, which becomes unresponsive to acute endotoxemia; 2) in the chronic phase of infection with *ToxG*, adipose and muscle tissue LPL modulation favors triglyceride partitioning towards lipid storage; 3) skeletal muscle LPL is a key determinant of the acute response of triglyceridemia to an immune challenge.

Toxoplasmosis is not a quiescent, latent infection, but a continuing infectious process, which progresses in intensity and severity over time (31,32). Weight loss that occurs in all animals during the first 14 days of infection with *ToxG* is associated with cachexia (19) and decreased fat mass accretion, as confirmed in the present study. Of the mice surviving this acute phase (over 75%), approximately half show a partial weight regain (gainers), whereas the other half remain at a stable, reduced body weight (non-gainers), which is caused by persistent cachexia and hypermetabolism (19). Although the expression profile of cytokines is different between these two groups, non-gainer mice being characterized by enhanced spleen and brain expression of cytokines involved in humoral immunity (IL-4, IL-10), whereas gainer animals have elevated TNF- α and IL-10 mRNA levels, these cytokines are undetectable in the serum as measured 90 days after cyst injection (20). At that time, however, gainer and non-gainer *ToxG*-infected animals display larger amounts of serum IFN- γ levels (6 and 67 pM, respectively) compared to non-infected mice (0.8 pM; D. Arsenijevic, unpublished results). Thus, it is likely that these differences among groups are also present, if not greater, at day 28 post-infection, in which the immune response would be enhanced because of the time course of the *ToxG* infection process. Lipopolysaccharide injection to these two groups results in a greater elevation in serum TNF- α , IL-10, and IFN- γ levels than in noninfected mice (20). The metabolic response to *Neospora caninum* infection remains incompletely established (33,34). Because of the fact that *Neospora* administration to mice does not elicit weight loss, it is generally accepted that, even in the presence of blunted weight gain, this parasite is weaker in severity and intensity

than *ToxG* (21,22). The present findings confirm the respective effects of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* on body weight regulation.

Both gainer and non-gainer *ToxG*-infected groups displayed low muscle LPL activity at the end of the infection period, whereas muscle LPL in *Neospora*-infected animals was similar to that of uninfected mice. Chronic conditions associated with low skeletal muscle LPL activity include obesity and a state of resistance of glucose metabolism to the action of insulin (insulin resistance). The *ToxG*-infected animals were obviously not obese, and plasma glucose and insulin levels were not indicative of insulin resistance. Although the present study was not aimed at establishing treatment effects on the cytokine profile, some cytokines such as $\text{IL-1}\beta$ and $\text{IFN-}\gamma$ strongly reduce muscle LPL activity in muscle (6). As noted above, since both gainer and non-gainer *ToxG*-infected animals display chronically higher serum levels of $\text{IFN-}\gamma$ than noninfected mice, this condition is likely to have contributed, at least partly, to the low muscle LPL activity levels observed in both *ToxG*-infected groups. Although infection with *Neospora caninum* acutely induces the production of large amount of $\text{IFN-}\gamma$ (35,36), the long-term cytokine profile resulting from the parasite inoculation is not well established. It may be suggested that the diverging effects of *ToxG* and *Neospora* on the chronic levels of muscle LPL may be the consequence of a different cytokine profile. This hypothesis remains to be determined experimentally. It is also possible that the reduced muscle sympathetic tone found in tumor-bearing animals (37) could affect basal muscle LPL in infected mice, since the adrenergic system is a potent activator of LPL activity in this tissue (38-40). On the other hand, it is likely that the impaired response of muscle LPL in *ToxG*-infected animals to acute endotoxemia was caused by the already high levels of cytokines prevailing in *ToxG*-infected animals, which prevented LPL to be further decreased by LPS. The lowering effect of LPS on muscle LPL activity, through acute cytokine production, in *Neospora*-infected mice constitutes indirect evidence that some of these cytokines were not present (or were found at low levels) before the injection of LPS, that is in the chronic phase of the infection.

Adipose tissue LPL was not significantly altered after 28 days of infection with *ToxG* and *Neospora*. Of note however is the fact that epididymal adipose LPL activity tended to be relatively higher in *ToxG*-gainer animals, which were gaining weight at a higher rate than the other groups. This was not the case for inguinal LPL, a depot specificity that is consistent with the greater responsiveness of epididymal (visceral) compared to inguinal (subcutaneous) fat to infection-induced changes in fat mass (Table 1). Also of note is the lack of effect of elevated cytokine (at least $\text{IFN-}\gamma$) levels in *ToxG*-infected mice discussed above on adipose LPL. It can be suggested that adipose LPL in infected mice was under the modulatory control of some

factor(s) that prevented the reducing action of cytokines, but that LPS-induced overproduction of cytokines overwhelmed the impact of such factors. One study reported that a reduction in adipose LPL activity in tumor-bearing rats was observed only when the animals were in the fasted state (41) (the present study was done in the ad libitum, freely-fed state), suggesting that insulin, a major modulator of adipose LPL (42), may have contributed to the maintenance of normal levels of adipose LPL activity in infected animals. Two other reports have demonstrated that enhanced LPL activity can reduce body weight loss (and especially fat mass) in tumor-bearing animals (8,9). On the other hand, it is also possible that, since TNF- α , a strong negative modulator of adipose LPL (6,14), was no longer found in the plasma of *ToxG*-infected animals in the chronic state of infection (20), LPL partially regained its activity in adipose tissue in the long term. Another possibility is that a low sympathetic tone caused by infection enhanced adipose LPL activity, since the adrenergic system decreases enzyme activity in adipose tissue (43).

Liver TG content was altered by chronic infection in parallel with body weight. This underlines the close association between liver lipid production and food intake (44). On the other hand, LPS induced a generalized increase in liver TG content, in accordance with the effects of cytokines on hepatic TG synthesis. It has been reported in both intact (45) and LPS-treated mice (46) that, among several cytokines, TNF- α , IL-1 and IFN- γ are potent stimulators of hepatic triglyceride synthesis, which induces the synthesis and secretion of VLDL of normal size and composition (47). In the present conditions, liver TG content, which can be taken as an index of hepatic TG production (48), increased by a similar magnitude in all groups (from 12 to 17 $\mu\text{mol/g}$) following acute LPS administration. However, LPS injection did not result in hypertriglyceridemia in *ToxG* nongainer mice, in which LPL activity remained unaltered. These observations suggest that the variable changes in triglyceridemia occurring after LPS injection among groups were the consequence of differences in the reduction in LPL activity (TG clearance) rather than in TG secretion, which is consistent with previous studies (5,49, and F. Picard & Y. Deshaies, unpublished results). On the other hand, it is important to note that the ability to stimulate hypercorticosteronemia in response to acute LPS remained intact in all infected mice, which is therefore unlikely to have contributed to the variable changes in triglyceridemia in response to endotoxemia.

The present results further suggest that skeletal muscle is a key factor in the determination of triglyceridemia after LPS administration. Indeed, in both control and *Neospora*-infected animals, LPS increased plasma TG levels and decreased adipose and muscle LPL activity. On the other hand, in the presence of a similar increase in hepatic TG content and an

absence of inhibition of muscle LPL, LPS injection failed to induce hypertriglyceridemia in *ToxG* gainer mice, even if adipose LPL activity was decreased to an extent similar to that of control animals. Therefore, in the present study, a diminution in muscle LPL brought about by LPS appeared to be a necessary condition to induce hypertriglyceridemia.

Interestingly, acute glucose responses to LPS administration were proportionally associated with fat mass. It is well known that besides its impact on lipid metabolism, LPS also affects glucose uptake, which becomes resistant to the action of insulin during endotoxemia (50,51). Whether this process is related to infection and to the magnitude of weight loss remains to be fully characterized.

In conclusion, the present findings show that chronic infection with *Toxoplasma gondii* reduces muscle LPL activity, which becomes unresponsive to a subsequent acute immunochallenge. The results also suggest that, in the chronic state of infection with *Toxoplasma gondii*, adipose and muscle tissue LPL modulation favors triglyceride partitioning towards lipid storage. Finally, the present findings demonstrate that skeletal muscle LPL is a major determinant of LPS-induced hypertriglyceridemia. Further studies are needed to define the factors underlying the tissue-specific modulation of LPL in acute and chronic infection.

ACKNOWLEDGMENTS

F. Picard is a recipient of a Ph.D. fellowship from the Medical Research Council of Canada. This study was supported by grants from the Medical Research Council of Canada.

REFERENCES

1. Grunfeld C, Pang M, Doerfler W, Shigenaga JK, Jensen P, Feingold KR: Lipids, lipoproteins, triglyceride clearance, and cytokines in human immunodeficiency virus infection and the acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 74:1045-1052, 1992
2. Lanza-Jacoby S, Wong SH, Tabares A, Baer D, Schneider T: Disturbances in the composition of plasma lipoproteins during gram-negative sepsis in the rat. *Biochim Biophys Acta* 1124:233-240, 1992
3. Lanza-Jacoby S, Phetteplace H, Sedkova N, Knee G: Sequential alterations in tissue lipoprotein lipase, triglyceride secretion rates, and serum tumor necrosis factor α during *Escherichia coli* bacteremic sepsis in relation to the development of hypertriglyceridemia. *Shock* 9:46-51, 1998
4. Lanza-Jacoby S, Sedkova N, Phetteplace H, Perroti D: Sepsis-induced regulation of lipoprotein lipase expression in rat adipose tissue and soleus muscle. *J Lipid Res* 38:701-710, 1997
5. Bagby GJ, Corll CB, Martinez RR: Triacylglycerol kinetics in endotoxic rats with suppressed lipoprotein lipase activity. *Am J Physiol* 253:E59-E64, 1987
6. Feingold KR, Marshall M, Gulli R, Moser AH, Grunfeld C: Effect of endotoxin and cytokines on lipoprotein lipase activity in mice. *Arterioscler Thromb* 14:1866-1872, 1994
7. Nonogaki K, Moser AH, Feingold KR, Grunfeld C: α -Adrenergic receptors mediate the hypertriglyceridemia induced by endotoxin, but not tumor necrosis factor, in rats. *Endocrinology* 135:2644-2650, 1994
8. Ohara M, Tsutsumi K, Ohsawa N: Suppression of carcass weight loss in cachexia in rats bearing Leyding cell tumor by the novel compound NO-1886, a lipoprotein lipase activator. *Metabolism* 47:101-105, 1998

9. Kawamura I, Yamamoto N, Sakai F, Yamazaki H, Goto T: Effect of lipoprotein lipase activators bezafibrate and NO-1886 on B16 melanoma-induced cachexia in mice. *Anticancer Res* 19:4099-4103, 1999
10. Eckel RH: Lipoprotein lipase: a multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases. *N Engl J Med* 320:1060-1068, 1989
11. Zechner R: The tissue-specific expression of lipoprotein lipase: implications for energy and lipoprotein metabolism. *Curr Opinion Lipidol* 8:77-88, 1997
12. Gouni I, Oka K, Etienne J, Chan L: Endotoxin-induced hypertriglyceridemia is mediated by suppression of lipoprotein lipase at a post-transcriptional level. *J Lipid Res* 34:139-146, 1993
13. Friedman G, Gallily R, Chajek-Shaul T, Stein O, Shiloni E, Etienne J, Stein Y: Lipoprotein lipase in heart cell cultures is suppressed by bacterial lipopolysaccharide: an effect mediated by production of tumor-necrosis factor. *Biochim Biophys Acta* 960:220-228, 1988
14. Lopez-Soriano J, Llovera M, Carbo N, Garcia-Martinez C, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM: Lipid metabolism in tumor-bearing mice: studies with knockout mice for tumor necrosis-factor receptor 1 protein. *Mol Cell Endocrinol* 132:93-99, 1997
15. Uchida Y, Tsukahara F, Ohba K, Ogawa A, Irie K, Fujii E, Yoshimoto T, Yoshioka T, Muraki T: Nitric oxide mediates down regulation of lipoprotein lipase activity induced by tumor necrosis factor- α in brown adipocytes. *Eur J Pharmacol* 335:235-243, 1997
16. Uchida Y, Tsukahara F, Ohba K-I, Ogawa A, Nomoto T, Muraki T: Augmentation of tumor necrosis factor- α -induced suppression of lipoprotein lipase by nitric oxide donors in cultured brown adipocytes. *Ann NY Acad Sci* 813:369-372, 1997
17. Hotamisligil GS, Spiegelman BM: Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259:87-91, 1993
18. Hotamisligil GS, Spiegelman BM: Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes* 43:1271-1278, 1994

19. Arsenijevic D, Girardier L, Seyhoux J, Chang HR, Dulloo AG: Altered energy balance and cytokine gene expression in a murine model of chronic infection with *Toxoplasma gondii*. *Am J Physiol* 272:E908-E917, 1997
20. Arsenijevic D, Girardier L, Seydoux J, Pechere JC, Garcia I, Lucas R, Chang HR, Dulloo AG: Metabolic-cytokine responses to a second immunological challenge with LPS in mice with *T. gondii* injection. *Am J Physiol* 274:E439-E445, 1998
21. Dubey JP, Lindsay DS: A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet Parasitol* 67:1-59, 1996
22. Buxton D: Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp.) in sheep and goats: recent advances. *Vet Res* 29:289-310, 1998
23. Monig H, Arendt T, Meyer M, Kloehn S, Bewig B: Activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in response to septic or non-septic diseases - implications for the euthyroid sick syndrome. *Intensive Care Med* 25:1402-1406, 1999
24. Hasselgren PO, Fisher JE: Counter-regulatory hormones and mechanisms in amino acid metabolism with special reference to the metabolic response in skeletal muscle. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2:9-14, 1999
25. Wolfe RR: Substrate utilization/insulin resistance in sepsis/trauma. *Baillere Clin Endocrinol Metab* 11:645-657, 1997
26. Chioloro R, Revelly JP, Tappy L: Energy metabolism in sepsis and injury. *Nutrition* 12 (Suppl 9):S45-S51, 1997
27. Strack Alison M, Sebastian Raynard J, Schwartz Michael W, Dallman Mary F: Glucocorticoids and insulin: reciprocal signals for energy balance. *Am J Physiol* 37:R142-R149, 1995
28. Huskinson-Mark JF, Araujo FG, Remington JS: Evaluation of the effect of drug on cyst form of *Toxoplasma gondii*. *J Infect Dis* 61:4038-4044, 1993

29. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226:497-509, 1957
30. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275, 1951
31. Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA: Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev* 11:267-299, 1998
32. Stahl W, Turek G: Chronic murine toxoplasmosis: clinicopathologic characterization of a progressive wasting syndrome. *Ann Trop Med Parasitol* 82:35-48, 1988
33. Long MT, Baszler TV, Mathison BA: Comparison of intracerebral parasite load, lesion development, and systemic cytokines in mouse strains infected with *Neospora caninum*. *J Parasitol* 84:316-320, 1998
34. Baszler TV, Long MT, McElwain TF, Mathison BA: Interferon-gamma and interleukin-12 mediate protection to acute *Neospora caninum* infection in BALB/c mice. *Int J Parasitol* 29:1635-1646, 1999
35. Lunden A, Marks J, Maley SW, Innes EA: Cellular immune response in cattle experimentally infected with *Neospora caninum*. *Parasite Immunol* 20:519-526, 1998
36. Marks J, Lunden A, Harkins D, Innes E: Identification of *Neospora* antigens recognized by CD4+ T cells and immune sera from experimentally infected cattle. *Parasite Immunol* 20:303-309, 1998
37. Costelli P, Garcia-Martinez C, Lovera M, Carbo N, Lopez-Soriano FJ, Agell N, Tessitore L, Baccino FM, Argiles JM: Muscle protein waste in tumor-bearing rats is effectively antagonized by a β_2 -adrenergic agonist (clenbuterol): role of the ATP-ubiquitin-dependent proteolytic pathway. *J Clin Invest* 95:2367-2372, 1995
38. Pedersen SB, Bak JF, Holck P, Schmitz O, Richelsen B: Epinephrine stimulates human muscle lipoprotein lipase activity in vivo. *Metabolism* 48:461-464, 1999

39. Eckel RH, Jensen DR, Schlaepfer IR, Yost TJ: Tissue-specific regulation of lipoprotein lipase by isoproterenol in normal-weight humans. *Am J Physiol* 271:R1280-R1286, 1996
40. Belahsen R, Deshaies Y: Modulation of lipoprotein lipase activity in the rat by the β_2 -adrenergic agonist clenbuterol. *Can J Physiol Pharmacol* 70:1555-1562, 1992
41. Fried SK, Kral JG: Sex differences in regional distribution of fat cell size and lipoprotein lipase activity in morbidly obese patients. *Int J Obes* 11:129-140, 1987
42. Picard F, Naïmi N, Richard D, Deshaies Y: Response of adipose tissue lipoprotein lipase to the cephalic phase of insulin secretion. *Diabetes* 48:452-459, 1999
43. Raynolds MV, Awald PD, Gordon DF, Gutierrez-Hartmann A, Rule DC, Wood WM, Eckel RH: Lipoprotein lipase gene expression in rat adipocytes is regulated by isoproterenol and insulin through different mechanisms. *Mol Endocrinol* 4:1416-1422, 1990
44. Mantha L, Palacios E, Deshaies Y: Modulation of triglyceride metabolism by glucocorticoids in diet-induced obesity. *Am J Physiol* 277:R455-R464, 1999
45. Feingold KR, Soued M, Serio MK, Moser AH, Dinarello CA, Grunfeld C: Multiple cytokines stimulate hepatic lipid synthesis *in vivo*. *Endocrinology* 125:267-274, 1989
46. Memon RA, Grunfeld C, Moser AH, Feingold KR: Tumor necrosis factor mediates the effects of endotoxin on cholesterol and triglyceride metabolism in mice. *Endocrinology* 132:2246-2253, 1993
47. Krauss RM, Grunfeld C, Doerrler WT, Feingold KR: Tumor necrosis factor acutely increases plasma levels of very low density lipoproteins of normal size and composition. *Endocrinology* 127:1016-1021, 1990
48. Picard F, Richard D, Huang Q, Deshaies Y: Effects of leptin on adipose tissue lipoprotein lipase in the obese *ob/ob* mouse. *Int J Obes* 22:1088-1095, 1998

49. Feingold KR, Strapans I, Memon RA, Moser AH, Shigenaga JK, Doerrler W, Dinarello CA, Grunfeld C: Endotoxin rapidly induced changes in lipid metabolism that produce hypertriglyceridemia: low doses stimulate hepatic triglyceride production while high doses inhibit clearance. *J Lipid Res* 33:1765-1776, 1992

50. Bédard S, Marcotte B, Marette A: Cytokines modulate glucose transport in skeletal muscle by inducing the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biochem J* 325:487-493, 1997

51. Kapur S, Bédard S, Marcotte B, Côté CH, Marette A: Expression of nitric oxide synthase in skeletal muscle: a novel role for nitric oxide as a modulator of insulin action. *Diabetes* 46:1691-1700, 1997

TABLES

Table 1. Body and tissue weights recorded in infected mice 28 days after i.p. injection of 10 cysts of either *Toxoplasma gondii* (*ToxG*) or *Neospora caninum*.

	Controls	<i>ToxG</i> gainers	<i>ToxG</i> nongainers	<i>Neospora</i> <i>caninum</i>
Body weight (g)	39.3 ± 1.2 ^a	34.8 ± 1.1 ^b	27.5 ± 0.8 ^c	33.3 ± 0.9 ^b
Epididymal WAT (mg)	894 ± 68 ^a	514 ± 59 ^b	176 ± 46 ^c	314 ± 36 ^d
Inguinal WAT (mg)	275 ± 44 ^a	187 ± 24 ^b	118 ± 12 ^c	195 ± 9 ^b
Gastrocnemius (mg)	167 ± 13 ^a	155 ± 10 ^a	114 ± 10 ^b	148 ± 9 ^a
Vastus lateralis (mg)	182 ± 8 ^a	186 ± 20 ^a	120 ± 7 ^b	175 ± 5 ^a

WAT: white adipose tissue. Values are means ± s.e.m. of 6 animals. Values not sharing a similar superscript are different from each other ($P < 0.05$).

Table 2. Liver triglyceride content and plasma glucose, insulin and corticosterone levels 90 min after saline or lipopolysaccharide injection (LPS; from *E. coli*, 100 ng/kg, i.p.) to mice infected for 28 days with 10 cysts from either *Toxoplasma gondii* (*ToxG*) or *Neospora caninum*.

	Controls		<i>ToxG</i> gainers		<i>ToxG</i> nongainers		<i>Neospora</i> <i>caninum</i>	
	Saline	LPS	Saline	LPS	Saline	LPS	Saline	LPS
Liver triglycerides ($\mu\text{mol/g}$)	58 \pm 10	72 \pm 2 *	32 \pm 3	49 \pm 10 *	17 \pm 3	29 \pm 1 *	52 \pm 2	67 \pm 3 *
Glucose (mmol/l)	11.5 \pm 2.5	16.5 \pm 1.7 *	9.3 \pm 1.0	7.1 \pm 1.2	8.0 \pm 1.0	4.6 \pm 0.3 *	11.1 \pm 0.5	13.1 \pm 0.5 *
Insulin (pmol/l)	124 \pm 55	99 \pm 29	100 \pm 62	144 \pm 19	88 \pm 22	92 \pm 2	57 \pm 18	162 \pm 31 *
Corticosterone (nmol/l)	105 \pm 63	497 \pm 39 *	126 \pm 76	417 \pm 122 *	255 \pm 88	542 \pm 90 *	46 \pm 2	500 \pm 27 *

Values are means \pm s.e.m. of 3 animals. * Significantly different from saline-injected mice ($P < 0.05$).

FIGURE LEGENDS

- Figure 1 Lipoprotein lipase specific activity in gastrocnemius (panel A) and vastus lateralis (panel B) skeletal muscle 90 min after saline or lipopolysaccharide injection (LPS; from *E. coli*, 100 ng/kg, i.p.) to mice infected for 28 days with either *Toxoplasma gondii* (*ToxG*) or *Neospora caninum*. Bars are means \pm s.e.m. of 3 animals. *Significantly different from saline-injected mice within the same infection status ($P < 0.05$). †Significantly different from noninfected, saline-injected mice ($P < 0.05$).
- Figure 2 Lipoprotein lipase specific activity in epididymal (panel A) and inguinal (panel B) white adipose depots 90 min after saline or lipopolysaccharide injection (LPS; from *E. coli*, 100 ng/kg, i.p.) to mice infected for 28 days with either *Toxoplasma gondii* (*ToxG*) or *Neospora caninum*. Bars are means \pm s.e.m. of 3 animals. *Significantly different from saline-injected mice ($P < 0.05$).
- Figure 3 Plasma triglyceride concentration 90 min after saline or lipopolysaccharide injection (LPS; from *E. coli*, 100 ng/kg, i.p.) to mice infected for 28 days with either *Toxoplasma gondii* (*ToxG*) or *Neospora caninum*. Bars are means \pm s.e.m. of 3 animals. *Significantly different from saline-injected mice ($P < 0.05$).

FIGURES

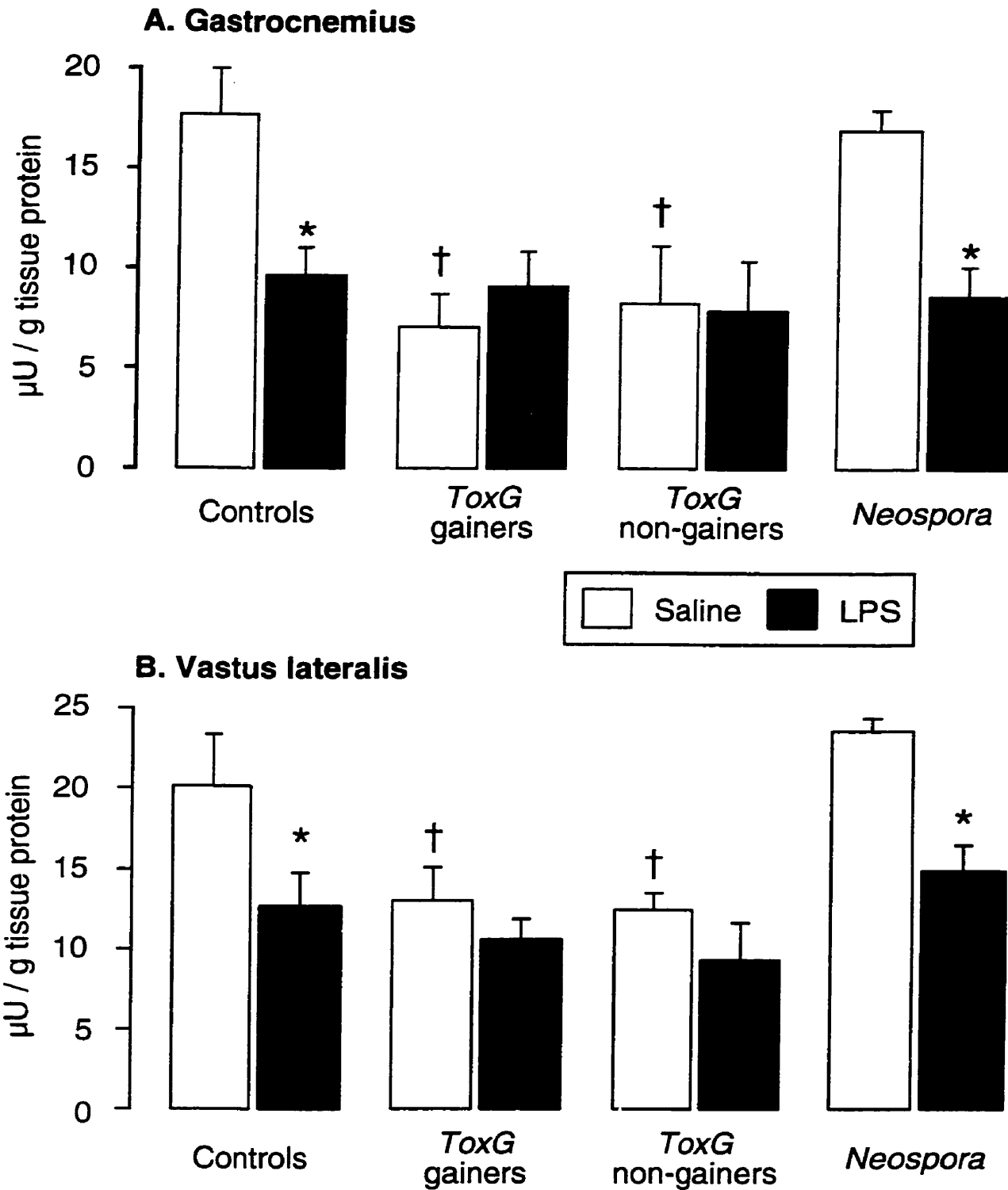


Figure 1

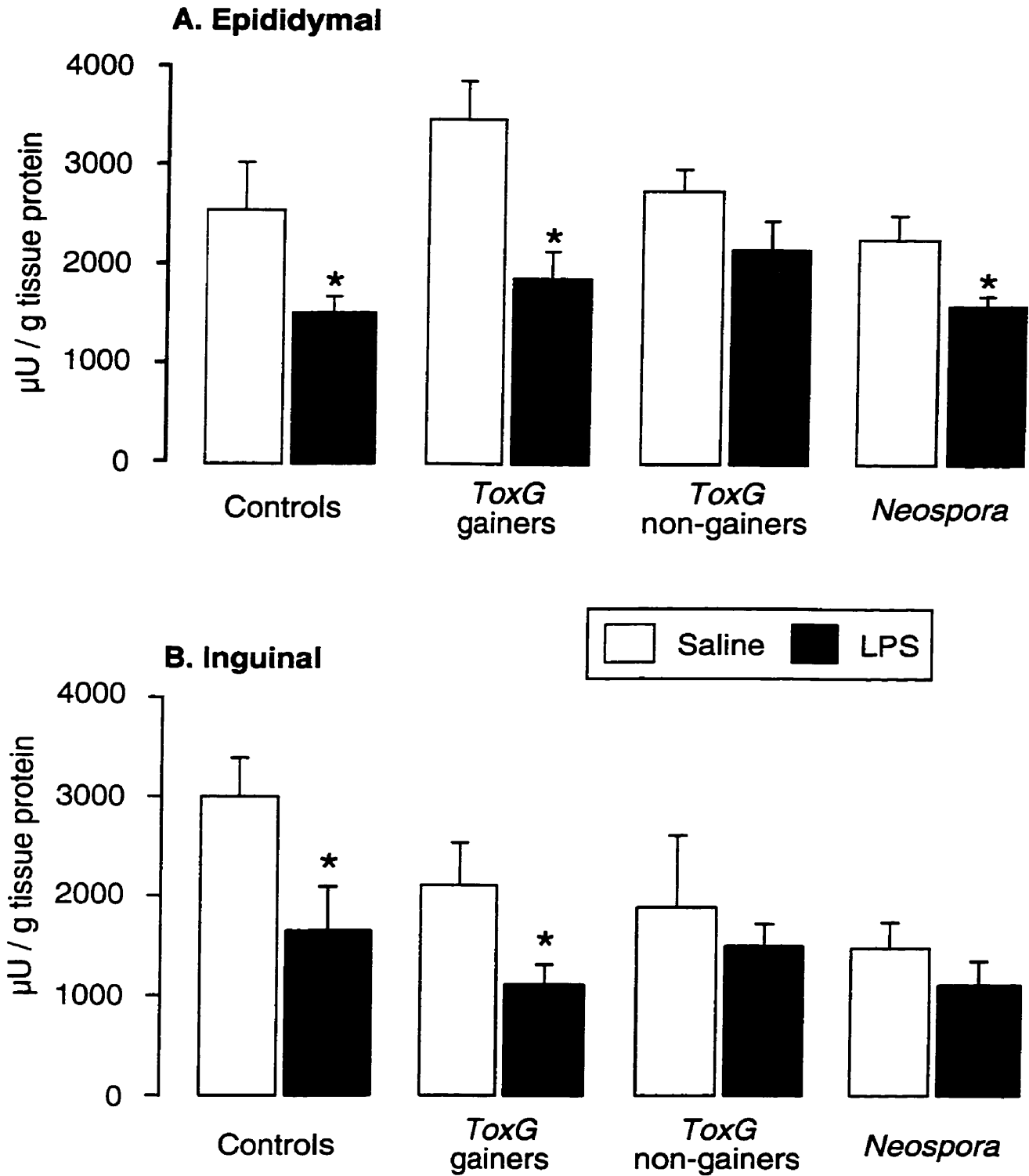


Figure 2

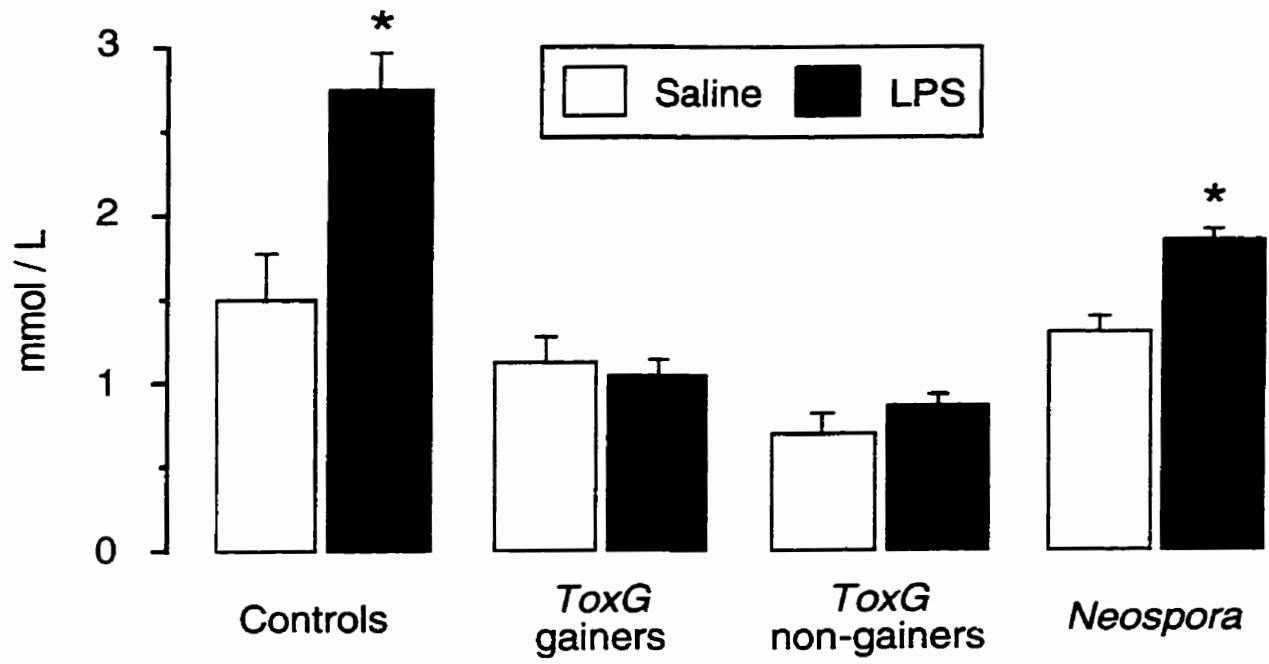


Figure 3

CHAPITRE 5

NITRIC OXIDE MEDIATES ENDOTOXIN-INDUCED HYPERTRIGLYCERIDEMIA THROUGH ITS ACTION ON SKELETAL MUSCLE LIPOPROTEIN LIPASE

Frédéric PICARD¹, Sonia KAPUR², Mylène PERREAULT²,
André MARETTE², and Yves DESHAIES¹

¹ Center for Research on Energy Metabolism, Dept. of Anatomy and Physiology, School of Medicine, Laval University, Québec, QC, Canada G1K 7P4

²Lipid Research Unit, CHUQ, Laval University Hospital Research Center, Québec, QC, Canada, G1V 4G2

Soumis à Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology

RÉSUMÉ

L'endotoxémie constitue une condition aiguë d'hypertriglycéridémie. Des études ont montré qu'à haute dose d'endotoxines, l'augmentation des niveaux circulants de triglycérides (TG) était plus fortement reliée à la diminution de leur catabolisme intravasculaire qu'à l'élévation de leur sécrétion hépatique. La lipoprotéine lipase (LPL) liée à la paroi endothéliale des capillaires sanguins est l'enzyme responsable de l'hydrolyse des TG circulants. L'objectif de cette étude était d'évaluer le rôle du monoxyde d'azote (NO), surproduit par l'enzyme NO synthase inductible (iNOS) pendant l'endotoxémie, dans la diminution de l'activité de la LPL tissulaire causée par l'administration aiguë de lipopolysaccharide (LPS). Chez des rats, l'injection d'un inhibiteur spécifique d'iNOS, l'aminoguanidine (AGN, 100 mg/kg), a prévenu la réduction de l'activité de la LPL du muscle squelettique et du tissu adipeux brun. Par contre, la diminution de la LPL dans le tissu adipeux blanc et le coeur n'a pas été affectée par l'AGN. La diminution de l'activité de la LPL dans le tissu adipeux blanc n'a pas pu être causée par la réduction concomitante de l'insulinémie, puisque chez des rats traités à la LPS, l'infusion d'une forte concentration d'insuline en présence d'euglycémie n'a pas changé l'activité de l'enzyme par rapport à des rats infusés avec une solution saline. Suite à la mesure de la quantité tissulaire de l'ARNm de la LPL et de sa masse, il semble que la diminution de l'activité de la LPL soit causée par des facteurs post-traductionnels. L'injection d'AGN a complètement bloqué l'augmentation de la triglycéridémie observée chez les rats traités à la LPS, situation qui n'était pas liée à des modifications dans la sécrétion hépatique des TG. Le rôle du NO (via iNOS) dans la réponse de la LPL musculaire à la LPS a été confirmé chez des souris invalidées pour le gène iNOS (-/-) et traitées à la LPS. Chez ces souris, l'activité de la LPL musculaire est demeurée inchangée après 6 heures d'endotoxémie, alors que l'activité de la LPL du tissu adipeux blanc et celle du coeur a été diminuée de 50% par la LPS de la même façon que chez les souris sauvages. L'hypertriglycéridémie, très évidente chez les souris sauvages injectées à la LPS, n'était pas observée chez les souris mutantes suite au même traitement. Ces résultats démontrent que dans l'endotoxémie aiguë, la diminution de la LPL musculaire, mais pas celle du tissu adipeux ni du coeur, est causée par la surproduction de NO via iNOS. Ces résultats démontrent aussi que l'hypertriglycéridémie causée par l'administration de LPS est médiée par l'effet du NO sur la LPL musculaire.

SUMMARY

Hypertriglyceridemia is a common characteristic of endotoxemia. Studies have shown that, at high doses of endotoxin, the elevation in plasma triglyceride (TG) levels was more closely related to the reduction in the activity of lipoprotein lipase (LPL), the enzyme responsible for TG intravascular clearance, than to the rate of hepatic TG secretion. The present studies were aimed at evaluating the role of nitric oxide (NO), overproduced in endotoxemia through the activation of inducible NO synthase (iNOS), in the decrease in tissue LPL activity brought about by lipopolysaccharide (LPS). In rats, the specific iNOS inhibitor aminoguanidine (AGN, 100 mg/kg) completely blunted the reduction in LPL activity in skeletal muscle and brown adipose tissue (BAT) brought about by LPS administration (15 mg/kg). LPS-induced decreases in LPL activity in heart and white adipose tissue were unaffected by AGN. The reduction in WAT LPL was not caused by the proportional changes in insulinemia, as LPS-treated rats infused for six hours with high levels of insulin had similar adipose tissue LPL activity than those infused with saline. RT-PCR and Western blot analyses revealed that AGN prevented LPS-mediated alterations in muscle LPL activity through post-translational mechanisms. AGN administration totally blunted the LPS-induced threefold elevation in plasma TG concentration through actions that were not related to changes in hepatic TG secretion. The contribution of iNOS and NO in the response of muscle LPL to LPS was confirmed in iNOS (-/-) knockout mice injected with endotoxin. Gastrocnemius LPL activity in these mice remained unchanged six hours after LPS injection, whereas heart and WAT LPL activity decreased by half as in wildtype animals. LPS increased plasma TG concentration in wildtype mice by 75%, whereas hypertriglyceridemia did not occur in knockout mice. These results show that, after LPS administration, reduced muscle LPL activity and the resulting hypertriglyceridemia are brought about by the overproduction of NO via the induction of iNOS. The findings further provide evidence for a central role of muscle LPL in the response of TG metabolism to endotoxemia.

INTRODUCTION

Hypertriglyceridemia is among the major changes in lipid metabolism during infection or endotoxemia, and is thought to act as part of the host defense (1,2,3). The elevation in circulating triglyceride levels is due both to increases in hepatic secretion of very low density lipoproteins (4,5) and to alterations in the clearance rate of triglycerides (6,7). It has been shown that, whereas low doses of endotoxin mostly affect the former process (8), the hypertriglyceridemia seen after high doses of endotoxin is in large part caused by the decreased activity of lipoprotein lipase (LPL; EC 3.1.1.34), the rate-limiting enzyme responsible for the intravascular hydrolysis of triglycerides [reviewed in (9)].

During short-term endotoxemia, LPL is down-modulated by as yet unknown post-translational mechanisms in both adipose tissue and skeletal muscle (10), which are two major sites of LPL production. Transcriptional modulation of LPL appears to become involved only after longer periods of endotoxin or cytokine exposure (6,11,12). No evidence has yet been described to determine the downstream mediator of the effects of endotoxin on LPL in various tissues.

Endotoxin administration in rodents stimulates the expression and activity of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in adipose tissue (13) as well as in skeletal muscle (14,15) from 4 h after endotoxin exposure to at least 8 h, which leads to overproduction of nitric oxide (NO) in these tissues. Among other targets, the activation of NO production notably interferes with insulin-stimulated glucose uptake in skeletal muscle (14,15). It has been recently demonstrated that NO also mediates the TNF- α -induced reduction in LPL in cultured brown adipocytes (16,17). However, these *in vitro* studies evaluated the effects of only one cytokine over prolonged periods of time (24 hours), which is not necessarily representative of the endotoxin-mediated, short-term LPL reduction in skeletal muscle and adipose tissue *in vivo*.

The aims of the present studies were therefore to determine the contribution of iNOS and NO in the acute (6 hours) decrease in LPL activity brought about by a high dose of endotoxin, and to evaluate its impact on hypertriglyceridemia. To this end, lipopolysaccharide (LPS) was injected in rats pretreated with the specific iNOS inhibitor aminoguanidine to test whether iNOS blockade could blunt or prevent the LPS-induced reduction in LPL and the appearance of hypertriglyceridemia. Hepatic triglyceride secretion rate was also assessed to evaluate the implication of the liver in the elevation in plasma TG caused by LPS injection. Another cohort of rats treated with LPS was subjected to a euglycemic-hyperinsulinemic clamp to assess the

possible role of insulin, a major modulator of LPL (18), in the decrease in adipose LPL during endotoxemia. Finally, iNOS knockout (-/-) mice were used to confirm the contribution of iNOS to the LPS-induced reduction in LPL and hypertriglyceridemia.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Study 1: Pharmacological inhibition of iNOS

Twelve male Wistar rats initially weighing 250-275 g were purchased from Charles River Laboratories (St-Constant, Canada) and housed individually in stainless steel cages in a room kept at $23 \pm 1^\circ\text{C}$ with a 12:12 h light-dark cycle (lights on at 7:00). The animals were cared for and handled in conformance with the Canadian Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the protocols were approved by our institutional animal care committee. Rats initially had ad libitum access to tap water and to a non-purified chow diet (Rodent chow #5075, Ralston Products, Woodstock, Ont, Canada). One week after their arrival, rats were randomly divided into four groups according to a 2 x 2 factorial design. Half of the rats received saline (1 mL/kg, i.p.) and the other half were given aminoguanidine (100 mg/kg, Sigma, St-Louis, MO) dissolved in saline. Thirty minutes later, the endotoxin lipopolysaccharide (LPS, from *Escherichia coli*, serotype 055:B5, Sigma, St-Louis, MO) was injected (15 mg/kg) to half of these groups, whereas the remaining half received saline. Rats were killed by decapitation six hours later, and blood and tissues were harvested and treated as described below. The experiment was repeated once, and both protocols yielded similar results.

Triglyceride secretion rate

A cohort of twenty male Wistar rats was used for assessment of triglyceride secretion rate. One week after their arrival, rats were fitted with a permanent polyethylene cannula in the left jugular vein under isoflurane anesthesia, and were allowed to recover from surgery for three days. On the day of the experiment, rats were injected with aminoguanidine and LPS exactly as indicated above. Five hours and a half later, a solution of Triton WR 1339 (300 mg/ml, Sigma, St-Louis, MO) was injected through the cannula (1 ml/kg), so that the midpoint of the time curve coincided with the time of killing in the other studies. Since the animals had not eaten for at least 6 h, TG secretion can be considered to be largely of hepatic origin. Plasma triglyceride levels were quantitated in serial blood samples taken through the venous catheter before and 20, 40 and 60

min after the administration of Triton. TG secretion rate was calculated by multiplying the slope of the regression line of plasma TG concentration versus time by plasma volume estimated from body weight and was expressed as micromoles per minute.

Hyperinsulinemic clamp in rats treated with LPS

Male Sprague-Dawley rats (200-250 g) purchased from Charles River (Montreal, Qc, Canada) were housed in individual cages under the same conditions as in study 1. Under ketamine/xylazine anesthesia (80 mg/kg and 10 mg/kg, respectively), rats were fitted with a permanent polyethylene cannula in the left jugular vein and another permanent polyethylene cannula in the right carotid artery. Three days after cannulation, overnight fasted rats were weighed and transferred to a quiet isolated room. Once installed, rats were allowed to acclimatize to their new surroundings for 60 minutes. A first blood sample was collected via the carotid artery catheter for basal levels of glucose and insulin. All animals were then injected with LPS (15 mg/kg, i.p.). The clamp was performed essentially as described by Kraegen et al. (19). Insulin dissolved in a solution of 0.9% NaCl containing 0.1% albumin (Fraction V, fatty acid free, Sigma, St.Louis, MO) was infused at a rate of $64 \text{ mU}\cdot\text{kg body weight}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ into the jugular vein. Every five minutes, 20 μL of blood were taken from the carotid artery to measure glycemia. A 25% glucose solution dissolved in 0.9% NaCl was infused into the jugular vein from the beginning of the clamp and was adjusted thereafter to maintain glycemia near the basal level. Sham infusions were similarly performed, except that no insulin was present in the NaCl/albumin solution and that no glucose was infused. After 5 hours, the animals were killed with an overdose of the ketamine/xylazine solution described above. In this experiment, only the gastrocnemius muscle and epididymal and perirenal white adipose tissues were harvested in addition to blood.

Study 2: genetic invalidation of iNOS

Twenty-six wild-type and 26 iNOS knockout mice (genetic background: C57BL/6J x 129/SvJ, kindly provided by C. Nathan, New York, NY), kept in an environment similar to that described above, were injected with LPS (20 mg/kg) or saline (n=13 in each group) and killed six hours later. Blood was collected by cardiac puncture, and tissues were harvested and treated as described above. A pilot study showed that LPL of male and female mice responded similarly, and analyses were thus performed with values pooled for gender.

Plasma and tissue sampling

Immediately after killing, blood was collected, centrifuged (1500 g, 15 min at 4 °C), and the separated plasma was stored at -70°C until later biochemical measurements. Perirenal and epididymal white adipose tissues, interscapular brown adipose tissue, gastrocnemius, soleus, tibialis and vastus lateralis skeletal muscles as well as the heart were excised, and approximately 50 mg of each tissue were homogenized with all-glass tissue grinders (Kontes, Vineland, NJ, USA). Adipose tissue samples were homogenized in 1 ml of a solution containing 0.25 mol/l sucrose, 1 mmol/l EDTA, 10 mmol/l Tris-HCl, and 12 mmol/l deoxycholate, pH 7.4. Muscle samples were homogenized in 1 ml of a solution containing 1 mol/l ethylene glycol, 50 mmol/l Tris-HCl, 3 mmol/l deoxycholate, 10 IU/ml heparin and 5% (v/v) aprotinin (Trasylol, Miles Pharmaceuticals, Rexdale, Canada), pH 7.4. Muscle homogenates were quickly frozen at -70 °C. Adipose tissue homogenates were centrifuged (12000 g, 20 min at 4°C), and the fraction between the upper fat layer and the bottom sediment was removed, diluted with 4 volumes of the homogenization solution without deoxycholate, and stored at -70°C until lipoprotein lipase activity measurement.

RNA extraction and RT-PCR

Total cellular RNA was isolated using guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction with the TRIzol Reagent (Life Technologies) based on the method developed by Chomczynski and Sacchi (20). cDNA synthesis and amplification were performed exactly as previously described (15). Sequences of the antisense and sense oligonucleotides (based on rat LPL and GAPDH) were as follows; LPL: 5'-CCAGCAGCATGGGCTCCAAG-3' and 5'-GAAGACACAGCTGAGGACAC-3', GAPDH: 5'-AGATCCACAACGGATACATT -3' and 5'-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3'. The expected sizes of the amplification products were 358 base pairs for LPL and 331 base pairs for GAPDH. The amplification products were run in 8% acrylamide gels, stained with ethidium bromide, and fluorescence associated with DNA bands was analyzed by laser scanning densitometry and quantitated with the NIH Image software.

Western blots

Protein samples (10 μg for adipose tissue and 50 μg for muscle) were subjected to SDS-PAGE on 7.5% polyacrilamide gels and electrophoretically transferred (100 V, 2 h) to polyvinylidene difluoride (PVDF) filter membranes. Briefly, membranes were washed three times in distilled water, and incubated for 1 h in skim milk at room temperature. The membranes were then washed for 30 min with buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.04% NP-40, and 0.02% Tween-20, and incubated overnight with an LPL monoclonal antibody (1.66 $\mu\text{g}/\text{mL}$) at 4 $^{\circ}\text{C}$ (5D2 LPL antibody, kindly provided by Dr J. D. Brunzell, University of Washington, Seattle, WA, USA). Membranes were then washed for 45 min at 37 $^{\circ}\text{C}$, followed by a 1-h incubation at room temperature with anti-mouse immunoglobulin G (1:10 000 dilution) conjugated to horseradish peroxidase. After washing for 45 min at 37 $^{\circ}\text{C}$, the immunoreactive bands were detected by the enhanced chemiluminescence method (ECL+, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). The conditions used herein resulted in the dissociation of the LPL dimer, and only monomeric LPL was detected.

Plasma determinations

Plasma glucose concentrations were measured by the glucose oxidase method with the Beckman glucose analyzer. Insulin was determined by RIA using a reagent kit from Linco Research (St. Charles, MO, USA) with rat insulin as standard. Plasma triglycerides were measured by an enzymatic method using a reagent kit from Boehringer Mannheim (Montréal, Canada) which allowed correction for free glycerol. Plasma nonesterified fatty acids (NEFA) were also determined by an enzymatic colorimetric technique (Wako Pure Chemical Industries, Richmond, VA). Corticosterone concentrations were measured by RIA (ICN Pharmaceuticals Inc, Orangeburg, NY). Nitric oxide concentration was evaluated by the accumulation of its stable degradation products nitrite and nitrate (21). Deproteinized plasma samples were incubated with nitrate reductase (0.1 U/mL) in the presence of 50 μM NADPH and 5 μM FAD for 15 min at 37 $^{\circ}\text{C}$ to reduce nitrate to nitrite. Samples were then incubated for 5 min at 37 $^{\circ}\text{C}$ with lactate dehydrogenase (10 U/mL) and sodium pyruvate (10 mM) to oxidize the remaining NADPH. Total nitrite was then measured using the Griess reagent (1.0% sulfanilamide/0.1% *N*-[1-naphthyl]-ethylenediamine dihydrochloride) and the absorption was read at 540 nm.

Tissue LPL activity

One hundred μ l of thawed tissue homogenates were incubated under gentle agitation for 1 h at 28°C with 100 μ l of a substrate mixture consisting of 0.2 mol/l Tris-HCl buffer, pH 8.6, which contained 10 MBq/l [*carboxyl*-¹⁴C]triolein (Amersham, Oakville, Canada) and 2.52 mmol/l cold triolein emulsified in 50 g/l gum arabic, as well as 20 g/l fatty acid free bovine serum albumin, 10% human serum as a source of apolipoprotein C-II, and either 0.2 or 2 mol/l NaCl. Free oleate released by LPL was then separated from intact triolein and mixed with Universol (NEN, Montréal, Canada), and sample radioactivity was determined in a scintillation counter. LPL activity was calculated by subtracting lipolytic activity determined in a final NaCl concentration of 1 mol/l (non-LPL activity) from total lipolytic activity measured in a final NaCl concentration of 0.1 mol/l. LPL activity was expressed as microunits (1 μ U = 1 μ mol nonesterified fatty acids released per hour of incubation at 28°C). The interassay coefficient of variation was 3.2% and was determined using bovine skim milk as a standard source of LPL. Protein content of the tissue extracts was measured by the method of Lowry et al. (22). Data are expressed as specific activity of LPL (μ U/ g tissue protein).

Statistical analysis

Data are presented as means \pm S.E.M. Group means were compared using a 2 x 2 factorial analysis of variance (ANOVA) to determine main effects of LPS and aminoguanidine (or genotype) and their interactions. Differences between individual group means were analyzed by Fisher's protected least squares difference (PLSD) test. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Study 1: Pharmacological inhibition of iNOS

Plasma triglyceride concentration was close to threefold higher in LPS-treated rats (3.5 versus 1.2 mmol/l) than in control animals (Figure 1). Whereas AGN had no effect by itself, it completely blunted the LPS-induced hypertriglyceridemia (LPS-AGN interaction: $P < 0.0002$).

LPS administration in rats lowered plasma glucose ($P = 0.002$) and insulin ($P = 0.007$) levels (Table 1), and increased plasma NEFA and corticosterone concentrations. Plasma

NO₃/NO₂ levels were greatly elevated (4.5 fold compared to controls, $P < 0.0001$) six hours after LPS injection. AGN alone had no effect on either glycemia, insulinemia, plasma NO₃/NO₂ or corticosterone levels, whereas it slightly but significantly increased plasma NEFA concentrations. The LPS-induced increase in plasma NO₃/NO₂ was partially blunted by prior AGN treatment (35 %, LPS-AGN interaction: $P < 0.0001$).

LPS decreased LPL specific activity by at least 50% in all tissues studied ($P < 0.0001$, Figure 2), including soleus, tibialis and vastus lateralis muscles as well as perirenal white adipose tissue (not shown). In gastrocnemius muscle and interscapular brown adipose tissue, AGN administration completely prevented the LPS-induced decrease in LPL activity (LPS-AGN interaction: $P < 0.05$), whereas in heart and epididymal white adipose tissue, AGN did not affect LPL activity of LPS-injected rats. In the heart, AGN significantly increased LPL activity ($P < 0.05$), independently of LPS administration.

LPL mRNA (adjusted for that of GAPDH mRNA) was not significantly affected by either LPS or AGN in both skeletal muscle (Figure 3, panel A) and white adipose tissue (panel B). In gastrocnemius muscle, no significant change in protein mass was observed between groups (Figure 4, panel A). On the other hand, in the epididymal white adipose tissue (panel B), LPL mass was increased by both LPS ($P < 0.003$) and AGN ($P < 0.003$) administration, which exerted additive effects when combined (LPS-AGN interaction: $P < 0.04$).

Hepatic triglyceride secretion rate

Triglyceride (TG) secretion rate was measured after administration of Triton 1339, which blocks intravascular TG clearance. LPS diminished TG secretion by 50% (from 5.5 to 2.8 $\mu\text{mol}/\text{min}$, $P < 0.05$), and triglyceride secretion was not affected by AGN alone. However, AGN injection before LPS administration dampened the LPS-induced reduction in TG secretion. Therefore, LPS-induced hypertriglyceridemia was not due to an increase in TG output into the circulation. Rather, LPS-induced hypertriglyceridemia was entirely due to reduced TG clearance, since Triton administration (inhibition of clearance) to control animals resulted in similar final plasma TG levels compared to those obtained after LPS injection (Figure 5).

Hyperinsulinemic clamp in rats treated with LPS

Hyperinsulinemia (plasma values at the end of the clamp: 124 ± 18 versus 0.5 ± 0.3 nmol/l in saline-infused rats, $P < 0.001$) brought about by a supraphysiologic dose of exogenous insulin

did not affect LPL activity in either epididymal or perirenal white adipose depots (Table 2). In gastrocnemius muscle, LPL activity was similar between LPS-treated rats infused with saline or with high levels of insulin.

Study 2: genetic invalidation of iNOS

As in normal rats, LPS injection to wild-type mice resulted in a large increase in plasma TG concentration (from 0.7 to 1.3 mmol/l, $P < 0.05$, Figure 6). However, LPS failed to induce hypertriglyceridemia in iNOS knockout mice. Compared to wild-type animals, iNOS knockout mice had higher plasma levels of glucose ($P = 0.001$, Table 3) but similar plasma insulin and corticosterone concentrations. LPS injection decreased glycemia ($P = 0.002$) and increased insulinemia ($P = 0.0006$) and corticosterone levels ($P < 0.0001$) in both groups of mice. Whereas plasma NEFA concentration increased by about 45% after LPS treatment in wild-type mice, it remained unchanged in knockout animals (LPS-genotype interaction: $P = 0.005$). A strong interaction was observed in the increase in plasma NO_2/NO_3 levels ($P < 0.0001$), which reflected the inability of iNOS knockout mice to overproduce NO during endotoxemia.

LPS administration to wild-type mice reduced LPL activity in all tissues studied (Figure 7), including vastus lateralis muscle and perirenal white adipose tissue (not shown). In contrast to what was observed in rats, LPS increased LPL activity in brown adipose tissue of mice (from 350 to 816 $\mu\text{U/g}$ protein, $P < 0.0001$). Knockout of the iNOS gene prevented the LPS-induced decrease in LPL activity in gastrocnemius muscle and also increased basal LPL activity in the heart ($P < 0.0001$) and in brown adipose tissue, in which no further increase occurred with LPS (LPS-genotype interaction: $P = 0.005$). In iNOS knockout mice, LPS also decreased LPL activity in epididymal white adipose tissue (78%) and the heart (42%).

DISCUSSION

Hypertriglyceridemia is among the major changes in lipid metabolism that occur with endotoxin administration. It has been suggested that this process occurs as part of the host defense (23) and that it serves to neutralize endotoxins, which can bind to circulating lipoproteins (24), thereby lowering the endotoxin-induced production of cytokines during endotoxemia, thus controlling the inflammatory response (2). The increase in circulating triglyceride (TG) levels

during endotoxemia can be the result of both higher hepatic secretion (5) and lower clearance at the periphery (7). As the dose of endotoxin increases, the contribution of TG hepatic secretion to hypertriglyceridemia decreases and that of TG clearance becomes more important (8). In rats, a dose of 0.5 mg/kg (which is 30 times lower than the dose used in the present studies) was shown to induce hypertriglyceridemia without affecting hepatic TG secretion (8). The results obtained herein demonstrate that the LPS-mediated increase in plasma TG was caused by a strong inhibition of TG clearance rather than by enhanced hepatic TG secretion. Indeed, in the present experiments, LPS at a dose of 15 mg/kg decreased TG secretion rates but also produced hypertriglyceridemia, which highlights the important role of TG hydrolysis in the latter process.

Lipoprotein lipase is a key enzyme implicated in the vascular clearance of circulating triglycerides. The modulation of the enzyme is usually tissue-specific and reciprocal in adipose tissue and muscle (25). For instance, after a meal, adipose tissue LPL activity is increased and muscle LPL activity is reduced (25,26). We have recently shown that insulin is a sufficient and necessary causal factor for the postprandial changes in LPL activity in both adipose tissue and muscle, including the heart (18). The postprandial modulation of LPL by insulin is also dependent on the duration of previous fasting, and can be counteracted by the sympathoadrenal system (27), but again in a tissue-specific, opposite manner. Therefore, endotoxemia constitute a rare instance in which LPL activity is decreased in almost every tissue (9), thus causing an overall reduction in LPL catalytic capacity (post-heparin LPL) within the vascular compartment (8).

It has been previously shown *in vivo* that the effects of endotoxins on LPL are mediated by cytokines, since no decrease in tissue LPL activity is seen in mice (C3H/HeJ) of which macrophages do not produce cytokines in response to LPS (3,28). Among others, tumor necrosis factor- α (TNF- α) is an important factor in the production of hypertriglyceridemia and the reduction in LPL activity, at least in adipose tissue (3,29). In skeletal muscle, interleukin-1 and interferon- γ appear to be more potent for the down-modulation of LPL *in vivo* (3). It was also shown that, after LPS administration (0.5 mg/kg), hypertriglyceridemia and decreased post-heparin LPL activity could be prevented by prior injection with the α_2 -antagonist yohimbine (30), suggesting that the sympathoadrenal system is activated and mediates at least part of the response of LPL to endotoxins. Finally, two recent studies have reported that the reduction in LPL activity in brown adipocytes exposed to TNF- α for 24 hours was mediated by overproduction of NO (16,17). Our present findings further show that NO not only induces the reduction in brown adipose tissue LPL *in vivo* during endotoxemia, but also in skeletal muscle.

The mechanisms implicated in the reduction in LPL activity after LPS administration are still unclear. LPS at doses as high as 30 mg/kg have been shown in rats to decrease LPL activity without affecting LPL mRNA or LPL mass in both adipose tissue and heart as assessed 7 hours after administration (10), which suggest that alterations in post-translational mechanisms leading to enzyme activation are responsible for the LPS-induced reduction in LPL activity. Changes in LPL mRNA and mass in soleus and white adipose tissue are not observed earlier than 24 h following LPS exposure in rats (6), which is consistent with the decrease in LPL mRNA observed in adipocytes incubated with TNF- α for similar lengths of time (11). In mice, concomitant reductions in the expression of PPAR γ and LPL in adipose tissue have not been reported earlier than 18 hours of endotoxemia (12). Since LPL transcription is mediated by peroxisome-proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) in adipose tissue (31), the decrease in PPAR γ may explain in large part the late reduction in LPL mRNA following LPS administration.

The present results demonstrate for the first time that, in LPS-treated animals, the decrease in muscle LPL activity is mediated by overproduction of NO via iNOS stimulation. This is demonstrated by the findings from both pharmacological (aminoguanidine) and genetic (knockout mice) invalidation of iNOS. It is important to note that the effects of NO on LPL were seen in several muscles, including soleus, tibialis, and vastus lateralis. Thus, the effects of NO on muscle LPL appears to be generalized and not specific to muscle fiber type. The reduction in LPL activity was caused by post-translational mechanisms, as previously suggested (10). These mechanisms remain to be determined, but it can be argued, since LPL exists in two forms (an inactive monomer and an active homodimer) and that LPS did not change overall protein mass, that LPS may have decreased the ratio of the dimeric to monomeric forms of the enzyme, thus affecting the covalent binding between the monomers. In this regard, changes in intracellular oxidation status brought about by NO-induced production of free radicals (32) may conceivably have an impact on the LPL dimerization process. In muscle, the induction of iNOS expression is detectable from 4 h to at least 8 h following LPS injection (13), whereas in both brown and white adipose tissues, iNOS activity is promoted as soon as 2 h after endotoxin exposure. In both tissues, cytokines act synergistically to induce iNOS activity (13). Thus, it is likely that other factors are also implicated in the rapid (from 1-2 h after the administration of endotoxins) decrease in muscle LPL activity (7,33), at which time iNOS is not present [or at least not detected with the use of our antibodies (A. Marette, M. Perreault, unpublished results)].

In brown adipose tissue (BAT), our findings suggest that NO mediates the LPS-induced LPL reduction, at least in rats. Indeed, the iNOS inhibitor AGN completely prevented in rats the

diminution in BAT LPL activity. These results concur with *in vitro* studies with brown adipocytes, in which NO donors mimicked, and aminoguanidine blunted, the effects of TNF- α on LPL activity (16). On the other hand, in wild-type mice, LPS increased, rather than decreased, BAT LPL activity, and no effect of LPS was observed in knockout animals. These results differ from those obtained in rats and were unexpected. However, the mechanisms implicated in LPL modulation by LPS in BAT remain unclear and few data are available. One could suggest that, in mice, the state of hypermetabolism that prevails after LPS administration may occur more rapidly than in rats (34,35). Indeed, in normal mice, the time course of hyperglycemia and hypoinsulinemia begins 90 min after LPS injection and is followed by hypoglycemia and hyperinsulinemia six hours later (F. Picard & Y. Deshaies, unpublished results). Our findings in rats show that hypoinsulinemia is still present at the latter time point, suggesting that LPS-induced changes in metabolism are slower in rats than in mice. Therefore, it can be hypothesized that, shortly after an initial reduction (which possibly could be mediated by NO), BAT LPL activity could have been increased through mechanisms other than NO. If this is the case, these mechanisms would have been active in both wild-type and knockout mice to promote higher LPS-induced energy expenditure (34). Since LPS strongly stimulates the sympathoadrenal system (5), which increases BAT LPL activity in numerous conditions (27,36), it may be argued that the latter is implicated in the elevation in BAT LPL in mice, as observed 6 h after LPS administration, and that it overwhelms the down-modulating effects of NO on BAT LPL.

In white adipose tissue, it is clear from the present results that the LPS-induced reduction in LPL activity was not mediated by NO. Indeed, AGN failed to prevent the decrease in LPL in all depots studied, including the perirenal tissue (data not shown). In addition, LPL activity of LPS-treated iNOS knockout mice was half that of saline-injected animals, which further suggests that NO is not implicated in LPL reduction. The post-translational mechanisms through which LPS affects adipose tissue LPL are not known at this point. In the present experiments, the decrease in LPL activity is not consistent with the increase in total LPL mass. It is possible that LPS alters the dimerization of the enzyme or its capacity to be secreted in its active form by the adipocyte (37). On the other hand, the present findings suggest that the contribution of insulinemia in the diminution in white adipose tissue LPL activity following LPS administration can be ruled out. Insulin levels in rats were decreased six hours after LPS injection, but were increased in mice. Since both species displayed a similar response of adipose LPL activity to LPS, it is unlikely that insulin participates in the LPS-induced alteration in LPL activity. The findings in LPS-treated rats infused with insulin further suggest that, in white adipose tissue, the hormone is not involved in the modulation of LPL during endotoxemia. However, insulin has

been shown to stimulate LPL activity and synthesis in adipocytes from septic rats after 20 hours of incubation (38). Thus, insulin might in the long-term counteract the effects of LPS on LPL by enhancing enzyme synthesis, possibly through stimulation of PPAR γ (31).

The present studies suggest a role of iNOS in modulating basal activity of LPL in the heart. In both AGN-treated rats and untreated iNOS knockout mice, heart LPL activity was 30 to 35% higher than in control animals. On the other hand, iNOS invalidation or inhibition failed to prevent the LPS-induced reduction in LPL activity in the heart. As in skeletal muscle, it has been shown that this diminution is caused by post-transcriptional mechanisms (10). Cardiomyocytes incubated with TNF- α had a similar reduction in LPL activity, suggesting that this cytokine may mediate the effects of LPS on LPL in the heart (39). Further studies are needed to determine the mechanisms whereby LPL is decreased in cardiac tissue of endotoxin-treated animals, which probably are NO-independent but cytokine-related (3), since iNOS inhibition seems to favor elevated LPL activity.

The present findings suggest that skeletal muscle LPL is an important determinant of triglyceridemia during high dose endotoxemia. Indeed, in both animal models of iNOS inhibition, only muscle LPL was correlated with TG levels. Adipose tissue LPL did not appear to play a role in the process, since hypertriglyceridemia was reversed by iNOS inhibition although adipose LPL remained unchanged. Similar conclusions can be drawn for heart LPL. Previous studies in rats have also shown that LPS-induced reductions in skeletal muscle LPL activity in absence of any change in adipose LPL were sufficient to stimulate a threefold elevation in plasma TG levels (7). Since LPL activity in BAT was modulated in an opposite manner in mice and rats by LPS, and given the relatively small mass of this tissue, the contribution of BAT LPL activity to the development of hypertriglyceridemia is unlikely to have been substantial. These results therefore demonstrate that LPS-induced hypertriglyceridemia is mediated by NO, mainly through its action on skeletal muscle LPL.

In conclusion, the present studies show that the LPS-induced reduction in skeletal muscle LPL activity is post-transcriptionally mediated by nitric oxide. They also demonstrate that adipose tissue and heart LPL activities are reduced during endotoxemia by mechanisms other than nitric oxide, which, in the case of adipose tissue, are not associated with changes in insulinemia. These other factors remain to be determined. Finally, our findings suggest that nitric oxide is a key player in the LPS-mediated increase in plasma triglyceride concentrations through modulation of LPL activity in skeletal muscle.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the professional assistance of Josée Lalonde for the triglyceride secretion protocol, and Sylvain Bédard for his help during in hyperinsulinemic clamp study. F. Picard is a recipient of a Ph.D. fellowship from the Medical Research Council of Canada. M. Perreault was a recipient of a Ph.D. fellowship from the Association du Diabète du Québec. This work was supported by grants from the Medical Research Council of Canada and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada.

REFERENCES

1. **Hardardottir I, Grünfeld C, Feingold KR.** Effects of endotoxin and cytokines on lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol* 1994;5:207-215
2. **Harris HW, Grunfeld C, Feingold KR, et al.** Chylomicrons alter the fate of endotoxin, decreasing tumor necrosis factor release and preventing death. *J Clin Invest* 1993;91:1028-1034
3. **Feingold KR, Marshall M, Gulli R, Moser AH, Grunfeld C.** Effect of endotoxin and cytokines on lipoprotein lipase activity in mice. *Arterioscler Thromb* 1994;14:1866-1872
4. **Lanza-Jacoby S, Wong SH, Tabares A, Baer D, Schneider T.** Disturbances in the composition of plasma lipoproteins during gram-negative sepsis in the rat. *Biochim Biophys Acta* 1992;1124:233-240
5. **Lanza-Jacoby S, Phetteplace H, Sedkova N, Knee G.** Sequential alterations in tissue lipoprotein lipase, triglyceride secretion rates, and serum tumor necrosis factor α during *Escherichia coli* bacteremic sepsis in relation to the development of hypertriglyceridemia. *Shock* 1998;9:46-51
6. **Lanza-Jacoby S, Sedkova N, Phetteplace H, Perroti D.** Sepsis-induced regulation of lipoprotein lipase expression in rat adipose tissue and soleus muscle. *J Lipid Res* 1997;38:701-710
7. **Bagby GJ, Corll CB, Martinez RR.** Triacylglycerol kinetics in endotoxic rats with suppressed lipoprotein lipase activity. *Am J Physiol* 1987;253:E59-E64
8. **Feingold KR, Strapans I, Memon RA, et al.** Endotoxin rapidly induced changes in lipid metabolism that produce hypertriglyceridemia: low doses stimulate hepatic triglyceride production while high doses inhibit clearance. *J Lipid Res* 1992;33:1765-1776
9. **Bagby GJ, Pekala PH.** Lipoprotein lipase in trauma and sepsis. In: *Lipoprotein lipase*, edited by Borensztajn, J. Chicago: Evener, 1987;247-274.

10. **Gouni I, Oka K, Etienne J, Chan L.** Endotoxin-induced hypertriglyceridemia is mediated by suppression of lipoprotein lipase at a post-transcriptional level. *J Lipid Res* 1993;34:139-146
11. **Zechner R, Newman TC, Sherry B, Cerami A, Breslow JL.** Recombinant human cachectin/tumor necrosis factor but not interleukin-1 α downregulates lipoprotein lipase gene expression at the transcriptional level in mouse 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biol* 1988;8:2394-2401
12. **Hill MR, Young MD, McCurdy CM, Gimble JM.** Decreased expression of murine PPAR γ in adipose tissue during endotoxemia. *Endocrinology* 1997;138:3073-3076
13. **Kapur S, Marcotte B, Marette A.** Mechanism of adipose tissue iNOS induction in endotoxemia. *Am J Physiol* 1999;276:E635-E641
14. **Kapur S, Bédard S, Marcotte B, Côté CH, Marette A.** Expression of nitric oxide synthase in skeletal muscle: a novel role for nitric oxide as a modulator of insulin action. *Diabetes* 1997;46:1691-1700
15. **Bédard S, Marcotte B, Marette A.** Cytokines modulate glucose transport in skeletal muscle by inducing the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biochem J* 1997;325:487-493
16. **Uchida Y, Tsukahara F, Ohba K, et al.** Nitric oxide mediates down regulation of lipoprotein lipase activity induced by tumor necrosis factor- α in brown adipocytes. *Eur J Pharmacol* 1997;335:235-243
17. **Uchida Y, Tsukahara F, Ohba K-I, Ogawa A, Nomoto T, Muraki T.** Augmentation of tumor necrosis factor- α -induced suppression of lipoprotein lipase by nitric oxide donors in cultured brown adipocytes. *Ann NY Acad Sci* 1997;813:369-372
18. **Picard F, Naïmi N, Richard D, Deshaies Y.** Response of adipose tissue lipoprotein lipase to the cephalic phase of insulin secretion. *Diabetes* 1999;48:452-459

19. **Kraegen EW, James DE, Bennett SP, Chisholm DJ.** In vivo insulin sensitivity in the rat determined by the euglycemic clamp. *Am J Physiol* 1983;245:E1-E7
20. **Chomczynski P, Sacchi N.** Single-step method of RNA isolation by guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-159
21. **Verdon CP, Burton BA, Prior RL.** Sample pretreatment with nitrate reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase quantitatively reduces nitrate while avoiding interference by NADP⁺ when the Griess reaction is used to assay for nitrite. *Anal Biochem* 1995;224:502-508
22. **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275
23. **Grunfeld C, Feingold KR.** Tumor necrosis factor, interleukin, and interferon induced changes in lipid metabolism as part of host defense. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992;200:224-227
24. **Warren HS, Riveau GR, De Deccker FA, Chedid LA.** Control of endotoxin activity and interleukin-1 production through regulation of lipopolysaccharide binding by a macrophage factor. *Infect Immun* 1988;56:204-212
25. **Eckel RH.** Lipoprotein lipase: a multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases. *N Engl J Med* 1989;320:1060-1068
26. **Zechner R.** The tissue-specific expression of lipoprotein lipase: implications for energy and lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol* 1997;8:77-88
27. **Picard F, Richard D, Timofeeva E, Deshaies Y.** Abnormal postprandial modulation by insulin and the β -adrenergic system in the Zucker rat after prolonged fasting. *Diabetologia* 2000;(In Press)
28. **Memon RA, Grunfeld C, Moser AH, Feingold KR.** Tumor necrosis factor mediates the effects of endotoxin on cholesterol and triglyceride metabolism in mice. *Endocrinology* 1993;132:2246-2253

29. **Lopez-Soriano J, Llovera M, Carbo N, Garcia-Martinez C, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM.** Lipid metabolism in tumor-bearing mice: studies with knockout mice for tumor necrosis-factor receptor 1 protein. *Mol Cell Endocrinol* 1997;132:93-99
30. **Nonogaki K, Moser AH, Feingold KR, Grunfeld C.** α -Adrenergic receptors mediate the hypertriglyceridemia induced by endotoxin, but not tumor necrosis factor, in rats. *Endocrinology* 1994;135:2644-2650
31. **Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, et al.** PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J* 1996;15:5336-5348
32. **Murad F.** Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling. *Biosci Rep* 1999;19:133-154
33. **Grunfeld C, Gulli RG, Moser AH, Gavin LA, Feingold KR.** Effects of tumor necrosis factor administration in vivo on lipoprotein lipase activity in various tissues of the rat. *J Lipid Res* 1989;30:579-585
34. **Arsenijevic D, Girardier L, Seyhoux J, Chang HR, Dulloo AG.** Altered energy balance and cytokine gene expression in a murine model of chronic infection with *Toxoplasma gondii*. *Am J Physiol* 1997;272:E908-E917
35. **Arsenijevic D, Girardier L, Seydoux J, et al.** Metabolic-cytokine responses to a second immunological challenge with LPS in mice with *T. gondii* injection. *Am J Physiol* 1998;274:E439-E445
36. **Mantha L, Deshaies Y.** β -Adrenergic modulation of triglyceridemia under increased energy expenditure. *Am J Physiol* 1998;274:R1769-R1776
37. **Bergö M, Olivecrona G, Olivecrona T.** Forms of lipoprotein lipase in rat tissues: in adipose tissue the proportion of inactive lipase increases on fasting. *Biochem J* 1996;313:893-898

38. **Rosato EF, Vemulapalli P, Lang CH, Lanza-Jacoby S.** Insulin stimulates lipoprotein lipase activity and synthesis in adipocytes from septic rats. *J Sur Res* 1997;73:73-79

39. **Friedman G, Gallily R, Chajek-Shaul T, et al.** Lipoprotein lipase in heart cell cultures is suppressed by bacterial lipopolysaccharide: an effect mediated by production of tumor-necrosis factor. *Biochim Biophys Acta* 1988;960:220-228

TABLES

Table 1. Plasma variables six hours after LPS administration (15 mg/kg) in rats treated or not with aminoguanidine (100 mg/kg) 30 min prior to LPS injection.

	Control		Aminoguanidine		ANOVA (<i>P</i>)		
	Saline	LPS	Saline	LPS	LPS (L)	AGN (A)	L x A
Glucose (mM)	8.5 ± 0.2	7.4 ± 0.4	8.6 ± 0.2	7.3 ± 0.3	0.002	NS	NS
Insulin (nM)	0.95 ± 0.2	0.60 ± 0.1	0.98 ± 0.1	0.38 ± 0.1	0.007	NS	NS
Nonesterified fatty acids (mM)	0.22 ± 0.0	0.52 ± 0.7	0.42 ± 0.0	0.68 ± 0.1	0.008	0.05	NS
Corticosterone (mM)	0.51 ± 0.3	1.36 ± 0.6	0.01 ± 0.0	1.68 ± 0.6	0.006	NS	NS
NO ₃ /NO ₂ (μM)	17.1 ± 1.3	77.9 ± 2.1	20.2 ± 0.4	50.2 ± 3.4	< 0.0001	0.0001	< 0.0001

Values are means ± S.E.M. of 3 animals (experiment repeated twice). NS: not significant.

Table 2. Specific activity of lipoprotein lipase ($\mu\text{U/g}$ protein) in epididymal and perirenal white adipose tissue (WAT) and gastrocnemius muscle of rats injected with LPS (15 mg/kg) and subjected or not to a euglycemic-hyperinsulinemic clamp for 5 hours.

	LPS	LPS + insulin
Epididymal WAT	1259 \pm 254	1281 \pm 202
Perirenal WAT	1114 \pm 183	1054 \pm 139
Gastrocnemius muscle	8.15 \pm 0.8	9.37 \pm 1.0

Values are means \pm S.E.M. of 6 animals.

Table 3. Plasma variables in wild-type and iNOS knockout (-/-) mice six hours after administration of LPS (20 mg/kg).

	Wild-type		iNOS -/-		ANOVA (<i>P</i>)		
	Saline	LPS	Saline	LPS	LPS (L)	Genotype (G)	L x G
Glucose (mM)	12.0 ± 0.7	8.1 ± 1.6	17.4 ● 1.7	12.2 ± 0.9	0.002	0.001	NS
Insulin (nM)	0.015 ± 0.004	0.036 ± 0.013	0.006 ± 0.002	0.053 ± 0.008	0.0006	NS	NS
Nonesterified fatty acids (mM)	0.39 ± 0.04	0.60 ± 0.03	0.38 ± 0.04	0.37 ● 0.03	0.01	0.004	0.005
Corticosterone (mM)	0.17 ± 0.04	0.76 ± 0.08	0.32 ± 0.08	0.80 ± 0.12	< 0.0001	0.25	NS
NO ₃ /NO ₂ (μM)	1.31 ± 0.04	3.92 ± 0.61	1.64 ± 0.36	1.33 ± 0.56	0.001	0.002	< 0.0001

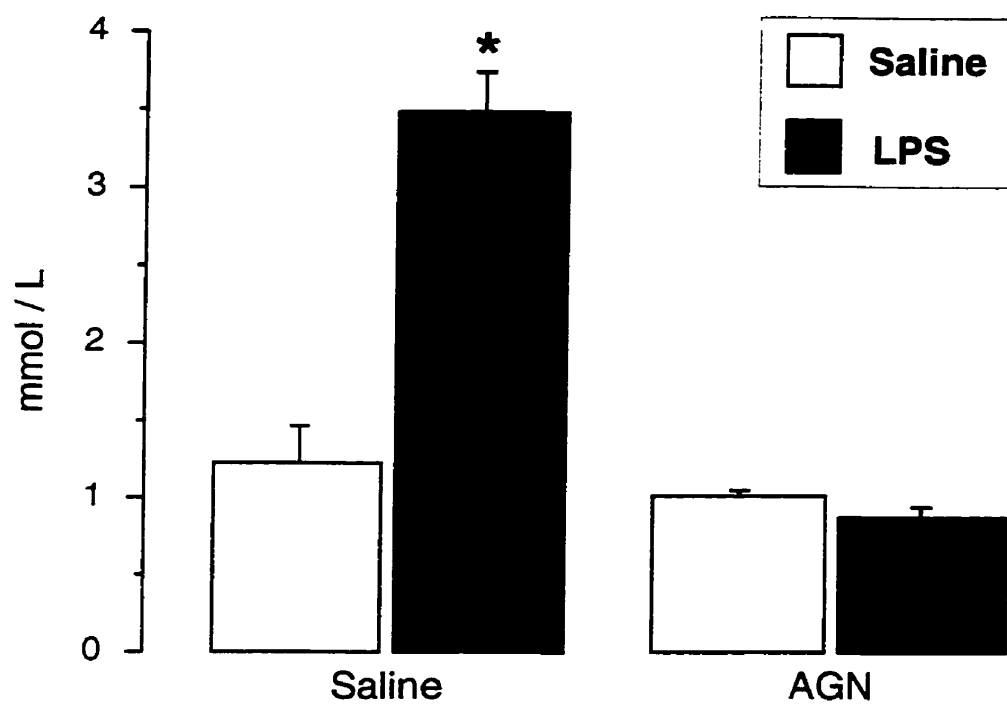
Values are means ± S.E.M. of 7-9 animals. NS: not significant.

FIGURE LEGENDS

- Figure 1 Plasma triglyceride concentration six hours after LPS injection (15 mg/kg) in rats treated or not with aminoguanidine (AGN, 100 mg/kg) 30 min prior to LPS administration. Bars represent means \pm S.E.M. of 3 animals. *Different from control rats ($P < 0.05$).
- Figure 2 Lipoprotein lipase specific activity six hours after LPS injection (15 mg/kg) in rats treated or not with aminoguanidine (AGN, 100 mg/kg) 30 min prior to LPS administration. Symbols represent means \pm S.E.M. of 3 animals. *Different from control animals ($P < 0.05$).
- Figure 3 Lipoprotein lipase (LPL) mRNA levels in skeletal muscle (panel A) and white adipose tissue (panel B) six hours after LPS injection (15 mg/kg) in rats treated or not with aminoguanidine (AGN, 100 mg/kg) 30 min prior to LPS administration. RNA was isolated, and LPL mRNA levels were evaluated by RT-PCR as described in EXPERIMENTAL PROCEDURES. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) transcript levels were also determined as an internal control. The right panels represent means \pm S.E.M. of one representative experiment with two rats.
- Figure 4 Lipoprotein lipase (LPL) protein levels in skeletal muscle (panel A) and white adipose tissue (panel B) six hours after LPS injection (15 mg/kg) in rats treated or not with aminoguanidine (AGN, 100 mg/kg) 30 min prior to LPS administration. Tissue proteins were subjected to SDS-PAGE on 7.5% polyacrylamide gels as described in EXPERIMENTAL PROCEDURES. Western immunoblotting was performed with a monoclonal antibody against LPL and bands were detected by enhanced chemiluminescence. The band corresponding to LPL (between 46 and 66 kDa) is depicted. The right panels represent means \pm S.E.M. of two experiments with two rats each. *Different from saline-injected rats, [†]Different from LPS-treated rats ($P < 0.05$).

- Figure 5 Hepatic secretion of triglycerides (TG) six hours after LPS injection (15 mg/kg) in rats treated or not with aminoguanidine (AGN, 100 mg/kg) 30 min prior to LPS administration. At time 0, blood was taken for measurement of basal TG levels before i.v. injection of a solution of Triton WR 1339 (300 mg/kg). Shown is the accumulation of TG over time (corrected for blood volume). Numbers represent mean secretion rate ($\mu\text{mol}/\text{min}$) \pm S.E.M of 5 animals. * Different from control animals ($P < 0.05$).
- Figure 6 Plasma triglyceride concentration in wild-type and iNOS knockout (-/-) mice determined six hours after injection of LPS (20 mg/kg). Bars represent means \pm S.E.M. of 7-9 animals. * Different from saline-treated animals ($P < 0.05$).
- Figure 7 Lipoprotein lipase specific activity in wild-type and iNOS knockout (-/-) mice injected with LPS (20 mg/kg). Gastrocnemius muscle and epididymal white adipose tissue are shown. Bars represent means \pm S.E.M. of 10-13 animals. * Different from saline-treated animals within the same genotype ($P < 0.05$). † Different from wild-type mice injected with saline ($P < 0.05$).

FIGURES

*Figure 1*

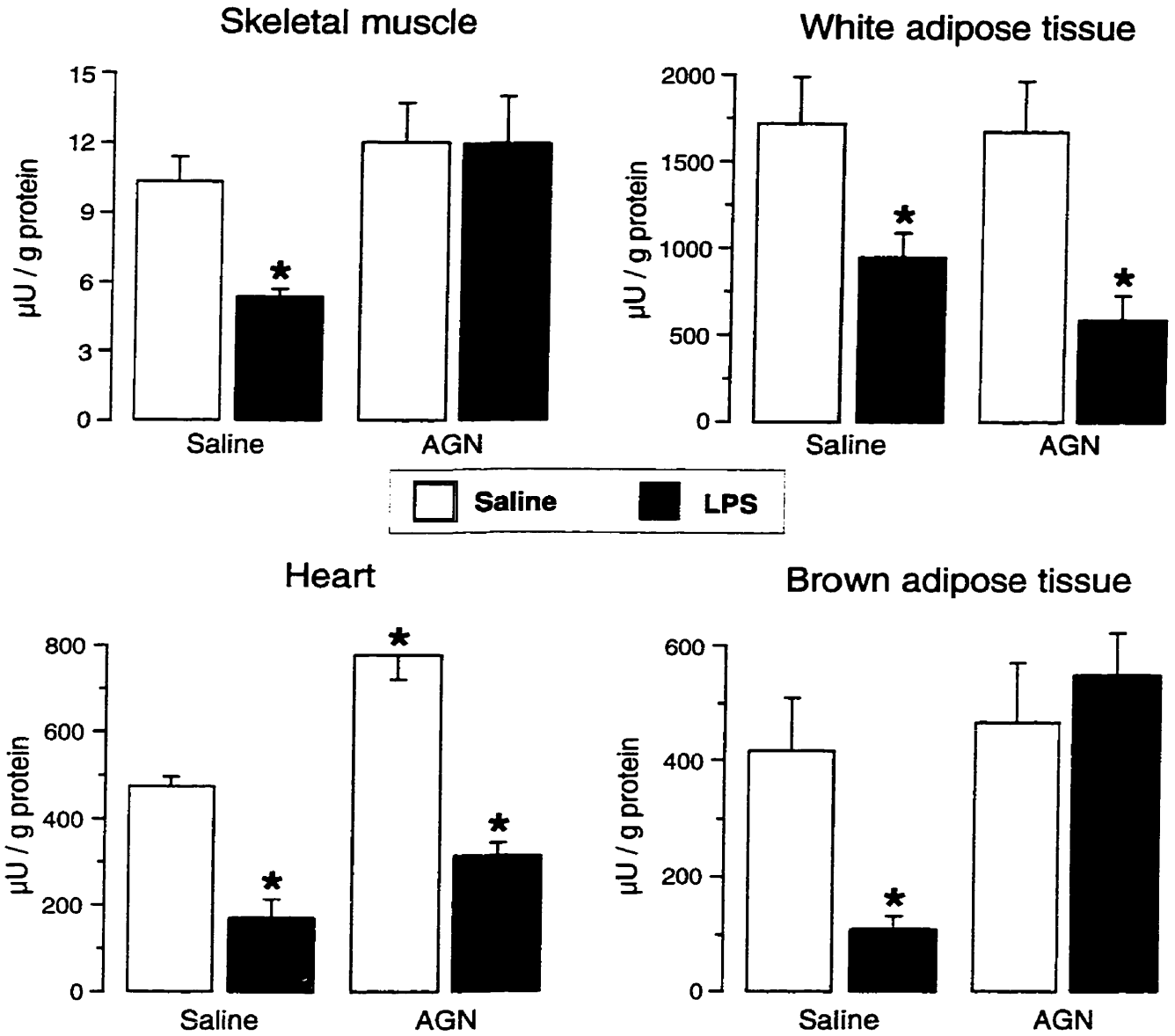


Figure2

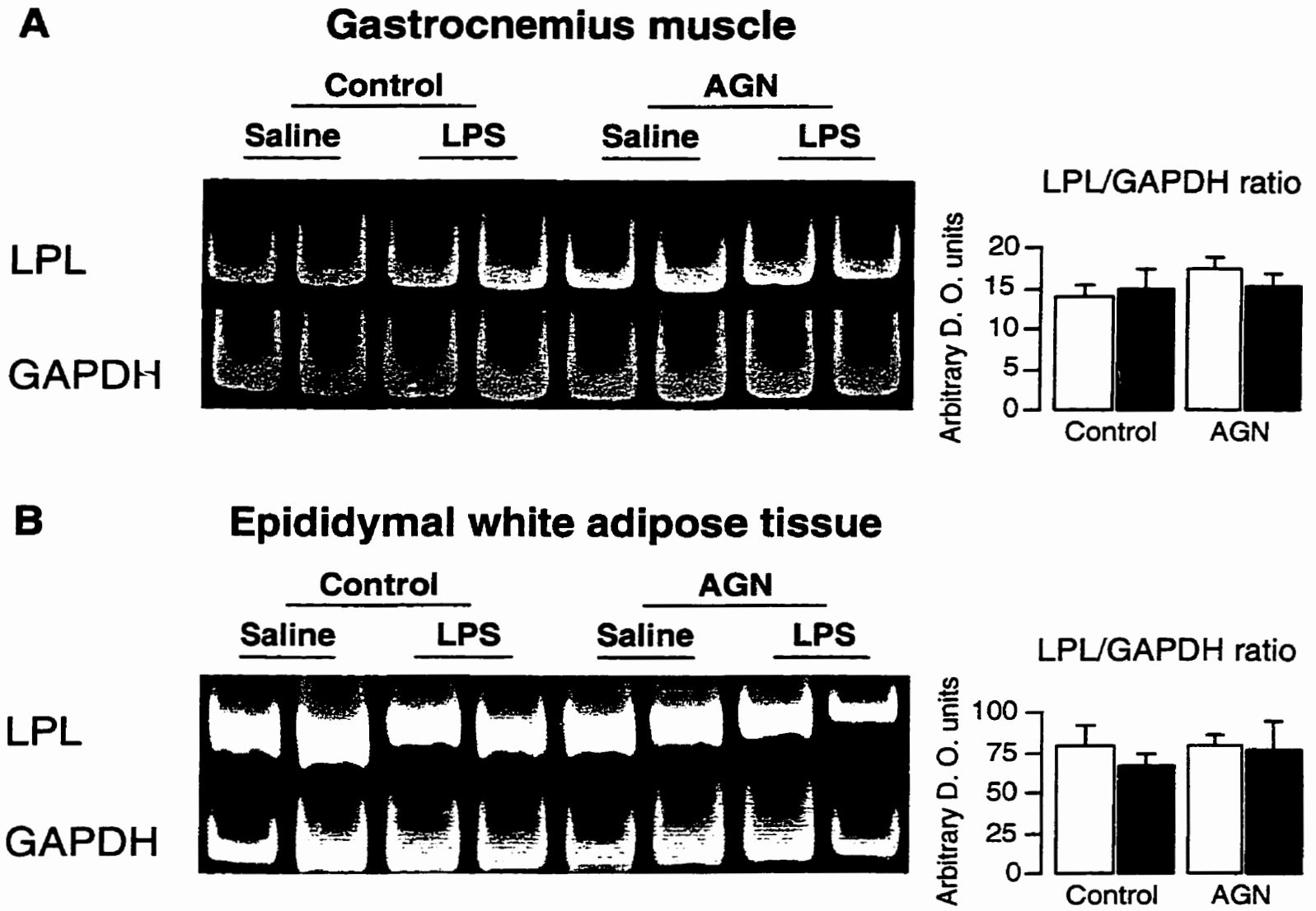


Figure 3

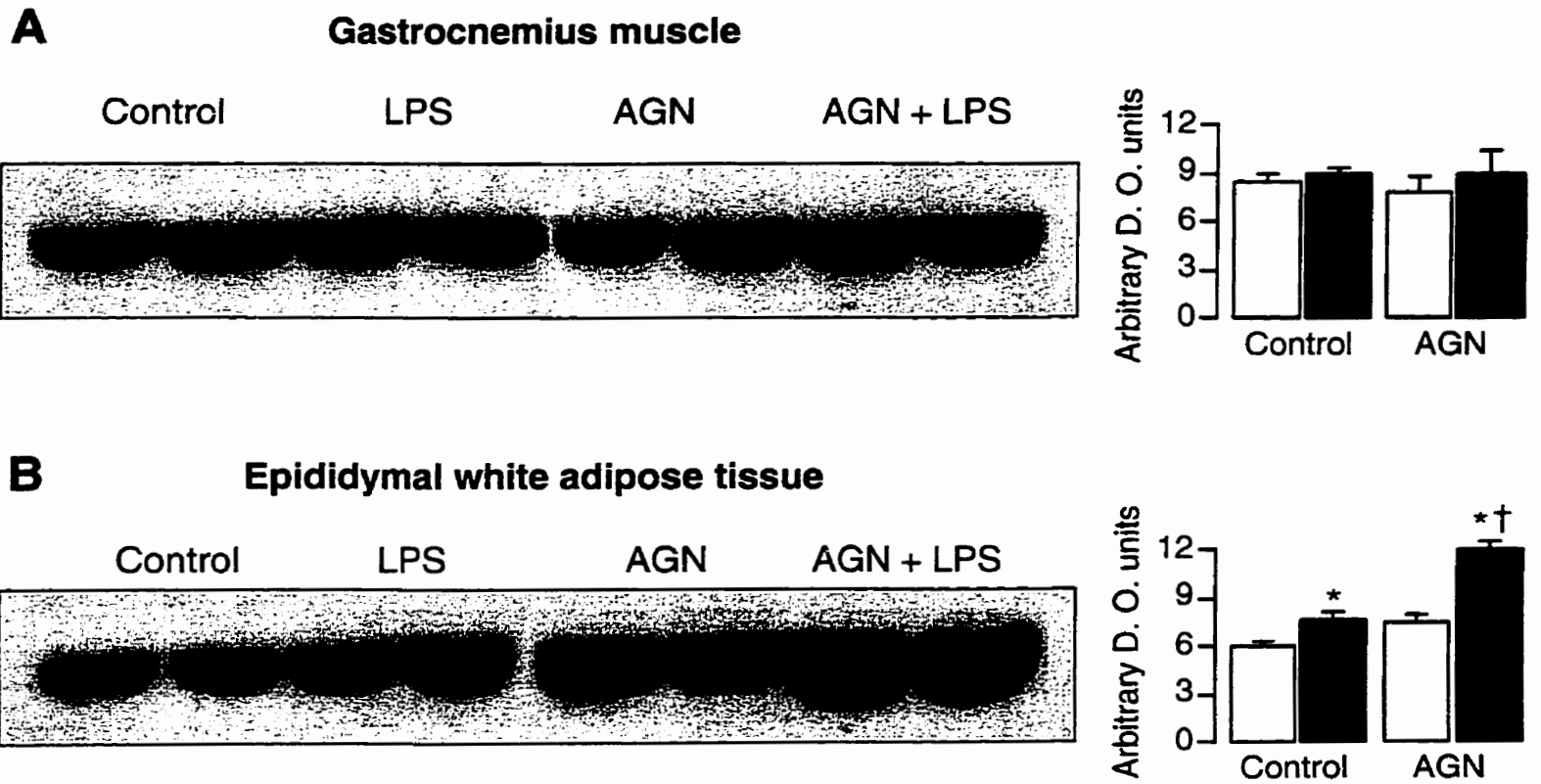


Figure 4

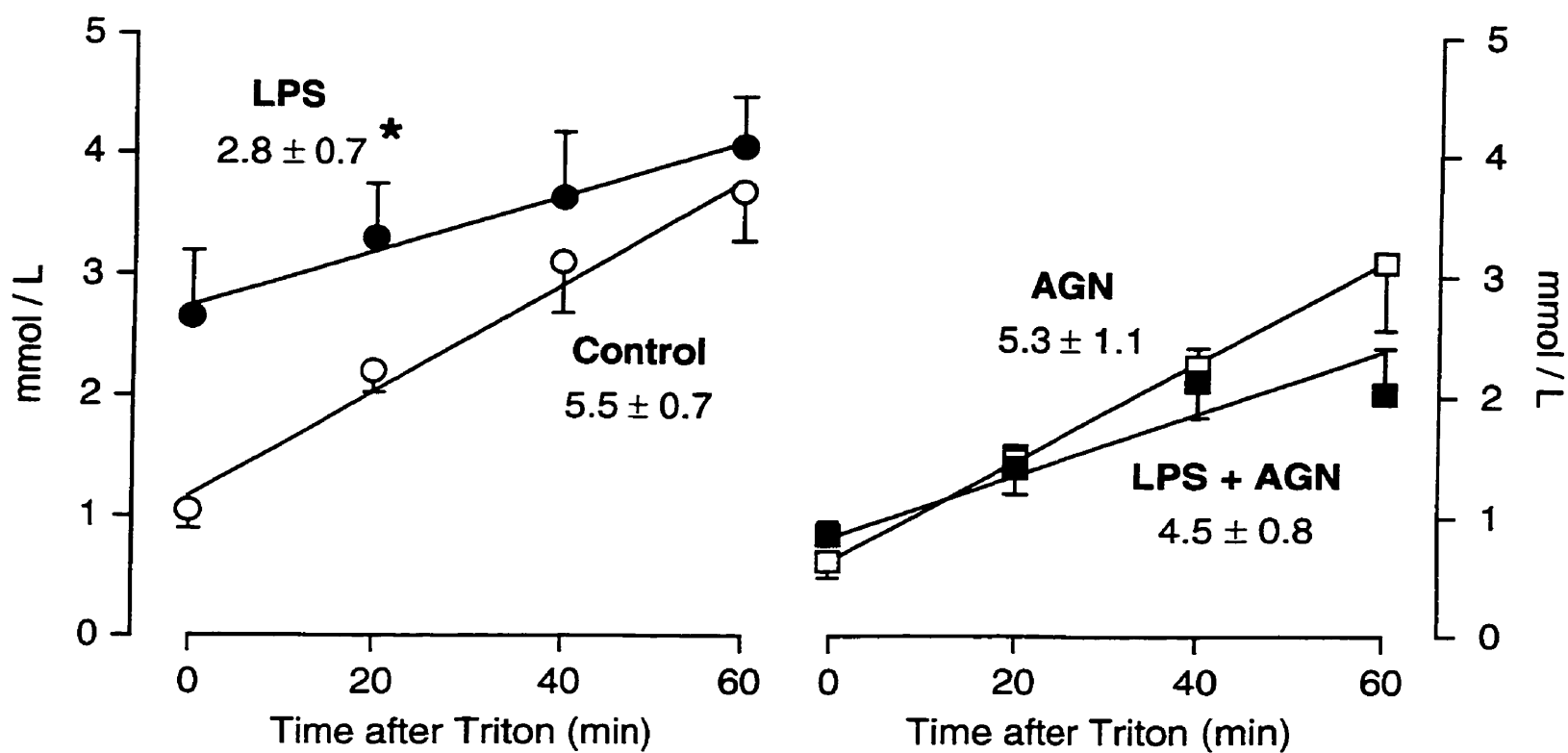
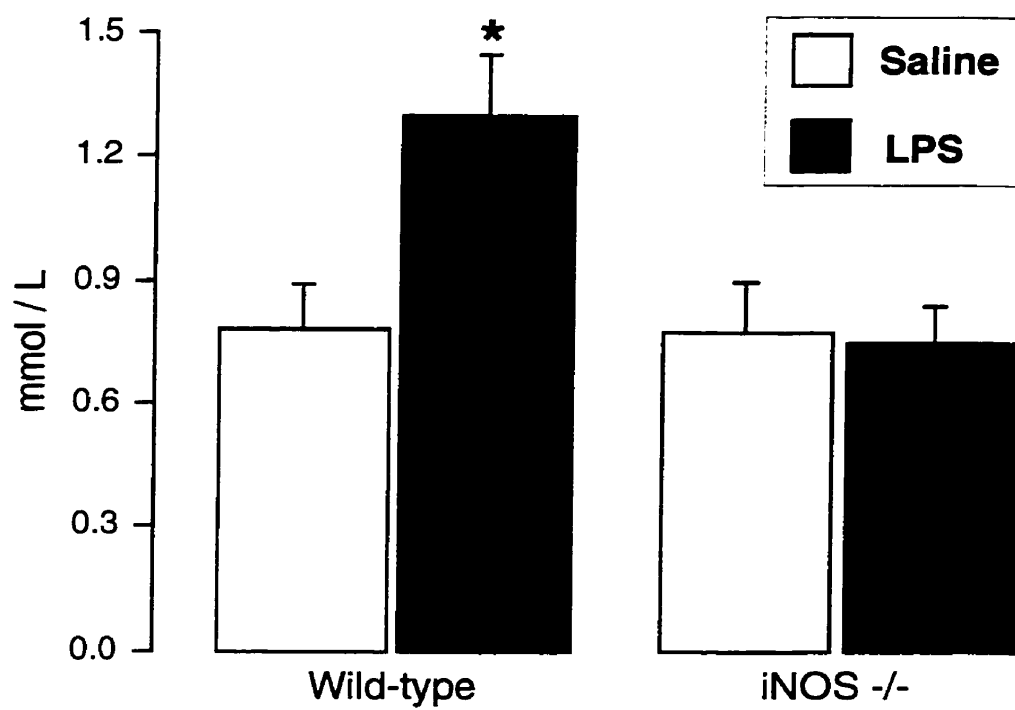


Figure 5

*Figure 6*

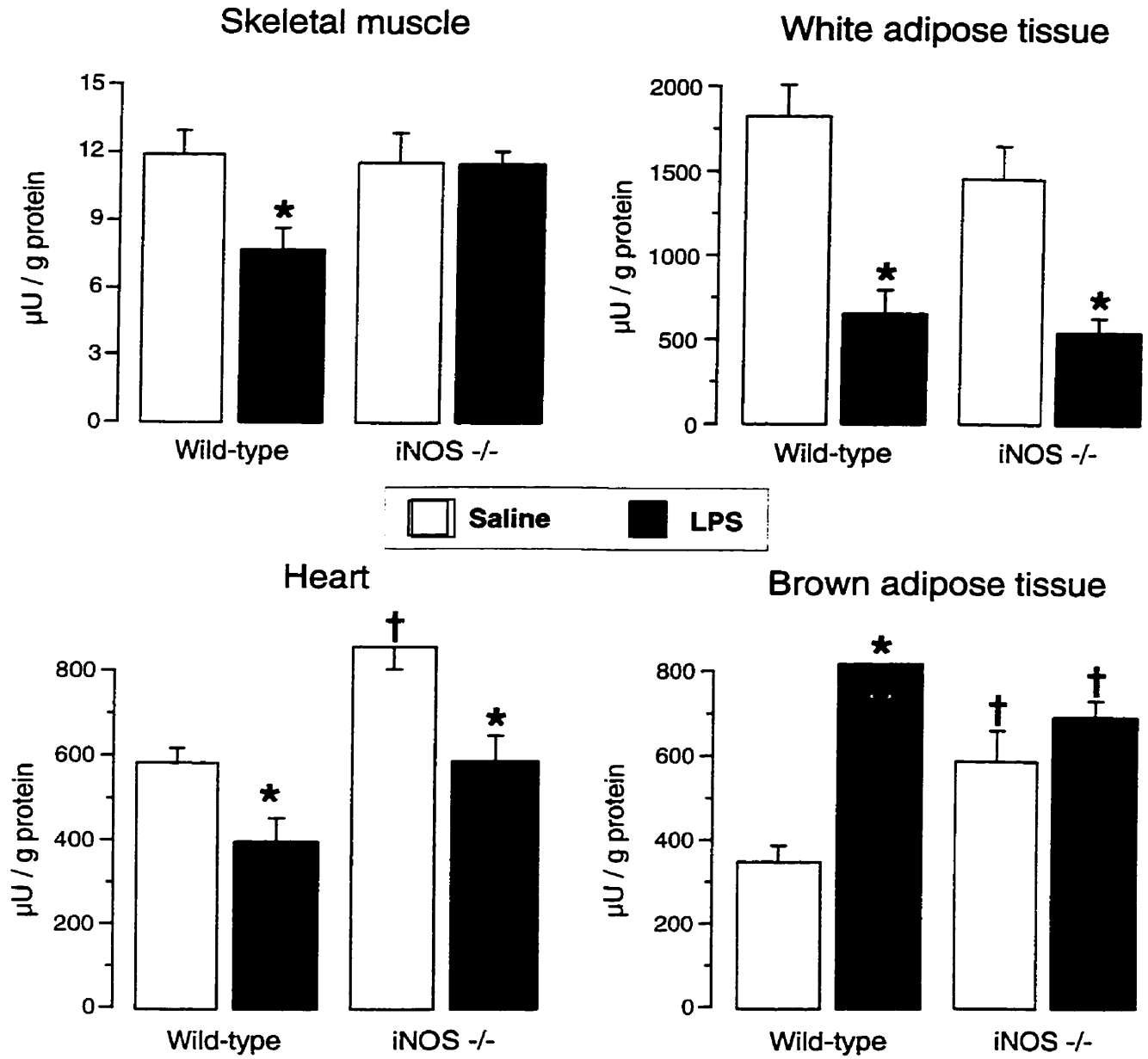


Figure 7

**DISCUSSION GÉNÉRALE, CONCLUSIONS,
ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE**

Les travaux réalisés dans le cadre de cette présente thèse avaient pour but d'évaluer les mécanismes de modulation de la LPL tissulaire pendant la prise alimentaire chez des animaux normaux et insulino-résistants et pendant l'infection afin de mieux définir le développement de l'hypertriglycéridémie qui est associée à ces deux conditions.

Rôle de l'insuline dans la modulation tissu-spécifique de la LPL en phase postprandiale

L'ingestion d'aliments provoque à court terme des changements d'activité de la LPL tissulaire importants. Dans le tissu adipeux blanc et brun, la prise alimentaire augmente l'activité de la LPL, alors que celle du muscle squelettique et du coeur répond de façon inverse au même stimulus (Eckel, 1989). Comme cette modulation tissu-spécifique peut être mimée par l'administration d'insuline, la grande majorité des études réalisées dans le cadre postprandial prennent pour acquis, sans preuve directe, que l'insuline est le médiateur hormonal de la réponse de la LPL tissulaire à un repas (Zechner, 1997). Les résultats du premier chapitre démontrent clairement que l'élévation de l'insulinémie constitue une condition nécessaire et suffisante à la réponse de la LPL à la prise alimentaire.

L'inhibition de la sécrétion d'insuline a empêché l'augmentation de l'activité de la LPL des tissus adipeux blanc et brun et la diminution de la LPL musculaire pendant la phase postprandiale, alors que l'élévation de l'insulinémie sans absorption de nutriment a causé une modulation tissu-spécifique inverse. Ces deux études s'appuient l'une l'autre, et confirment le rôle central de l'insuline dans la réponse postprandiale de la LPL à la prise alimentaire.

Deux phases importantes d'activation de la LPL du tissu adipeux ont été observées en phase postprandiale. La première phase n'a pu être empêchée par l'administration de diazoxide, qui a dû être mélangé à la nourriture pour ne pas interférer avec le processus d'ingestion volontaire de la part des animaux. Cette méthode (par rapport à l'injection aiguë par exemple) fit en sorte que l'action de la drogue fut retardée à cause du délai d'absorption du composé dans la circulation. Or, l'insuline est sécrétée très rapidement en réponse à l'exposition à un repas; ce processus est d'origine nerveuse, puisque cette phase de sécrétion d'insuline, appelée céphalique, est manifeste en absence de changement dans la glycémie (Ionescu *et al.*, 1988). Il est donc probable que la modulation de la LPL du tissu adipeux et du muscle squelettique observée une heure après le début du repas soit causée par une phase céphalique de sécrétion de l'insuline antérieure, puisque l'insulinémie était faible à la première heure du repas. Cette

hypothèse est supportée par les résultats obtenus chez les rats dont la phase céphalique de sécrétion d'insuline a pu être étudiée de façon indépendante suite à l'installation d'une fistule gastrique. Chez ces rats, l'augmentation du triple des concentrations sanguines d'insuline, sans qu'il y ait preuve d'absorption de nutriment, a provoqué l'élévation proportionnelle de l'activité de la LPL du tissu adipeux. Cette étude met en relation, pour la première fois, la phase céphalique de sécrétion d'insuline et l'activation de la LPL adipeuse en phase postprandiale. De par le rôle attribué à cette phase céphalique, l'augmentation de la LPL dans le tissu adipeux pourrait être mise en place de façon à contrôler l'hypertriglycéridémie subséquente causée par l'entrée massive de triglycérides d'origine alimentaire.

Dans le muscle squelettique et cardiaque, les mécanismes impliqués dans la diminution de l'activité de la LPL ne semblent pas être les mêmes que dans le tissu adipeux, puisque l'activité de l'enzyme du muscle n'a pas été modulée en deux phases comme le fut celle du tissu adipeux. L'absence de réduction de l'activité de l'enzyme observée dans le muscle soleus des animaux traités au diazoxide une heure après la prise alimentaire montre que des facteurs autres que l'insuline peuvent aussi, à tout le moins dans ce tissu, influencer l'activité de l'enzyme, puisque l'insulinémie n'a pas été altérée par la drogue à ce moment. D'autre part, le fait que l'activité de la LPL du coeur n'ait pas été altérée pendant cette période indique que l'activité de la LPL des muscles squelettique et cardiaque est modulée par des mécanismes différents.

Suite à une première élévation à une heure après le début du repas chez les animaux traités au diazoxide, l'activité de la LPL du tissu adipeux blanc est demeurée au même niveau deux heures plus tard malgré une chute importante de l'insulinémie causée par l'action inhibitrice de la drogue sur la sécrétion d'insuline. Ces observations suggèrent que la modulation de la LPL dans ce tissu est un processus qui implique d'autres facteurs que l'insuline, et que si l'hormone est nécessaire à l'augmentation postprandiale de l'activité de la LPL du tissu adipeux blanc, un autre mécanisme indépendant de l'insuline est mis en place pour conserver le gain d'activité à un certain niveau. Le glucose est intimement lié à la biologie intracellulaire de la LPL de par son impact sur la glycosylation de l'enzyme, une étape critique qui influence de manière importante l'activité de la LPL, à tout le moins dans le tissu adipeux blanc (Masuno *et al.*, 1991a). Or, les concentrations plasmatiques de glucose chez les animaux traités au diazoxide étaient très élevées trois heures après le début du repas. Il se pourrait donc que dans ces conditions, la forte augmentation de la glycémie ait prévenu la diminution de l'activité de la LPL en favorisant un processus de glycosylation accru. Encore faudrait-il que le glucose plasmatique soit capté de façon plus importante par l'adipocyte, et ce en présence d'insulinémie basse. Il faudrait aussi que la glycosylation soit limitante dans le processus d'activation de la LPL. Or, *in vitro*, il

semble qu'un minimum de glucose seulement soit requis pour que le processus soit efficace (Parkin *et al.*, 1980). D'autre part, le métabolisme est encore sous l'influence des hormones postprandiales à trois heures après la prise alimentaire, et il est possible que les hormones contre-régulatrices ne soient pas mises en branle à ce moment. Ceci pourrait faire en sorte qu'en absence d'insuline et d'hormone contre-régulatrice, le tissu adipeux se retrouve dans une position intermédiaire, encore sous l'influence des mécanismes stimulés par l'augmentation de l'insulinémie dans la première heure du repas, mais où la LPL n'est pas altérée sans être activée davantage. Enfin, une hypothèse alternative serait que la prise alimentaire active une protéine chaperon de la LPL, comme RAP (Berryman et Bensadoun, 1995), qui pourrait protéger l'enzyme contre sa dédimérisation lorsque cette dernière est activée par l'insuline.

Résistance de la LPL du tissu adipeux à l'action de l'insuline

Une première étude chez le rat Zucker obèse dont le métabolisme du glucose est résistant à l'action de l'insuline a démontré que, lorsqu'on diminue l'activité de la LPL du tissu adipeux à des niveaux semblables à ceux observés chez un rat maigre, sa réactivation par l'insuline en phase postprandiale est altérée de façon importante.

En accord avec les résultats relatés dans le premier chapitre, il semble que l'activation de la LPL du tissu adipeux comporte au moins deux étapes successives. L'ingestion continue de nourriture a conduit à une augmentation substantielle de l'activité de la LPL du tissu adipeux blanc chez le rat obèse pendant la première heure d'alimentation, suggérant que cette étape ne devient pas résistante à l'action de l'insuline. Par contre, l'activité de la LPL est demeurée stable pendant les cinq heures suivantes malgré l'hyperinsulinémie persistante. Ces résultats sont semblables et coïncident dans le temps avec la relative stabilité de l'activité de la LPL du tissu adipeux observée trois heures après le début du repas chez des animaux traités avec le diazoxide. En fait, dans la première étude, l'effecteur est absent (insuline) alors que dans l'autre, le signal est défectueux (résistance à l'insuline). Il est intéressant de constater que les deux conditions mènent à une altération à première vue similaire de la réponse normale de la LPL du tissu adipeux blanc à la prise alimentaire. Ces résultats démontrent qu'au moins une étape de la modulation de la LPL est résistante à l'action de l'insuline pendant la phase postprandiale chez le rat obèse Zucker. Ils suggèrent aussi que les divergences d'opinions sur le sujet sont le fruit d'une absence de standardisation des niveaux d'activité de base de la LPL adipeuse. À cet égard, il faut rappeler que l'activité de la LPL du tissu adipeux des rats obèses Zucker était soit plus élevée (condition *ad libitum*), similaire (après 24 heures de jeûne), ou plus faible (6 heures après

le début de la prise alimentaire) que celle des rats maigres. Ces observations indiquent qu'il faut prêter attention à l'état nutritionnel dans lequel une étude est effectuée avant de pouvoir conclure sur les altérations de la modulation de la LPL du tissu adipeux chez le rat obèse Zucker, et elles mettent en lumière l'une des raisons pour lesquelles on retrouve des interprétations divergentes sur le sujet dans la littérature. Il semble donc que la LPL adipeuse réponde de façon habituelle à la prise alimentaire lorsque les rats obèses Zucker ne sont soumis qu'à un jeûne de douze heures (Bessesen *et al.*, 1991), résultats qui ont été aussi obtenus dans le premier chapitre, où les rats Zucker avaient été privés de nourriture pendant une période de même durée. Ces observations suggèrent que la résistance à l'insuline affecte certaines étapes dans l'activation de la LPL en particulier, et qu'elle ne peut être manifeste si l'étude de l'activation se déroule au-delà de ces étapes.

Dans un modèle nutritionnel de résistance à l'insuline, l'ingestion chronique d'un régime riche en sucre et en graisses a diminué de moitié la quantité de glucose infusé nécessaire pour maintenir l'euglycémie en présence d'hyperinsulinémie, ce qui illustre jusqu'à quel point une telle alimentation peut détériorer le métabolisme du glucose. Chez ces rats, l'activation à court terme de la LPL du tissu adipeux blanc était inexistante et n'a été remarquée qu'à la douzième heure suivant le début de la prise alimentaire. Ces résultats suggèrent que le degré de résistance à l'insuline est une variable importante qui peut se répercuter sur les étapes impliquées dans l'activation postprandiale de la LPL adipeuse. En effet, chez ces rats privés de nourriture pendant une période de durée identique à celle utilisée pour l'étude précédente chez le rat Zucker, même la première étape d'activation semble être résistante à l'action de l'insuline. Ces observations laissent croire que, selon le degré de sa sévérité, la résistance à l'insuline peut affecter plus d'une étape, mais que certaines sont plus susceptibles que d'autres à devenir altérées, comme c'est le cas pour certaines des voies clé du métabolisme du glucose (Virkamäki *et al.*, 1999). Ces résultats démontrent aussi qu'une alimentation athérogène comme celle utilisée dans le cadre de ces études amène une détérioration très importante de la réponse de la LPL du tissu adipeux à la prise alimentaire. Évidemment, le régime alimentaire riche en sucre et en graisses (représentant chacun 40% des calories totales), même s'il est utile lors de protocoles expérimentaux, représente une condition extrême qui n'est pas très fréquente dans la population, peu de gens consommant autant de sucrose. Néanmoins, étant donné l'action potentialisatrice du sucrose sur les effets délétères d'un régime riche en graisses sur la sensibilité à l'insuline, il se pourrait que l'ingestion d'une quantité normale de sucre, en présence d'une alimentation riche en graisses, affecte substantiellement le métabolisme des triglycérides.

Chez les rats dont la résistance à l'insuline est d'origine génétique, il a fallu au moins douze heures pour que l'activité de la LPL du tissu adipeux revienne aux niveaux observés avant la privation de nourriture. Le même phénomène, peut-être même plus marqué, s'est produit chez les animaux où la résistance à l'insuline a été induite par l'ingestion chronique d'un régime riche en sucre et en graisses. Il a été démontré que les changements d'activité de la LPL du tissu adipeux en phase postprandiale chez des animaux âgés sont dépendants de la transcription du gène de la LPL (Semb et Olivecrona, 1989a). D'autres études ont rapporté que la LPL d'adipocytes de rats âgés ne répondait pas à l'insuline à court terme (Fried *et al.*, 1990a). Or, le vieillissement est très étroitement associé au développement de la résistance du métabolisme du glucose à l'insuline (Harris *et al.*, 1987). Ces observations suggèrent que l'augmentation tardive de l'activité de la LPL du tissu adipeux chez des rats résistants à l'insuline est imputable à l'activation de la transcription du gène de la LPL. Ce mécanisme serait donc en mesure d'être stimulé de façon adéquate par l'insuline chez des animaux insulino-résistants. Il est fort probable que ce mécanisme soit à la base des niveaux d'activité chroniquement élevés de la LPL adipeuse observés chez les personnes obèses. Ce phénomène pourrait être causé par la présence continue de l'hyperinsulinémie, cette dernière activant de manière constante la transcription du gène de l'enzyme.

Modulation postprandiale de la LPL musculaire dans la résistance à l'insuline

Chez les rats obèses Zucker privés de nourriture pendant douze heures comme chez ceux privés pendant vingt-quatre heures, la prise alimentaire a diminué l'activité de la LPL dans le coeur et les muscles squelettiques, suggérant fortement que dans ces conditions, la LPL du muscle demeure sensible à l'action de l'insuline. Il est donc probable que les faibles niveaux d'activité de LPL musculaire rencontrés chez les obèses soient causés par l'hyperinsulinémie chronique. À cet égard, ces résultats confirment ceux obtenus par Pollare et coll. qui ont montré une association inverse entre l'activité de la LPL du muscle et les niveaux d'insuline plasmatique chez des patients qui différaient entre eux quant à leur degré de résistance à l'insuline (Pollare *et al.*, 1991).

Importance de la LPL du tissu adipeux dans l'hypertriglycémie postprandiale

Dans les deux études effectuées dans le cadre postprandial, l'hypertriglycémie plus prononcée chez les rats insulino-résistants coïncidait dans le temps avec les différences les plus marquées en valeur absolue entre l'activité de la LPL du tissu adipeux de ces derniers et celle des rats témoins sensibles à l'action de l'insuline. Cette observation suggère qu'en présence d'un apport de lipides d'origine alimentaire et d'une diminution de la LPL musculaire, une altération dans l'activation postprandiale de la LPL du tissu adipeux serait à même d'exacerber l'hypertriglycémie en atténuant le catabolisme intravasculaire des triglycrides. Cette hypothèse est supportée par des travaux qui ont montré qu'en phase postprandiale, l'extraction nette des triglycrides par le tissu adipeux (mesurée par différences artério-veineuses) est diminuée chez les sujets obèses insulino-résistants comparativement aux individus sains (Potts *et al.*, 1995). Cependant, puisque la résistance à l'insuline affecte une étape précoce de l'activation de la LPL adipeuse seulement dans des conditions faisant suite à une privation de nourriture prolongée (d'au moins vingt-quatre heures chez le rat), il est peu probable que cette situation se manifeste dans la vie courante d'un rat dont le comportement alimentaire est normal. Par contre, une étude chez l'humain a montré que l'activation de la LPL adipeuse était de plus faible amplitude chez les sujets insulino-résistants même après un jeûne de douze heures (Ong et Kern, 1989a), ce qui suggère que les altérations temporelles ne sont pas les mêmes que chez le rat, et/ou que la période de temps nécessaire pour que l'activité de la LPL adipeuse puisse atteindre des niveaux affectés par la résistance à l'insuline est de moindre durée. Quoi qu'il en soit, cette situation pourrait être d'importance chez une personne obèse qui tente d'améliorer son comportement alimentaire en augmentant la durée des intervalles entre les repas, mais qui, par le fait même, favorise une réponse exagérée de la triglycémie postprandiale via une activation atténuée de la LPL du tissu adipeux. Finalement, il est intéressant de noter que les rats traités au diazoxide affichaient, trois heures après le repas, une triglycémie similaire aux rats témoins malgré le fait que l'activation de la LPL du tissu adipeux ait été inhibée par la drogue. Ces résultats suggèrent que l'absence de diminution postprandiale de l'activité de la LPL musculaire chez les rats traités au diazoxide a compensé pour la perte relative d'activité de la LPL adipeuse par rapport aux rats n'ayant pas été traités au diazoxide.

Interaction du système β -adrénergique et de l'insuline dans la modulation postprandiale de la LPL tissulaire après un jeûne prolongé

Tel que démontré dans le premier chapitre de cette thèse, la modulation postprandiale de la LPL tissulaire est causée par l'élévation de l'insulinémie. Suite à un jeûne d'environ douze heures, l'activité de la LPL du tissu adipeux augmente dès la première heure après le début du repas, alors que celle des muscles cardiaque et squelettique diminue pendant sensiblement la même période. Or, les résultats du deuxième chapitre démontrent que les effets à très court terme de la prise alimentaire sur la modulation de la LPL tissulaire sont dépendants de la durée du jeûne la précédant et peuvent être contrecarrés par l'activation du système β -adrénergique. En effet, chez les rats maigres normaux, l'activité de la LPL du tissu adipeux n'était pas augmentée après une heure de prise alimentaire *ad libitum*, alors que celle du muscle s'est élevée de façon très marquée, à l'opposé de la stimulation rapide de l'enzyme dans le tissu adipeux et de sa diminution lors de l'ingestion de nourriture suite à un jeûne de courte durée. L'administration de propranolol à ces rats a permis de constater que cette réponse atypique de la LPL tissulaire était causée par une forte stimulation du système β -adrénergique sur l'ensemble des tissus étudiés à l'exception du coeur. Cette modulation atypique était absente chez les rats obèses dans tous les tissus étudiés, démontrant que les altérations du système β -adrénergique observées dans le tissu adipeux brun d'animaux obèses (Dulloo et Miller, 1987; Marette *et al.*, 1990; Pacak *et al.*, 1995) peuvent aussi s'appliquer au tissu adipeux blanc et au muscle squelettique. En absence de système β -adrénergique fonctionnel et actif chez les rats obèses Zucker, l'insuline a pu moduler de façon tissu-spécifique l'activité de la LPL.

La défectuosité généralisée du système β -adrénergique chez les rats obèses pourrait avoir des répercussions majeures sur le métabolisme des triglycérides lorsque ce système est sollicité à plus long terme, par exemple lors de l'exercice physique, le stress chronique, ou l'exposition au froid. Dans ce dernier exemple, malgré une augmentation marquée de la sécrétion de particules VLDL, la triglycéridémie est fortement diminuée, ce qui implique que l'élimination intravasculaire des triglycérides via la LPL est accrue de manière très importante (Mantha et Deshaies, 1998). Or, une altération dans la modulation de la LPL tissulaire par le système β -adrénergique pourrait possiblement freiner le catabolisme des triglycérides. Cette situation serait à même de contribuer à l'hypertriglycéridémie observée à jeûn chez les personnes obèses caractérisées par un stress continu (Treiber *et al.*, 1999). Comme une stimulation β -adrénergique diminue l'activité de la LPL du tissu adipeux blanc, il est aussi probable que l'hypertriglycéridémie dans ces conditions soit le fruit, du moins en partie, d'une altération dans la stimulation de l'activité de la LPL du muscle squelettique. Quoique cette hypothèse doive être

vérifiée expérimentalement, ces observations suggèrent que, dans des situations autres que postprandiales, la LPL du muscle contribue substantiellement à la détermination de la triglycémie. En contrepartie, la stimulation de la lipolyse par le stress est potentialisée dans l'obésité (McArthur *et al.*, 1998), ce qui laisse croire que l'augmentation du taux de sécrétion hépatique de triglycérides via un apport accru de substrats précurseurs pourrait aussi favoriser l'hypertriglycémie dans des conditions qui stimulent le système β -adrénergique.

Contribution de la LPL musculaire au développement de l'hypertriglycémie pendant l'endotoxémie aiguë

L'endotoxémie chez les souris (chapitre 4 et 5) et les rats (chapitre 5) a provoqué à court terme une forte augmentation de la concentration plasmatique de triglycérides. Cette hypertriglycémie était indépendante de la sécrétion hépatique des triglycérides dans l'étude chez les rats, confirmant le fait que la lipopolysaccharide (LPS) n'affecte pas ce processus lorsque les doses administrées sont importantes (Feingold *et al.*, 1992). À plus faible dose chez la souris, la LPS a induit une production accrue de triglycérides, mais qui était d'amplitude similaire dans tous les groupes étudiés. Or, dans cette étude, les niveaux de triglycérides sanguins en réponse à l'administration de LPS ont presque doublé chez certains groupes, alors que chez d'autres, la triglycémie n'a pas été affectée, même en présence d'un contenu hépatique de triglycérides augmenté. Ces études démontrent que, dans ces conditions expérimentales, l'hypertriglycémie était causée par une diminution du catabolisme intravasculaire des triglycérides. Ces observations suggèrent également qu'une production accrue de triglycérides au foie ne mène pas nécessairement à leur sécrétion dans la circulation sanguine.

Pendant l'endotoxémie aiguë, l'activité de la LPL a diminué de façon marquée dans tous les tissus étudiés (tissus adipeux blanc et brun, muscles squelettique et cardiaque). L'hypertriglycémie associée à cette condition aurait donc pu être causée par ce phénomène généralisé. Cependant, l'absence de changement dans la LPL du muscle squelettique suite à l'administration d'aminoguanidine a empêché l'élévation des niveaux de triglycérides sanguins par la LPS. Ces résultats permettent donc d'imputer l'hypertriglycémie aiguë provoquée par l'endotoxémie à des altérations de la LPL du muscle squelettique. Il sont aussi en accord avec le concept d'un rôle important de la LPL musculaire dans des conditions autres que postprandiales. À cet égard, il a été montré que la surexpression spécifique de la lipoprotéine

lipase dans le muscle squelettique pouvait atténuer de façon presque complète l'hypertriglycémie induite par un régime riche en graisses (Schaefer et Eckel, 1999).

La surexpression de la LPL dans le muscle squelettique peut aussi prévenir le développement de l'obésité induite à long terme par un régime riche en graisses (Jensen *et al.*, 1997), les acides gras provenant des triglycérides étant dirigés massivement vers le muscle au détriment du tissu adipeux. Par un mécanisme encore inconnu, il semble que cette situation peut influencer la régulation du bilan énergétique. Quoi qu'il en soit, cette dernière situation est l'inverse de celle observée chez les souris cachexiques suite à l'infection chronique avec le parasite *Toxoplasma gondii*. À long terme, l'activité de la LPL du muscle squelettique est demeurée très faible chez ces souris, probablement à cause des niveaux élevés de cytokines circulantes (à tout le moins IFN- γ). Par contre, l'activité de la LPL du tissu adipeux était similaire à celle des souris non infectées, malgré la présence de ces mêmes cytokines. Ces observations suggèrent que la modulation de la LPL du tissu adipeux pendant l'infection chronique est sous l'influence d'autres facteurs qui maintiennent à la hausse l'activité de l'enzyme. Il est à noter que les souris ont l'habitude de grignoter à toute heure du jour et que dans cette étude, les animaux n'ont pas été tués à jeun. Or, l'insuline renverse les effets des tumeurs sur la LPL adipeuse chez le rat *in vivo* (Costelli *et al.*, 1999). Il est donc possible que l'insulinémie, dont les niveaux étaient chez les souris cachexiques similaires aux souris non infectées, ait contribué à la stabilité de l'activité chronique de la LPL du tissu adipeux. Cette modulation tissu-spécifique de la LPL a pu favoriser la partition tissulaire des acides gras dérivés de l'hydrolyse des triglycérides circulants vers le tissu adipeux blanc au détriment du muscle squelettique.

Rôle du monoxyde d'azote dans la modulation de la LPL pendant l'endotoxémie aiguë

La diminution de l'activité de la LPL pendant l'endotoxémie est médiée par les cytokines produites dans ces conditions (Hardardottir *et al.*, 1994). Alors que dans le tissu adipeux le TNF- α joue un rôle prépondérant dans ce processus, l'IFN- γ semble être plus impliqué dans la chute de l'activité de la LPL du tissu musculaire (Feingold *et al.*, 1994). Deux études ont proposé que l'effet du TNF- α sur l'activité de la LPL dans des adipocytes bruns *in vitro* était causée par la surproduction de monoxyde d'azote (NO) induite par la cytokine (Uchida *et al.*, 1997a; Uchida *et al.*, 1997b). Les résultats du chapitre 5, en plus de confirmer le rôle du NO dans la diminution de l'activité de la LPL du tissu adipeux *in vivo* (à tout le moins chez le

rat), démontrent également, pour la première fois, que la réduction de l'activité de la LPL musculaire provoquée par l'endotoxémie *in vivo* est médiée par le NO via la stimulation de l'enzyme iNOS. En effet, l'inhibition pharmacologique (avec aminoguanidine chez le rat) et génétique (inactivation du gène chez la souris) d'iNOS ont complètement empêché la chute d'activité de la LPL du muscle. Ces résultats démontrent un nouveau rôle du NO dans la modulation de la LPL du muscle squelettique.

La diminution de l'activité de la LPL musculaire pendant l'endotoxémie n'a pas été accompagnée d'une réduction proportionnelle dans l'ARNm ni dans la masse de l'enzyme, suggérant que les effets majeurs de la lipopolysaccharide sur la LPL se situent au niveau post-traductionnel. Ces résultats confirment une étude antérieure qui a observé les mêmes phénomènes (Gouni *et al.*, 1993). Le fait que la masse totale de LPL n'ait pas été altérée par la LPS laisse croire que la dégradation de l'enzyme n'est pas un mécanisme prédominant qui pourrait avoir des répercussions importantes dans la diminution de l'activité de la LPL. Cependant, comme la LPL est active sous forme dimérique, il peut être suggéré que la LPS inactive la LPL en altérant l'état dimérique de l'enzyme. Comment le NO affecte cette condition reste à être déterminé. Les monomères de la LPL sont unis par des liens covalents. Or, la stimulation de la synthèse de NO amène une augmentation de la production de radicaux libres (Murad, 1999). Il se pourrait donc que les radicaux libres altèrent les liens covalents qui lient les monomères. Comme cette supposition n'est qu'une hypothèse ne pouvant s'appuyer sur des données expérimentales, des études plus poussées sont nécessaires pour comprendre les mécanismes d'action du NO sur la LPL du muscle squelettique.

D'autre part, l'absence d'un effet probant de l'endotoxémie sur la LPL du tissu adipeux et du coeur suggèrent que l'implication du NO dans la diminution de la LPL de ces tissus est très minime. Il est difficile de comprendre à première vue pourquoi le NO affecte la LPL du muscle et pas celle du tissu adipeux blanc, puisque ce dernier est apte à produire du NO via iNOS en grande quantité lorsque mis en présence de cytokines et de LPS (Kapur *et al.*, 1999). Il se pourrait que le TNF- α affecte directement ou indirectement l'activité de la LPL du tissu adipeux mais sans avoir recours au NO, alors que l'IFN- γ serait incapable de telles actions. Cette hypothèse reste à être vérifiée expérimentalement. Par ailleurs, il apparaît que la LPL du coeur soit sensible à l'inhibition d'iNOS dans des conditions normales. En effet, chez les souris dont le gène iNOS était invalidé comme chez les rats traités à l'aminoguanidine, les niveaux d'activité de la LPL du coeur étaient plus élevés comparativement à ceux des animaux témoins. L'impact à long terme de l'augmentation présumée de l'apport d'acides gras au coeur via l'action de la LPL reste à être déterminé chez ces animaux. D'un autre côté, il est difficile de concilier le

fait que la LPL du coeur soit augmentée chez les souris invalidées pour le gène iNOS en condition basale, mais que l'absence de production de NO en réponse à l'endotoxémie n'empêche pas la diminution de l'activité de l'enzyme. Ces observations suggèrent que la modulation de l'activité de la LPL du coeur est reliée indirectement à l'absence de NO en conditions normales, et que l'effet des cytokines n'est pas médié par le NO. Quoique cette hypothèse reste à être vérifiée, il se pourrait que les acides gras provenant de la lipolyse du tissu adipeux, qui est elle-même stimulée par le NO (Gaudiot *et al.*, 1998), affectent à long terme l'activité de la LPL du coeur (Boivin *et al.*, 1994).

Perspectives de recherche

Tel que mentionné tout au long de la présente discussion, plusieurs points et mécanismes intracellulaires restent à être définis. Entre autres, il serait intéressant d'identifier, dans des adipocytes isolés, quelle(s) étape(s) dans l'activation de la LPL peut devenir résistante à l'action de l'insuline. Cette évaluation pourrait se faire en traitant les cellules avec des inhibiteurs de la voie de signalisation de l'insuline, et d'observer, en présence de ces inhibiteurs, si la stimulation de la LPL par l'insuline est altérée dans ces conditions. Il est aussi nécessaire de définir les mécanismes par lesquels le NO affecte l'activité de la LPL musculaire. Une caractérisation biochimique précise de la structure de la LPL du tissu adipeux et du muscle dans les conditions étudiées (phase postprandiale, endotoxémie aiguë) permettrait également d'identifier les mécanismes d'inactivation de l'enzyme. Étant donné l'implication de celle-ci dans le développement de l'hypertriglycéridémie et de l'obésité induite par un régime riche en graisses (Schaepfer et Eckel, 1999; Jensen *et al.*, 1997), il se pourrait que le NO puisse jouer un rôle dans la modulation de la LPL dans des états de résistance à l'insuline. En effet, l'expression de iNOS est induite par un régime riche en graisses (M. Perreault et A. Marette, résultats non publié). Il serait donc intéressant de vérifier si la baisse d'activité de la LPL dans le muscle observée dans l'obésité induite par un régime riche en graisses serait prévenue chez des souris invalidées pour le gène iNOS. Une autre alternative serait de vérifier si les faibles niveaux d'activité de la LPL du muscle squelettique des rats obèses Zucker peuvent être augmentés suite à l'administration chronique ou aiguë d'aminoguanidine. L'effet de ces traitements sur la triglycéridémie pourrait procurer de bonnes indications sur des applications cliniques potentielles d'inhibiteurs de iNOS, notamment dans le domaine cardiovasculaire. À cet égard, il est intéressant de noter qu'il semble y avoir une interaction entre le NO et la LPL dans les macrophages (Renier et Lambert, 1995). Puisque ces cellules sont impliquées de façon importante dans le développement de l'athérosclérose, et que la LPL de la paroi artérielle est pro-

athérogénique (Clee *et al.*, 2000), la présente découverte d'un rôle du NO dans la modulation de la LPL ouvre la porte à tout un champ de nouvelles voies de recherche sur l'implication du NO dans la contribution de la LPL des macrophages au développement de l'athérosclérose.

En conclusion, les travaux présentés dans cette thèse ont permis (1) d'établir le rôle essentiel et suffisant de l'insuline dans la modulation postprandiale tissu-spécifique de la LPL; (2) de détailler les altérations temporelles dans la sensibilité de la LPL du tissu adipeux à l'insuline en phase postprandiale, et l'absence de telles altérations au niveau du muscle, dans l'insulino-résistance d'origine génétique et nutritionnelle; (3) d'imputer l'hypertriglycémie aiguë provoquée par l'endotoxémie à des altérations de la LPL du muscle squelettique; (4) de démontrer un nouveau rôle du monoxyde d'azote dans la modulation de la lipoprotéine lipase du muscle squelettique. Ces travaux auront donc permis de mettre en lumière de nouveaux aspects de la modulation d'une enzyme identifiée il y a déjà plusieurs décennies, mais dont les rôles biologiques et leurs conséquences bénéfiques ou délétères continuent de faire l'objet d'une recherche active.

BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE

- Ailhaud G. (1990) Cellular and secreted lipoprotein lipase revisited. *Clin.Biochem.* 23: 343-347.
- Ames Richard P. (1995). Glucose tolerance and insulin resistance in relation to sodium balance in hypertension and diabetes mellitus. Dans: Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management. Edité par Laragh JH et Brenner BM. Raven Press Ltd., New York. pp. 2315-2320.
- Amri EZ, Vannier C, Etienne J et Ailhaud G. (1986) Maturation and secretion of lipoprotein lipase in cultured adipose cells. II. Effects of tunicamycin on activation and secretion of the enzyme. *Biochim.Biophys.Acta* 875: 334-343.
- Appel B et Fried SK. (1992) Effects of insulin and dexamethasone on lipoprotein lipase in human adipose tissue. *Am.J.Physiol.* 262: E695-E699.
- Arnault F, Etienne J, Noe L, Raisonnier A, Brault D, Harney JW, Berry MJ, Tse C, Fromental-Ramain C, Hamelin J et Galibert F. (1996) Human lipoprotein lipase last exon is not translated, in contrast to lower vertebrates. *J.Mol.Evol.* 43: 109-115.
- Arner P. (1993). Regulation of adipose tissue lipolysis: importance for the metabolic syndrome. Dans: New concepts in the pathogenesis of NIDDM. Edité par Östenson CG. Plenum Press, New York. pp. 259-267.
- Arsenijevic D, Girardier L, Seydoux J, Pechere JC, Garcia I, Lucas R, Chang HR et Dulloo AG. (1998) Metabolic-cytokine responses to a second immunological challenge with LPS in mice with *T. gondii* injection. *Am.J.Physiol.* 274: E439-E445.
- Ashby P et Robinson DS. (1980) Effects of insulin, glucocorticoids and adrenaline on the activity of rat adipose-tissue lipoprotein lipase. *Biochem.J.* 188: 185-192.
- Auerbach BJ, Cain W, Ansong M, Newton RS, Saxena U et Bisgaier CL. (1999) Lipoprotein lipase greatly enhances the retention of lipoprotein(a) to endothelial cell-matrix. *Atherosclerosis* 142: 89-96.

Austin MA, King MC, Vranizan KM et Krauss RM. (1990) Atherogenic lipoprotein phenotype: a proposed genetic marker for coronary heart disease risk. *Circulation* 82: 495-506.

Austin MA et Selby JV. (1995) LDL subclass phenotypes and the risk factors of the insulin resistance syndrome. *Int.J.Obes.* 19 (suppl. 1): S22-S26.

Austin MA et Edwards KL. (1996) Small, dense low density lipoproteins, the insulin resistance syndrome and noninsulin-dependent diabetes. *Curr.Opinion Lipidol.* 7: 167-171.

Auwerx J, Deeb S, Brunzell JD, Wolfbauer G et Chait A. (1989) Lipoprotein lipase gene expression in THP-1 cells. *Biochemistry* 28: 4563-4567.

Auwerx J, Leroy P et Schoojans K. (1992) Lipoprotein lipase: recent contributions from molecular biology. *Crit.Rev.Clin.Lab.Sci.* 29: 243-268.

Auwerx J, Schoojans K, Fruchart JC et Staels B. (1996) Transcriptional control of triglyceride metabolism: fibrates and fatty acids change the expression of the LPL and apo C-III genes by activating the nuclear receptor PPAR. *Arteriosclerosis* 124 (Suppl): S29-S37.

Auwerx J. (1999) PPAR γ , the ultimate thrifty gene. *Diabetologia* 42: 1033-1049.

Avramoglu RK, Cianflone K et Sniderman AD. (1996) Role of neutral lipid accessible pool in the regulation of secretion of apoB-100 lipoprotein particles by HepG2 cells. *J.Lipid Res.* 36: 2513-2528.

Babaev VR, Fazio S, Gleaves LA, Carter KJ, Semenkovich CF et Linton MF. (1999) Macrophage lipoprotein lipase promotes foam cell formation and atherosclerosis in vivo. *J.Clin.Invest.* 103: 1697-1705.

Bagby GJ, Corll CB et Martinez RR. (1987) Triacylglycerol kinetics in endotoxic rats with suppressed lipoprotein lipase activity. *Am.J.Physiol.* 253: E59-E64.

Bagby GJ et Pekala PH. (1987). Lipoprotein lipase in trauma and sepsis. Dans: Lipoprotein lipase. Edité par Borensztajn J. Evener, Chicago. pp. 247-274.

- Balagopalakrishna C, Paka L, Pillarisetti S et Goldberg IJ. (1999) Lipolysis-induced iron release from dimeric transferrin: possible role of lipoprotein lipase in LDL oxidation. *J.Lipid Res.* 40: 1347-1356.
- Baldo A, Sniderman AD, St-Luce S, Avramoglu RK, Maslowska M, Hoang B, Monge JC, Bell A, Mulay S et Cianflone K. (1993) The adipsin-acylation stimulating protein system and regulation of intracellular triglycide synthesis. *J.Clin.Invest.* 92: 1543-1547.
- Ball KL, Speake BK et Robinson DS. (1986) Effects of adrenaline on the turnover of lipoprotein lipase in rat adipose tissue. *Biochim.Biophys.Acta* 877: 399-405.
- Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A et Evans RM. (1999) PPAR γ is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol.Cell* 4: 585-595.
- Baron AD. (1996) The coupling of glucose metabolism and perfusion in human skeletal muscle. *Diabetes* 45 (Suppl 1): S105-S109.
- Baynes C, Henderson AD, Anyaoku V, Richmond W, Hugues CL, Johnston DG et Elkeles RS. (1991) The role of insulin insensitivity and hepatic lipase in the dyslipidemia of type 2 diabetes. *Diabetic Med.* 8: 560-566.
- Behr SR et Kraemer FB. (1986) Regulation of the secretion of lipoprotein lipase by mouse macrophages. *Biochim.Biophys.Acta* 889: 346-354.
- Beisiegel U, Weber W et Olivecrona G. (1991) Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88: 8342-8346.
- Belahsen R et Deshaies Y. (1992) Modulation of lipoprotein lipase activity in the rat by the β_2 -adrenergic agonist clenbuterol. *Can.J.Physiol.Pharmacol.* 70: 1555-1562.
- Belahsen Rekia et Deshaies Yves. (1993) Alpha-1 adrenergic blockade interacts with dietary carbohydrates on triacylglycerol metabolism in Rats. *J.Nutr.* 123: 520-528.

- Ben-Zeev O, Lusic AJ, LeBoeuf RC, Nikazy J et Schotz MC. (1983) Evidence for independent genetic regulation of heart and adipose lipoprotein lipase activity. *J.Biol.Chem.* 258: 13632-13636.
- Ben-Zeev O, Doolittle MH, Davis RC, Elovson J et Schotz MC. (1992) Maturation of lipoprotein lipase. Expression of full catalytic activity requires glucose trimming but not translocation to the *cis*-Golgi compartment. *J.Biol.Chem.* 267: 6219-6227.
- Benavides A, Siches M et Llobera M. (1998) Circadian rhythms of lipoprotein lipase and hepatic lipase activities in intermediate metabolism of adult rat. *Am.J.Physiol.* 275: R811-R817.
- Bergeron Jean, Julien Pierre et Murthy Ven MR. (1996) Expression de la lipoprotéine lipase humaine: mutations et physiopathologie. *m/s Méd.Sci.* 7: 1061-1068.
- Bergö M, Olivecrona G et Olivecrona T. (1996a) Diurnal rhythms and effects of fasting and refeeding on rat adipose tissue lipoprotein lipase. *Am.J.Physiol.* 271: E1092-E1097.
- Bergö M, Olivecrona G et Olivecrona T. (1996b) Forms of lipoprotein lipase in rat tissues: in adipose tissue the proportion of inactive lipase-increases on fasting. *Biochem.J.* 313: 893-898.
- Bernal Claudio A, Gutman Raul A et Lombardo Yolanda B. (1995) The duration of feeding on a sucrose-rich diet determines variable in vitro effects of insulin and fructose on rat liver triglyceride metabolism. *J.Nutr.Biochem.* 6: 422-430.
- Berryman DE et Bensadoun A. (1995) Heparan sulfate proteoglycans are primarily responsible for the maintenance of enzyme activity, binding, and degradation of lipoprotein lipase in Chinese hamster ovary cells. *J.Biol.Chem.* 270: 24525-24531.
- Berthoud H-R, Trimble ER, Siegel EG, Bereiter DA et Jeanrenaud B. (1980) Cephalic-phase insulin secretion in normal and pancreatic islet-transplanted rats. *Am.J.Physiol.* 238: E336-E340.
- Berthoud H-R, Bereiter DA, Trimble ER, Siegel EG et Jeanrenaud B. (1981) Cephalic phase, reflex insulin secretion: neuroanatomical and physiological characterization. *Diabetologia* 20: 393-401.

- Bessesen DH, Robertson AD et Eckel RH. (1991) Weight reduction increases adipose but decreases cardiac LPL in reduced-obese Zucker rats. *Am.J.Physiol.* 261: E246-E251.
- Bessesen DH, Rupp CL et Eckel RH. (1995) Trafficking of dietary fat in lean rats. *Obes.Res.* 3: 191-203.
- Bey L, Etienne J, Tse C, Brault D, Noe L, Raisonner A, Arnault F, Hamilton MT et Galibert F. (1998) Cloning, sequencing and structural analysis of 976 base pairs of the promoter sequence for the rat lipoprotein lipase gene. Comparison with the mouse and human sequences. *Gene* 209: 31-38.
- Bittner Vera. (1994) Atherogenicity of postprandial lipoproteins and coronary heart disease. *The Endocrinologist* 4: 359-372.
- Björntorp P. (1995) Insulin resistance: the consequence of a neuroendocrine disturbance? *Int.J.Obes.* 19 (suppl. 1): S6-S10.
- Björntorp P. (1996) The regulation of adipose tissue distribution in humans. *Int.J.Obes.* 20: 291-302.
- Blanchette-Mackie EJ, Masuno H, Dwyer NK, Olivecrona T et Scow RO. (1989) Lipoprotein lipase in myocytes and capillary endothelium of heart: immunocytochemical study. *Am.J.Physiol.* 256: E818-E828.
- Boden G, Jadali F, White J, Liang Y, Mozzoli M, Chen X, Coleman E et Smith C. (1991) Effects of fat on insulin-stimulated carbohydrate metabolism in normal men. *J.Clin.Invest.* 88: 960-966.
- Boden G. (1996a) Fatty acids and insulin resistance. *Diab.Care* 19: 394-395.
- Boden G. (1996b) Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 45: 3-10.
- Boivin A, Montplaisir I et Deshaies Y. (1994) Postprandial modulation of lipoprotein lipase in rats with insulin resistance. *Am.J.Physiol.* 267: E620-E627.

-
- Boivin A et Deshaies Y. (1995) Hypothesis: an amino acid sequence in lipoprotein lipase codes for its degradation by Ca^{2+} -dependent proteases. *Lipids* 30: 95-97.
- Boivin A et Deshaies Y. (1996) Dietary rat models in which the development of hypertriglyceridemia and that of insulin resistance are dissociated. *Metabolism* 45: 1-10.
- Boivin A et Deshaies Y. (2000) Contribution of hyperinsulinemia to modulation of lipoprotein lipase activity in the obese Zucker rat. *Metabolism* 49: 134-140.
- Boogaerts James R, Malone-McNeal Monica, Archambault-Schexnayder Jane et Davis Roger A. (1984) Dietary carbohydrate induces lipogenesis and very-low-density lipoprotein synthesis. *Am.J.Physiol.* 246: E77-E83.
- Bouchard C, Després J-P et Mauriège P. (1993) Genetic and non-genetic determinants of regional fat distribution. *Endo.Rev.* 14: 72-93.
- Bouchard C. (1995) Genetics and the metabolic syndrome. *Int.J.Obes.* 19 (suppl. 1): S52-S59.
- Bourgeois CS, Wiggins D, Hems R et Gibbons GF. (1995) VLDL output by hepatocytes from obese Zucker rats is resistant to the inhibitory effect of insulin. *Am.J.Physiol.* 269: E208-E215.
- Brault D, Noé L, Etienne J, Hamelin J, Raisonnier A, Souli A, Chuat J-C, Dugail I, Quignard-Boulangé A, Lavau M et Galibert F. (1992) Sequence of rat lipoprotein lipase encoding cDNA. *Gene* 121: 237-246.
- Braun JEA et Severson DL. (1992a) Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase. *Biochem.J.* 287: 337-347.
- Braun JEA et Severson DL. (1992b) Lipoprotein lipase release from cardiac myocytes is increased by decavanadate but not insulin. *Am.J.Physiol.* 262: E663-E670.
- Brindley DN. (1995) Role of glucocorticoids and fatty acids in the impairment of lipid metabolism observed in the metabolic syndrome. *Int.J.Obes.* 19 (suppl. 1): S69-S75.

- Briquet-Laugier V, Ben-Zeev O, White A et Doolittle MH. (1999) cld and lec23 are disparate mutations that affect maturation of lipoprotein lipase in the endoplasmic reticulum. *J.Lipid Res.* 40: 2044-2058.
- Brown C, Quig D et Layman DK. (1987) Lipoprotein lipase activities in exercise-trained rats isocalorically fed high or low fat diets. *Nutr.Res.* 7: 1187-1195.
- Brun RP, Kim JB, Hu E et Spiegelman B. (1997) Peroxisome-proliferator-activated receptor gamma and the control of adipogenesis. *Curr.Opinion Lipidol.* 8: 212-218.
- Buscà R, Pujana MA, Pognonec P, Auwerx J, Deeb SS, Reina M et Vilaro S. (1995) Absence of N-glycosylation at asparagine 43 in human lipoprotein lipase induces its accumulation in the rough endoplasmic reticulum and alters this cellular compartment. *J.Lipid Res.* 36: 939-951.
- Buscà R, Martinez M, Vitella E, Pognonec P, Deeb S, Auwerx J, Reina M et Vilaro S. (1996) The mutation gly¹⁴²-glu in human lipoprotein lipase produces a missorted protein that is diverted to lysosomes. *J.Biol.Chem.* 271: 2139-2146.
- Buscà R, Martinez M, Vilella E, Peinado J, Gelpi JL, Deeb S, Auwerx J, Reina M et Vilaro S. (1998) The carboxy-terminal region of human lipoprotein lipase is necessary for its exit from the endoplasmic reticulum. *J.Lipid Res.* 39: 821-833.
- Bédard S, Marcotte B et Marette A. (1997) Cytokines modulate glucose transport in skeletal muscle by inducing the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biochem.J.* 325: 487-493.
- Camps L, Reina M, Llobera M, Vilaro S et Olivecrona T. (1990) Lipoprotein lipase. Cellular origin and functional distribution. *Am.J.Physiol.* 258: C673-C681.
- Cardin AD, Jackson RL et Johnson JD. (1982) 5-Dimethylaminonaphthalene-1-sulfonyl 3 aminotyrosyl apoprotein CIII. Preparation, characterization, and interaction with phospholipid vesicles. *J.Biol.Chem.* 257: 4987-4992.
- Carneheim C, Nedergaard J et Cannon B. (1984) β -adrenergic stimulation of lipoprotein lipase in rat brown adipose tissue during acclimatation to cold. *Am.J.Physiol.* 246: E327-E333.

- Carneheim C, Nedergaard J et Cannon B. (1988) Cold-induced β -adrenergic recruitment of lipoprotein lipase in brown fat is due to increased transcription. *Am.J.Physiol.* 254: E155-E161.
- Carneheim CMH et Alexson SEH. (1989) Refeeding and insulin increase lipoprotein lipase activity in rat brown adipose tissue. *Am.J.Physiol.* 256: E645-E650.
- Carrero P, Gomez-Coronado D, Olivecrona G et Lasuncion MA. (1996) Binding of lipoprotein lipase to apolipoprotein B-containing lipoproteins. *Biochim.Biophys.Acta* 1299: 198-206.
- Carroll R, Liu L et Severson DL. (1995) Post-transcriptional mechanisms are responsible for the reduction in lipoprotein lipase activity in cardiomyocytes from diabetic rat hearts. *Biochem.J.* 310: 67-72.
- Casaroli-Marano RP, Peinado-Onsurbe J, Reina M, Staels B, Auwerx J et Vilaro S. (1996) Lipoprotein lipase in highly vascularized structures of the eye. *J.Lipid Res.* 37: 1037-1044.
- Casaroli-Marano RP, Garcia R, Vilella E, Olivecrona G, Reina M et Vilaro S. (1998) Binding and intracellular trafficking of lipoprotein lipase and triacylglycerol-rich lipoproteins by liver cells. *J.Lipid Res.* 39: 789-806.
- Chajek-Shaul T, Friedman G et Knobler H. (1985) Importance of different steps of glycosylation for the activity and secretion of lipoprotein lipase in rat preadipocytes studied with monensin and tunicamycin. *Biochim.Biophys.Acta* 837: 123-134.
- Chajek-Shaul T, Halimi O et Ben-Waim M. (1989) Phosphatidylinositol-specific phospholipase C releases lipoprotein lipase from the heparin releasable pool in rat heart cell culture. *Biochim.Biophys.Acta* 1014: 178-183.
- Chan BL, Lisanti MP, Rodriguez-Boulan E et Saltiel AR. (1988) Insulin-stimulated release of lipoprotein lipase by metabolism of its phosphatidylinositol anchor. *Science* 241: 1670-1672.
- Chiappe de Cingolani GE, Goers JWF, Giannotti M et Caldiz CI. (1996) Comparative effects of insulin and isoproterenol on lipoprotein lipase in rat adipose cells. *Am.J.Physiol.* 270: C1461-C1467.

Choi SY, Sivaram P, Walker DE, Curtiss LK, Gretch DG, Sturley SL, Attie AD, Deckelbaum RJ et Goldberg IJ. (1995) Lipoprotein lipase associations with lipoproteins involves protein-protein interaction with apolipoprotein B. *J.Biol.Chem.* 270: 8081-8086.

Choi SY, Pang L, Kern PA, Kayden HJ, Curtiss LK, Vanni-Reyes TM et Goldberg IJ. (1997) Dissociation of LPL and LDL: effects of lipoproteins and anti-apoB antibodies. *J.Lipid Res.* 38: 77-85.

Chung BH, Segrest JP, Smith K, Griffin FM et Brouillette CG. (1989) Lipolytic surface remnants of triglyceride-rich lipoproteins are cytotoxic to macrophages but not in the presence of high density lipoprotein. A possible mechanism for atherosclerosis? *J.Clin.Invest.* 83: 1363-1374.

Cianflone K, Maslowska M et Sniderman A. (1995) The acylation stimulating protein-adipsin system. *Int.J.Obes.* 19 (suppl. 1): S34-S38.

Cianflone Katherine, Dahan Smadar, Monge Juan Carlos et Sniderman Allan D. (1992) Pathogenesis of carbohydrate-induced hypertriglyceridemia using HepG2 cells as a model system. *Arterioscler.Thromb.* 12: 271-277.

Cigolini M et Smith U. (1979) Human adipose tissue in culture. VIII. Studies on the insulin-antagonistic effect of glucocorticoids. *Metabolism* 28: 502-510.

Clauser E, Leconte I et Auzan C. (1992) Molecular basis of insulin resistance. *Horm.Res.* 38: 5-12.

Clee SM, Bissada N, Miao F, Marais AD, Henderson HE, Steures P, McManus J, McManus B, LeBoeuf RC, Kastelein JP et Hayden MR. (2000) Plasma and vessel wall lipoprotein lipase have different roles in atherosclerosis. *J.Lipid Res.* 41: 521-531.

Clerk LH, Smith ME, Rattigan S et Clark MG. (2000) Increased chylomicron triglyceride hydrolysis by connective tissue flow in perfused rat hindlimb. Implications for lipid storage. *J.Lipid Res.* 41: 329-335.

Cohen JC et Berger GM. (1990) Effects of glucose ingestion on postprandial lipemia and triglyceride clearance in humans. *J.Lipid Res.* 31: 597-602.

- Cohn JS. (1994) Postprandial lipid metabolism. *Curr.Opinion Lipidol.* 5: 185-190.
- Colvins PL et Parks JS. (1999) Metabolism of high density lipoprotein subfractions. *Curr.Opinion Lipidol.* 10: 309-314.
- Cooper DA, Lu SC, Viswanath R, Freiman RN et Bensadoun A. (1992) The structure and complete nucleotide sequence of the avian lipoprotein lipase gene. *Biochim.Biophys.Acta* 1129: 166-171.
- Costelli P, Tessitore L, Batetta B, Mulas MF, Spano O, Pani P, Baccino FM et Dessi S. (1999) Alterations of lipid metabolism and cholesterol metabolism in cachectic tumor-bearing rats are prevented by insulin. *J.Nutr.* 129: 700-706.
- Couillard C, Bergeron N, Prud'homme D, Bergeron J, Tremblay A, Bouchard C, Mauriège P et Després J-P. (1998) Postprandial triglyceride response in visceral obesity in men. *Diabetes* 47: 953-960.
- Cryer A. (1988) Lipoprotein lipase: Molecular interactions of the enzyme. *Biochem.Soc.Trans.* 13: 27-28.
- Crémel G, Fickova M, Klimes I, Leray C, Leray V, Meuillet E, Roques M, Staedel C et Hubert P. (1993). Lipid modulation of insulin receptor tyrosine kinase activity in cultured cells, animals, and reconstituted systems. Dans: *Dietary Lipids and Insulin Action*. Edité par Klimes I, Howard BV, Storlien LH et Sebökova E. The New York Academy of Sciences, New York. pp. 164-171.
- Cupp M, Bensadoun A et Melford K. (1987) Heparin decreases the degradation rate of lipoprotein lipase in cultured adipocytes. *J.Biol.Chem.* 262: 6383-6388.
- D'Allaire F, Atgié C, Mauriège P, Simard P-M et Bukowiecki LJ. (1995) Characterization of β 1- and β 3-adrenoceptors in intact brown adipocytes of the rat. *Br.J.Pharmacol.* 114: 275-282.
- Davis RC, Wong H et Mikazy J. (1992) Chimeras of hepatic lipase and lipoprotein lipase. Domain localization of enzyme-specific properties. *J.Biol.Chem.* 267: 21499-21504.

- Deeb SS et Peng R. (1989) Structure of the human lipoprotein lipase gene. *Biochemistry* 28: 4131-4135.
- DeFronzo RA et Ferrannini E. (1991) Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diab.Care* 14: 173-194.
- DeFronzo Ralph A. (1988) The triumvirate: β -cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes* 37: 667-687.
- Deshaies Y, G elo en A, Paulin A et Bukowiecki LJ. (1991a) Restoration of lipoprotein lipase activity in insulin-deficient rats by insulin infusion is tissue-specific. *Can.J.Physiol.Pharmacol.* 69: 746-751.
- Deshaies Yves, Martineau Marie-Jos e et Lalonde Jos e. (1991b) Chronic α_1 - adrenergic blockade, serum triacylglycerols, and tissue lipoprotein lipase activity in rats fed diets high in starch or sucrose. *Nutrition* 7: 109-115.
- Deshaies Yves et Belahsen Rekia. (1993) Postprandial plasma triacylglycerols in rats under α_1 -adrenergic blockade. *Am.J.Physiol.* 264: E541-E547.
- Despr es J-P. (1991) Lipoprotein metabolism in visceral obesity. *Int.J.Obes.* 15: 45-52.
- Despr es J-P. (1994) Dyslipidaemia and obesity. *Baillere Clin.Endocrinol.Metab.* 8: 629-660.
- Despr es J-P et Marette A. (1994) Relation of components of insulin resistance syndrome to coronary disease risk. *Curr.Opinion Lipidol.* 5: 274-289.
- Despr es J-P, Lamarche Beno t, Mauri e Pascale, Cantin Bernard, Dagenais Gilles R, Moorjani Sital et Lupien Paul-J. (1996) Hyperinsulinemia as an independent risk factor for ischemic heart disease. *N.Engl.J.Med.* 334: 952-957.
- Despr es J-P. (1998) The insulin resistance-dyslipidemic syndrome of visceral obesity: effect on patient's risk. *Obes.Res.* 6 (Suppl 1): S8-S17.

Diamond P et LeBlanc J. (1988) A role for insulin in cephalic phase of postprandial thermogenesis in dogs. *Am.J.Physiol.* 254: E625-E632.

Dobbins RL, Chester MW, Daniels MB, McGarry JD et Stein DT. (1998) Circulating fatty acids are essential for efficient glucose-stimulated insulin secretion after prolonged fasting in humans. *Diabetes* 47: 1613-1618.

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

Draznin B, Kao M et Sussman KE. (1987) Insulin and glyburide increase cytosolic free-Ca²⁺ concentration in isolated rat adipocytes. *Diabetes* 36: 174-178.

Dulloo AG et Miller DS. (1987) Obesity: a disorder of the sympathetic nervous system. *Wld.Rev.Nutr.Diet.* 50: 1-56.

Durrington PN. (1998) Triglycerides are more important in atherosclerosis than epidemiology has suggested. *Atherosclerosis* 141 (Suppl 1): S57-S62.

Eckel RH, Prasad JE, Kern PA et Marshall S. (1984) Insulin regulation of lipoprotein lipase in cultured rat adipocytes. *Endocrinology* 114: 1665-1671.

Eckel RH. (1987). Adipose tissue lipoprotein lipase. Dans: Lipoprotein lipase. Edité par Borensztajn J. Evener, Chicago. pp. 79-132.

Eckel RH et Yost TJ. (1987) Weight reduction increases adipose tissue lipoprotein lipase responsiveness in obese women. *J.Clin.Invest.* 80: 992-997.

Eckel RH. (1989) Lipoprotein lipase: a multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases. *N.Engl.J.Med.* 320: 1060-1068.

Eckel RH, Yost TJ et Jensen DR. (1995a) Alterations in lipoprotein lipase in insulin resistance. *Int.J.Obes.* 19 (suppl. 1): S16-S21.

- Eckel RH, Yost TJ et Jensen DR. (1995b) Sustained weight reduction in moderately obese women results in decreased activity of skeletal muscle lipoprotein lipase. *Eur.J.Clin.Invest.* 25: 396-402.
- Eckel RH, Jensen DR, Schlaepfer IR et Yost TJ. (1996) Tissue-specific regulation of lipoprotein lipase by isoproterenol in normal-weight humans. *Am.J.Physiol.* 271: R1280-R1286.
- Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, Cromlish W, Collins S, Loy AL, Normandin D, Cheng A, Himms-Hagen J, Chan C-C, Ramachandran C, Gresser MJ, Tremblay ML et Kennedy BP. (1999) Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* 283: 1544-1548.
- Eliasson B, Mero N, Taskinen M-R et Smith U. (1997) The insulin resistance syndrome and postprandial lipid intolerance in smokers. *Atherosclerosis* 129: 79-88.
- Enerback S, Semb H et Olivecrona G. (1987) Molecular cloning and sequence analysis of cDNA encoding lipoprotein lipase of guinea pig. *Gene* 58: 1-12.
- Enerbäck Sven et Gimble Jeffrey M. (1993) Lipoprotein lipase gene expression: physiological regulators at the transcriptional and post-transcriptional level. *Biochim.Biophys.Acta* 1169: 107-125.
- Erskine JM, Jensen DR et Eckel RH. (1994) Macronutrient regulation of lipoprotein lipase is posttranslational. *J.Nutr.* 124: 500-507.
- Ewart HS, Carroll R et Severson DL. (1997) Lipoprotein lipase activity in rat cardiomyocytes is stimulated by insulin and dexamethasone. *Biochem.J.* 327: 439-442.
- Ewart HS et Severson DL. (1999) Insulin and dexamethasone stimulation of cardiac lipoprotein lipase activity involves the actin-based cytoskeleton. *Biochem.J.* 340: 485-490.
- Fagius J et Berne C. (1994) Increase in muscle nerve sympathetic activity in humans after food intake. *Clin.Sci.* 86: 159-167.
- Fajardo N et Deshaies Y. (1998) Long-term α 1-adrenergic blockade attenuates diet-induced dyslipidemia and hyperinsulinemia in the rat. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 913: 919.

Farese RV, Yost TJ et Eckel RH. (1991) Tissue-specific regulation of lipoprotein lipase activity by insulin/glucose in normal-weight humans. *Metabolism* 40: 214-216.

Feingold KR, Soued M, Serio MK, Moser AH, Dinarello CA et Grunfeld C. (1989) Multiple cytokines stimulate hepatic lipid synthesis *in vivo*. *Endocrinology* 125: 267-274.

Feingold KR, Strapans I, Memon RA, Moser AH, Shigenaga JK, Doerrler W, Dinarello CA et Grunfeld C. (1992) Endotoxin rapidly induced changes in lipid metabolism that produce hypertriglyceridemia: low doses stimulate hepatic triglyceride production while high doses inhibit clearance. *J.Lipid Res.* 33: 1765-1776.

Feingold KR, Marshall M, Gulli R, Moser AH et Grunfeld C. (1994) Effect of endotoxin and cytokines on lipoprotein lipase activity in mice. *Arterioscler.Thromb.* 14: 1866-1872.

Felber J-P, Haesler E et Jéquier E. (1993) Metabolic origin of insulin resistance in obesity with and without Type 2 (non-insulin-dependant) diabetes mellitus. *Diabetologia* 36: 1221-1229.

Felts JM, Itakura H et Crane RT. (1975) The mechanisms of assimilation of constituents of chylomicrons, very low density lipoproteins and remnants - a new theory. *Biochem.Biophys.Res.Com.* 66: 1467-1475.

Fernandez-Real JM, Molina A, Broch M, Ricart W, Gutierrez C, Casamitjana R, Vendrell J, Soler J et Gomez-Saez JM. (1999) Tumor necrosis factor system activity is associated with insulin resistance and dyslipidemia in myotonic dystrophy. *Diabetes* 48: 1108-1112.

Ferraro RT, Eckel RH, Larson DE, Fontvieille A-M, Rising R, Jensen DR et Ravussin E. (1993) Relationship between skeletal muscle lipoprotein lipase activity and 24-hour macronutrient oxidation. *J.Clin.Invest.* 92: 441-445.

Fisher RM, Coppack SW, Humphreys SM, Gibbons GF et Frayn KN. (1995) Human triacylglycerol-rich lipoprotein subfractions as substrates for lipoprotein lipase. *Clin.Chim.Acta* 236: 7-17.

- Fontbonne A, Eschwege E et Cambien F. (1989) Hypertriglyceridemia as a risk factor of coronary heart disease mortality in subjects with impaired glucose tolerance or diabetes. Results from the 11 year follow-up of the Paris Prospective Study. *Diabetologia* 32: 300-304.
- Frayn KN. (1993) Insulin resistance and lipid metabolism. *Curr.Opinion Lipidol.* 4: 197-204.
- Frayn KN. (1998) Nutrient partitioning: is LPL the gatekeeper? *Int.J.Obes.* 22 (Suppl 3): S5.
- Fried SK et Kral JG. (1987) Sex differences in regional distribution of fat cell size and lipoprotein lipase activity in morbidly obese patients. *Int.J.Obes.* 11: 129-140.
- Fried SK et Zechner R. (1989) Cachetin/tumor necrosis factor decreases human adipose tissue lipoprotein lipase mRNA levels, synthesis, and activity. *J.Lipid Res.* 30: 1917-1923.
- Fried SK, Velazquez N et Nobel J. (1990a) Nutrition-induced variations in responsiveness to insulin effects on lipoprotein lipase activity in isolated rat fat cells. *J.Nutr.* 120: 1087-1095.
- Fried SK, Velazquez N et Nobel J. (1990b) Nutrition-induced variations in responsiveness to insulin effects on lipoprotein lipase activity in isolated rat fat cells. *J.Nutr.* 120: 1087-1095.
- Fried SK, Russell CD, Grauso NL et Brolin RE. (1993) Lipoprotein lipase regulation by insulin and glucocorticoid in subcutaneous and omental adipose tissues of obese women and men. *J.Clin.Invest.* 92: 2191-2198.
- Fried SK, Bunkin DA et Greenberg AS. (1998) Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoids. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 83: 847-850.
- Friedman G, Chajek-Shaul T, Olivecrona T, Stein O et Stein Y. (1982) Fate of milk ¹²⁵I-labeled lipoprotein lipase in cells in culture: comparison of lipoprotein lipase and non-lipoprotein lipase synthesizing cells. *Biochim.Biophys.Acta* 711: 114-122.
- Friedman G, Chajek-Shaul T et Stein O. (1986) Beta-adrenergic stimulation enhances translocation, processing and synthesis of lipoprotein lipase in rat heart cells. *Biochim.Biophys.Acta* 877: 112-120.

Fujisawa Takuji, Riby Jacques et Kretchmer Norman. (1991) Intestinal absorption of fructose in the rat. *Gastroenterology* 101: 360-367.

Fuki IV, kuhn KM, Lomazov IR, Rothman VL, Tuszynski GP, Lozzo RV, Swenson TL, Fisher EA et Williams KJ. (1997) The syndecan family of proteoglycans. Novel receptors mediating internalization of atherogenic lipoproteins in vitro. *J.Clin.Invest.* 100: 1611-1622.

Garg A. (1996) Insulin resistance in the pathogenesis of dyslipidemia. *Diab.Care* 19: 387-389.

Gaudiot N, Jaubert A-M, Charbonnier E, Sabourault D, Lacasa D, Giudicelli Y et Ribière C. (1998) Modulation of white adipose tissue lipolysis by nitric oxide. *J.Biol.Chem.* 273: 13475-13481.

Gimble JM, Hua X, Wanker F, Morgan C, Robinson C, Hill MR et Nadon N. (1995) In vitro and in vivo analysis of murine lipoprotein lipase gene promoter: tissue-specific expression. *Am.J.Physiol.* 268: E213-E218.

Ginsberg HN. (1994) Lipoprotein metabolism and its relationship to atherosclerosis. *Med.Clin.North Am.* 78: 1-20.

Glickman RM et Sabesin SM. (1994). Lipoprotein Metabolism. Dans: *The Liver: Biology and Pathobiology*. Edité par Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachter DA et Shafritz DA. Raven Press Ltd., New York. pp. 391-414.

Gnudi L, Jensen DR, Tozzo E, Eckel RH et Kahn BB. (1996) Adipose-specific overexpression of Glut-4 in transgenic mice alters lipoprotein lipase activity. *Am.J.Physiol.* 270: R785-R792.

Goldberg IJ, Kandel JJ et Blum CB. (1986) Association of plasma lipoproteins with post-heparin activities. *J.Clin.Invest.* 78: 1523-1528.

Goldberg IJ, Le N-A, Ginsberg HN, Krauss RM et Lindgren FT. (1988) Lipoprotein metabolism during acute inhibition of lipoprotein lipase in the cynomolgus monkey. *J.Clin.Invest.* 81: 561-568.

Goldberg IJ. (1996) Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J.Lipid Res.* 37: 693-707.

Gorski J et Stankiewick-Choroszuca B. (1982) The effect of hormones on lipoprotein lipase activity in skeletal muscles of the rat. *Horm.Metab.Res.* 14: 189-191.

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

Gouni I, Oka K, Etienne J et Chan L. (1993) Endotoxin-induced hypertriglyceridemia is mediated by suppression of lipoprotein lipase at a post-transcriptional level. *J.Lipid Res.* 34: 139-146.

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

Groop LC, Saloranta C, Shank M, Bonadonna RC, Ferrannini E et DeFronzo RA. (1991) The role of free fatty acid metabolism in the pathogenesis of insulin resistance in obesity and noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 72: 96-107.

Grundy Scott M et Denke Margo A. (1990) Dietary influences on serum lipids and lipoproteins. *J.Lipid Res.* 31: 1149-1172.

Grunfeld C et Feingold KR. (1992) Tumor necrosis factor, interleukin, and interferon induced changes in lipid metabolism as part of host defense. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 200: 224-227.

Grunfeld C, Pang M, Doerrler W, Shigenaga JK, Jensen P et Feingold KR. (1992) Lipids, lipoproteins, triglyceride clearance, and cytokines in human immunodeficiency virus infection and the acquired immunodeficiency syndrome. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 74: 1045-1052.

Hainault I, Carlotti M, Hajduch E, Guichard C et Lavau M. (1993). Fish oil in a high lard diet prevents obesity, hyperlipemia, and adipocyte insulin resistance in rats. Dans: *Dietary Lipids and Insulin Action*. Edité par Klimes I, Howard BV, Storlien LH et Sebökova E. The New York Academy of Sciences, New York. pp. 98-101.

Hallfrisch J, Cohen L et Reiser S. (1981) Effects of feeding rats sucrose in a high fat diet. *J.Nutr.* 111: 531-536.

Hallfrisch Judith, Lazar Frances, Jorgensen Carol et Reiser Sheldon. (1979) Insulin and glucose responses in rat fed sucrose or starch. *Am.J.Clin.Nutr.* 32: 787-793.

Hardardottir I, Grünfeld C et Feingold KR. (1994) Effects of endotoxin and cytokines on lipid metabolism. *Curr.Opinion Lipidol.* 5: 207-215.

Harris HW, Grunfeld C, Feingold KR, Read TE, Kane JP, Jones AL, Eichbaum EB, Bland GF et Rapp JH. (1993) Chylomicrons alter the fate of endotoxin, decreasing tumor necrosis factor release and preventing death. *J.Clin.Invest.* 91: 1028-1034.

Harris MI, Hadden WC, Knowler WC et Bennett PH. (1987) Prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance and plasma glucose levels in U.S. population aged 20-74 yr. *Diabetes* 36: 523-534.

Hauner H, Petruschke T, Russ M, Rohrig K et Eckel J. (1995) Effects of tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) on glucose transport and lipid metabolism of newly-differentiated human fat cells in cell culture. *Diabetologia* 38: 764-771.

Havel R. (1994) Triglyceride-rich lipoproteins and atherosclerosis - new perspectives. *Am.J.Clin.Nutr.* 59: 795-799.

Hendricks WL, Van Vark LC, Scoonderwoerd K, Jansen H et Havekes LM. (1998) Not the mature 56 kDa lipoprotein lipase protein but a 37 kDa protein co-purifying with the lipase mediates the binding of low density lipoproteins to JTT4 macrophages. *Biochem.J.* 330: 765-769.

Herzberg Gene R et Rogerson Maria. (1992) Dietary fat eliminates the stimulation of hepatic triacylglycerol secretion in fructose-fed rats. *Nutr.Res.* 12: 529-542.

Hespeel P, Vergauwen L, Vandenberghe K et Richter EA. (1995) Important role of insulin and flow in stimulating glucose uptake in contracting skeletal muscle. *Diabetes* 44: 210-215.

Higgins Janine A, Brand Miller Janette C et Denyer Gareth S. (1996) Development of insulin resistance in the rat is dependent on the rate of glucose absorption from the diet. *J.Nutr.* 126: 596-602.

Hill MR, Kelly K, Wu X, Wanker F, Bass H, Morgan C, Wang C et Gimble JM. (1995) Lipopolysaccharide regulation of lipoprotein lipase expression in murine macrophages. *Infect.Immun.* 63: 858-864.

Hill MR, Young MD, McCurdy CM et Gimble JM. (1997) Decreased expression of murine PPAR γ in adipose tissue during endotoxemia. *Endocrinology* 138: 3073-3076.

Hirano Tsutomu, Mamo John CL, Poapst Mary E, Kuksis Arnis et Steiner George. (1989) Impaired very low-density lipoprotein-triglyceride catabolism in acute and chronic fructose-fed rats. *Am.J.Physiol.* 256: E559-E565.

Hokanson JE. (1999) Functional variants in the lipoprotein lipase gene and risk for cardiovascular disease. *Curr.Opinion Lipidol.* 10: 393-399.

Homma H, Kurachi H, Nishio Y, Takeda T, Yamamoto T, Adachi K, Morishige K, Ohmichi M, Matsuzawa Y et Murata Y. (2000) Estrogen suppresses transcription of lipoprotein lipase gene. Existence of a unique estrogen response element on the lipoprotein lipase promoter. *J.Biol.Chem.* 275: 11404-11411.

Hoogewerf AJ et Bensadoun A. (1991) Occurrence of sulfate in an asparagine-linked complex oligosaccharide of chicken adipose lipoprotein lipase. *J.Biol.Chem.* 266: 1048-1057.

Hotamisligil GS et Spiegelman BM. (1993) Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259: 87-91.

Hotamisligil GS et Spiegelman BM. (1994) Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes* 43: 1271-1278.

Howard BV. (1999) Insulin resistance and lipid metabolism. *Am.J.Cardiol.* 84: 28J-32J.

Hua X, Enerback S et Hudson J. (1991) Cloning and characterization of the promoter of the murine lipoprotein lipase-encoding gene: structural and functional analysis. *Gene* 107: 247-258.

Hultin M, Carneheim C, Rosenqvist K et Olivecrona T. (1995) Intravenous lipid emulsions: removal mechanisms as compared to chylomicrons. *J.Lipid Res.* 36: 2174-2184.

Ionescu E, Rohner-Jeanrenaud F, Proietto J, Rivest RW et Jeanrenaud B. (1988) Taste-induced changes in plasma insulin and glucose turnover in lean and genetically obese rats. *Diabetes* 37: 773-779.

Iritani Nobuko, Nishimoto Naomi, Katsurada Akihiko et Fukuda Hitomi. (1992) Regulation of hepatic lipogenic enzyme gene expression by diet quantity in rats fed a fat-free, high carbohydrate diet. *J.Nutr.* 122: 28-36.

Ito Y, Azrolan N et O'Connell A. (1990) Hypertriglyceridemia as a result of human apo CIII gene expression in transgenic mice. *Science* 249: 790-793.

Iverius PH et Ostlund-Lindqvist AM. (1976) Lipoprotein lipase from bovine milk. Isolation procedure, chemical characterization and molecular weight analysis. *J.Biol.Chem.* 251: 7791-7795.

Iverius PH et Ostlund-Lindqvist AM. (1986) Preparation, characterization, and measurement of lipoprotein lipase. *Methods Enzymol.* 129: 691-704.

Jacob S, Machann J, Rett K, Brechtel K, Volk A, Renn W, Mearker E, Matthaei S, Schick F, Claussen C-D et Häring H-U. (1999) Association of increased intramyocellular lipid content with insulin resistance in lean nondiabetic offspring of type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 48: 1113-1119.

Jemaa R, Tuzet S, Portos C, Betoulle D, Apfelbaum M et Fumeron F. (1995) Lipoprotein lipase gene polymorphisms: associations with hypertriglyceridemia and body mass index in obese people. *Int.J.Obes.* 19: 270-274.

Jensen DR, Schlaepfer IR, Morin CL, Pennington DS, Marcell T, Ammon SM, Gutierrez-Hartmann A et Eckel RH. (1997) Prevention of diet-induced obesity in transgenic mice overexpressing skeletal muscle lipoprotein lipase. *Am.J.Physiol.* 273: R683-R689.

Jensen H, Breedveld B et Schoonderwoerd K. (1998) Role of lipoprotein lipases in postprandial lipid metabolism. *Atherosclerosis* 141 (Suppl 1): S31-S34.

Jeppesen J, Hollenbeck CB, Zhou MY, Coulston AM, Jones C, Chen YD et Reaven GM. (1995) Relation between insulin resistance, hyperinsulinemia, postheparin plasma lipoprotein lipase activity, and postprandial lipemia. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 15: 320-324.

Johansson J, Walldius G et Carlson LA. (1992) Close correlation between high-density lipoprotein and triglycerides in normotriglyceridaemia. *J.Intern.Med.* 232: 43-51.

Julien P, Vohl M-C, Gaudet D, Gagné C, Lévesque G, Després J-P, Cadelis F, Brun LD, Nadeau A et Murthy VMR. (1997) Hyperinsulinemia and abdominal obesity affect the expression of hypertriglyceridemia in heterozygous familial lipoprotein lipase deficiency. *Diabetes* 46: 2063-2068.

Kahn Barbara B et Pedersen Oluf. (1993) Suppression of GLUT4 expression in skeletal muscle of rats that are obese from high fat feeding but not from high carbohydrate feeding or genetic obesity. *Endocrinology* 132: 13-22.

Kapur S, Bédard S, Marcotte B, Côté CH et Marette A. (1997) Expression of nitric oxide synthase in skeletal muscle: a novel role for nitric oxide as a modulator of insulin action. *Diabetes* 46: 1691-1700.

Kapur S, Marcotte B et Marette A. (1999) Mechanism of adipose tissue iNOS induction in endotoxemia. *Am.J.Physiol.* 276: E635-E641.

Kawakami M et Cerami A. (1981) Studies of endotoxin-induced decrease in lipoprotein lipase activity. *J.Exp.Med.* 154: 631-639.

Kazumi T, Vranic M et Steiner G. (1986) Triglyceride kinetics: effects of dietary glucose, sucrose, or fructose alone or with hyperinsulinemia. *Am.J.Physiol.* 250: E325-E330.

Kazumi Tsutomu, Vranic Mladen et Steiner George. (1985) Changes in very low density lipoprotein particle size and production in response to sucrose feeding and hyperinsulinemia. *Endocrinology* 117: 1145-1150.

Kazumi Tsutomu, Yoshino Gen, Matsuba Kohji, Iwai Masahide, Iwatani Ippei, Matsushita Masayuki, Kasama Toshio, Hosokawa Tomoyoshi, Numano Fujio et Baba Shigeaki. (1991) Effects of dietary glucose or fructose on the secretion rate and particle size of triglyceride-rich lipoprotein in Zucker fatty rats. *Metabolism* 40: 962-966.

Kern A, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, deMunnich R et Simsollo RB. (1995) The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J.Clin.Invest.* 95: 2111-2119.

Kern PA, Ranganathan G, Yukht A, Ong JM et Davis RC. (1996) Translational regulation of lipoprotein lipase by thyroid hormone is via a cytoplasmic repressor that interacts with the 3' untranslated region. *J.Lipid Res.* 37: 2322-2340.

Kiens B, Lithell H, Mikines KJ et Richter EA. (1989) Effects of insulin and exercise on muscle lipoprotein lipase activity in man and its relation to insulin action. *J.Clin.Invest.* 84: 1124-1129.

Kim Jason K, Wi Jae K et Youn Jang H. (1996) Metabolic impairment precedes insulin resistance in skeletal muscle during high-fat feeding in rats. *Diabetes* 45: 651-658.

Kirchgessner TG, Chuat JC et Heinzmann C. (1989a) Organisation of the human lipoprotein lipase gene and evolution of the lipase gene family. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 86: 9647-9651.

Kirchgessner TG, LeBoeuf RC, Langner CA, Zollman S, Chang CH, Taylor BA, Schotz MC, Gordon JI et Lusis AJ. (1989b) Genetic and developmental regulation of the lipoprotein lipase gene. Loci both distal and proximal to the lipoprotein lipase structural gene control gene expression. *J.Biol.Chem.* 264: 1573-1582.

Klimes I, Seboková E, Vraná A et Kazdová L. (1993). Raised dietary intake of n-3 polyunsaturated fatty acids in high sucrose-induced insulin resistance. Dans: *Dietary Lipids and Insulin Action*. Edited par Klimes I, Howard BV, Storlien LH et Seboková E. The New York Academy of Sciences, New York. pp. 69-81.

Klingenspor M, Ebbinghaus C, Hulshorst G, Stohr S, Spiegelhalter F, Haas K et Heldmaier G. (1996) Multiple regulatory steps are involved in the control of lipoprotein lipase activity in brown adipose tissue. *J.Lipid Res.* 37: 1685-1695.

Knutson VP. (2000) The release of lipoprotein lipase from 3T3-L1 adipocytes is regulated by microvessel endothelial cells in an insulin-dependent manner. *Endocrinology* 141: 693-701.

Kontula K et Ehnholm C. (1996) Regulatory mutations in human lipoprotein disorders and atherosclerosis. *Curr.Opinion Lipidol.* 7: 64-68.

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

Kraemer FB, Takeda D, Natu V et Sztalryd C. (1998) Insulin regulates lipoprotein lipase activity in rat adipose cells via wortmannin- and rapamycin-sensitive pathways. *Metabolism* 47: 555-559.

Krapp A, Zhang H, Ginzinger D, Liu MS, Lindberg A, Olivecrona G, Hayden MR et Beisiegel U. (1995) Structural features in lipoprotein lipase necessary for the mediation of lipoprotein uptake into cells. *J.Lipid Res.* 36: 2362-2373.

Krauss RM, Grunfeld C, Doerrler WT et Feingold KR. (1990) Tumor necrosis factor acutely increases plasma levels of very low density lipoproteins of normal size and composition. *Endocrinology* 127: 1016-1021.

Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, Satoh S, Nakano R, Ishii C, Sugiyama T, Eto K, Tsubamoto Y, Okuno A, Murakami K, Sekihara H, Hasegawa G, Naito M, Toyoshima Y, Tanaka S, Shiota K, Kitamura T, Fujita T, Ezaki O, Aizawa S, Nagai R, Tobe K, Kimura S et Kadowaki T. (1999) PPAR γ mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol.Cell* 4: 597-609.

Kuusela P, Jacobsson A, Klingenspor M, Rehnmark S, Heldmaier G, Cannon B et Nedergaard J. (1997a) Contrasting adrenergic effects on lipoprotein lipase gene expression in the brown adipose tissue of intact mice and in cultured adipocytes from mice. *Biochim.Biophys.Acta* 1345: 327-337.

Kuusela P, Rehnmark S, Jacobsson A, Cannon B et Nedergaard J. (1997b) Adrenergic stimulation of lipoprotein lipase gene expression in rat brown adipocytes differentiated in culture: mediation via β 3- and α 1-adrenergic receptors. *Biochem.J.* 321: 759-767.

- Ladu MJ, Kapsas H et Palmer WK. (1991) Regulation of lipoprotein lipase in adipose and muscle tissues during fasting. *Am.J.Physiol.* 260: R953-R959.
- Lahdenperä S, Syvanäanne M, Kahri J et Taskinen M-R. (1996) Regulation of low-density lipoprotein particle size distribution in NIDDM and coronary disease: importance of serum triglycerides. *Diabetologia* 39: 453-461.
- Lanza-Jacoby S, Wong SH, Tabares A, Baer D et Schneider T. (1992) Disturbances in the composition of plasma lipoproteins during gram-negative sepsis in the rat. *Biochim.Biophys.Acta* 1124: 233-240.
- Lanza-Jacoby S, Sedkova N, Phetteplace H et Perroti D. (1997) Sepsis-induced regulation of lipoprotein lipase expression in rat adipose tissue and soleus muscle. *J.Lipid Res.* 38: 701-710.
- Lanza-Jacoby S, Phetteplace H, Sedkova N et Knee G. (1998) Sequential alterations in tissue lipoprotein lipase, triglyceride secretion rates, and serum tumor necrosis factor α during *Escherichia coli* bacteremic sepsis in relation to the development of hypertriglyceridemia. *Shock* 9: 46-51.
- Lash JM. (1996) Regulation of skeletal muscle blood flow during contractions. *Proc.Exp.Biol.Med.* 211: 218-235.
- Laville M, Auboeuf D, Khalfallah Y, Vega N, Riou JP et Vidal H. (1996) Acute regulation by insulin of phosphatidylinositol-3-kinase, Rad, Glut4, and lipoprotein lipase mRNA levels in human muscle. *J.Clin.Invest.* 98: 43-49.
- Lee J-J, Smith PJ et Fried SK. (1998) Mechanisms of decreased lipoprotein lipase activity in adipocytes of starved rats depend on the duration of starvation. *J.Nutr.* 128: 940-946.
- Lee SK, Opara EC, Surwit RS, Feinglos MN et Akwari OE. (1995) Defective glucose-stimulated insulin release from perfused islets of C57BL/6J mice. *Pancreas* 11: 211-216.
- Lewis GF, O'Meara NM et Soltys PA. (1990) Postprandial lipoprotein metabolism in normal and obese subjects: comparison after the vitamin A fat-loading test. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 71: 1041-1050.

Lewis GF, Uffelman KD, Szeto LW et Steiner G. (1993) Effects of acute hyperinsulinemia on VLDL triglyceride and VLDL apoB production in normal weight and obese individuals. *Diabetes* 42: 833-842.

Lewis GF. (1997) Fatty acid regulation of very low density lipoprotein production. *Curr.Opinion Lipidol.* 8: 146-153.

Lewis Gary F et Steiner George. (1996) Hypertriglyceridemia and its metabolic consequences as a risk factor for atherosclerotic cardiovascular disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diab.Metab.Rev.* 12: 37-56.

Lindqvist P, Ostlund-Lindqvist AM et Witztum JL. (1983) The role of lipoprotein lipase in the metabolism of triglyceride-rich lipoproteins by macrophages. *J.Biol.Chem.* 258: 9086-9092.

Lo JY, Smith LC et Chan L. (1995) Lipoprotein lipase: role of intramolecular disulfide bonds in enzyme catalysis. *Biochem.Biophys.Res.Com.* 206: 266-271.

Lookene A, Groot NB, Kastelein JJ, Olivecrona G et Bruin T. (1997) Mutation of tryptophan residues in lipoprotein lipase. Effects on stability, immunoreactivity, and catalytic properties. *J.Biol.Chem.* 272: 766-772.

Lopez-Soriano FJ, Carbo N et Argilés JM. (1991) Lipid metabolism in the obese Zucker rat. Disposal of an oral [¹⁴C]triolein load and lipoprotein lipase activity. *Biochem.J.* 274: 651-656.

Lopez-Soriano J, Llovera M, Carbo N, Garcia-Martinez C, Lopez-Soriano FJ et Argiles JM. (1997) Lipid metabolism in tumor-bearing mice: studies with knockout mice for tumor necrosis-factor receptor 1 protein. *Mol.Cell.Endocrinol.* 132: 93-99.

Mackintosh Veronica S, Phan Cam T, Mortimer Bok-Cheng et Redgrave Trevor G. (1996) Vasoactive mediators affect the clearance of lipids from emulsion models of plasma lipoproteins in rats. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 27: 447-454.

MacPhee CE, Hatters DM, Sawyer WH et Howlett GJ. (2000) Apolipoprotein C-II (39-42) activates lipoprotein lipase by direct lipid-independent binding. *Biochemistry* 39: 3433-3440.

- Maheux P, Azhar S, Kern PA, Chen Y-DI et Reaven GM. (1997) Relationship between insulin-mediated glucose disposal and regulation of plasma and adipose tissue lipoprotein lipase. *Diabetologia* 40: 850-858.
- Malaisse Willy J. (1995) Anomalies du métabolisme insulaire dans le diabète. *m/s Méd.Sci.* 11: 199-202.
- Mamo JCL. (1995) Atherosclerosis as a post-prandial disease. *Endocrinol.Metab.* 2: 229-244.
- Mantha L et Deshaies Y. (1998) β -Adrenergic modulation of triglyceridemia under increased energy expenditure. *Am.J.Physiol.* 274: R1769-R1776.
- Mantha L, Palacios E et Deshaies Y. (1999) Modulation of triglyceride metabolism by glucocorticoids in diet-induced obesity. *Am.J.Physiol.* 277: R455-R464.
- Marette A, Géoën A, Collet A et Bukowiecki LJ. (1990) Defective metabolic effect of norepinephrine and insulin in obese Zucker rat brown adipose tissue. *Am.J.Physiol.* 258: E320-E328.
- Marotta T, Ferrara LA, Di Marino L, Mancini M, Annuzzi G, Russo O, D'Orta G, Lucarelli C et Rossi F. (1995) Factors affecting lipoprotein lipase in hypertensive patients. *Metabolism* 44: 712-718.
- Marshall BA, Tordjman K, Host HH, Ensor NJ, Kwon G, Marshall CA, Coleman T, McDaniel ML et Semenkovich CF. (1999) Relative hypoglycemia and hyperinsulinemia in mice with heterozygous lipoprotein lipase (LPL) deficiency: islet LPL regulates insulin secretion. *J.Biol.Chem.* 274: 27426-27432.
- Martineau M-J et Deshaies Y. (1990) Fasting and postprandial changes in determinants of triacylglycerol metabolism in rats meals high in starch or sucrose. *Nutr.Res.* 10: 1215-1226.
- Masuno H et Okuda H. (1995) Glycosylation and secretion of lipoprotein lipase by 3T3-L1 adipocytes: effects of brefeldin A. *J.Atheroscl.Thromb.* 2: 46-52.

Masuno HC, Blanchette-Mackie EJ et Chernick SS. (1991a) Synthesis of inactive nonsecretable high mannose-type lipoprotein lipase by cultured brown adipocytes of combined lipase-deficient cld/cld mice. *J.Biol.Chem.* 256: 1628-1638.

Masuno HC, Schultz CJ et Park JW. (1991b) Glycosylation, activity and secretion of lipoprotein lipase in cultured brown adipocytes of newborn mice. Effect of tunicamycin, monensin, 1-deozymannojirimycin, and swainsosine. *Biochem.J.* 277: 801-809.

Matsuo T, Sumida H et Suzuki M. (1995) Effects of chemical sympathectomy on lipoprotein lipase activities in peripheral tissues of rats fed high fat diets consisting of different fats. *J.Nutr.Sci.Vitaminol.* 41: 377-386.

Mayes PA. (1993) Intermediary metabolism of fructose. *Am.J.Clin.Nutr.* 58: S754-S765.

McArthur MD, Graham SE, Russell J C et Brindley DN. (1998) Exaggerated stress-induced release of nonesterified fatty acids in JCR:LA-corpulent rats. *Metabolism* 47: 1383-1390.

McGarry JD. (1998) Glucose-fatty acid interactions in health and diseases. *Am.J.Clin.Nutr.* 67 (suppl.): 500S-504S.

Mead JR, Cryer A et Ramji DP. (1999) Lipoprotein lipase, a key role in atherosclerosis. *FEBS Letters* 462: 1-6.

Memon RA, Grunfeld C, Moser AH et Feingold KR. (1993) Tumor necrosis factor mediates the effects of endotoxin on cholesterol and triglyceride metabolism in mice. *Endocrinology* 132: 2246-2253.

Merkel M, Weinstock PH, Chajek-Shaul T, Radner H, Yin B, Breslow JL et Goldberg IJ. (1998) Lipoprotein lipase expression exclusively in liver. A mouse model for metabolism in the neonatal period and during cachexia. *J.Clin.Invest.* 102: 893-901.

Miesenbock G, Holzl B, Foger B, Brandstatter E, Paulweber B, Sandhofer F et Patsch JR. (1993) Heterozygous lipoprotein lipase deficiency due to a missense mutation as the cause of impaired triglyceride tolerance with multiple lipoprotein abnormalities. *J.Clin.Invest.* 91: 448-455.

- Mingrone G, DeGaetano A, Greco AV, Capristo E, Benedetti G, Castagnetto M et Gasbarrini G. (1997) Reversibility of insulin resistance in obese diabetic patients: role of plasma lipids. *Diabetologia* 40: 599-605.
- Moller David E et Flier Jeffrey S. (1991) Insulin resistance - mechanisms, syndromes, and implications. *N.Engl.J.Med.* 325: 938-948.
- Moncada S, Radomski MW et Palmer RMJ. (1988) Endothelium-derived relaxing factor: identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochem.Pharmacol.* 37: 2495-2501.
- Moncada S, Palmer RMJ et Higgs EA. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol.Rev.* 43: 109-142.
- Morita T, Imagawa T, Kanawaga A et Ueki H. (1995) Sodium ortovanadate increases phospholipase A2 activity in isolated rat fat pads: a role of phospholipase A2 in the vanadate-stimulated release of lipoprotein lipase activity. *Biol.Pharm.Bull.* 18: 347-349.
- Motoyashiki T, Morita T et Ueki H. (1996) Involvement of the rapid increase in cAMP content in the vanadate-stimulated release of lipoprotein lipase activity from rat fat pads. *Biol.Pharm.Bull.* 19: 1412-1416.
- Motoyashiki T, Miyake M, Yoshida A, Morita T et Ueki H. (1999) A vanadyl sulfate-bovine serum albumin complex stimulates the release of lipoprotein lipase activity from isolated rat fat pads through an increase in the cellular content of cAMP and myo-inositol 1,4,5-triphosphate. *Biol.Pharm.Bull.* 22: 780-786.
- Mulder M, Lombardi P et Jensen H. (1992) Heparan sulfate proteoglycans are involved in the lipoprotein lipase-mediated enhancement of the cellular binding of very low density and low density lipoproteins. *Biochem.Biophys.Res.Com.* 185: 582-587.
- Murad F. (1999) Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling. *Biosci.Rep.* 19: 133-154.
- Murdoch SJ et Breckenridge WC. (1996) Effect of lipid transfer proteins on lipoprotein lipase induced transformation of VLDL and HDL. *Biochim.Biophys.Acta* 1303: 222-232.

- Murthy Ven, Julien Pierre et Gagné Claude. (1996) Molecular pathobiology of the human lipoprotein lipase gene. *Pharmacol.Ther.* 70: 101-105.
- Nara M, Takahashi M, Kanda T, Shimomura Y et Kobayashi I. (1997) Running exercise improves metabolic abnormalities and fat accumulation in sucrose-induced insulin-resistant rats. *Obes.Res.* 5: 348-353.
- Nielsen MS, Jacobsen C, Olivecrona G, Gliemann J et Petersen CM. (1999) Sortilin/neurotensin receptor-3 binds and mediates degradation of lipoprotein lipase. *J.Biol.Chem.* 274: 8832-8836.
- Nilsson-Ehle P. (1981) Impaired regulation of adipose tissue lipoprotein lipase in obesity. *Int.J.Obes.* 5: 695-699.
- Noguchi Y, Nomura K, Yoshikawa T, Fukuzawa K, Makino T, Tsuburaya A et Matsumoto A. (1996) Role of insulin-resistance in decreasing lipoprotein lipase activity in tumor-bearing rats. *Surg.Today* 26: 271-275.
- Nomura T, Hagino Y, Gotoh M et Iguchi A. (1984) The effects of streptozotocin diabetes on tissue specific lipase activities in the rat. *Lipids* 19: 594-599.
- Nonogaki K, Moser AH, Feingold KR et Grunfeld C. (1994) α -Adrenergic receptors mediate the hypertriglyceridemia induced by endotoxin, but not tumor necrosis factor, in rats. *Endocrinology* 135: 2644-2650.
- Nordestgaard B, Abildgaard S, Wittrup H, Steffenson R, Jensen G et Tybjaerg-Hansen A. (1997) Heterozygous lipoprotein lipase deficiency: frequency in the general population, effect on plasma lipid levels, and risk of ischemic heart disease. *Circulation* 96: 1737-1744.
- Nuutila Pirjo, Raitakari Maria, Laine Hanna, Kirlevä Olli, Takala Teemu, Utriainen Tapio, Mäkimattila Sari, Pitkänen Olli-Pekka, Ruotsalainen Ulla, Iida Hidehiro, Knuuti Juhani et Yki-Järvinen Hannele. (1996) Role of blood flow in regulating insulin-stimulated glucose uptake in humans (studies using bradykinin [^{15}O]water and [^{18}F]fluoro-deoxy-glucose and positron emission tomography). *J.Clin.Invest.* 97: 1741-1747.

O'Meara NM, Lewis GF, Cabana VG, Iverius PH, Getz GS et polonsky KS. (1992) Role of basal triglyceride and high density lipoprotein in determination of postprandial lipid and lipoprotein responses. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 75: 465-471.

Obunike JC, Sivaram P, Paka L, Low MG et Goldberg IJ. (1996) Lipoprotein lipase degradation by adipocytes: receptor-associated protein (RAP)-sensitive and proteoglycan-mediated pathway. *J.Lipid Res.* 37: 2439-2449.

Obunike JC, Paka S, Pillarisetti S et Goldberg IJ. (1997) Lipoprotein lipase can function as a monocyte adhesion protein. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 17: 1414-1420.

Olin KL, Potter-Perigo S, Barrett PH, Wight TN et Chait A. (1999) Lipoprotein lipase enhances the binding of native and oxidized low density lipoproteins to versican and biglycan synthesized by cultured arterial smooth muscle cells. *J.Biol.Chem.* 274: 34629-34636.

Olivecrona G, Vilaro S, Esko JD et Olivecrona T. (1996) Synthesis and secretion of lipoprotein lipase in heparan sulfate-deficient Chinese hamster ovary cells. *Isr.J.Med.Sci.* 32: 430-444.

Olivecrona G et Beisiegel U. (1997) Lipid binding of apolipoprotein CII is required for stimulation of lipoprotein lipase activity against apolipoprotein CII-deficient chylomicrons. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 17: 1545-1549.

Olivecrona T, Chernick SS et Olivecrona G. (1987a) Synthesis and secretion of lipoprotein lipase in 3T3-L1 adipocytes: demonstration of inactive forms of lipase in cells. *J.Biol.Chem.* 262: 10748-10759.

Olivecrona T, Chernick SS, Olivecrona G, Garrison M et Scow RO. (1987b) Synthesis and secretion of lipoprotein lipase in 3T3-L1 adipocytes: demonstration of inactive form of lipase in cells. *J.Biol.Chem.* 262: 10748-10759.

Olivecrona T, Bergö M, Hultin M et Olivecrona G. (1995) Nutritional regulation of lipoprotein lipase. *Can.J.Cardiol.* 11 (suppl G): G73-G78.

Olofsson S-O, Asp L et Borén J. (1999) The assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins. *Curr.Opinion Lipidol.* 10: 341-346.

- Ong JM, Kirchgessner TG, Schotz MC et Kern PA. (1988) Insulin increases the synthetic rate and messenger RNA level of lipoprotein lipase in isolated rat adipocytes. *J.Biol.Chem.* 263: 12933-12938.
- Ong JM et Kern PA. (1989a) Effect of feeding and obesity on lipoprotein lipase activity, immunoreactive protein, and messenger RNA levels in human adipose tissue. *J.Clin.Invest.* 84: 305-311.
- Ong JM et Kern PA. (1989b) The role of glucose and glycosylation in the regulation of lipoprotein lipase synthesis and secretion in rat adipocytes. *J.Biol.Chem.* 264: 3177-3182.
- Ong JM, Simsolo RB, Saghizadeh M, Pauer A et Kern PA. (1994) Expression of lipoprotein lipase in rat muscle: regulation by feeding and hyperthyroidism. *J.Lipid Res.* 35: 1542-1551.
- Oschry Y et Eisenberg S. (1982) Rat plasma lipoprotein. Re-evaluation of a lipoprotein system in an animal devoid of cholesterol ester transfer activity. *J.Lipid Res.* 23: 1099-1106.
- Ottosson M, Vikman-Adolfsson K, Enerbäck S, Olivecrona G et Björntorp P. (1994) The effects of cortisol on the regulation of lipoprotein lipase activity in human adipose tissue. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 79: 820-825.
- Pacak K, McCarty R, Palkovits M, Cizza G, Kopins IJ, Goldstein DS et Chrousos GP. (1995) Decreased central and peripheral catecholaminergic activation in obese Zucker rats. *Endocrinology* 136: 4360-4367.
- Park JW, Oh MS, Yang JY, Park BH, Rho HW, Lim SN, Jhee EC et Kim HR. (1995) Glycosylation, dimerization, and heparin affinity of lipoprotein lipase in 3T3-L1 adipocytes. *Biochim.Biophys.Acta* 1254: 45-50.
- Park O-J, Cesar D, Faix D, Wu K, Shackleton CHL et Hellerstein MK. (1992) Mechanisms of fructose-induced hypertriglyceridaemia in the rat. *Biochem.J.* 282: 753-757.
- Parkin SM, Walker K, Ashby P et Robinson DS. (1980) Effects of glucose and insulin on the activation of lipoprotein lipase and on protein synthesis in rat adipose tissue. *Biochem.J.* 188: 193-199.

Patsch JR, Prasad S, Gotto Jr AM et Patsch W. (1987) High density lipoprotein 2. Relationship of the plasma levels of this lipoprotein species to its composition, to the magnitude of postprandial lipemia, and to the activities of lipoprotein lipase and hepatic lipase. *J.Clin.Invest.* 80: 341-347.

Patsch JR, Miesenböck G, Hopferwieser T, Mühlberger V, Knapp E, Dunn JK, Gotto AM Jr et Patsch W. (1992) Relation of triglyceride metabolism and coronary artery disease. Studies in the postprandial state. *Arterioscler.Thromb.* 12: 1336-1345.

Pedersen SB, Bak JF, Holck P, Schmitz O et Richelsen B. (1999) Epinephrine stimulates human muscle lipoprotein lipase activity in vivo. *Metabolism* 48: 461-464.

Pentikainen MO, Oorni K et Kovanen PT. (2000) Lipoprotein lipase (LPL) strongly links native and oxidized low density lipoprotein particles to decorin-coated collagen. Roles for both dimeric and monomeric forms of LPL. *J.Biol.Chem.* 275: 5694-5701.

Pfeffer SR et Rothman JE. (1987) Biosynthetic protein transport and sorting by the endoplasmic reticulum and Golgi. *Ann.Rev.Biochem.* 56: 829-854.

Pidlich J et Gangl A. (1989). Phospholipid and triglyceride metabolism of the intestinal mucosa. Dans: Intestinal lipid and lipoprotein metabolism. Edité par Windler E et Greten A. W. Zuckschwerdt Verlag, Munich. pp. 15-23.

Plata-Salaman CR. (1998) Cytokines and feeding. *News Physiol.Sci.* 13: 298-304.

Plutzky J. (1999) Atherosclerotic plaque rupture: emerging insights and opportunities. *Am.J.Cardiol.* 84: 15J-20J.

Pohl U et de Wit C. (1999) A unique role of NO in the control of blood flow. *News Physiol.Sci.* 14: 74-80.

Pollare T, Vessby B et Lithell H. (1991) Lipoprotein lipase activity in skeletal muscle is related to insulin sensitivity. *Arterioscler.Thromb.* 11: 1192-1203.

Porkka KVK et Raitakari OT. (1996) Serum lipoproteins in children and young adults: determinants and treatment strategies. *Curr.Opinion Lipidol.* 7: 183-187.

- Potts JL, Coppack SW, Fisher RM, Humphreys SM, Gibbons GF et Frayn KN. (1995) Impaired postprandial clearance of triglycerol-rich lipoproteins in adipose tissue in obese subjects. *Am.J.Physiol.* 268: E588-E594.
- Powley TL et Berthoud H-R. (1985) Diet and cephalic phase insulin responses. *Am.J.Clin.Nutr.* 42: 991-1002.
- Pradines-Figuères A, Vannier C et Ailhaud G. (1988) Short-term stimulation by insulin of lipoprotein lipase secretion in adipose cell. *Biochem.Biophys.Res.Com.* 154: 982-990.
- Pradines-Figuères A, Vannier C et Ailhaud G. (1990) Lipoprotein lipase stored in adipocytes and muscle cells is a cryptic enzyme. *J.Lipid Res.* 31: 1467-1476.
- Previato L, Parrot CL et Santamarina-Fojo S. (1991) Transcriptional regulation of the human lipoprotein lipase gene in 3T3-L1 adipocytes. *J.Biol.Chem.* 266: 18958-18963.
- Proietto J, Rohner-Jeanrenaud F, Ionescu E et Jeanrenaud B. (1987) Role of the oropharynx in regulation of glycemia. *Diabetes* 36: 791-795. .
- Purnell JQ et Brunzell JD. (1997) The central role of dietary fat, not carbohydrate, in the insulin resistance syndrome. *Curr.Opinion Lipidol.* 8: 17-22.
- Querfield U, Ong JM, Prehn J, Carty J, Saffari B, Jordan SC et Kern PA. (1990) Effects of cytokines on the production of lipoprotein lipase in cultured human macrophages. *J.Lipid Res.* 31: 1379-1386.
- Quig DW, Layman DK, Bechtel PJ et Hackler LR. (1983) The influence of starvation and refeeding on the lipoprotein lipase activity of skeletal muscle and adipose tissue of lean and obese Zucker rats. *J.Nutr.* 113: 1150-1156.
- Randle PJ, Garland PB, Hales CN et Newsholme EA. (1963) The glucose fatty-acid cycle: its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1: 785-789.
- Randle PJ, Garland PB, Newsholme EA et Hales CN. (1965) The glucose fatty acid cycle in obesity and maturity onset diabetes mellitus. *Ann.Natl.Acad.Sci.* 131: 324-333.

Randle Philip J, Kerbey Alan et Espinal Joseph. (1988) Mechanisms decreasing glucose oxidation in diabetes and starvation: role of lipid fuels and hormones. *Diab.Metab.Rev.* 4: 623-638.

Ranganathan G, Ong JM, Yukht A, Saghizadeh M, Simsolo RB, Pauers A et Kern PA. (1995) Tissue-specific expression of human lipoprotein lipase. Effect of the 3'-untranslated region on translation. *J.Biol.Chem.* 270: 7149-7155.

Ranganathan G, Kaakaji R et Kern PA. (1999) Role of protein kinase C in the translational regulation of lipoprotein lipase in adipocytes. *J.Biol.Chem.* 274: 9122-9127.

Ranganathan S et Kern PA. (1998) Thiazolidinediones inhibit lipoprotein lipase activity in adipocytes. *J.Biol.Chem.* 273: 26117-26122.

Rattigan S, Dora KA, Colquhoun EQ et Clark MG. (1995) Inhibition of insulin-mediated glucose uptake in rat hindlimb by an α -adrenergic vascular effect. *Am.J.Physiol.* 268: E305-E311.

Rattigan Stephen, Howe Peter RC et Clark Michael G. (1986) The effect of a high-fat diet and sucrose drinking option on the development of obesity in spontaneously hypertensive rats. *Br.J.Nutr.* 56: 73-80.

Raynolds MV, Awald PD, Gordon DF, Gutierrez-Hartmann A, Rule DC, Wood WM et Eckel RH. (1990) Lipoprotein lipase gene expression in rat adipocytes is regulated by isoproterenol and insulin through different mechanisms. *Mol.Endocrinol.* 4: 1416-1422.

Reaven GM, Risser TR, Chen Y-DI et Reaven EP. (1979) Characterization of a model of dietary-induced hypertriglyceridemia in young, non-obese rats. *J.Lipid Res.* 20: 371-378.

Reaven GM et Laws A. (1994) Insulin resistance, *compensatory* hyperinsulinemia, and coronary heart disease. *Diabetologia* 37: 948-952.

Reaven GM, Mondon CE, Chen YDI et Breslow JL. (1994) Hypertriglyceridemic mice transgenic for the human apolipoprotein C-III gene are neither insulin resistant nor hyperinsulinemic. *J.Lipid Res.* 35: 820-824.

Reaven GM, Lithell H et Landsberg L. (1996) Hypertension and associated metabolic abnormalities - the role of insulin resistance and the sympathoadrenal system. *N.Engl.J.Med.* 334: 374-381.

Reaven GM. (1997) Do high carbohydrate diets prevent the development or attenuate the manifestations (or both) of syndrome X? A viewpoint strongly against. *Curr.Opinion Lipidol.* 8: 23-27.

Reaven Gerald M. (1988) Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37: 1595-1607.

Rechsteiner M. (1988) Regulation of enzyme levels by proteolysis: the role of PEST regions. *Adv.Enzyme Regul.* 29: 135-151.

Renier G, Skamene E, DeSanctis JB et Radzioch D. (1993) High macrophage lipoprotein expression and secretion are associated in inbred murine strains with susceptibility to atherosclerosis. *Arterioscler.Thromb.* 13: 190-196.

Renier G et Lambert A. (1995) Lipoprotein lipase synergizes with interferon gamma to induce macrophage nitric oxide synthetase mRNA expression and nitric oxide production. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 15: 392-399.

Renier G, Desfaits A-C, Lambert A et Mikhail R. (1996) Role of oxidant injury on macrophage lipoprotein lipase (LPL) production and sensitivity to LPL. *J.Lipid Res.* 37: 799-809.

Richelsen B, Pedersen SB, Møller-Pedersen T, Schmitz O, Møller N et Børghlum JD. (1993) Lipoprotein lipase activity in muscle tissue influenced by fatness, fat distribution and insulin in obese females. *Eur.J.Clin.Invest.* 23: 226-233.

Rodrigues B, Cam MC, Jian K, Lim F, Samdandam N et Shepherd G. (1997) Differential effects of streptozotocin-induced diabetes on cardiac lipoprotein lipase activity. *Diabetes* 46: 1346-1353.

Rosell S et Belfrage E. (1979) Blood circulation in adipose tissue. *Physiol.Rev.* 59: 1078-1104.

Rothblat GH, de la Llera-Moya M, Atger V, Kellner-Weibel G, Williams DL et Phillips MC. (1999) Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights. *J.Lipid Res.* 40: 781-796.

Roy D, Perreault M et Marette A. (1998) Insulin stimulation of glucose uptake in skeletal muscles and adipose tissues in vivo is NO dependent. *Am.J.Physiol.* 274: E692-E699.

Rutledge JC et Goldberg IJ. (1994) Lipoprotein lipase (LPL) affects low density lipoprotein (LDL) flux through vascular tissue: evidence that LPL increases LDL accumulation in vascular tissue. *J.Lipid Res.* 35: 1152-1160.

Sakaguchi T, Arase K, Fisler JS et Bray GA. (1988) Effect of starvation and food intake on sympathetic activity. *Am.J.Physiol.* 255: R284-R288.

Salinelli S, Lo JY, Mims MP, Zsigmond E, Smith LC et Chan L. (1996) Structure-function relationship of lipoprotein lipase-mediated enhancement of very low density lipoprotein binding and catabolism by the low density receptor. Functional importance of a properly folded surface loop covering the catalytic center. *J.Biol.Chem.* 271: 21906-21913.

Saloranta C et Groop L. (1996) Interactions between glucose and FFA metabolism in man. *Diab.Metab.Rev.* 12: 15-36.

Samra JS, Clark ML, Humphreys SM, MacDonald IA et Frayn KN. (1996a) Regulation of lipid metabolism in adipose tissue during early starvation. *Am.J.Physiol.* 271: E541-E546.

Samra JS, Simpson EJ, Clark ML, Forster CD, Humphreys SM, MacDonald IA et Frayn KN. (1996b) Effects of epinephrine infusion on adipose tissue: interactions between blood flow and lipid metabolism. *Am.J.Physiol.* 271: E834-E839.

Santamarina-Fojo Silvia et Brewer HBryan Jr. (1994) Lipoprotein lipase: structure, function and mechanism of action. *Int.J.Clin.Lab.Res.* 24: 143-147.

Santamarina-Fojo Silvia et Dugi Klaus A. (1994) Structure, function and role of lipoprotein lipase in lipoprotein metabolism. *Curr.Opinion Lipidol.* 5: 117-125.

Sartippour MR, Lambert A, Laframboise M, St-Jacques P et Renier G. (1998) Stimulatory effect of glucose on macrophage lipoprotein lipase expression and production. *Diabetes* 47: 431-438.

Saxena U, Klein MG et Goldberg IJ. (1990) Metabolism of endothelial cell-bound lipoprotein lipase. Evidence for heparan sulfate proteoglycan-mediated internalization and recycling. *J.Biol.Chem.* 265: 12880-12886.

Saxena U, Klein MG et Vanni TM. (1992) Lipoprotein lipase increases low density lipoprotein retention by subendothelial cell matrix. *J.Clin.Invest.* 89: 373-380.

Schaepfer IR et Eckel RH. (1999) Plasma triglyceride reduction in mice after direct injections of muscle-specific lipoprotein lipase DNA. *Diabetes* 48: 223-227.

Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S et Auwerx J. (1996a) PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO.J.* 15: 5336-5348.

Schoonjans K, Staels B et Auwerx J. (1996b) Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J.Lipid Res.* 37: 907-925.

Schrezenmeir J, Keppler I, Fenselau S, Weber P, Biesalski HK, Probst R, Laue Ch, Zuchhold HD, Prellwitz W et Beyer J. (1993). The phenomenon of a high triglyceride response to an oral lipid load in healthy subjects and its link to the metabolic syndrome. Dans: *Dietary Lipids and Insulin Action*. Edité par Klimes I, Howard BV, Storlien LH et Sebökova E. The New York Academy of Sciences, New York. pp. 302-314.

Sehayek E, Wang XX, Vlodaysky I, Avner R, Levkovitz H, Olivecrona T, Olivecrona G, Willnow TE, Herz J et Eisenberg S. (1996) Heparan sulfate-dependent and low density lipoprotein receptor-related protein-dependent catabolic pathways for lipoprotein lipase in mouse embryonic fibroblasts. *Isr.J.Med.Sci.* 32: 449-454.

Semb H et Olivecrona T. (1986a) Lipoprotein lipase in guinea pig tissues: molecular size and rate of synthesis. *Biochim.Biophys.Acta* 878: 330-337.

Semb H et Olivecrona T. (1986b) Nutritional regulation of lipoprotein lipase in guinea pig tissue. *Biochim.Biophys.Acta* 876: 249-255.

Semb H et Olivecrona T. (1987) Mechanisms for turn-over of lipoprotein lipase in guinea pig adipocytes. *Biochim.Biophys.Acta* 921: 104-115.

Semb H et Olivecrona T. (1989a) Two different mechanisms are involved in nutritional regulation of lipoprotein lipase in guinea-pig adipose tissue. *Biochem.J.* 262: 505-511.

Semb H et Olivecrona T. (1989b) The relation between glycosylation and activity of guinea pig lipoprotein lipase. *J.Biol.Chem.* 264: 4195-4200.

Semenkovich CF, Wims M, Noe L, Etienne J et Chan L. (1989) Insulin regulation of lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes is mediated at posttranscriptional and posttranslational levels. *J.Biol.Chem.* 264: 9030-9038.

Semenkovich CF, Luo CC et Nakanishi MK. (1990) In vitro expression and site-specific mutagenesis of the cloned human lipoprotein lipase gene. Potential N-linked glycosylation site asparagine 43 is important for both enzyme activity and secretion. *J.Biol.Chem.* 265: 5429-5433.

Sethi JK et Hotamisligil GS. (1999) The role of TNF α in adipocyte metabolism. *Cell Dev.Biol.* 10: 19-29.

Severson DL, Lee M et Carroll R. (1988) Secretion of lipoprotein lipase from myocardial cells isolated from adult rat hearts. *Mol.Cell.Biochem.* 79: 17-24.

Shepherd J. (1994) Lipoprotein metabolism: an overview. *Drugs* 47 (suppl. 2): 1-10.

Shimada K, Gill PJ, Silbert JE et Douglas WHJ. (1981) Involvement of cell surface heparin sulfate in the binding of lipoprotein lipase to cultured bovine endothelial cells. *J.Clin.Invest.* 68: 995-1002.

Simon C, Schlienger JL, Sapin R et Imler M. (1986) Cephalic phase insulin secretion in relation to food presentation in normal and overweight subjects. *Physiol.Behav.* 36: 465-469.

- Simsolo RB, Ong JM et Kern PA. (1992) Characterization of lipoprotein lipase activity, secretion, and degradation at different sites of post-translational processing in primary cultures of rat adipocytes. *J.Lipid Res.* 33: 1777-1784.
- Sjostrom L, Smith U, Krotkiewski M et Björntorp P. (1972) Cellularity in different regions of adipose tissue in young men and women. *Metabolism* 21: 1143-1153.
- Sjöstrom L, Garellick G, Krotkiewski M et Luyckx A. (1980) Peripheral insulin in response to the sight and smell of food. *Metabolism* 29: 901-909.
- Smith Ulf. (1994) Carbohydrates, fat, and insulin action. *Am.J.Clin.Nutr.* 59 (suppl.): 686S-689S.
- Sniderman AD et Cianflone K. (1995) Metabolic disruptions in the adipocyte-hepatocyte fatty acid axis as causes of hyperapoB. *Int.J.Obes.* 19 (suppl. 1): S27-S33.
- Soria A, Chicco A, Mocchiutti N, Gutman RA, Lombardo YB, Martin-Hidalgo A et Herrera E. (1996) A sucrose-rich diet affects triglyceride metabolism differently in pregnant and nonpregnant rats and has negative effects on fetal growth. *J.Nutr.* 126: 2481-2486.
- Sparks JD et Sparks CE. (1993) Hormonal regulation of lipoprotein assembly and secretion. *Curr.Opinion Lipidol.* 4: 177-186.
- Speidel MT, Booyse FM, Abrams A, Moore MA et Chung BH. (1990) Lipolysed hypertriglyceridemic serum and triglyceride-rich lipoprotein cause lipid accumulation in and are cytotoxic to cultured human endothelial cells. High density lipoproteins inhibit this cytotoxicity. *Thromb.Res.* 58: 251-264.
- Spiegelman BM et Flier JS. (1996) Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. *Cell* 87: 377-389.
- Staels B, Martin G, Martinez M, Albert C, Peinado-Onsurbe J, Saladin R, Hum DW, Reina M, Vilaro S et Auwerx J. (1996) Expression and regulation of the lipoprotein lipase gene in human adrenal cortex. *J.Biol.Chem.* 271: 17425-17432.

Stins MF, Sivaram P, Sasaki A et Goldberg IJ. (1993) Specificity of lipoprotein lipase binding to endothelial cells. *J.Lipid Res.* 34: 1853-1861.

Stolba P, Kapil M, Wichterle D et Dvorak P. (1993). Kinetics of free fatty acids in hypertriglyceridemia. Dans: *Dietary Lipids and Insulin Action*. Edité par Klimes I, Howard BV, Storlien LH et Sebökova E. The New York Academy of Sciences, New York. pp. 373-375.

Storlien LH, James DE, Burleigh KM, Chisholm DJ et Kraegen EW. (1986) Fat feeding causes widespread in vivo insulin resistance, decreased energy expenditure, and obesity in rats. *Am.J.Physiol.* 251: E576-E583.

Storlien LH, Pan DA, Kriketos AD et Baur LA. (1993). High fat diet-induced insulin resistance. Dans: *Dietary Lipids and Insulin Action*. Edité par Klimes I, Howard BV, Storlien LH et Sebökova E. The New York Academy of Sciences, New York. pp. 82-90.

Strubbe JH. (1992) Parasympathetic involvement in rapid meal-associated conditioned insulin secretion in the rat. *Am.J.Physiol.* 263: R615-R618.

Syu L-J et Saltiel AR. (1999) Lipotransin: a novel docking protein for hormone-sensitive lipase. *Mol.Cell* 4: 109-115.

Tan MH, Sata T et Havel RJ. (1977) The significance of lipoprotein lipase in rat skeletal muscles. *J.Lipid Res.* 18: 363-370.

Tanaka T, Itoh H, Doi K, Fukunaga Y, Hosoda K, Shintani M, Yamashita J, Chun T-H, Inoue M, Masatsugu K, Sawada N, Saito T, Inoue G, Nishimura H, Yoshimasa Y et Nakao K. (1999) Down regulation of peroxisome proliferator-activated receptor expression by inflammatory cytokines and its reversal by thiazolidinediones. *Diabetologia* 42: 702-710.

Tataranni PA, Baier LJ, Paolisso G, Howard BV et Ravussin E. (1996) Role of lipids in development of noninsulin-dependent diabetes mellitus: lessons learned from Pima Indians. *Lipids* 31: S-267-S-270.

Tengku-Muhammad TS, Hughes TR, Cryer A et Ramji DP. (1999a) Synergism between lipopolysaccharide and interferon gamma in the regulation of lipoprotein lipase in macrophages. *Cytokine* 11: 408-415.

Tengku-Muhammad TS, Hughes TR, Cryer A et Ramji DP. (1999b) Involvement of both the tyrosine kinase and the phosphatidylinositol-3' kinase signal transduction pathways in the regulation of lipoprotein lipase expression in JTT4.2 macrophages by cytokines and lipopolysaccharide. *Cytokine* 11: 463-468.

Tenkanen H, Taskinen M-R, Antikainen M, Ulmanen I, Kontula K et Ehnholm C. (1994) A novel amino acid substitution (His183 to Gln) in exon 5 of the lipoprotein lipase results in loss of catalytic activity: phenotypic expression of the mutant gene in a heterozygous state. *J.Lipid Res.* 35: 220-228.

Terretaz J, Cusin I, Etienne J et Jeanrenaud B. (1994) *In vivo* regulation of adipose tissue lipoprotein lipase in normal rats made hyperinsulinemic and in hyperinsulinemic genetically-obese (*fa/fa*) rats. *Int.J.Obes.* 18: 9-15.

Thompson GR. (1989). Lipoprotein metabolism. Dans: A Handbook of Hyperlipidaemia. Edité par Thomson G R. Current Science Ltd., London. pp. 23-42.

Ting AE et Pagano RE. (1990) Detection of a-phosphatidylinositol-specific phospholipase C at the surface of Swiss 3T3 cells and its potential role in the regulation of cell growth. *J.Biol.Chem.* 265: 5337-5340.

Toida S, Takahashi M, Shimizu H, Sato N, Shimomura Y et Kobayashi I. (1996) Effect of high sucrose feeding on fat accumulation in the male Wistar rat. *Obes.Res.* 4: 561-568.

Treiber F, Harshfield G, Davis H, Kapuku G et Moore D. (1999) Stress responsivity and body fatness: links between socioeconomic status and cardiovascular risk factors in youth. *Ann.NY Acad.Sci.* 896: 435-438.

Uchida Y, Tsukahara F, Ohba K, Ogawa A, Irie K, Fujii E, Yoshimoto T, Yoshioka T et Muraki T. (1997a) Nitric oxide mediates down regulation of lipoprotein lipase activity induced by tumor necrosis factor- α in brown adipocytes. *Eur.J.Pharmacol.* 335: 235-243.

Uchida Y, Tsukahara F, Ohba K-I, Ogawa A, Nomoto T et Muraki T. (1997b) Augmentation of tumor necrosis factor- α -induced suppression of lipoprotein lipase by nitric oxide donors in cultured brown adipocytes. *Ann.NY Acad.Sci.* 813: 369-372.

van Barlingen Harrold HJJ, de Jong Harmen, Erkelens DWillem et de Bruin Tjerk WA. (1996) Lipoprotein lipase-enhanced binding of human triglyceride-rich lipoproteins to heparan sulfate: modulation by apolipoprotein E and apolipoprotein C. *J.Lipid Res.* 37: 754-763.

van Beek AP, van Barlingen HH, de Ruijter-Heijstek FC, Jansen H, Erkelens DW, Dallinga-Thie GM et de Bruin TW. (1998) Preferential clearance of apoB-48-containing lipoproteins after heparin-induced lipolysis is modulated by lipoprotein lipase activity. *J.Lipid Res.* 39: 322-332.

van Eck M, Zimmermann R, Groot P, Zechner R et van Berkel T. (2000) Role of macrophage derived lipoprotein lipase in lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* (In Press)

van Vlijmen BJ, Rohlmann A, Page ST, Bensadoun A, Bos IS, van Berkel TJ, Havekes LM et Herz J. (1999) An extrahepatic receptor-associated protein-sensitive mechanism is involved in the metabolism of triglyceride-rich lipoproteins. *J.Biol.Chem.* 274: 35219-35226.

Vannier C, Amri E-Z, Etienne J, Négrel R et Ailhaud G. (1985) Maturation and secretion of lipoprotein lipase in cultured adipose cells I. Intracellular activation of the enzyme. *J.Biol.Chem.* 7: 4424-4431.

Vannier C, Etienne J et Ailhaud G. (1986) Intracellular localization of lipoprotein lipase in adipose cells. *Biochim.Biophys.Acta* 875: 344-354.

Vannier C et Ailhaud G. (1989) Biosynthesis of lipoprotein lipase in cultured mouse adipocytes II. Processing, subunit assembly, and intracellular transport. *J.Biol.Chem.* 264: 13206-13216.

Vannier C, Deslex S, Pradines-Figuères A et Ailhaud G. (1989) Biosynthesis of lipoprotein lipase in cultured mouse adipocytes I. Characterization of a specific antibody and relationship between the intracellular and secreted pools of the enzyme. *J.Biol.Chem.* 22: 13199-13205.

Vara Elena et Tamarit-Rodriguez Jorge. (1989) Norepinephrine inhibits islet lipid metabolism, Ca^{2+} uptake, and insulin secretion. *Am.J.Physiol.* 257: E923-E929.

Vidal-Puig A, Jimenez-Linan M, Lowell BB, Hamann A, Hu E, Spiegelman B, Flier JS et Moller DE. (1996) Regulation of PPAR γ gene expression by nutrition and obesity in rodents. *J.Clin.Invest.* 97: 2553-2561.

Virkamäki A, Ueki K et Kahn CR. (1999) Protein-protein interaction in sulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J.Clin.Invest.* 103: 931-943.

Vohl M-C, Lamarche B, Moorjani S, Prud'homme D, Nadeau A, Bouchard C, Lupien P-J et Després J-P. (1995) The lipoprotein lipase HindIII polymorphism modulates plasma triglyceride levels in visceral obesity. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 15: 714-720.

Wang C-S, Hartsuck J et McConathy WJ. (1992) Structure and functional properties of lipoprotein lipase. *Biochim.Biophys.Acta* 1123: 1-17.

Wang X, Greilberger J, Levak-Frank S, Zimmermann R, Zechner R et Jürgens G. (1999) Endogenously produced lipoprotein lipase enhances the binding and uptake of mildly and moderately oxidized low density lipoprotein in mouse peritoneal macrophages. *Biochem.J.* 343: 347-353.

Wang XL, McCredie RM et Wilcken DEL. (1996) Common DNA polymorphisms at the lipoprotein lipase gene: association with severity of coronary artery disease and diabetes. *Circulation* 93: 1339-1345.

Warnotte C, Gilon P, Nenquin M et Henquin JC. (1994) Mechanisms of the stimulation of insulin release by saturated fatty acids. A study of palmitate effects in mouse β -cells. *Diabetes* 43: 703-711.

Warren HS, Riveau GR, De Deccker FA et Chedid LA. (1988) Control of endotoxin activity and interleukin-1 production through regulation of lipopolysaccharide binding by a macrophage factor. *Infect.Immun.* 56: 204-212.

Weber P, Schrezenmeir J, Fenselau S, Ausieker S, Probst R, Zuchhold HD, Prellwitz W et Beyer J. (1993). Prolonged postprandial increment in triglycerides and decreased postprandial response of very low density lipoproteins in type 2 diabetics following an oral lipid load. Dans: *Dietary Lipids and Insulin Action*. Edité par Klimes I, Howard BV, Storlien LH et Sebökova E. The New York Academy of Sciences, New York. pp. 315-321.

Weinstock PH, Bisgaier CL, Aalto-Selata K, Radner H, Ramakrishnan R, Levak-Frank S, Essenberg AD, Zechner R et Breslow JL. (1995) Severe hypertriglyceridemia, reduced high density lipoprotein, and neonatal death in lipoprotein lipase knockout mice. *J.Clin.Invest.* 96: 2555-2568.

Weinstock PH, Levak-Frank S, Hudgins LC, Radner H, Friedman JM, Zechner R et Breslow JL. (1997) Lipoprotein lipase controls fatty acid entry into adipose tissue, but fat mass is preserved by endogenous synthesis in mice deficient in adipose tissue lipoprotein lipase. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 94: 10261-10266.

Wencel HE, Smothers C, Opara EC, Kuhn CM, Feinglos MN et Surwit RS. (1995) Impaired second phase insulin response of diabetes-prone C57BL/6J mouse islets. *Physiol.Behav.* 57: 1215-1220.

West DB, Prinz WA et Greenwood MRC. (1989a) Regional changes in adipose tissue blood flow and metabolism in rats after a meal. *Am.J.Physiol.* 257: R711-R716.

West DB, Prinz WA et Greenwood MRC. (1989b) Regional changes in adipose tissue blood flow and metabolism in rats after a meal. *Am.J.Physiol.* 257: R711-R716.

Williams KJ, Petrie KA et Brocia RW. (1991) Lipoprotein lipase modulates net secretory output of apolipoprotein B in vitro. A possible explanation for combined hyperlipidemia. *J.Clin.Invest.* 88: 1300-1306.

Wilson DE, Emi M, Iverius PH, Hata A, Wu L, Hillas E, Williams RR et Lalouel JM. (1990) Phenotypic expression of heterozygous lipoprotein lipase deficiency in the extended pedigree of a proband homozygous for a missense mutation. *J.Clin.Invest.* 86: 735-750.

Xiang S-Q, Cianflone K, Kalant D et Sniderman AD. (1999) Differential binding of triglyceride-rich lipoproteins to lipoprotein lipase. *J.Lipid Res.* 40: 1655-1662.

Yang CH, Gu Z et Yang HX. (1989) Structure of bovine milk lipoprotein lipase. *J.Biol.Chem.* 264: 16822-16827.

Yost TJ, Froyd KK, Jensen DR et Eckel RH. (1995) Change in skeletal muscle lipoprotein lipase activity in response to insulin/glucose in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 44: 786-790.

Young James B et Landsberg Lewis. (1977) Stimulation of the sympathetic nervous system during sucrose feeding. *Nature* 269: 615-617.

Yukht A, Davis RC, Ong JM, Ranganathan G et Kern PA. (1995) Regulation of lipoprotein lipase translation by epinephrine in 3T3-L1 cells. Importance of the 3' untranslated region. *J.Clin.Invest.* 96: 2438-2444.

Zak A, Zeman M, Tvrzicka E, Pisarikova A, Sindelkova E et Vrana A. (1993). Glucose tolerance, insulin secretion, plasma lipid fatty acids, and the hypolipidemic effects of fish oil. Dans: *Dietary Lipids and Insulin Action*. Edité par Klimes I, Howard BV, Storlien LH et Sebökova E. The New York Academy of Sciences, New York. pp. 378-379.

Zambon A, Schmidt I, Beisiegel U et Brunzell JD. (1996) Dimeric lipoprotein lipase is bound to triglyceride-rich plasma lipoproteins. *J.Lipid Res.* 37: 2394-2404.

Zammit VA. (1996) Role of insulin in hepatic fatty acid partitioning: emerging concepts. *Biochem.J.* 314: 1-14.

Zavaroni I, Bonini L, Fantuzzi M, Dall'Aglio E, Passeri M et Reaven GM. (1994) Hyperinsulinemia, obesity, and syndrome X. *J.Intern.Med.* 235: 51-56.

Zechner R, Newman TC, Sherry B, Cerami A et Breslow JL. (1988) Recombinant human cachectin/tumor necrosis factor but not interleukin-1 α downregulates lipoprotein lipase gene expression at the transcriptional level in mouse 3T3-L1 adipocytes. *Mol.Cell.Biol.* 8: 2394-2401.

Zechner R. (1997) The tissue-specific expression of lipoprotein lipase: implications for energy and lipoprotein metabolism. *Curr.Opinion Lipidol.* 8: 77-88.

Zierath JR, Houseknecht KL, Gnudi L et Kahn BB. (1997) High-fat feeding impairs insulin-stimulated GLUT4 recruitment via an early insulin-signaling defect. *Diabetes* 46: 215-223.

Zilversmit DB. (1979) Atherogenesis: a postprandial phenomenon. *Circulation* 60: 473-485.

Zilversmit DB. (1995) Atherogenic nature of triglycerides, postprandial lipidemia, and triglyceride-rich remnant lipoproteins. *Clin.Chem.* 41: 153-158.