



uOttawa

L'Université canadienne  
Canada's university

FACULTÉ DES ÉTUDES SUPÉRIEURES  
ET POSTDOCTORALES



FACULTY OF GRADUATE AND  
POSTDOCTORAL STUDIES

Sophie Drapeau

AUTEUR DE LA THÈSE / AUTHOR OF THESIS

M.Sc. (sciences de l'activité physique)

GRADE / DEGREE

Département de l'activité physique

FACULTÉ, ÉCOLE, DÉPARTEMENT / FACULTY, SCHOOL, DEPARTMENT

Les effets de traitements aux acides gras polyinsaturés omega-3 à longue chaîne sur la sécrétion  
d'adiponectine de préadipocytes humains différenciés

TITRE DE LA THÈSE / TITLE OF THESIS

Pascal Imbault

DIRECTEUR (DIRECTRICE) DE LA THÈSE / THESIS SUPERVISOR

CO-DIRECTEUR (CO-DIRECTRICE) DE LA THÈSE / THESIS CO-SUPERVISOR

François Haman

Eric Doucet

Gary W. Slater

Le Doyen de la Faculté des études supérieures et postdoctorales / Dean of the Faculty of Graduate and Postdoctoral Studies

**LES EFFETS DE TRAITEMENTS AUX ACIDES GRAS POLYINSATURÉS  
OMEGA-3 À LONGUE CHAÎNE SUR LA SÉCRÉTION D'ADIPONECTINE DE  
PRÉADIPOCYTES HUMAINS DIFFÉRENCIÉS.**

Présenté par

**SOPHIE DRAPEAU**

B.Sc. Biochimie, université d'Ottawa, 2007

**THÈSE DE MAÎTRÎSE**



**uOttawa**

L'Université canadienne  
Canada's university

École des sciences de l'activité physique

Université d'Ottawa

©Sophie Drapeau, Ottawa, Canada, 2010



Library and Archives  
Canada

Published Heritage  
Branch

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file* *Votre référence*  
ISBN: 978-0-494-65971-7  
*Our file* *Notre référence*  
ISBN: 978-0-494-65971-7

**NOTICE:**

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

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

**AVIS:**

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

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

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

  
**Canada**

## RÉSUMÉ COURT

---

L'effet bénéfique des acides gras polyinsaturés oméga-3 à longue chaîne (AGPIIn-3LC) sur les concentrations d'adiponectine a été dénoté au sein d'études d'intervention réalisées chez l'animal et l'humain. L'objectif de cette thèse était de caractériser l'effet des AGPIIn-3LC sur la sécrétion d'adiponectine à partir de préadipocytes humains différenciés et de déterminer si cet effet est influencé par le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ . Les adipocytes humains ont été exposés à 125 $\mu$ M de DHA ou EPA pour une durée de 24 h. Les concentrations d'adiponectine suite au traitement DHA ont augmenté de 0.19 $\pm$ 0.02 à 0.22 $\pm$ 0.01 ng/ $\mu$ g ou 13.6% (P<0.05) et de 0.19 $\pm$ 0.02 à 0.24 $\pm$ 0.06 ng/ $\mu$ g ou 26.2% (P=0.09) suite au traitement EPA. Après l'ajout d'un inhibiteur du PPAR $\gamma$ , les concentrations d'adiponectine ont diminué de 5.8% et de 12.2% pour les traitements respectifs DHA et EPA. Ces résultats confirment l'effet positif des AGPIIn-3LC sur les niveaux d'adiponectine. Ces effets semblent partiellement médiés par les récepteurs PPAR $\gamma$ .

The beneficial effect of long chain omega-3 polyunsaturated fatty acids (LCn-3PUFA) on adiponectin levels has been observed in several animal and human studies after dietary treatment. The purpose of this study was to observe the effect of LCn-3PUFA on the secretion of adiponectin in differentiated human preadipocytes and determine if this effect is under the influence of PPAR $\gamma$  nuclear receptors. Human adipocytes were exposed to 125 $\mu$ M of DHA or EPA for 24 h. Levels of adiponectin following DHA treatment increased from 0.19 $\pm$ 0.02 to 0.22 $\pm$ 0.01 ng/ $\mu$ g, or 13.6% (P<0.05) and from 0.19 $\pm$ 0.02 to 0.24 $\pm$ 0.06 ng/ $\mu$ g or 26.2% (P=0.09) after EPA treatments. After the addition of a PPAR $\gamma$  inhibitor, adiponectin levels dropped of 5.8% and 12.2% for DHA and EPA, respectively. These results confirm the positive effect of LCn-3PUFA on adiponectin levels. These effects seem to be partially mediated by PPAR $\gamma$ .

L'effet bénéfique des acides gras polyinsaturés oméga-3 à longue chaîne (AGPI n-3 LC) sur les niveaux d'adiponectine a été dénoté au sein d'études d'intervention réalisées chez l'animal ainsi que chez l'humain. Cet effet a aussi été rapporté au sein d'études *in vitro* réalisées avec des lignées cellulaires murines ou des adipocytes isolés de rongeurs. L'effet des AGPI n-3 LC au niveau de la modulation de l'adiponectine de cellules adipeuses humaines demeure toujours inconnu. L'objectif de cette thèse était de caractériser l'effet des AGPI n-3 LC sur la sécrétion d'adiponectine à partir de préadipocytes humains différenciés. Un deuxième objectif consistait aussi à déterminer si l'effet des AGPI n-3 LC sur la sécrétion d'adiponectine était sous l'influence de PPAR $\gamma$ , un récepteur nucléaire bien connu dans la modulation de l'adiponectine. Pour ce faire, des préadipocytes humains ont été différenciés pour une période de 2 semaines et ensuite exposés à 125 $\mu$ M de DHA ou EPA pour une durée de 24 h. Les concentrations d'adiponectine suite au traitement DHA ont augmenté de 0.19 $\pm$ 0.02 à 0.22 $\pm$ 0.01 ng/ $\mu$ g, ou 13.6%, (P<0.05). Une augmentation d'adiponectine a aussi été observée suite au traitement EPA de 0.19 $\pm$ 0.02 à 0.24 $\pm$ 0.06 ng/ $\mu$ g ou 26.2% mais n'a toutefois pas atteint les niveaux de significativité (P = 0.09). L'ajout d'un inhibiteur du récepteur PPAR $\gamma$  a entraîné une baisse des concentrations d'adiponectine de 5.8%, P=0.33 et de 12.2%, P=0.29 pour les traitements au DHA et EPA respectivement. Dans l'ensemble, ces résultats confirment l'effet positif des AGPI n-3 LC sur les niveaux d'adiponectine. Ces effets semblent partiellement médiés par les récepteurs PPAR $\gamma$ .

The beneficial effect of long chain omega-3 polyunsaturated fatty acids (LC n-3 PUFA) on adiponectin levels has been observed in several animal and human studies after dietary treatment. This effect has also been observed *in vitro* in 3T3-L1 cell line as well as in isolated rat adipocytes. The use of nuclear receptor PPAR $\gamma$  inhibitors such as BADGE and GW9662 seems to demonstrate its involvement in the mechanism underlying the increase in adiponectin levels following LC n-3 PUFA treatments. However, the mechanism still needs to be clearly established. The purpose of this study was to observe the effect of LC n-3 PUFA on the secretion of adiponectin in differentiated human preadipocytes and to determine if this effect is under the influence of PPAR $\gamma$ . Human preadipocytes were differentiated for 2 weeks and exposed to 125 $\mu$ M of DHA or EPA for 24 h. Levels of adiponectin following DHA treatment increased from 0.19 $\pm$ 0.02 to 0.22 $\pm$ 0.01 ng/ $\mu$ g, or 13.6% (P<0.05). However, the increase measured after EPA treatments of 0.19 $\pm$ 0.02 to 0.24 $\pm$ 0.06 ng/ $\mu$ g or 26.2% was not significant (P=0.09). After addition of PPAR $\gamma$  inhibitor, adiponectin levels dropped only of 5.8%, P=0.33 and 12.2%, P=0.29 for DHA and EPA treatments respectively. Taken together, these results confirm the positive effect of LC n-3 PUFA on adiponectin levels. These effects seem to be partially mediated by PPAR $\gamma$  receptors.

## TABLE DES MATIÈRES

---

---

RÉSUMÉ COURT.....	i
RÉSUMÉ COURT (version anglaise).....	ii
RÉSUMÉ LONG.....	iii
RÉSUMÉ LONG (version anglaise).....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....	1
1.1. Introduction.....	1
1.2. Objectifs et hypothèses.....	4
CHAPITRE 2 : REVUE DE LITTÉRATURE.....	5
2.1. Les différents types d'acides gras.....	5
2.1.1. Effets métaboliques des acides gras saturés et polyinsaturés.....	7
2.1.2. Sources d'acides gras polyinsaturés oméga-3 à longue chaîne.....	9
2.2. Le tissu adipeux blanc.....	10
2.2.1. La différenciation adipocytaire.....	11

2.2.2. Le tissu adipeux blanc: organe sécrétoire.....	15
2.3. L'adiponectine.....	16
2.3.1. Séquence et structures de l'adiponectine.....	17
2.3.2. Effets physiologiques de l'adiponectine au niveau de la sensibilité à l'insuline.....	21
2.4. Effets des acides gras polyinsaturés oméga-3 à longue chaîne sur l'expression et la sécrétion de l'adiponectine.....	24
2.4.1. Mécanismes potentiels de l'augmentation de la sécrétion de l'adiponectine par les acides gras polyinsaturés oméga-3 à longue chaîne .....	37
 CHAPITRE 3: MÉTHODES.....	 41
3.1. Culture cellulaire.....	41
3.2. Préparation des solutions d'acides gras et de contrôles.....	45
3.3. Analyse d'adiponectine.....	46
3.4. Analyse de l'expression du gène de l'adiponectine.....	46
3.4.1. Préparation de l'ARN.....	46
3.4.2. Transcription inverse.....	47
3.4.3. Quantification des copies d'ARNm par réaction de polymérase en chaîne en temps réel).....	47
3.5. Analyses statistiques.....	48
 CHAPITRE 4 : RÉSULTATS.....	 49
4.1. Différenciation des préadipocytes humains.....	49

4.2.1. Adiponectine, effets des acides gras polyinsaturés oméga-3 à longue chaîne.....	50
4.2.2. Adiponectine, effet de l'inhibition du PPAR $\gamma$ .....	53
4.3. Effet des AGPI n-3 LC sur l'expression du gène de l'adiponectine.....	53
CHAPITRE 5 : DISCUSSION.....	54
CHAPITRE 6 : PERSPECTIVES FUTURES.....	61
CHAPITRE 7 : RÉFÉRENCES.....	64

### 1.1. Introduction

Les lipides alimentaires constituent une composante importante de notre diète. En plus d'agir à titre de substrats énergétiques, les lipides alimentaires affectent l'expression génique, conduisant à des changements dans le métabolisme ainsi que dans la différenciation et croissance cellulaire (1, 2). En effet, certains acides gras ainsi que leurs métabolites peuvent agir en tant qu'hormones et contrôler l'activité ou l'abondance de facteurs de transcription spécifiques. À titre d'exemple, il a été démontré que certains régulateurs nucléaires, tels les peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) sont régulé par certains acides gras (3, 4). Plusieurs évidences suggèrent qu'une alimentation à haute teneur en lipides constitue un risque au développement de la résistance à l'insuline (5). Plus précisément, une consommation élevée de lipides, particulièrement de sous forme de graisses saturées, contribue à l'hyperinsulinémie (6-8). Sur la base de ces observations, une meilleure compréhension de l'effet biologique des lipides alimentaires sur l'expression génique est d'importance afin d'éviter ou de mieux prévenir certains désordres métaboliques.

Bien qu'une consommation élevée de graisses saturées est associée au développement de certains désordres métaboliques, une ingestion élevée d'acides gras polyinsaturés n-3 à longues chaînes (AGPI n-3 LC) a plutôt été associée à diverses vertus. À titre d'exemple, ceux-ci semblent être bénéfiques pour la prévention du

développement du diabète (9). Les effets bénéfiques des n-3 au niveau de la prévention du développement du diabète découlent de l'action de ces derniers au niveau de plusieurs organes clés impliqués dans la régulation de l'homéostasie du glucose (2). Le tissu adipeux est l'un de ces organes impliqués dans la l'homéostasie du glucose et de récents travaux suggèrent que les n-3 agissent au niveau de sa capacité sécrétoire en favorisant la sécrétion de l'adiponectine (10-14).

L'adiponectine est une protéine de 30kDa sécrétée exclusivement par le tissu adipeux (15). L'adiponectine totale est inversement corrélée avec la résistance à l'insuline (16) et contrairement aux autres adipokines, est aussi inversement corrélée avec l'indice de masse corporelle (IMC) (17). L'adiponectine a aussi démontré des propriétés anti-inflammatoires (18) et d'intérêt, a une influence positive sur la sensibilité à l'insuline (19).

Plusieurs études démontrent une augmentation dans les niveaux d'adiponectine suivant une diète enrichie ou un traitement aux AGPI n-3 LC chez l'humain (10-14), chez l'animal (11, 20-34) ainsi qu'*in vitro* avec des cellules 3T3-L1 (11, 35, 36) et des adipocytes isolés de rats (35). Selon nos connaissances, l'effet des AGPI n-3 LC sur la sécrétion d'adiponectine d'adipocytes humains demeure toutefois inconnu.

Les études ayant utilisé des adipocytes isolés de rongeurs (26) ou de lignée cellulaire murine (35) ont aussi permis de suggérer que le mécanisme à partir duquel les AGPI n-3 LC augmentent la sécrétion de l'adiponectine implique le récepteur nucléaire

PPAR $\gamma$ . L'implication de ce récepteur nucléaire dans la modulation de l'adiponectine par les AGPI n-3 LC demeure toutefois à être précisée au niveau du tissu adipeux humain.

Les objectifs de cette thèse étaient donc de : 1) caractériser l'effet des AGPI n-3 LC sur la sécrétion d'adiponectine; et 2) définir si ces effets sont sous l'influence du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  à l'aide de la culture de préadipocytes différenciés humains.

## 1.2. Objectifs et hypothèses

Objectif 1: Examiner les effets *in vitro* d'AGPI n-3 LC sur la production d'adiponectine à partir de préadipocytes humains différenciés.

⇒ Hypothèse 1: Selon les diverses études retrouvées dans la littérature démontrant l'effet des AGPI n-3 sur l'adiponectine, on remarque majoritairement une augmentation dans les niveaux de production de cette adipokine par les AGPI n-3 LC (Tableau 4, 5 et 6). Nous anticipons alors que les niveaux d'adiponectine sécrétés par les adipocytes humains ayant été exposés aux AGPI n-3 LC seront supérieurs comparativement aux conditions contrôles.

Objectif 2: Définir si la modulation de l'adiponectine par les AGPI n-3 LC est sous influence du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ .

⇒ Hypothèse 2: Basé sur le fait que les AGPI-n3 LC sont des ligands naturels du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  (3, 4). Nous prévoyons que l'augmentation dans les niveaux d'adiponectine par les AGPI n-3 et la troglitazone sera supprimée en présence de l'inhibiteur GW9662.

## CHAPITRE 2 : REVUE DE LITTÉRATURE

---

### 2.1. Les différents types d'acides gras.

Les molécules d'acide gras se composent de deux sous unités chimiquement distinctes. Elles se composent premièrement d'une longue chaîne d'hydrocarbure hydrophobe. La deuxième partie de l'acide gras est un groupement carboxyle (-COOH) et présente la réactivité d'un acide carboxylique. Il existe plusieurs types d'acides gras. Ceux-ci se distinguent selon la longueur de la queue hydrophobe, le nombre d'insaturations et la position de celles-ci sur la chaîne carbonée. Ces variations de la chaîne hydrophobe donnent aux acides gras diverses propriétés physiques distinctes. Notamment, une augmentation de longueur de la chaîne augmente l'hydrophobicité, les insaturations créent des vrilles dans la chaîne et augmentent la fluidité et enfin, la position des insaturations offre une conformation spécifique aux acides gras (37).

Les acides gras sont classés en trois catégories principales: acides gras saturés, mono-insaturés et polyinsaturés (AGPI) selon le nombre d'insaturations qu'ils contiennent. Ils sont aussi classés selon la longueur de leurs chaînes hydrophobes. Les acides gras les plus communément retrouvés dans la nourriture ont des chaînes soit de 14, 16, 18, 20 et de 22 carbones. Techniquement, les acides gras ayant plus de 12 carbones dans leurs chaînes hydrophobes sont décrits comme étant des acides gras à longue chaîne (LC). Cependant, ce nom est souvent utilisé afin de décrire les acides gras ayant une chaîne hydrophobe contenant plus de 20 carbones (38).

L'union internationale de la chimie pure et appliquée a défini les règles de la nomenclature des acides gras (39). Selon cette nomenclature internationale, le carbone du groupement carboxyle est toujours noté 1. Toutefois, il a été estimé qu'il était pratique de réaliser une numérotation de la chaîne carbonée à partir du groupement méthyle terminal. Il existe donc une deuxième nomenclature, utilisée notamment par les nutritionnistes définie par 'nomenclature oméga (n ou  $\omega$ )-x' où le premier lien double est situé sur le  $x^{\text{ième}}$  carbone à partir du groupement méthyle jusqu'au groupement carboxyle. De plus, les acides gras possèdent une nomenclature usuelle utilisée dans le langage courant (Tableau 1).

**Tableau 1 : Nomenclature des acides gras polyinsaturés n-3 à longue chaîne (AGPI n-3 LC).**

Nom		Abréviation		
Usuel	Chimique	Référence carboxyle	Référence oméga	Autre
acide $\alpha$ -linoléinique	acide 9,12,15-octadécénoïque	C18:3( $\Delta$ 9,12,15)	C18:3n-3 ou C18:3( $\omega$ -3)	ALA
acide eicosapentaénoïque	acide 5,8,11,14,17-eicosapentaénoïque	C20:5( $\Delta$ 5,8,11,14,17)	C20:5n-3 ou C20:5( $\omega$ -3)	EPA
acide docosahexaénoïque	acide 4,8,12,15,19-docosahexaénoïque	C22:6( $\Delta$ 4,8,12,15,19)	C22:6n-3 ou C22:6( $\omega$ -3)	DHA

Adapté de (40).

### 2.1.1. Effets métaboliques des acides gras saturés et polyinsaturés

Les caractéristiques physiques distinctes des différents types d'acides gras influencent grandement leurs effets physiologiques et métaboliques suite à leur consommation. Plusieurs études démontrent qu'une forte consommation de lipides, particulièrement de graisses saturées, contribue à l'hyperinsulinémie, un facteur de risque du diabète type 2 (6-8). À l'opposé, il semble aussi y avoir une association entre de bas niveaux d'insuline et l'apport alimentaire d'acides gras mono-insaturés (41-43) ainsi que polyinsaturés (44). Plusieurs autres effets bénéfiques d'un sous-type des AGPI, les AGPI n-3 LC, ont été dénotés au niveau de certaines composantes physiologiques et métaboliques (Tableau 2).

**Tableau 2 : Effets physiologiques et métaboliques des AGPI n-3 LC.**

Composantes physiologiques/métaboliques	Effet d'AGPI n-3 LC	Dose de EPA et DHA (g/jour)*	Référence
Adiposité	Perte adipeuse dans diverses études animales	-	(45-49)
	Perte adipeuse au sein de petites cohortes de sujets humains.	2-3	(50-52)
Dyslipidémie	Réduction des niveaux de triglycérides plasmatiques de 20-30% dans la plupart des études humaines et animales	1-4	(53, 54)
	Amélioration du profil des lipoprotéines plasmatiques, majoritairement une augmentation du cholestérol-HDL et un déclin du cholestérol-LDL.	1.5-4	(55)
Maladie cardiovasculaire	Baisse de l'incidence de MCCI ; effets antiarythmiques	0.2-1	(56)
	Prévention secondaire de MCCI et de mortalités reliées aux MCV	0.5-1.8	(56, 57)
	Diminution de la pression artérielle	3-6	(57)
	Ralentissement de la progression de l'artériosclérose	1.5-5	(57)
Résistance à l'insuline	Prévention de la résistance à l'insuline induite par une diète dans diverses études animales	-	(9, 27, 58-61)
	Amélioration de la sensibilité à l'insuline et de l'homéostasie du glucose chez des individus sains	2	(62)
Diabète type 2	Effets non consistants	-	(54)

\*Chez l'humain d'âge adulte. HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density

lipoprotein; MCV, maladie cardiovasculaire; MCCI, maladies du coeur coronariennes

ischémiques. Adapté de (40)

### 2.1.2. Sources d'acides gras polyinsaturés oméga-3 à longue chaîne

Certains acides gras sont considérés essentiels à notre alimentation. Lors de la synthèse des acides gras chez l'humain, les enzymes catalysent l'ajout des insaturations à la position  $\omega$ -9 et plus seulement. Les acides gras  $\omega$ -3 et  $\omega$ -6 sont alors considérés essentiels à notre diète car nous ne pouvons pas les synthétiser. Certaines plantes et certains organismes possèdent la capacité enzymatique nécessaire à leur synthèse (63) et sont ainsi des sources de ces acides gras essentiels. À titre d'exemple, les huiles extraites de graines des plantes de lin, de carthame et de tournesol ainsi que le poisson sont d'excellentes sources d'acides gras  $\omega$ -3 et  $\omega$ -6 (64). Il convient de mentionner que le poisson s'avère une bonne source d'AGPI n-3 LC (composés de plus de 20 carbones) s'il se nourrit de microorganismes (ex. plancton, algues) capable de synthétiser ces acides gras (Tableau 3) (38).

**Tableau 3: Composition d'AGPI de la chair de poisson frais et cru (g d'acide gras/100 g de poisson).**

	gras total (g)	AGPI (g/100g)				
		18 :2 $\omega$ -6 LA	18 :3 $\omega$ -3 ALA	20 :4 $\omega$ -6 AA	20 :5 $\omega$ -3 EPA	22 :6 $\omega$ -3 DHA
Morue	0.70	tr	tr	0.02	0.08	0.06
Hareng	13.20	0.29	0.18	0.04	0.51	0.69
Saumon	6.30	0.17	0.30	0.27	0.32	1.12
Maquereau	13.10	0.30	0.22	0.07	0.71	1.10
Thon	2.97	0.06	0.07	0.05	0.23	0.63

AA, acide arachidonique; ALA, acide  $\alpha$ -linoléinique; DHA, acide docosahexaénoïque;

EPA, acide eicosapentaénoïque; LA, acide linoléique.

Adapté de (38). Source : (64, 65)

L'apport quotidien recommandé d'AGPI n-3 LC varie entre 0.2-0.65g/jour (66-68). Le Guide alimentaire canadien recommande une consommation de deux portions de poisson par semaine. Quoiqu'il soit difficile de trouver des données pertinentes chez les Canadiens, les quantités consommées aux États-Unis varient entre 0.1-0.2g/jour (69) et de 0.1-0.5g/jour en Europe (70). Sur la base de ces résultats, il est juste de croire que les recommandations ne sont pas toujours atteintes. De plus, les doses optimales associées aux effets bénéfiques rapportés dans le tableau 2 sont supérieures aux recommandations.

Parmi tous les effets bénéfiques des AGPI n-3 LC, l'amélioration de la sensibilité à l'insuline est le plus notable et étudié. La pathophysiologie de l'insulinorésistance implique divers organes tels le foie, le pancréas, les muscles et le tissu adipeux. Nous nous concentrerons particulièrement sur les effets des AGPI n-3 LC au niveau du tissu adipeux en considérant que ces derniers agissent comme régulateurs spécifiques de la transcription génique et gouvernent de cette façon le contenu tissulaire et circulatoire de certaines protéines et enzymes (71).

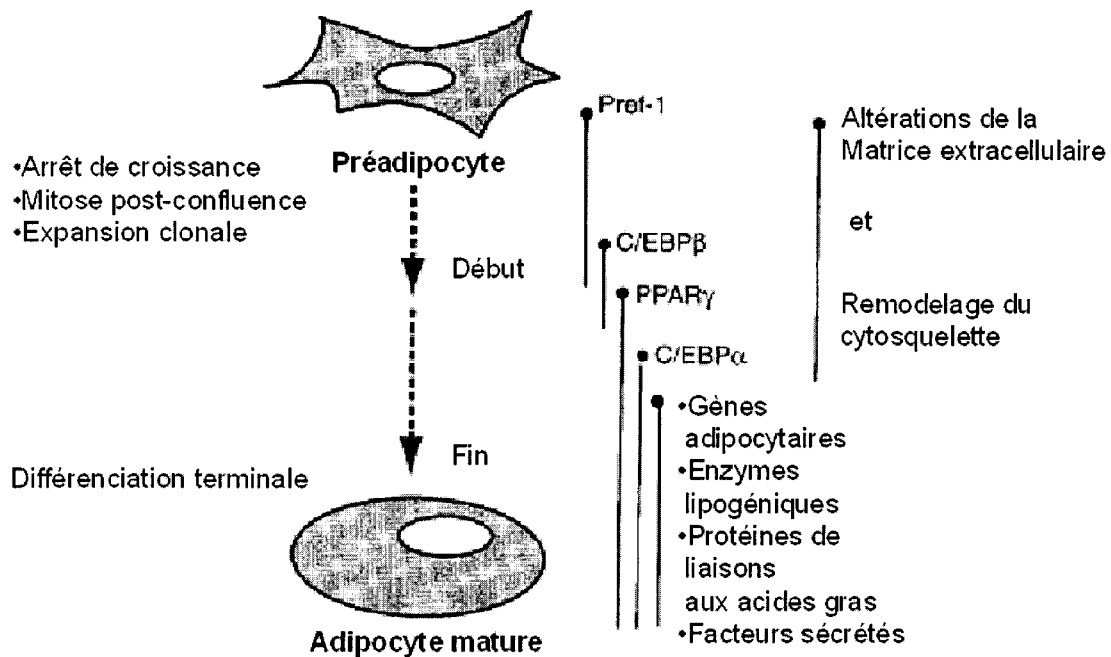
## 2.2. Le tissu adipeux blanc

Le tissu adipeux blanc, autrefois perçut comme un simple isolant thermique et mécanique servant d'entrepôt pour les lipides, est maintenant considéré comme un organe complexe multifonctionnel. Dans ce contexte, il faut souligner que la principale composante cellulaire du tissu adipeux est l'adipocyte mature rempli de lipides constituant environ deux tiers du tissu adipeux (72). Le tissu adipeux blanc est également

constitué de préadipocytes (dépourvus de lipides), de cellules endothéliales, de fibres nerveuses, de macrophages et monocytes. Le tissu adipeux blanc est réparti au niveau du corps entier, sous deux dépôts distincts: sous-cutané et viscéral. Il démontre un dynamisme remarquable tout au long de la vie (72). C'est-à-dire qu'il accumule les sources énergétiques supplémentaires sous forme de lipides et mobilise ces dernières selon les besoins énergétiques. Les adipocytes présentent une morphologie sphérique et flexible avantageuse pour leur capacité d'emmagasiner et de relâcher de lipides. Les diamètres peuvent varier de 30  $\mu\text{m}$  jusqu'à 160  $\mu\text{m}$  pour les adipocytes du dépôt sous-cutané et de 20 à 100  $\mu\text{m}$  pour le dépôt viscéral (73). Lorsque les adipocytes atteignent leurs tailles critiques, il se produit alors un déclenchement de l'augmentation du nombre de cellules adipeuses matures (74), ce phénomène portant le nom d'hyperplasie. Ce processus hautement complexe requiert la différenciation de préadipocytes en adipocytes matures et est nécessaire afin que ces cellules obtiennent et donnent au tissu adipeux ces capacités lipidique, thermique, mécanique ainsi que sécrétoire.

### 2.2.1. La différenciation adipocytaire

La différenciation adipocytaire, aussi appelée adipogenèse, est composée de divers stades distincts. Plusieurs changements doivent se produire afin de transformer le préadipocyte à allure fibroblastique en adipocyte mature. Ce phénomène, fortement influencé par de multiples facteurs externes est aussi grandement contrôlé par divers régulateurs nucléaires (Figure 1).



**Figure 1. Chronologie des différents stages et événements de la différenciation adipocytaire ainsi que de l'expression des facteurs transcriptionnels impliqués.**

Pref-1, preadipocyte factor-1; C/EBP, CCAAT/enhancer binding proteins; PPAR $\gamma$ , peroxisome proliferator-activated receptor gamma. Adapté de (75).

La première étape de la différenciation adipocytaire est l'arrêt de croissance (75). De façon intrigante, le contact cellulaire (confluence) menant habituellement à l'arrêt de croissance chez les préadipocytes ne semble pas être nécessaire à la différenciation, mais ce serait plutôt l'arrêt de croissance en tant que tel qui limiterait la différenciation (76). Malgré leurs faibles expressions dans les stages primaires de la différenciation, les facteurs de transcription C/EBP- $\alpha$  (77) et PPAR $\gamma$  (78) seraient impliqués dans cette étape, due à leur activité antimitotique. L'expression de ces facteurs augmente significativement et devient beaucoup plus importante une fois la différenciation engagée.

Il a été démontré dans certaines lignées cellulaires que les cellules doivent subir au moins une réplication d'ADN ainsi que le doublage cellulaire suivant l'arrêt de croissance (mitose post-confluence) afin de poursuivre le prochain stage différentiel, l'expansion clonale (76). Cependant, cette étape ne s'avère pas essentielle en ce qui à trait aux préadipocytes humains, où l'inhibition de la mitose n'empêche pas l'adipogenèse (79). Il est toutefois possible que ces cellules aient subi une division cellulaire *in vivo* et que ceci coïncide à un stage plus avancé dans le processus différentiel (75).

Le début de la différenciation adipocytaire s'accompagne de modifications de l'expression génique de l'adipocyte en formation. Une observation typique est le début de l'expression de la lipoprotéine lipase (LPL) qui a souvent été associée comme signe primaire de la différenciation (80). L'expression des facteurs de transcription de la famille des PPAR et C/EBP sont tous deux rapidement induits au début de la différenciation. Les isomères de ces régulateurs sont exprimés subséquentment afin d'aboutir avec l'expression majoritaire des isomères PPAR $\gamma$  et C/EBP- $\alpha$  (75). Ils sont responsables des changements dans les patrons d'expression observés au début de la différenciation des gènes contenant dans leurs promoteurs les éléments spécifiques reconnus par ces régulateurs. C'est pourquoi on remarque que l'augmentation de l'expression de C/EBP- $\alpha$  au début de la différenciation est rapidement suivie du début de l'expression de plusieurs gènes spécifiques aux adipocytes (81). Un autre facteur de régulation, le SREBP-1c, habituellement impliqué dans le métabolisme des lipides, est aussi induit au début de la différenciation et pourrait alors gouverner en partie l'expression génique de l'adipocyte (82). Le changement morphologique nécessite et est

responsable de plusieurs des changements d'expression observés au début de la différenciation. Le préadipocyte à allure fibroblastique doit subir de nombreuses modifications afin d'acquérir les caractéristiques d'un adipocyte mature sphérique. Ceci implique une restructuration au niveau du cytosquelette ainsi qu'au niveau des composantes de la matrice extracellulaire (75) nécessitant donc des modifications dans les patrons d'expression d'actine/tubuline (83), collagène (84), fibronectine (85) et autres.

Parmi les événements finaux de la différenciation lors du stage de différenciation terminale, l'adipocyte acquiert la sensibilité à l'insuline et augmente notablement son taux de lipogenèse (75). Ceci requiert une augmentation dans l'expression et dans l'activité de la panoplie de protéines et enzymes reliés à ces activités tel l'acide gras synthétase (86) ainsi que les transporteurs de glucose (87). Un changement dans les proportions des sous-types de récepteurs adrénergiques (diminution de  $\beta_1$  et augmentation de  $\beta_2$  et de  $\beta_3$ ) et dans le nombre total de ces récepteurs sont également observés (88, 89). De plus, il y a production de protéines spécifiques à l'adipocyte telles: l'adipocyte lipid-binding protein (aP2) (90), la fatty acid translocase (FAT/CD36) (91) et la périlipine (92) permettant notamment à l'adipocyte d'accomplir sa fonction première d'entreposage lipidique. Enfin, les adipocytes acquièrent une autre fonction dite sécrétoire en produisant et sécrétant divers facteurs, les adipokines, agissant dans diverses voies métaboliques et processus physiologiques.

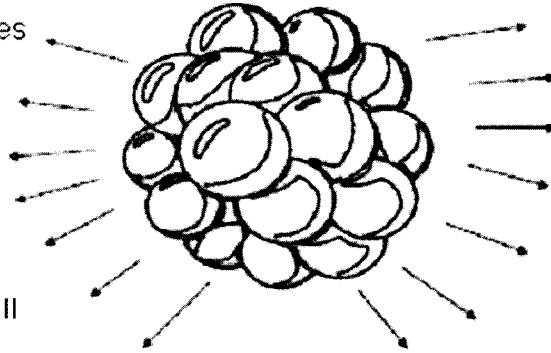
### 2.2.2. Le tissu adipeux blanc: un organe sécrétoire

En plus de fournir une protection mécanique et thermique, l'emmagasinage de lipides constituait autrefois la fonction classique du tissu adipeux blanc. Au cours des années 50, l'existence d'un facteur circulatoire dont les niveaux augmentaient avec la masse adipeuse signalant au cerveau d'atténuer la faim afin de diminuer le poids corporel fut soulevée (93). Ce n'est que quarante ans plus tard que la découverte de ce facteur, la leptine, produit du gène *ob* majoritairement dérivé du tissu adipeux blanc, a vu le jour (94, 95). Ceci a mené à un nouveau concept suggérant que le tissu adipeux est un organe dynamique ayant l'habileté de produire différents facteurs (Figure 2) pouvant interagir soit de façon auto-/paracrine ou endocrine. Ce concept suggère aussi que le tissu adipeux et ses facteurs sécrétés font partie d'un système intégré qui soutiendrait une communication entre les organes. Des anomalies au niveau de la sécrétion de tels facteurs pourraient être impliquées dans le développement de l'obésité et des complications qui y sont reliées. Une meilleure connaissance du métabolisme et des fonctions des protéines dérivées du tissu adipeux peut ainsi favoriser le développement d'approches appropriées au niveau de la prévention et/ou du traitement des complications associées au surplus pondéral. À titre d'exemple, l'adiponectine, la protéine la plus abondamment sécrétée à l'heure actuelle par l'adipocyte, démontre des capacités sensibilisatrices à l'insuline (19) et est faiblement présente chez les individus obèses (17). L'optimisation de vecteurs améliorant la production de cette hormone serait ainsi favorable pour cette catégorie croissante de gens susceptibles au développement d'une

résistance à l'insuline.

### **AUTO-/PARACRINE**

hormones stéroïdes  
protastaglandins  
TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$   
PAI-1, TF  
adipsine/ASP  
angiotensinogène II  
IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8



### **ENDOCRINE**

Hormones stéroïdes  
leptine  
IL-6, IL-8  
PAI-1  
adiponectine  
\* TNF- $\alpha$   
\* angiotensinogène II

**Figure 2. Facteurs sécrétoires de l'adipocyte humain devisés selon leur mode d'action auto/paracrine ou endocrine.**

TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor alpha ;TGF- $\beta$ , transforming growth factor beta; PAI, plasminogen activator inhibitor; TF, tissue factor; ASP, acylation stimulating protein; IL, interleukine; \* agit seulement possiblement de façon endocrine, Adapté de (72)

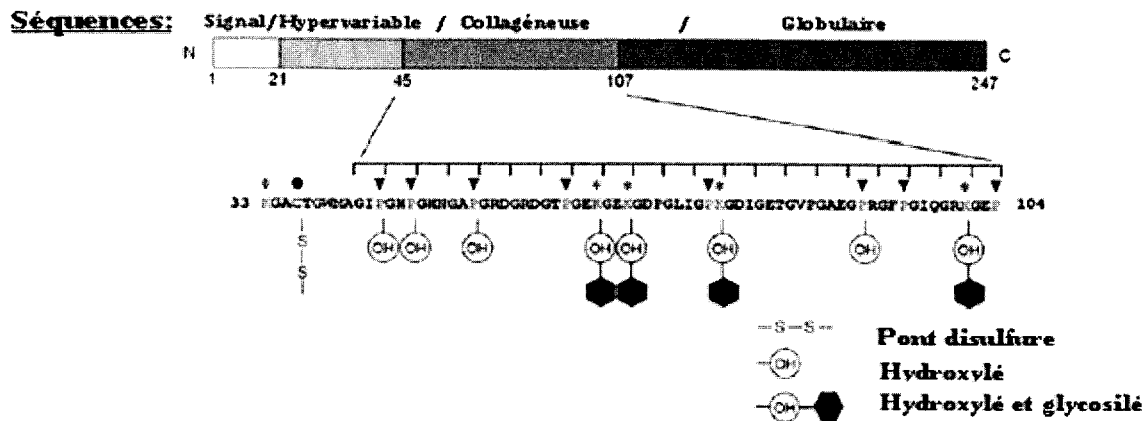
### **2.3. L'adiponectine**

L'adiponectine, à l'heure actuelle, est l'adipokine la plus abondamment sécrétée et est unique au tissu adipeux (15). Elle fut découverte en 1995 et sa transcription fut caractérisée comme étant strictement induite pendant et suivant la différenciation adipocytaire (96). En concordance avec les niveaux importants d'adiponectine en circulation (5-30 $\mu$ g/mL) (73), il a été démontré suite au séquençage d'une bibliothèque d'ADN complémentaire du tissu adipeux humain, que le transcrit de l'adiponectine est exprimé en plus grand nombre relativement aux autres transcrits (97). Depuis sa

découverte, de nombreuses études démontrent les potentiels antidiabétiques, antiathérogéniques ainsi qu'anti-inflammatoires de cette protéine et ont fait de cette dernière une cible importante à considérer lors de la mise sur pied de traitements des complications métaboliques. (73). Contrairement à la plupart des autres adipokines, l'adiponectine est négativement corrélée avec l'indice de masse corporelle (IMC) (17). Les principales fonctions biologiques de l'adiponectine seront détaillées subséquentement dans cette thèse. Il sera question notamment de décrire les effets de l'adiponectine au niveau de la sensibilisation à l'insuline (19), de l'utilisation des acides gras comme source énergétique (98) et du système inflammatoire (18, 99).

### 2.3.1. Séquence et structures de l'adiponectine

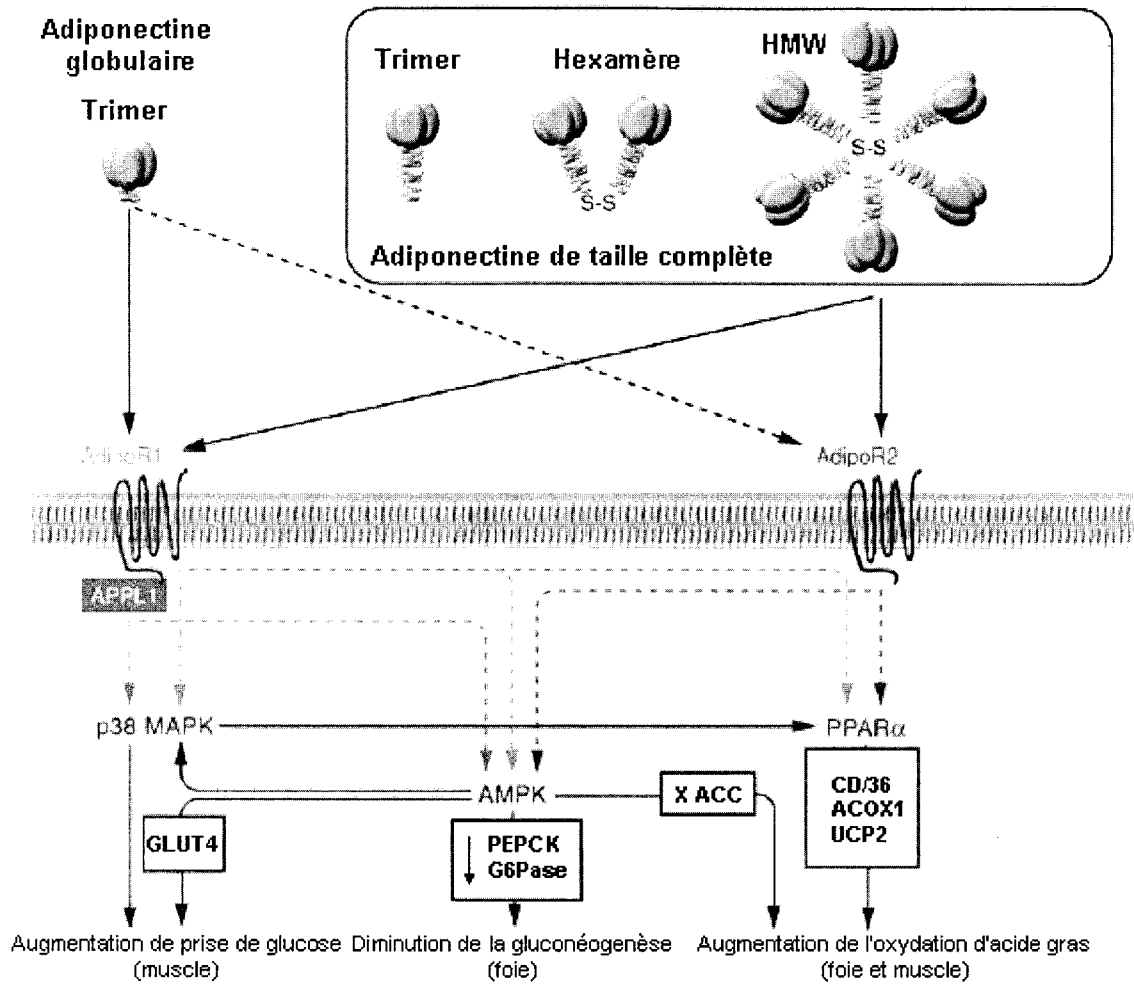
L'adiponectine est une protéine de 30kDa (96) codée par sa séquence primaire composée de 4 domaines: séquence de signal suivie d'une séquence hypervariable menant à la séquence codant pour la région collagèneuse et enfin une autre pour la région globulaire de l'adiponectine (Figure 3) (73). La région collagèneuse contient des lysines et prolines qui sont hydroxylées (et subséquentement glycolysées pour 4 des lysines) lors de modifications posttraductionnels durant la sécrétion. Ces modifications sont nécessaires à l'oligomérisation des sous unités d'adiponectine sous forme de structures supérieures (100) (Figure 4). Un autre point important à noter est la présence d'une cystéine dans la région hypervariable (Figure 3) qui est aussi nécessaire à la formation de formes supérieures via la formation de ponts disulfures entre les cystéines des sous unités (101).



**Figure 3. Structure de la séquence et modifications post-traductionnelles de l'adiponectine.** Adapté de (100)

La structure de la protéine est composée de 2 régions, soit une homologue au collagène (102) et une autre région globulaire homologue au complément C1q (103)(Figure 4). La forme monomérique n'est pas retrouvée dans la circulation où l'adiponectine y est présente que sous 3 formes oligomériques: trimère (bloc d'assemblage formé sous l'interaction des régions globulaires), hexamère (2 trimères reliés via ponts disulfures) et complexe de haut poids moléculaire (high molecular weight, HMW) (composé de 12-18 unités monomériques) (100) (Figure 4). L'oligomérisation est une étape clef. À ce titre, plusieurs études démontrent l'efficacité supérieure de l'adiponectine HMW comparativement aux autres formes au niveau des effets inhibiteurs de la production de glucose hépatique (100, 104). La proportion moyenne des concentrations HMW sur la concentration totale d'adiponectine est d'environ 0.5 (105). L'utilisation du ratio des concentrations de l'adiponectin HMW sur

les concentrations totales de la protéine serait d'ailleurs un meilleur prédicteur de la sensibilité à l'insuline que les concentrations totales d'adiponectine (106). Différents facteurs peuvent être à la source de ce qui détermine le ratio d'adiponectine HMW/Total. Premièrement, certaines mutations retrouvées dans la région collagèneuse changeant la séquence de l'adiponectine d'un seul acide aminé peut causer une diminution ou même l'incapacité de la protéine à former le complexe HMW (107). Les individus portant une de ces mutations sont d'ailleurs beaucoup plus à risque de développer le diabète type 2 (107). Un autre facteur pouvant affecter le ratio est l'activité du PPAR $\gamma$  (104), possiblement car ce récepteur augmente l'expression de l'oxydoréductase Ero1-L $\alpha$ , une enzyme clé dans la formation du complexe HMW (108). Par le même mécanisme, les niveaux énergétiques cellulaires peuvent aussi influencer la production d'adiponectine HMW. En effet, lorsque les concentrations intracellulaires de glucose augmentent, le ratio NAD<sup>+</sup>/NADH diminue menant à la réduction de l'activité de SIRT1, une déacétylase NAD-dépendante. Étant donné que SIRT1 diminue l'activité du PPAR $\gamma$ , une augmentation de l'entrée du glucose à l'intérieur de l'adipocyte pourrait alors mener à une augmentation de l'activité du PPAR $\gamma$  permettant alors une augmentation de la sécrétion de l'adiponectine HMW (104, 108). Il convient de mentionner que l'adiponectine peut être exprimée sous une autre forme, c.-à-d. l'adiponectine globulaire. Cette dernière est présente sous de faibles concentrations plasmatiques (109) (Figure 4) et serait le résultat du clivage protéique par le leucocyte élastase, une serine protéase sécrétée par les monocytes activés et/ou neutrophiles (110).



**Figure 4. Réponses cellulaires induites par les différents oligomères de l'adiponectine lors de la liaison à leur récepteur spécifique.** AdipoR, adiponectin receptor; HMW, high molecular weight; APPL1, adaptor protein containing pleckstrin homology domain, phosphotyrosine (PTB) binding domain and leucine zipper motif; MAPK, mitogen activated protein kinase; AMPK, adenosine monophosphate kinase; GLUT, glucose transporter; PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase; G6Pase, glucose-6-phosphatase; ACC, acetyl coenzyme-A carboxylase; ACOX, acyl-coenzyme A oxidase; UCP, uncoupling protein. Adapté de (111)

### 2.3.2. Effets physiologiques de l'adiponectine au niveau de la sensibilité à l'insuline.

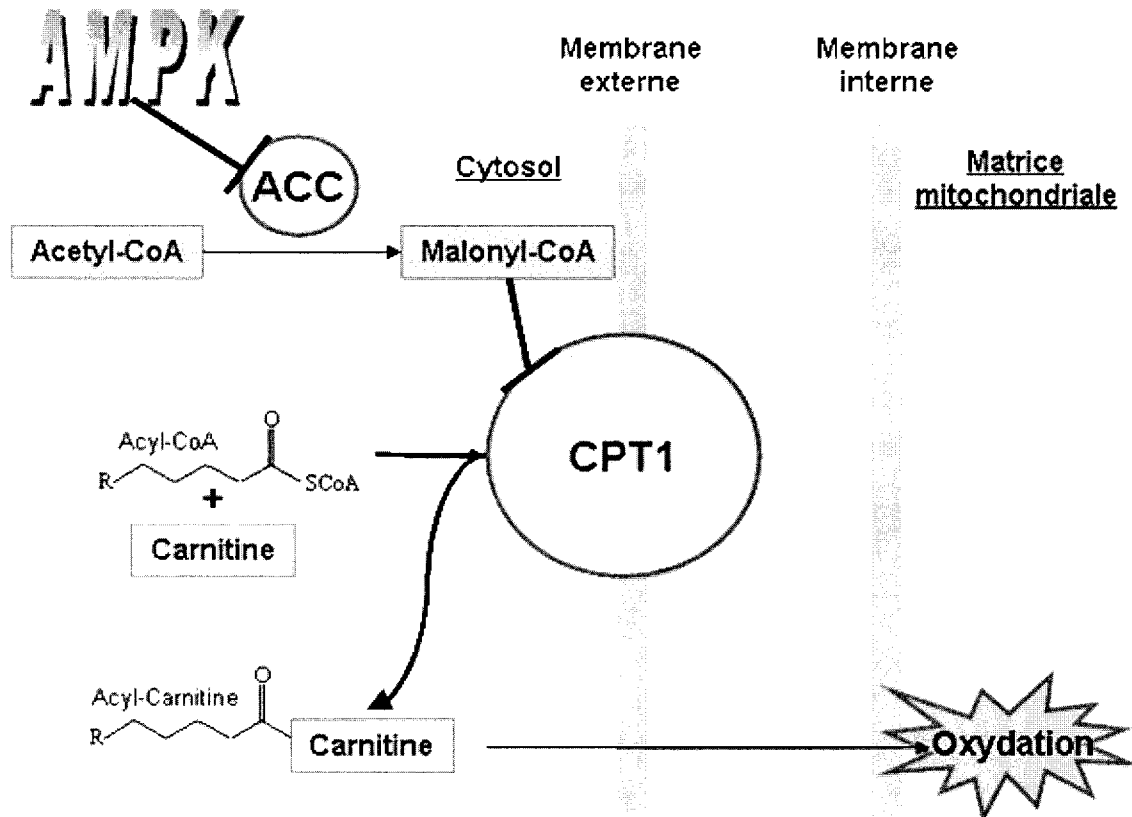
Il existe 2 récepteurs spécifiques à l'adiponectine: adipoR1 et adipoR2. AdipoR1 est ubiquitaire et abondamment exprimé dans le muscle squelettique. Ce récepteur possède une affinité plus importante pour l'adiponectine globulaire que celle de haut poids moléculaire. Les récepteurs adipoR2 sont plutôt exprimés au niveau hépatique et présentent une meilleure capacité de liaison avec le complexe de haut poids moléculaire (112). À l'aide de manipulation génétique de myocytes C2C12 et d'hépatocytes conduisant à la surexpression d'adipoR1/R2, il a été montré que l'adiponectine stimule l'activité d'un certain régulateur nucléaire (PPAR- $\alpha$ ) et d'un enzyme clé (AMPK) impliqués dans l'oxydation des lipides et l'entrée du glucose (112) (Figure 4). Sous ces actions, l'adiponectine favorise la sensibilité à l'insuline dont les mécanismes sont décrits ci-dessous (113). Cependant, il est important de noter que ces explications reposent principalement sur l'une des hypothèses à la base du principe de la résistance à l'insuline selon lequel le surplus de triglycérides intracellulaire au niveau du muscle squelettique interfèrerait dans la voie de signalisation de l'insuline. Ce surplus de triglycérides entraînerait par conséquent une inhibition du recrutement des transporteurs de glucose (GLUT-4) à la membrane cellulaire causant ainsi une incapacité d'absorption du glucose en réponse à l'insuline, c.-à-d. résistance à l'insuline (114).

Au niveau des tissus musculaires squelettiques, il a été démontré que l'adiponectine favorise la diminution de triglycérides pouvant ainsi améliorer la sensibilité à l'insuline. Cette diminution de triglycérides par l'adiponectine peut être attribuée à sa capacité à

promouvoir l'expression de certains gènes impliqués dans le transport (CD36) et l'oxydation (acyl coenzyme A oxidase) d'acides gras ainsi que dans la dissipation de chaleur (protéine découplante 2) (115) (Figure 4). L'expression de ces gènes est régulée par le régulateur PPAR- $\alpha$  (exprimé majoritairement au niveau des muscles squelettiques et le foie) (115) et il a été démontré que l'adiponectine augmente l'expression de ce régulateur *in vivo* chez les souris (115) ainsi qu'*in vitro* dans les myocytes C2C12 (116). L'adiponectine diminuerait alors le contenu de triglycérides dans le muscle ainsi que le foie via l'augmentation de l'expression du régulateur PPAR- $\alpha$  et des gènes subséquentement induits favorisant leur oxydation (Figure 4), menant alors à l'amélioration de la sensibilité à l'insuline.

Il a également été démontré que l'adiponectine augmente l'activité de l'adénosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) (98). Par ce mécanisme, l'adiponectine inhibe (phosphoryle) l'acétyl coenzyme-A carboxylase (ACC) favorisant ainsi l'oxydation des acides gras au niveau musculaire squelettique (Figure 4 et 5) (113). Cet effet est expliqué via la diminution de la malonyl Coa, un produit de l'ACC, et un inhibiteur bien connu de la carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1), enzyme mitochondriale permettant l'entrée des acides gras à l'intérieur de la matrice mitochondriale où ils sont oxydés (Figure 5). Toujours dans le muscle, l'activation de l'AMPK augmente le recrutement des GLUT4 vers la membrane (augmentant alors la prise du glucose) (113). Au niveau hépatique, toujours par l'entremise de l'AMPK, l'inhibition de l'ACC augmente également l'oxydation des acides gras (113) (Figure 4 et 5) et permet aussi un contrôle de la production de glucose hépatique. (117). Ceci est fort

probablement attribuable à une diminution de 50% de l'expression de gènes impliqués dans la gluconéogenèse (PEPCK et G6Pase) ainsi que dans la glycolyse (G6Pase, dont l'activité est aussi affectée) (Figure 4) (118).



**Figure 5. Favorisation de l'oxydation des acides dans la mitochondrie via activation de l'AMPK.** ACC, acetyl coenzyme-A carboxylase; AMPK, adenosine monophosphate-activated protein kinase ; CPT1, carnitine palmitoyltransferase 1.

Outre ces effets au niveau du muscle squelettique et du foie, l'adiponectine favorise également la sensibilité à l'insuline au niveau du tissu adipeux (73). Cet effet serait en effet médié par l'inhibition de l'adiponectine du facteur de nécrose tumorale

(tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ )) (119) et/ou autres facteurs sécrétés par l'adipocyte contribuant à la résistance à l'insuline (120).

Dans l'ensemble, l'adiponectine s'ajoute aux facteurs sécrétés par l'adipocyte qui lui confèrent un statut de cellule endocrine. Cette hormone joue un rôle important au niveau du métabolisme des lipides en favorisant l'oxydation des graisses au niveau du muscle squelettique. L'adiponectine intervient également au niveau du métabolisme des glucides en sensibilisant le foie à l'action de l'insuline, favorisant ainsi un meilleur contrôle de la glycémie. Chez l'humain, les niveaux circulants plasmatiques de l'hormone sont inversement proportionnels au degré d'obésité et la sévérité de l'insulinorésistance d'un individu. Il faut mentionner ici que les agonistes des PPAR $\gamma$  tels les thiazolidinediones augmentent les niveaux d'adiponectine (104, 115, 121). Une question qui demeure toujours sans réponse à l'heure actuelle est à savoir si les ligands naturels des PPAR $\gamma$ , tels les AGPI n-3 LC, peuvent influencer positivement la sécrétion de cette hormone dont le rôle au niveau du contrôle de l'équilibre lipidique et glucidique s'avère prometteur pour le maintien du poids corporel et le contrôle de la glycémie. Cette protéine active le catabolisme des lipides et intervient dans le contrôle de la glycémie.

#### 2.4. Effets des AGPI n-3 LC sur l'expression et la sécrétion de l'adiponectine

Les effets des AGPI n-3 LC sur les niveaux d'adiponectine (Tableau 4-6) ont été caractérisés par l'intermédiaire d'études réalisées chez l'humain, l'animal (souris et rats) ou encore via des approches *in vitro*. Dans l'ensemble, les résultats démontrent une

augmentation de l'expression ou des concentrations de l'adiponectine en réponse aux AGPI n-3 LC.

Chez l'humain (Tableau 4), plusieurs études démontrent une augmentation de concentrations de l'adiponectine suite à la prise de suppléments ou à l'incorporation d'AGPI n-3 LC à la diète chez des adultes en santé (15%) (14), des individus obèses (60% et 22%) (11, 13) et des diabétiques de type II (31%) (12), et ce indépendamment des changements de poids corporels. Outre les interventions nutritionnelles, des associations positives entre les niveaux d'adiponectine et des marqueurs à long terme de la consommation d'AGPI n-3 LC (ex. tissu adipeux, plaquettes sanguines et granulocytes) ont également été observées (122). Il convient toutefois de mentionner que certaines études d'intervention n'ont pas dénoté d'effet au niveau des concentrations d'adiponectine (123).

Chez l'animal (Tableau 5), l'augmentation des concentrations plasmatiques d'adiponectine suite à divers traitements d'AGPI n-3 est presque unanime (11, 20-34). En plus d'une augmentation des niveaux circulants d'adiponectine, la majorité des études démontrent une augmentation de l'expression (nombre de transcrits d'ARNm) d'adiponectine suite à une diète d'AGPI n-3 LC (20, 21, 25-27, 30). Il faut tout de même noter que d'autres démontrent une diminution (11, 124) ou une absence d'effet (11, 24) des diètes au AGPI n-3 LC sur l'expression du gène adiponectine.

Les études *in vitro* (Tableau 6) sont beaucoup moins nombreuses et peu consistantes. En effet, certains travaux démontrent une augmentation (11, 35, 36) ou une diminution (125) des concentrations de l'adiponectine en réponse à une exposition aux AGPI n-3 LC. Au niveau de l'effet des AGPI n-3 LC sur l'expression de l'adiponectine, une diminution (124, 125), une absence d'effet (26, 35) ou une augmentation (36) fut rapportée. Il est important de mentionner qu'aucune de ces études ne fut menée avec des adipocytes humains, mais bien avec des cellules 3T3-L1 ou provenant de rats.

**Tableau 4 : Effets de divers AGPI n-3 LC : synthèse des études chez l'humain.**

<b>Réf.</b>	<b>Sujets</b>	<b>Traitements</b>	<b>Méthodes d'analyses</b>	<b>Résumés des Résultats</b>
(10)	2 groupes de 30 bébés (14F et 16M) prématurés.	Alimentation avec : 1-Formule contrôle ou 2-enrichie d'un mélange d'AGPI n-3 LC comprenant 47mg DHA/jour pour environ 33 jours.	ELISA	Niveaux supérieurs d'adiponectine totale chez les bébés de diète 2- d'AGPI n-3 LC Différence entre les groupes, P=0.002.
(126)	Deux groupes : (traitement:16, contrôle: 19) âge moyen=63 ans; IMC=27.5 ayant eu un incident cardiaque il y a plus de 3 mois.	Traitement de 3 mois avec une capsule de 1g/jour d'Omacor <sup>a</sup> équivalent à 460mg de EPA et 380mg de DHA/jour.	ELISA	Augmentation non significative des niveaux d'adiponectine totale du groupe traitement.
(11)	Deux groupes, âge moyen=52 ans et IMC= 30 -Contrôle : 10H/16F -Traitement : 11H/15F	1.8g/jour EPA pour une période de 3 mois.	ELISA	Augmentation significative des niveaux d'adiponectine totale du groupe traitement.
(12)	126 patients hyperlipidémiques : -76 diabétiques de type 2 (41H/35F) âge moyen=66 ans / 50 non diabétiques (26H/24F) âge moyen=55 ans.	1.8g/jour EPA pour une période de 6 mois.	ELISA	-Augmentation des niveaux d'adiponectine chez les diabétiques, (P<0.01). -Aucune augmentation dans les niveaux d'adiponectine chez les non diabétiques.
(13)	116 F avec surpoids et hyperinsulinémiques, âge moyen=44.7 ans, IMC=35.0.	3 Traitements d'une période de 24 semaines 1-(n=39) perte de poids avec AGPI n-3 LC (1.3g EPA et 2.9g DHA/jour).	RIA	-Augmentation Pré-Post des niveaux d'adiponectine dans le groupe de perte de poids accompagné d'AGPI n-3 LC, (P<0.0001), reflétant en partie la perte de poids.

	2-(n=38) perte de poids avec huile placebo (2.8g linoléique et 1.4g oléique/jour). 3-(n=39) groupe contrôlé.		-Effet 'time*group' entre les 2 interventions de perte de poids, (P=0.0012) i.e. effet spécifique des AGPI n-3 LC sur l'adiponectine.
(122)	291 participants (M=185, F=106,) âgés de 39 à 77 ans référés pour une angiographie coronarienne.	-Échantillons sanguins et de tissu adipeux. -ELISA	-Chez les hommes : corrélations entre les niveaux d'adiponectine et le niveau d'EPA dans les plaquettes (r=0.26; p<0.01) et dans les granulocytes (r=0.23; p<0.01) et avec le contenu de DHA dans le tissu adipeux (r=0.15; p<0.05) dans les granulocytes (r=0.17; p<0.05). Suite à une régression, seul le EPA demeura significativement corrélé avec l'adiponectine selon son contenu dans les plaquettes (p=0.017) et les granulocytes (p=0.03).
(123)	16F et 10H, IMC=28-33, âge moyen=37.6	-Diète contrôle ou contenant 3.5% (% énergie) de AGPI n-3 (plate et marines) ~7g/jour pour une diète de 2000 calories/jour. Ceci pour une période de 14 semaines.	-Radio-immunoassay -Pas d'augmentation significative des niveaux d'adiponectine totale ou HMW du à la diète AGPI n-3.
(14)	17 (H=10, F=7) âge moyen=27.1, IMC=22.4	Diète 10 semaines avec un supplément de 1.7g/jour de ALA et 3 portions de poisson par semaines (procurant 1.25g/jour de EPA et DHA)	Augmentation pré-post des niveaux d'adiponectine, (p=0.02).

M, mâles ; F, femelle, ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay; IMC, Indice de masse corporelle; RIA, Radio-immunoassay.

<sup>a</sup> Capsule pharmaceutique concentrée en AGPI LC n-3

Tableau 5 : Effets de divers AGPI n-3 LC : synthèse des études animale.

Réf.	Animaux	Traitements	Méthodes d'analyses	Résumés des Résultats
(11)	Deux groupes : 1-Souris C57BL/6J ob/ob <sup>a</sup> (n=14) et 2-WT (n=10) mâles âgés de 6 semaines.	Deux traitements : Souris ob/ob et WT nourries <i>ad libitum</i> pour 4 semaines sous : -Diète standard ou -Une moulté dont 5% du poids est composé d'EPA	-ELISA -Real time PCR	-Augmentation des niveaux d'adiponectine chez les souris ob/ob nourries avec la diète 5% EPA, (P<0.05) vs contrôle parallèle à leurs perte de poids. -Augmentation Pré-Post non significative dû à la diète 5% EPA chez les WT vs contrôle. -Pas de différences significatives entre les niveaux d'expression de l'adiponectine (ARNm).
	Souris C57BL/6J ob/ob mâles âgés de 8 semaines.	<u>Effet d'une courte exposition</u> Deux traitements : Diète <i>ad libitum</i> d'une période de 2 semaines sous: -Diète standard ou -supplémentée de 5% du poids avec EPA	-ELISA -Real time PCR	-Augmentation dans les niveaux d'adiponectine, chez les souris nourries avec 5% EPA (P<0.01) WT vs contrôle. -Diminution de l'expression d'adiponectine chez les souris nourries avec 5% EPA (P<0.05) vs contrôle.
	Souris C57BL/6J mâles âgés de 10 semaines	<u>Effets EPA dès le début de l'obésité</u> Trois traitements : Obésité induite avec administration orale sur une période de 8 semaines sous : -Diète standard ou -Diète riche en gras (HF) (supplémentée ou non avec EPA).	-ELISA -Real time PCR	-Augmentation des concentrations d'adiponectine chez les souris nourries avec la diète HF-EPA comparativement aux souris nourries HF (P<0.01) dès 2 semaines. -Pas d'augmentation significative de l'expression de l'adiponectine.
(20)	Rats Wistar mâles âgés de 5 semaines.	Deux traitements : Nourris pour 10 semaines sous : -Diète standard (n=19) ou -Supplémentée de 0.8% EPA et 2.0% DHA	-ELISA -Real time PCR	-Augmentation dans les niveaux d'adiponectine chez les rats nourris avec la diète AGPI n-3 LC vs diète régulière, (P<0.05).

		(% énergie totale) (n=22).		-Augmentation de l'expression de l'adiponectine dans le tissu adipeux épidermique des rats AGPI n-3 LC vs diète standard, (P<0.05) mais pas au niveau tissu adipeux viscéral.
(21)	Deux groupes : 1-Souris diabétiques db/db <sup>a</sup> (n=10) et 2- contrôle (db/+) mâles (n=15) âgés de 7 semaines.	2 traitements de 6 semaines : -Diète riche en graisses (HF) saturées et mono-insaturées (30% énergie totale) (n=5db/db et n=7db/+) ou -HF dont 40% des graisses fut remplacées d'un concentré d'EPA et DHA (12% énergie totale) (n=5db/db et 7db/+).	-ELISA -Real time PCR	-Augmentation dans les niveaux d'adiponectine chez les souris db/db et db/+ nourris HF-AGPI n-3 LC vs HF, (P<0.05) et (P<0.001) respectivement. - Augmentation de l'expression de l'adiponectine dans le dépôt gonadal des souris nourries HF-AGPI n-3 LC vs HF, (P<0.01).
(22)	Souris C57BL/6J mâles âgés de 7 semaines	Cinq traitements de 8 semaines, nourris <i>ad libitum</i> avec: -une diète standard, - riche en lipides de produits laitiers (21% poids/poids) (HF), - HF supplémentée de 1.5, 2.5 ou 5% (poids/poids) d'huile de krill <sup>b</sup> i.e. 0.05, 0.08 et 0.16% de EPA et de 0.03, 0.04 et 0.09% DHA respectivement. (n=10 / groupes)	-Quantification de l'adiponectine non décrite	-Pas de différence entre les niveaux d'adiponectine des souris HF et standard. -Niveaux d'adiponectine significativement plus élevés chez les souris HF 5% huile de krill vs HF, (P<0.001).
(23)	Rats 'Otsuka Long-Evans Tokushima fatty' <sup>c</sup> âgés de 4 semaines.	2 traitements de 4 semaines avec: -Diète 5% d'huile de maïs et 2% de PC <sup>d</sup> d'œuf ou -Diète 5% d'huile de maïs et 2% d'un mélange d'AG n-3 contenant de la PC (donnant à cette diète une composition de 0.24% EPA et 0.56% poids/poids), (n=6 / groupes).	-ELISA	-Niveaux d'adiponectine significativement plus élevés chez les souris nourries à la diète contenant 5% d'huile de maïs et 2% d'un mélange d'AGPI n-3 LC vs celles nourries à la diète n'en contenant pas, (P<0.05)
(24)	Rats Wistar mâles.	3 traitements de 7 mois: -Diète contrôle (n=5) ou	-RIA -Real time	-Niveaux d'adiponectine significativement plus élevés chez les rats nourris à la diète

		-Diète riche en sucrose (SRD, n=10). Ce groupe fut ensuite randomisé en 2 groupes SRD ou SRD contenant 7% (poids/poids) d'huile de foie de morue pour les 2 prochains mois (donne environ 0.175% de EPA et 0.245% de DHA)	PCR	contenant 7% d'huile de foie de morue que ceux nourris à la diète n'en contenant pas, (P<0.05). -Aucune différence entre les groupes pour l'expression de l'adiponectine.
(25)(1 27)	Rats Wistar mâles âgés de 6 semaines.	4 traitements de 5 semaines : 2 groupes : nourris d'une diète contrôlée (n=15) ou diète riche en lipides (HF) (n=14) suivie de 2 sous-groupes ayant gavage oralement 1g/kg/jour de EPA ou d'eau.	-ELISA -Northern blot	-Diète HF augmente les niveaux d'adiponectine (P<0.001), pas d'effet de l'EPA. -Effet de EPA sur les niveaux d'adiponectine, (P<0.05) lorsque corrigé pour l'adiposité (adiponectine/g de tissu adipeux) -Niveaux d'expression d'adiponectine plus élevé chez les rats traités à l'EPA.
(26)	-Souris 129Sv mâles âgés de 10-12 semaines.	<u>Effet chronique</u> 5 traitements de 15 jours, nourries <i>ad libitum</i> soit avec une des moulés isocaloriques : -contrôle, contenant 27% (du poids) d'huile de carthame ou 27%, 13.5% ou 8% d'huile de menhaden <sup>d</sup> (FO) représentant environ 3.6, 1.8 et 1.1 % de EPA et 2.3, 1.1 et 0.7 % de DHA. (n=10 / groupes).	-RIA pour échantillons de plasma aux jours : 0, 2, 4, 8 et 15 -Western blot. -Real time PCR	-Diète 27% FO augmente de 2.7 fois les niveaux d'adiponectine après 15 jours (P<0.00005) vs diète d'huile de carthame. L'effet de FO était significatif à toutes concentrations et dose dépendant sur les niveaux d'adiponectine. -Adiponectine HMW augmentée sous diète FO. -Augmentation dans les niveaux d'expression d'adiponectin du tissu adipeux épидymal après 15 jours sous diète FO vs contrôle, (P<0.04). Cependant, cet effet n'est pas remarqué au niveau du tissu adipeux sous-cutané.
		<u>Effet aigu :</u> À 0 et 12h, administration orale des doses	-RIA des échantillons	- Aucun effet des gavages sur les niveaux d'adiponectine après 24h.

	de 0.01ml/g de poids d'une solution saline, d'huile de menhaden ou de OmegaRx® (360mg/mL EPA et 180mg/mL DHA), (n=3 pour / groupes).	aux heures: 0, 1, 3, 7 et 24 -Real time PCR	-Augmentation dans les niveaux d'expression d'adiponectine du tissu adipeux épидymal après 24h suite aux 2 traitements d'huiles. Pas d'effet au niveau du tissu adipeux sous-cutané.
	<u>L'effet continu de l'huile de menhaden (FO).</u> Après avoir été nourries 8 jours avec la diète supplémentée de 27% d'huile de menhaden (FO), la diète fut échangée pour celle contenant 27% d'huile de carthame pour jours supplémentaires.	-RIA des échantillons aux jours: 0, 8, 10, 13, 15	-Les niveaux d'adiponectine des souris nourries à FO sont demeurés 2 fois plus élevés que celles nourries à l'huile de carthame et ce, 7 jours après la fin de la diète FO, (P<0.01).
	<u>Coadministration de BADGE<sup>e</sup></u> -Les souris furent nourries <i>ad libitum</i> avec: diète contrôle, FO 27% ou huile de carthame 27% pour une période de 4 jours. Simultanément, 1mg/kg de BADGE fut administré (ou non) par injection 1 fois par jour. (n=4-10 par groupes)	-RIA des échantillons aux jours: 0, 1 et 4.	-L'inhibition de PPAR $\gamma$ supprime l'effet d'induction des niveaux d'adiponectine chez les souris nourries avec la diète FO, (P<0.01). - Aucun effet de BADGE sur les niveaux d'adiponectine chez les souris nourries à l'huile de carthame.
(27)	Souris C57BL/6J mâles adultes Diète riche en graisses (HF) pour une période de 2 semaines suivie du traitement avec HF ou HF contenant 0.9% EPA et 3.9% DHA (isocalorique) pour 5 semaines. Durant cette période, les souris étaient nourries <i>ad libitum</i> ou avaient une restriction calorique de 30% (n=10 / groupes) -Suite aux traitements, les adipocytes furent isolés et incubés 24h.	-ELISA -Real time PCR.	-Niveaux d'adiponectine augmentés sous la diète AGPI n-3 LC de façon similaire avec ou sans restriction calorique, (P<0.05). -Les adipocytes isolés provenant du dépôt épидymal des souris AGPI n-3 LC produisaient et exprimaient plus d'adiponectine que ceux des animaux nourris HF, (P<0.05). Aucun effet au niveau du tissu adipeux dorsolombaire.
(28)	Souris BALB/ Diète standard ou diète riche en sucrose de	-ELISA	-Niveaux d'adiponectine plus élevé après le

(29)	cA1c1 mâles âgés de 8 semaines.	14 jours. EPA fut administré oralement à un des groupes nourris à la diète riche en sucrose (1g/kg/jour). (n=10 / groupes)	traitement de la diète contenant EPA comparativement au groupe n'en contenant pas, (P<0.001).
	Souris C57BL/6J (LDLR-/-) <sup>f</sup> femelles adultes âgées de 2-3 mois.	3 traitements de 12 semaines : - diète riche en gras (HF) -HF supplémentées d'huile d'olive ou d'huile de menhaden (diète contenant donc approximativement 7.9g/kg EPA et 5.15g/kg de DHA).	-Les souris nourries à l'huile de menhaden avaient des niveaux d'adiponectine totale augmentés de 90% vs groupe à la diète l'huile d'olive, (P<0.01) -Augmentation notable dans les formes HMW (P<0.01), MMW, (P<0.01) et LMW, (P<0.001).
(30)	Souris ob/ob.	- 2 groupes: diète standard (n=8) et diète isocalorique enrichie de AGPI n-3 (n=16) (EPA et DHA, composition non mentionnée) pour 5 semaines.	-Niveaux d'expression, (P<0.05) et de production d'adiponectine plus élevé chez les souris nourries avec la diète supplémentée en AGPI n-3.
(31)	Souris C57BL/6J femelles âgées de 8 semaines.	4 traitements de 8 semaines: diète contrôle; 0.5% (poids/poids) d'acide linoléique conjugué (CLA) ; CLA + 1.5% EPA ou CLA + 1.5% DHA (n=10 / groupes).	-Diminution des concentrations d'adiponectine sous la diète CLA. -EPA et DHA restaurent partiellement les niveaux d'adiponectine (P<0.05).
(32)	Souris mâles Crj:CD-1(ICR) âgés de 5 mois.	4 diètes HF et 4 faibles en graisses combinées ou non à EPA et DHA de % (poids/poids) variant entre 0.9-15.2% EPA et 1.0-21.2% DHA pour 3 mois (n=9 dans chaque groupe).	-Effets positifs des AGPI n-3 LC sur les niveaux d'adiponectine
(33)	Souris C57BL/6J mâles âgés de 3 mois	4 diètes de 20 semaines: HF, HF supplémenté de 6.9 % DHA et 2.9% EPA (isocalorique), HF supplémentée d'AGPI n-3 LC en plus de rosiglitazone (10mg/kg) (n=8/groupes).	-Augmentation des niveaux d'adiponectine et du ratio HMW/adiponectine totale sous la diète AGPI n-3 LC.
(34)	-Souris Sv/129 (WT)	3 diètes isocaloriques de 2 semaines : contrôle, 27% huile de carthame	-Dans les WT et PPAR- $\alpha$ nulles, la diète supplémentée en AGPI n-3 LC augmenta

-Souris PPAR- $\alpha$ nulle mâles âgés de 10-12 semaines.	(poids/poids) ou diète à l'huile de carthame avec 8% remplacé par de l'huile de menhaden (donne à la diète 1.28% EPA et 0.72%DHA)	les niveaux d'adiponectine vs la diète contrôle, ( $p<0.0001$ ) et à la diète 27% huile de carthame (WT: $p<0.005$ et PPAR- $\alpha$ nulles $p<0.0001$ ).
(124) Souris C57B16 mâles âgés de 30 ou 90 jours.	10 groupes 2 traitements : Aigu (rats de 90 jours): nourris 2 jours. Chronique (rats de 30 jours): nourris 8 semaines. 5 diètes : Contrôle, HF 17.5% huile de fève de soya, 17.5%huile de noix de coco, 17.5% de lard et 17.5% huile de poisson (donne à la diète 2.4% EPA et 1.4% DHA)	-ELISA (n=9 par groupes) -Real time PCR. (n=6-8 par groupes) -Traitements chroniques : niveaux plus bas d'adiponectine vs contrôle dans tous les groupes à l'exception du groupe nourri à l'huile de poisson. Aucun effet au niveau de l'expression.

PCR, Polymerase chain reaction (réaction polymérase en chaîne); PC, Phosphatidylcholine; RIA, Radio-immunoassay; BADGE, bisphenol A diglycidyl ether.

<sup>a</sup> Souris ayant une mutation au niveau du gène codant pour le récepteur de la leptine (db/db) ou du gène codant pour la leptine (ob/ob) dont celles étant homozygote deviennent rapidement obèses du à l'hyperphagie et développent aussi des caractéristiques diabétiques.

<sup>b</sup> Petit crustacé semblable à la crevette.

<sup>c</sup> Ces rats sont hyperphagiques en raison de l'invalidation du récepteur à la cholecystokinine. Ils deviennent ainsi obèses et présentent plusieurs désordres métaboliques.

<sup>d</sup> Type de poisson.

<sup>e</sup> Inhibiteur de PPAR $\gamma$ .

<sup>f</sup> Déficience du récepteur des lipoprotéines de faible densité.

**Tableau 6 : Revue des études *in vitro* observant l'effet de divers AGPI n-3 LC.**

<b>Réf.</b>	<b>Cellules</b>	<b>Traitements</b>	<b>Méthodes d'analyses</b>	<b>Résumés des Résultats</b>
(11)	-3T3-L1 <sup>a</sup> -3T3-L1 en coculture avec des macrophages RAW264	-Exposition à l'EPA (0 et 200µM). -Exposition à diverses concentrations d'EPA (0, 50, 100 et 200µM) en présence de macrophages RAW264.	-ELISA -Real time (PCR)	-Augmentation non significative des concentrations et de l'expression d'adiponectine en réponse à 200µM d'EPA. -Les traitements avec EPA ont renversé de façon dose dépendante la diminution dans les concentrations d'adiponectine induite par la coculture avec macrophages, (P<0.05).
(26)	-3T3-L1	-Exposition de 24H avec: -Albumine serine bovine (contrôle), EPA et OmegaRx <sup>b</sup> , troglitazone <sup>c</sup> ou dexaméthasone (concentrations non disponibles)	-Real time (PCR)	-Aucune augmentation dans l'expression d'adiponectine suite au traitement EPA et OmegaRx. Cependant, l'expression fut induite et supprimée par la troglitazone et dexaméthasone respectivement.
(35)	-Adipocytes de rats mâles Spague-Dawley	-Cellules de rat incubées avec: contrôle, 25 µ M de EPA ou DHA ou 3µM de pioglitazone <sup>c</sup> pour 4h ou 24h.	-immuno-precipitation/ Western blot -Pulse-chase -Real Time PCR	-Augmentation de l'adiponectine totale (P<0.05) et HMW (P<0.02) par EPA, DHA et pioglitazone après 4h et 24h. -Pas d'augmentation de l'expression.
(125)	Adipocytes de rats mâles Wistar	-Cellules de rat incubées avec: contrôle, 100 ou 200 µM de EPA ou 10µM de pioglitazone pour 96h.	-ELISA -Real time (PCR)	-Diminution des niveaux (EPA=200 µM, P<0.05) et de l'expression d'adiponectine (100 et 200 µM, P<0.001) par l'EPA. -Pas d'effets (EPA=100 µM)
(124)	-3T3-L1	-Cellules incubées avec: contrôle,	-Real time	-Diminution de l'expression, (P<0.05) dans

(36)	-3T3-L1	250 $\mu$ M de EPA, DHA, acide linoléique, laurique, palmitique ou oléique pour 48h. -Cellules incubées avec: contrôle, 125 $\mu$ M de EPA, DHA, acide, palmitique ou oléique pour 24h.	(PCR)) -ELISA -Real time (PCR)	toutes les conditions vs contrôle à l'exception de l'acide linoléique et oléique. -Augmentation des niveaux d'adiponectine par les 2 AGPI n-3 LC (P<0.05) -Augmentation de l'expression d'adiponectine par le DHA seulement, (P<0.05)
------	---------	--	--------------------------------------	---

<sup>a</sup> Fibroblastes embryonniques de souris/lignée cellulaire ayant des caractéristiques adipocytaires après exposition à des facteurs

induisant la différenciation adipocytaire telle l'insuline.

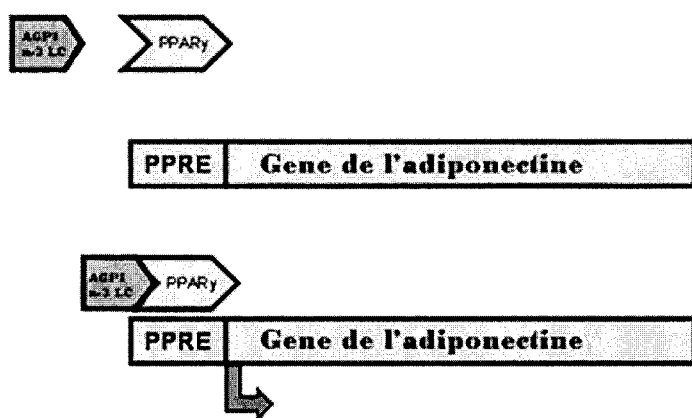
<sup>b</sup> Capsule procurant 400 mg d'EPA et 200 mg de DHA par 1000mg.

<sup>c</sup> Agoniste de PPAR $\gamma$ .

#### 2.4.1. Mécanismes potentiels de l'augmentation de la sécrétion de l'adiponectine par les AGPI n-3 LC.

Les mécanismes par lesquels les AGPI n-3 augmentent l'expression et les niveaux d'adiponectine méritent encore à ce jour certaines clarifications. La voie la plus communément acceptée est celle du PPAR $\gamma$ . Ces récepteurs nucléaires sont spécifiques au tissu adipeux et ont l'habileté d'initier l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides (128). Le fait que l'adiponectine contienne l'élément de réponse PPAR $\gamma$  (PPRE): GGGGCAXAAGTCA (séquence humaine où X représente un nucléotide non particulier) au niveau de son promoteur (129) justifie pourquoi l'adiponectine est sous l'influence des agonistes des PPAR $\gamma$  tels les thiazolidinediones (TZD) (26, 35, 121, 130). Suite à la formation d'un hétérodimère avec le récepteur rétinoïde X (RXR), le récepteur PPAR $\gamma$  reconnaît par son domaine lieur à l'ADN (DBD) la séquence PPRE se retrouvant entre autres en amont de la séquence codant pour l'adiponectine (129). Le récepteur PPAR $\gamma$  doit toutefois être activé par un agoniste se liant à son domaine lieur aux ligands (LBD) afin d'initier l'expression de ces gènes. Une fois activé, le DBD du PPAR $\gamma$ , composé de deux doigts de zinc (131), permet de faire contact avec le promoteur et d'initier le processus de transcription. Il convient de mentionner que les AGPI n-3 LC, dû à la longueur de leurs chaîne hydrophobe (plus de 20 carbones) et à la position de leurs insaturations se lient très bien à l'intérieur de la poche hydrophobe du LBD du PPAR  $\gamma$  et sont de ce fait des ligands et agonistes naturels du PPAR $\gamma$  capable d'activer son activité (4, 132) (Figure 6). Certaines études démontrent aussi que les AGPI n-3 LC augmentent l'expression du PPAR $\gamma$  (30, 36, 133), menant

possiblement à une augmentation de la traduction et de la proportion de ce récepteur, améliorant conséquemment son activité et l'expression de gènes cibles, telle l'adiponectine. Cependant, il faut aussi considérer que l'opposé fut aussi démontré (25). D'autres indications soutenant la voie du PPAR $\gamma$  pour l'augmentation de l'adiponectine par les AGPI n-3 LC sont démontrées à l'aide d'inhibiteurs de l'activité de ce récepteur. En effet, l'addition d'agents tels BADGE (26) ou GW9662 (35) restaure les niveaux d'adiponectine élevés par les AGPI n-3 LC à des niveaux plus bas similaires aux contrôles.



**Figure 6. Initiation de la transcription du gène de l'adiponectine par PPAR $\gamma$  et un de ses agonistes naturels, un AGPI n - 3 LC.**

En résumé, plusieurs études démontrent les bienfaits des AGPI n-3 LC, notamment au niveau de leur impact sur la sensibilité à l'insuline. Il est maintenant bien reconnu que le tissu adipeux est un organe clé impliqué dans la pathophysiologie de l'insulino-résistance. Le tissu adipeux est le seul organe sécrétant l'adiponectine. Cette adipokine possède des propriétés sensibilisatrices à l'insuline et sa sécrétion est modulée

par les AGPI n-3 LC. Un mécanisme possible à la base de ce résultat implique l'activation du PPAR $\gamma$  par les AGPI n-3 LC. Ce mécanisme a été mis en lumière par l'intermédiaire d'études effectuées chez l'animal et d'études *in vitro*. Ces dernières études *in vitro* ont utilisé des modèles de lignées cellulaires murines qui, telles que mentionnées ci-dessous, présentent certaines limites en comparaison aux cellules humaines. À notre connaissance, les effets des AGPI n-3 LC au niveau des préadipocytes humains différenciés demeurent inconnus. Ainsi, le premier objectif de cette étude était d'examiner les effets des AGPI n-3 LC sur la sécrétion d'adiponectine au niveau de préadipocytes humains différenciés. À titre de second objectif, nous avons investigué si la modulation de l'adiponectine par les AGPI n-3 LC était sous influence du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ .

L'unicité de cette thèse repose sur la méthode de culture de préadipocytes de nature humaine. À ce jour, les recherches *in vitro* réalisées pour l'étude des effets d'AGPI n-3 LC sur les niveaux d'adiponectine ont été effectuées à l'aide de lignées cellulaires de nature murines ou d'adipocytes isolés de rats. Il existe des différences substantielles entre les lignées cellulaires murines et les préadipocytes humains. À titre d'exemple, les lignées cellulaires murines présentent une croissance rapide, une capacité proliférative illimitée et une différenciation facilitée, leur conférant un métabolisme plus rapide que les préadipocytes de nature humaine. À titre d'exemple, les lignées cellulaires 3T3-L1 ne prennent que 7-10 jours à se différencier en adipocytes matures (124, 134) alors qu'une période d'au moins 14 jours est requise pour les préadipocytes humains. Il est alors juste de croire que le métabolisme accru des cellules murines utilisées pour l'étude des effets

des AGPI n-3 LC ne reflète pas nécessairement ce qui pourrait survenir au niveau de la cellule humaine. De plus, les lignées cellulaires murines diffèrent des préadipocytes humains du fait qu'elles sont aneuploïde et donc, ne reflètent pas aussi bien le contexte *in vivo* que les préadipocytes humains qui sont, pour leur part, diploïdes.

### 3.1. Culture de préadipocytes humains

Les préadipocytes humains cryopréservés furent achetés de ZenBio, Inc. (Research Triangle Park, Caroline du Nord, États-Unis). Les cellules utilisées provenaient de la région abdominale d'un mélange cellulaire d'hommes et de femmes IMC<24.9 ayant subi une chirurgie électorive (Lot#L020602Abd, ZenBio, États-Unis). L'isolation accomplie par la compagnie ZenBio, Inc. des préadipocytes fut effectuée par force de centrifugation rotationnelle suivant un traitement à la collagénase. Cette technique communément utilisée se résume comme suit (135-138):

Les échantillons de tissu adipeux (2-15 g) sont premièrement dépourvus de tout matériel fibreux et de vaisseaux sanguins visibles et ensuite coupés en plus petits morceaux (approximativement 10-20mg). Une digestion est ensuite effectuée en deux étapes dans un tampon phosphate salin (PBS) 10 mM (Cat# SH30256FS, Fisher Scientific Canada) contenant 1.5mg/ml de collagénase (CLS type I, Worthington Biochemical Corporation, Freehold, New Jersey, États-Unis) ainsi que 20 mg/ml sérum bovin foetal (Cat# SH3039603C, Fisher Scientific Canada), pH 7.4 pour une durée de 30-45 minutes dans un bain d'eau à 37°C avec agitation. La solution est ensuite filtrée à l'aide d'une membrane de nylon ayant des pores de 250µm. Les débris de tissu restant sont digérés et filtrés à nouveau de la même façon. Ces suspensions cellulaires sont ensuite centrifugées à 200\*g (force gravitationnelle) pour 10min Les adipocytes matures flottant ainsi que la

solution d'incubation sont aspirés et jetés tandis que les cellules sédimentées sont resuspendues 10 min à température de la pièce dans un tampon composé de 154 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 mM  $\text{KHCO}_3$  et 0.1 mM EDTA afin de lyser les érythrocytes. Cette étape est importante afin d'éliminer les cellules rouges qui affectent l'adhésion ainsi que la prolifération des préadipocytes. Suite à une autre centrifugation, la fraction cellulaire (culot) est resuspendue dans 10mL de médium Dulbecco's Modified Eagle's/Ham's F-12 medium (DMEM F-12) (Cat# SH3002301, Fisher Scientific Canada). Ce matériel est encore une fois filtré à l'aide d'une membrane de nylon dont les pores sont maintenant de 70 $\mu\text{m}$ . Le filtrat est lavé à deux reprises et centrifugé à nouveau. Le culot contenant les préadipocytes est habituellement resuspendu dans une solution DMEM F-12 supplémentée de 10% de sérum bovin fœtal et distribué à l'intérieur de plaques afin d'initier la culture *in vitro*.

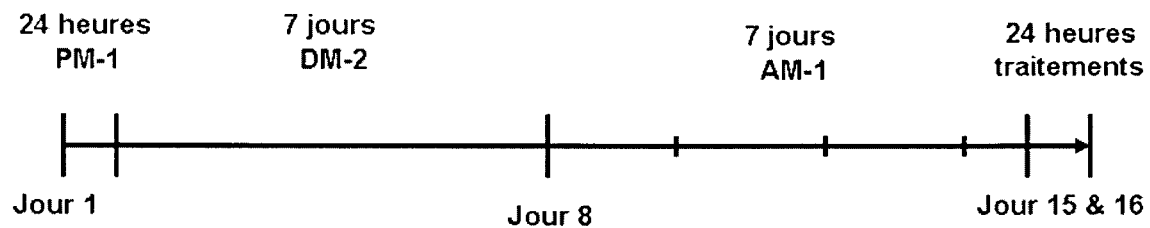
Suite à la réception des préadipocytes, ces derniers sont transférés dans l'azote liquide. Les manipulations menant à la différenciation sont décrites ci-dessous et respectent les directives fournies par le fournisseur ZenBio. Toutes ces manipulations se déroulent dans l'enceinte d'un cabinet de biosécurité. La figure 7 résume les étapes et un descriptif des solutions utilisées est présenté dans le tableau 7.

Lors de la mise en plaque, les préadipocytes furent décongelés dans un bain d'eau à 37°C et ensuite transférés dans un tube conique contenant 10mL de *preadipocyte medium* (Cat# PM-1, ZenBio, États-Unis) et centrifugés 5 minutes à 1200rpm à 20°C. Ensuite, les cellules ont été resuspendues dans 24mL de *preadipocyte medium* frais et distribuées à

une densité de  $\sim 43\,500$  cellules/cm<sup>2</sup> (0.5mL/puits) dans des plaques de 48 puits (Cat# CS003548, Fisher Scientific, Canada) et incubées à 37°C, 5%CO<sub>2</sub> pour 24 h.

Afin d'initier la différenciation, le média fut remplacé par 0.5mL d'*adipocyte differentiation medium* (Cat# DM-2, ZenBio, États-Unis) et incubé pour une période de 7 jours. Ce médium contient des agents capables d'induire la différenciation tel un agoniste de PPAR $\gamma$ .

Une fois la différenciation bien initiée, elle fut maintenue pour une période supplémentaire de 7 jours en substituant 0.3mL du *differentiation medium* pour 0.4mL du *adipocyte medium* (Cat# AM-1, ZenBio, États-Unis) similaire au précédent mais ne contenant pas d'agents stimulant la différenciation. Ce médium fut remplacé (0.3mL pour 0.3mL) aux 2 jours pour la totalité de cette période de 7 jours. À la fin de cette période, les cellules contiennent des gouttelettes de lipides (Figure 8) et expriment la LPL ainsi que la Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) et sont alors considérées différenciées (135, 139, 140) et prêtes à être exposées à différentes conditions.



**Figure 7. Ligne de temps représentant la culture de préadipocytes humains menant à leur différenciation.** PM-1, *preadipocyte medium*; DM-2, *differentiation medium*; AM-

1, *adipocyte medium*. Le média AM-1 fut remplacé à tous les 2 jours (indiqué par une petite ligne).

**Tableau 7 : Composition des solutions utilisées lors de la culture primaire de préadipocytes humains**

Composé	PM-1	DM-2	AM-1	Description
DMEM/Ham's F-12 (1 :1, v/v)	X	X	X	Médium de culture cellulaire utilisé afin de maintenir les cellules en culture contenant l'essentiel c'est-à-dire des sels, vitamines, glucose ainsi qu'acides aminés.
HEPES pH 7.4	X	X	X	Un composé chimique ayant une capacité tampon. Il est ajouté au médium afin de garder un pH stable.
sérum bovin fœtal	X	X	X	Ajouté au milieu du à sa grande concentration et variété protéique, tel des facteurs de croissance, permettant aux cellules de survivre et de grandir.
Biotine (vitamine B <sub>7</sub> )		X	X	Vitamine essentielle à la croissance cellulaire ainsi qu'à la synthèse d'acides gras.
acide pantothénique (vitamine B <sub>5</sub> )		X	X	Vitamine essentielle à la synthèse d'acides gras.
Insuline humaine		X	X	Nécessaire afin de permettre l'entrée du glucose.
Dexaméthasone		X	X	Augmente l'expression du facteur de transcription C/EBP- $\delta$ favorisant ainsi la différenciation adipocytaire (141, 142).
Isobutylmethylxanthine (IMX)		X		Augmente l'expression du facteur de transcription C/EBP- $\beta$ favorisant ainsi la différenciation adipocytaire (141, 143).
Agoniste du PPAR $\gamma$		X		Permet l'initiation de la différenciation adipocytaire (144).
Pénicilline	X	X	X	Antibiotiques utilisés pour restreindre les contaminations.
Streptomycine	X	X	X	
Amphotéricyne B	X	X	X	

### 3.2. Préparation des solutions d'acides gras et des contrôles

Le DHA (Cat# D2534, Sigma-Aldrich, Canada), l'EPA (Cat# E2011, Sigma-Aldrich, Canada) ainsi que l'acide palmitique (PA) (Cat# P0500, Sigma-Aldrich, Canada) ont été dilués avec de l'éthanol 99% à une concentration de 0.2M. Cette solution a ensuite été diluée 1/25 dans une solution 20% d'albumine de sérum bovin dépourvue d'acides gras dans une solution tampon phosphate saline (PBS) (Cat# SH30256FS, Fisher Scientific, Canada) à 60°C avec mixtion. Cette solution a par la suite été ajoutée aux solutions de traitements (*adipocyte medium*) respectives afin d'obtenir une concentration finale de 125µM d'acide gras. À titre de contrôle, la même quantité de la solution 20% d'albumine de sérum bovin a été ajoutée à toutes autres conditions ne contenant pas d'acide gras

La troglitazone (Cat# T2573, Sigma-Aldrich, Canada) et l'inhibiteur PPAR $\gamma$ , GW9662, (Cat# 70785, Cayman Chemical, États-Unis) ont été dilués dans un premier temps avec du DMSO (Cat# D8418, Sigma-Aldrich, Canada) et ajoutés aux solutions de traitements à des concentrations de 10 et 50µM respectivement. Chacun des 8 traitements (contrôle, troglitazone, troglitazone+GW9662, PA, DHA, DHA+GW9662, EPA et EPA+GW9662) a été répété 6 fois et ce, pour une durée de 24 h. Une exposition de 48h à ces traitements a également été effectuée.

### 3.3. Analyses d'adiponectine

Les concentrations d'adiponectine ont été mesurées à l'aide d'un 'kit' Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) commercialement disponible (Cat# EZHADP-61K, Millipore) en suivant les directives du fournisseur. Il convient de noter que les échantillons récoltés n'ont pas été dilués, tel que suggéré par le fournisseur. La sensibilité du kit s'étendait de 1.563-100 ng/mL. Les concentrations ont été déterminées à l'aide d'un lecteur de plaque Synergy HT (Bio-tech, Montreal, Canada) et le logiciel KC4.

Afin de contrôler pour le nombre de cellules contenues dans chacun des puits de culture, les concentrations d'adiponectine furent divisées par la concentration de protéines totales du lysat des préadipocytes différenciés. Les concentrations protéiques furent mesurées à l'aide d'un kit BCA protein assay commercialement disponible (Cat# 23227, Pierce, Rockford IL, USA) en suivant les directives du fournisseur. Les échantillons ont été analysés en duplicata et la valeur moyenne des coefficients de variation était de  $1.71 \pm 2.09\%$ .

### 3.4. Analyse de l'expression du gène de l'adiponectine

#### 3.4.1. Préparation de l'ARN

Suite à une exposition de 24h aux divers traitements, les adipocytes ont été lysés et homogénéisés à l'aide d'un vortex afin d'isoler l'ARN total. L'isolation a été effectuée à l'aide d'une trousse commerciale: RNeasy Plus mini Kit (Cat# 74134, Qiagen,

Mississauga, Canada) en suivant les directives du fournisseur. Les échantillons d'ARN total ont été entreposés à -80°C ou utilisés directement pour la transcription inverse.

#### 3.4.2. Transcription inverse

Suite à la quantification spectrophotométrique de l'ARN total à partir du lecteur de plaque Synergy HT (Bio-tech, Montreal, Canada) et du logiciel KC4, 50ng a été transcrit en ADN complémentaire (ADNc) à partir d'une trousse commerciale: Reverse Transcriptase Omiscript (Cat# 205111, Qiagen, Mississauga, Canada). Les échantillons d'ADNc ont été entreposés à -80°C ou utilisés directement pour la quantification des copies d'ARNm des gènes ciblés.

#### 3.4.3. Quantification des copies d'ARNm par Real time PCR (réaction de polymérase en chaîne en temps réel)

À l'aide du Rotor gene RG-3000 (Biotech, Montreal, Canada), 2 $\mu$ l de la réaction de la transcription inverse (10% de la réaction totale) a été amplifiée par PCR avec le 'kit' Real-Time PCR SYBR Green (Cat#204054, Qiagen, Mississauga, Canada) dans un volume réactionnel total de 25 $\mu$ l en duplicata. Les échantillons ont premièrement été incubés dans le Rotor gene pour l'activation de la HotStarTaq Plus DNA Polymerase à 95°C pour 15 minutes suivi de 40 cycles d'amplification comprenant chacun 15 secondes à 94°C (dénaturation de l'ADNc), 30 secondes à 55°C (hybridation des amorces) et de 30 secondes à 72°C (extension des amorces). Les amorces ont été achetées de la compagnie

'QuantiTect Primer Assay' (Qiagen, Mississauga, Canada) ciblant les gènes d'intérêts comprenant l'adiponectine (Cat# QT00014091) et PPAR $\gamma$  (Cat# QT00029841) ainsi que le gène constitutionnel de la b-actine (Cat# QT01680476). Les données des gènes d'intérêts ont été normalisées à partir des données du gène constitutionnel afin de corriger pour la quantité d'ADNc de chaque réaction.

Des dilutions du produit de la transcription inverse ont été utilisées afin de faire les courbes standards des gènes d'adiponectine, PPAR $\gamma$  et b-actine. Ces dilutions ont été amplifiées simultanément avec les échantillons à partir de la même méthode Real-Time PCR.

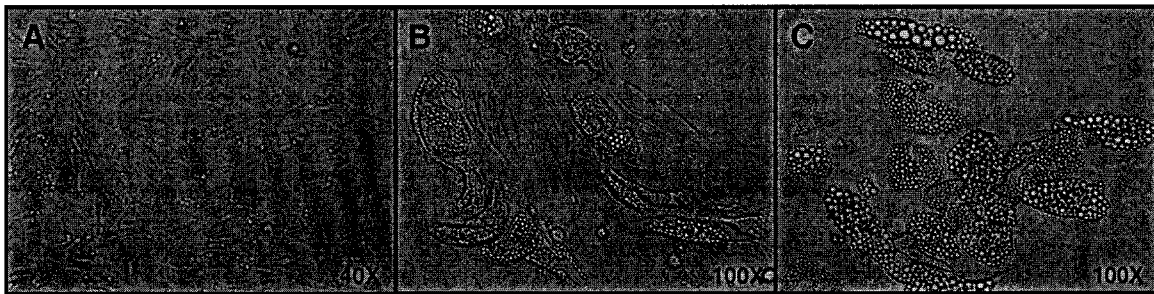
La spécificité de l'amplification a été déterminée par l'analyse de la courbe de dénaturation (lent réchauffement des échantillons jusqu'à 95°C tout en mesurant constamment la fluorescence). Les produits de réaction ne démontrant qu'un seul pic dans le profil de leurs courbes de dénaturation a indiqué la spécificité de la réaction.

### 3.5. Analyses statistiques

Les données présentées dans la figure et dans le texte sont exprimées sous forme de données relativement au contrôle  $\pm$  l'écart type. Un niveau de significativité de  $P < 0.05$  a été considéré comme statistiquement significatif. Le T-test non apparié a été utilisé comme test statistique afin de distinguer les différences significatives entre les conditions à l'aide du logiciel Microsoft Office Excel 2003.

### 4.1. Différenciation des préadipocytes humains

La figure 8 démontre l'évolution de la différenciation des préadipocytes humains. À la suite de la mise en plaque, i.e. 24 h, les préadipocytes présentent une morphologie fibroblastique (Figure 8A). La progression de la différenciation est apparente par l'apparition de gouttelettes lipidiques aux environs de 7 jours suivant l'initiation de la différenciation (Figure 8B). Les gouttelettes lipidiques occupent un espace encore plus important 2 semaines après initiation de la différenciation (Figure 8C) où le processus de différenciation est complété (135, 139, 140).

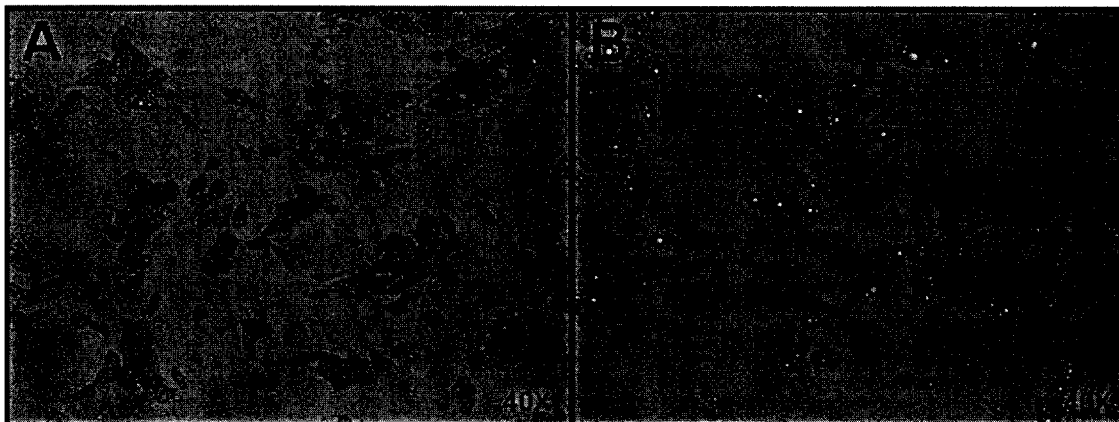


**Figure 8. Morphologie de préadipocytes humains lors du processus de différenciation.** Après la mise en plaque des cellules à une densité de  $\sim 43\,500$  cellules/cm<sup>2</sup> dans un milieu de culture (Cat# PM-1, ZenBio, États-Unis) contenant du sérum pour une période de 24 h, les cellules ont été exposées à un milieu de différenciation (Cat# DM-2, ZenBio, États-Unis) contenant un agoniste du PPAR $\gamma$ , IMX et de l'insuline pour 7 jours. A) Cellules au jour 1; B) 7 et C) 14 de la période de différenciation.

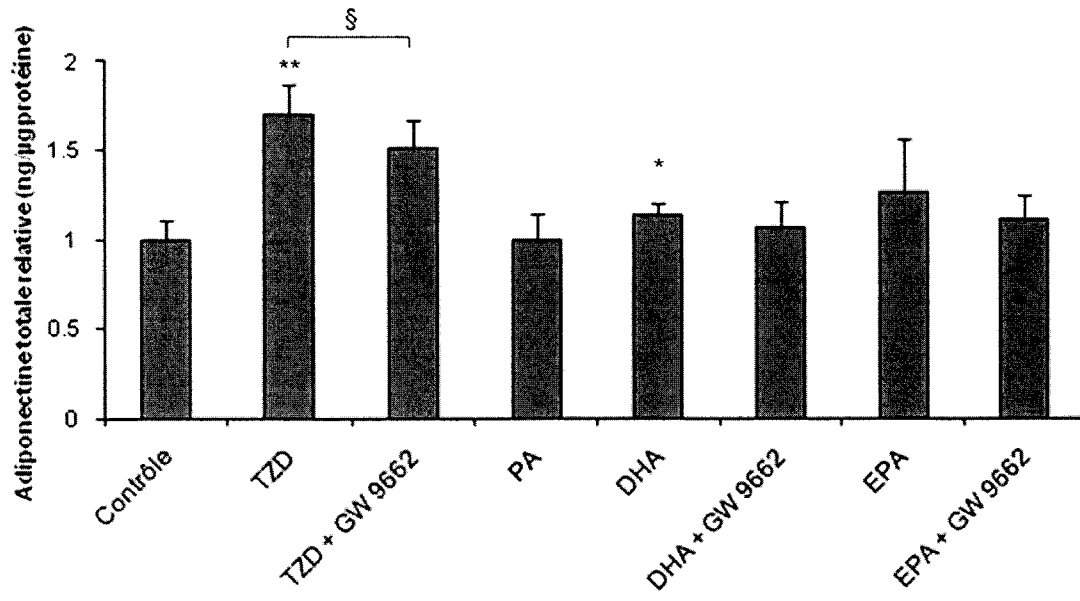
#### 4.2.1. Adiponectine, effets des AGPI n-3 LC

L'effet des AGPI n-3 LC sur la morphologie des adipocyte est présenté à la Figure 9. Comparativement à la condition contrôle (Figure 9A), les adipocytes ayant été exposés à 125 $\mu$ M d'EPA apparaissent plus petite (figure 9B).

La figure 10 illustre les concentrations d'adiponectine relative à la situation contrôle mesurées dans le milieu de culture des adipocytes exposés à divers traitements de durée de 24 h. L'ajout de l'agoniste PPAR $\gamma$  (troglitazone) au milieu de culture a entraîné une augmentation significative des concentrations d'adiponectine ( $0.43\pm 0.03$  ng/ $\mu$ g vs du contrôle  $0.25\pm 0.05$  ng/ $\mu$ g, ( $P < 0.0001$ ) c'est-à-dire 1.8 fois plus élevée. Une augmentation des concentrations d'adiponectine a aussi été observée lors de l'exposition des cellules à la condition DHA ( $0.19\pm 0.02$  à  $0.22\pm 0.01$  ng/ $\mu$ g,  $P < 0.05$ ). Une augmentation des concentrations d'adiponectine a aussi été dénotée lors de l'exposition à la condition EPA ( $0.19\pm 0.02$  à  $0.24\pm 0.06$  ng/ $\mu$ g,  $P = 0.09$ ). Cette augmentation n'a cependant pas atteint les niveaux de significativité. Aucune augmentation au niveau des concentrations d'adiponectine n'a été observée sous l'exposition au PA. Il convient de mentionner qu'une exposition de 48 h aux différentes conditions expérimentales n'a pas mené à une amplification de l'effet des AGPI n-3 LC sur les concentrations d'adiponectine observé suite à l'exposition de 24h (données non présentées). Il est aussi important de noter que des signes d'apoptose ont été observés visuellement suites à l'exposition de 48h aux AGPI n-3 LC.



**Figure 9. Morphologie des adipocytes contrôls vs. exposés aux AGPI n-3 LC pour 24h.** Suite à 2 semaines après initiation de la différentiation, le media (Cat# AM-1, ZenBio, États-Unis) a été remplacé par les solutions de traitements pour 24h. A) Control et B) EPA 125µM .



**Figure 10. Niveaux d'adiponectine relatifs d'adipocytes humains suite à 24 heures d'exposition à diverses conditions.** TZD, thiazolidinediones (troglitazone); PA, acide palmitique; DHA, acide docosahexaénoïque; EPA, acide eicosapentaénoïque. Les adipocytes une fois différenciés furent exposés soit à 125μM d'acide gras, 10 μM de troglitazone en présence ou non de 50 μM de GW9662 pour 24 h. \* P<0.05, \*\* P<0.0001 vs contrôle; § P<0.05 vs GW9662 respectif.

#### 4.2.2. Adiponectine, effet de l'inhibiteur PPAR $\gamma$

Dans le but de préciser si l'induction des concentrations d'adiponectine suite à une exposition aux AGPI n-3 LC découle de l'intermédiaire du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ , un inhibiteur du PPAR $\gamma$ , le GW9662, a été utilisé. Cet inhibiteur a entraîné une diminution partielle de l'augmentation des concentrations d'adiponectine induite par la condition TZD ( $0.43\pm 0.03$  à  $0.38\pm 0.04$ , ( $P < 0.05$ )) (Figure 10). Une diminution partielle mais non significative des concentrations d'adiponectine fut aussi observée pour les traitements DHA+GW9662 (diminution de 5.8%) et EPA+GW9662 (12.2%).

#### 4.3. Effet des AGPI n-3 LC sur l'expression du gène de l'adiponectine

Afin de renforcer les liens entre les AGPI n-3 LC, l'activation du PPAR $\gamma$  et l'augmentation conséquente de l'expression du gène de l'adiponectine, nous avons tenté de quantifier le nombre de transcrits (ARNm) de l'adiponectine ainsi que du PPAR $\gamma$ . Cependant, le nombre de transcrits d'adiponectine présents dans les échantillons d'ARN totaux n'atteignant pas le seuil de détection a rendu impossible de quantifier cette variable.

Les lipides contribuent à diverses fonctions au niveau de la physiologie humaine :

a) ils constituent une source de substrats énergétiques et une composante structurale au niveau cellulaire; b) ils interviennent à titre de régulateur de l'expression de gènes qui modulent le métabolisme des lipides et des hydrates de carbones (113). Parmi cette grande famille des lipides, les acides gras modulent le métabolisme cellulaire de façon spécifique selon leur structure et métabolisme. Il est maintenant bien reconnu qu'en plus de ses fonctions d'entreposage des lipides, le tissu adipeux présente des propriétés endocrines via les différentes protéines qu'ils sécrètent. Un intérêt particulier a été dévolu au cours de la dernière décade à une protéine sécrétée par le tissu adipeux, l'adiponectine. Cette protéine aux effets insulino-sensibilisateurs au niveau hépatique (19) est d'ailleurs faiblement exprimée au niveau circulatoire ou tissulaire chez des individus diabétiques (16). Il est maintenant bien accepté que les concentrations plasmatiques d'adiponectine augmentent en réponse à un traitement aux agonistes du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ , les thiazolidinediones (121). Cependant, le mécanisme soutenant la régulation de cet effet n'est toujours pas clairement défini. Plusieurs études ont aussi rapporté l'effet d'agonistes naturels du PPAR $\gamma$ , les AGPI n-3 LC, sur les concentrations plasmatique et l'expression de l'adiponectine (Tableaux 4-6) réalisées à partir d'interventions nutritionnelles chez l'humain (10-14), chez l'animal (11, 20-34) ainsi qu'à partir de traitements *in vitro* avec des cellules 3T3-L1 (11, 35, 36) et des adipocytes isolés de rats (35). Certaines de ces études réalisées chez l'animal (26) ou encore à l'aide de lignées cellulaires murines (35)

on aussi réussi à indiquer l'implication du PPAR $\gamma$  dans le mécanisme expliquant cet effet. À notre connaissance, les effets des AGPI n-3 LC au niveau de cellules adipeuses humaines demeurent inconnus. L'objectif de cette thèse était donc de caractériser les effets des AGPI n-3 LC DHA et EPA sur les niveaux d'adiponectine à l'aide de la culture de préadipocytes humains.

Nos résultats confirment l'effet positif des AGPI n-3 LC sur les niveaux d'adiponectine plasmatiques (10-14). En effet, nous avons observé qu'une concentration de 125 $\mu$ M DHA augmente significativement la sécrétion d'adiponectine de 0.19 $\pm$ 0.02 à 0.22 $\pm$ 0.01 ng/ $\mu$ g, c'est-à-dire une augmentation d'environ 13.6% (P<0.05) suite à une exposition de 24 h. Similairement, une exposition de 24 h de 125 $\mu$ M EPA a mené à une augmentation des concentrations d'adiponectine dans le milieu de culture de 0.19 $\pm$ 0.02 à 0.24 $\pm$ 0.06 ng/ $\mu$ g (26.2%). Cette augmentation n'a toutefois pas atteint les niveaux de significativité (P = 0.09) (Figure 10). L'augmentation des niveaux d'adiponectine par le traitement au DHA concorde avec les interventions nutritionnelles réalisées chez l'humain (10-14), ainsi que les études animales (11, 20-34) ayant noté des niveaux d'adiponectine plus élevés suite à divers traitements aux AGPI n-3 LC. Plus précisément, au niveau *in vitro*, Banga *et al.* (2009) ont aussi démontré que l'exposition d'adipocytes isolés de rats à seulement 25 $\mu$ M de DHA et EPA pour une période de 24 h s'accompagne d'une augmentation des niveaux d'adiponectine d'environ 250 et de 150 % respectivement (35). À l'aide de préadipocytes différenciés de nature murine, Robinson *et al.* (2007) ont aussi étudié l'effet de 125 $\mu$ M DHA et EPA sur les niveaux d'adiponectine de cellules différenciées 3T3-L1, résultant à une augmentation de 102 et

44% respectivement suite à une exposition de 24 h (36). L'écart entre l'amplitude des augmentations des niveaux d'adiponectine de ces études et celles de la présente thèse mérite d'être souligné. À titre spéculatif, il est possible que ces différences soient dues aux différents types de cellules utilisées. Dans le cas de l'étude de Robinson *et al.* (2007), les cellules utilisées étaient des cellules 3T3-L1. Ces cellules sont issues d'une lignée murine et sont aussi cancérogènes. Cette dernière caractéristique fait en sorte qu'elles se prolifèrent plus rapidement (124, 134) et présentent des taux métaboliques plus élevés que les préadipocytes humains différenciés. À un traitement donné, il est donc possible que la réponse cellulaire soit accrue.

Malgré que l'augmentation de 26.2%, (P=0.09) observé suite au traitement EPA sur les niveaux d'adiponectine soit supérieure à l'augmentation observée suite au traitement au DHA (13.6%, P<0.05), l'effet de cet AGPI n-3 LC n'était pas significatif (Figure 10). Une autre étude menée avec des cellules 3T3-L1 rapporte aussi une augmentation non significative dans les niveaux d'adiponectine suite à l'exposition de 200 µM de EPA (11). Les résultats de notre étude et ceux de Itoh *et al.* (2007) abondent malgré tout dans la même direction que les études réalisées chez l'humain (10-14), chez l'animal (11, 20-34) ainsi que les études qu'*in vitro* effectuées avec des cellules 3T3-L1 (11, 35, 36) et des adipocytes isolés de rats (35). La différence entre l'effet plus prononcé du DHA comparativement à l'EPA est sûrement due à la différence de longueurs et insaturations entre ces acides gras leur donnant différentes capacités de liaisons à l'intérieur de la poche hydrophobe du LBD du PPAR $\gamma$ . L'étude de Robinson *et al.* qui démontre aussi les effets de DHA et EPA individuellement sur les niveaux

d'adiponectine à partir de cellules 3T3-L1 indique que le DHA à une activité plus importante que le EPA en ce qui concerne la capacité d'augmentation de la sécrétion d'adiponectine (40% plus DHA pour que EPA) et que seul le DHA réussissait à augmenter son expression (36). Cette tendance est d'ailleurs aussi retrouvée dans l'étude de Banga *et al.* (35) où une augmentation d'environ 250% dans les niveaux d'adiponectine est notée suite au traitement avec DHA et seulement de 150% pour EPA. Dans l'ensemble, ces divers travaux supportent que l'effet positif de l'EPA au niveau des concentrations et/ou l'expression de l'adiponectine.

Étant donné que les augmentations dans les niveaux d'adiponectine en réponse au DHA et EPA étaient moindres au sein de notre étude que celles rapportées dans les études effectuées avec des cellules 3T3-L1 (36) ou des adipocytes isolés de rats (35), nous avons étudié l'effet d'une exposition prolongée (i.e. 48 h) de nos conditions expérimentales. L'exposition de 48 h des préadipocytes différenciés au DHA ou EPA a entraîné la mort cellulaire (apoptose). Ceci corrobore les résultats récemment rapportés d'une étude supportant que les AGPI n-3 LC puissent causer l'apoptose des adipocytes chez le rat (25) affectant conséquemment la production d'adiponectine. Nos résultats supportent ce phénomène alors qu'une exposition aux différents acides gras utilisés supérieure à 24h s'accompagnait de signes apparents d'apoptose cellulaire, i.e. fragmentation des membranes cellulaires et détachement des cellules à la matrice). Dans l'ensemble donc, nous pouvons écarter la possibilité qu'une exposition prolongée des préadipocytes différenciés humains à une concentration de 125 $\mu$ M d'AGPI n-3 LC puisse augmenter les concentrations de l'adiponectine au-delà des valeurs observées.

Il s'avère toujours délicat de transposer des résultats *in vitro* au contexte de la vie réelle. Tout de même, il convient de souligner qu'une augmentation de 13,6% des concentrations d'adiponectine, telle qu'observée suite à l'exposition des adipocytes différenciés en réponse à l'exposition au DHA, corrobore les résultats issus de différentes interventions cliniques. L'effet chronique des AGPI n-3 LC chez les humains via la prise de suppléments (11-13) ou d'une modification de la diète (14) s'accompagne d'une augmentation des concentrations plasmatiques d'adiponectine pouvant varier de 15-60%. Une telle augmentation est non négligeable puisqu'en général, sans l'appui de médication spécifique, une perte pondérale d'environ 10% est requise pour entraîner une augmentation des concentrations plasmatiques d'adiponectine de l'ordre de 15% chez l'humain (145). La majorité des études cliniques réalisées avec la prise de suppléments procurant de 2 à 4g d'AGPI n-3 LC par jour s'échelonnaient de 3 à 6 mois. Afin d'obtenir de telles doses d'AGPI n-3 LC, il faudrait théoriquement consommer 14 à 28 portions de 100g de poisson par semaine (Tableau 3). Cette consommation significative de poisson présente certains risques à l'exposition de contaminants environnementaux tel le méthylmercure (146), un composé chimique dont un excès peut causer des complications au niveau cardiovasculaire (147) ainsi que des déficits développementaux auprès d'enfants (148). Ceci dit, dans le but d'augmenter l'adiponectine via les AGPI n-3 LC, il serait préférable d'utiliser les suppléments d'huiles de poisson purifiées comme source d'AGPI n-3 LC au lieu d'augmenter la consommation de poisson et d'éviter les effets défavorables à long terme du méthylmercure.

Aucune augmentation des concentrations d'adiponectine dans le milieu de culture n'a été dénotée suite à l'exposition de 125  $\mu\text{M}$  d'PA (Figure 10). Cette observation a également été rapportée au sein d'études réalisées avec des cellules 3T3-L1 (36) et des adipocytes isolés de rats suite à une exposition à 25  $\mu\text{M}$  d'PA pour 4 et 24 h (35). Nos résultats renforcent ainsi l'effet spécifique des AGPI n-3 LC sur l'adiponectine au niveau des préadipocytes humains différenciés.

Nous démontrons aussi que l'inhibiteur du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ , GW9662, en combinaison avec les AGPI n-3 LC n'inhibe pas significativement l'augmentation des concentrations d'adiponectine mesurées dans le milieu de culture en réponse aux AGPI n-3 LC. En effet, seule une diminution partielle et non significative des niveaux d'adiponectine au sein des conditions DHA + GW9662 (5.8%,  $P=0.33$ ) et EPA + GW9662 (12.2%,  $P=0.29$ ) a été observée. Le choix de cet inhibiteur PPAR $\gamma$  (GW9662) repose sur plusieurs études démontrant son efficacité (35, 149). Nous avons aussi sélectionné ce dernier au lieu de l'autre inhibiteur PPAR $\gamma$  disponible, BADGE, puisque le GW9662 est beaucoup plus spécifique (150). Suite à l'inhibition de PPAR $\gamma$  par GW9662, seule une diminution partielle des niveaux d'adiponectine augmentés par la troglitazone fut observée. C'est-à-dire que l'on ne remarque seulement qu'une diminution de 13.9% ( $P<0.05$ ) indiquant que l'inhibiteur n'était pas assez puissant pour inhiber à 100% l'activité du PPAR $\gamma$ . De cette observation, on explique possiblement pourquoi la diminution d'adiponectine n'est pas significative suite à l'addition de l'inhibiteur. Malgré ce fait, vu que la diminution par l'inhibiteur des niveaux d'adiponectine augmentés par les AGPI n-3 LC n'était pas complète, c'est-à-dire du moins retournée à la valeur du

contrôle, il n'est pas possible d'éliminer la possibilité que l'augmentation dans les niveaux d'adiponectine par les AGPI n-3 LC ne se produise par un autre mécanisme que le celui du PPAR $\gamma$ . Cependant, de fortes évidences illustrent bien l'importance du rôle de ce récepteur dont l'étude de Banga *et al.* (2009) qui démontre les niveaux d'adiponectine revenant similaire à celle du contrôle des cellules de rats exposés à 25 $\mu$ M DHA et EPA lorsque inhibé avec 1.5  $\mu$ M de GW9662 (35). Une autre étude, menée avec des souris (26), démontre aussi un retour au niveau du contrôle des niveaux augmentés par les AGPI n-3 LC lorsque traités simultanément avec BADGE. Ces résultats indiquant clairement le rôle de PPAR $\gamma$  dans l'augmentation de la sécrétion d'adiponectine produite par les AGPI n-3 LC. Peut-être une concentration supérieure à 50 $\mu$ M de GW9662 serait nécessaire afin d'inhiber complètement l'effet de 125 $\mu$ M des AGPI n-3 LC et de 10 $\mu$ M de troglitazone sur les niveaux d'adiponectine observés spécifiquement chez les préadipocytes différenciés humains.

En conclusion, nos résultats démontrent qu'une exposition de préadipocytes humains différenciés aux acides gras à longue chaîne de la famille n-3 contribue à l'augmentation des concentrations d'adiponectine dans le milieu de culture. D'un point de vue mécanistique, nos résultats démontrent que l'effet positif entraîné par les n-3 au niveau de la sécrétion d'adiponectine est en partie causé par l'intermédiaire des récepteurs nucléaires PPAR $\gamma$ . Considérant les propriétés antiathérogénique, antidiabétique et anticarcinogénique bien reconnues de l'adiponectine, nos résultats soutiennent donc les effets bénéfiques pouvant découler d'une consommation d'aliments à haute teneur en AGPI n-3 LC.

## CHAPITRE 6 : PERSPECTIVES FUTURES

---

Cette étude a permis de démontrer que l'exposition d'AGPI n-3 LC tel le DHA et l'EPA au niveau de préadipocytes humains différenciés entraîne une augmentation de la sécrétion de l'adiponectine. Les travaux de cette thèse ont également permis de démontrer qu'un mécanisme potentiel pouvant expliquer l'augmentation de l'adiponectine observée suite à une exposition aux AGPI n-3 LC peut découler de l'intermédiaire du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ .

Suite à l'inhibition du PPAR $\gamma$  par GW9662, les concentrations d'adiponectine augmentées par l'agoniste PPAR $\gamma$  n'ont été diminuées que de 11.0% (Figure 10). Ceci démontre que l'inhibiteur n'était pas assez spécifique pour inhiber complètement l'activité du PPAR $\gamma$ . Il est alors juste de croire que l'inhibiteur n'était pas suffisamment spécifique dans les conditions contenant simultanément les AGPI n-3 LC. Les diminutions non significatives des conditions contenant l'inhibiteur (DHA+GW9662 et DHA+GW9662) comparativement à celles des AGPI n-3 LC, ne reflètent donc pas nécessairement que l'adiponectine soit augmentée via un autre mécanisme que PPAR $\gamma$ . Afin de démontrer l'implication du PPAR $\gamma$  dans l'augmentation des concentrations d'adiponectine par les AGPI n-3 LC avec plus de certitude, certaines modifications devraient être apportées à l'inhibiteur afin d'optimiser l'inhibition de l'activité du PPAR $\gamma$ . Premièrement, une plus grande concentration de GW9662 pourrait

potentiellement réussir à inhiber PPAR $\gamma$  avec plus de succès. L'essai d'un autre inhibiteur du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  pourrait également être mis à l'essai (108).

Le domaine lieur aux ligands (LBD) du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  étant composé d'une poche hydrophobe, se lie facilement et est activé par plusieurs AG (4, 132). Une fois activé, son domaine lieur à l'ADN (DBD) se lierait à plusieurs promoteurs contenant le PPRE permettant le début leurs transcriptions (129) expliquant, dans le cas de l'adiponectine, l'augmentation de ses concentrations plasmatiques. Plusieurs des études animales ou *in vitro* (tableaux 5 et 6) ayant observé l'effet des AGPI n-3 LC sur l'adiponectine ont aussi mesuré les effets sur l'expression du gène adiponectine; la majorité rapportant une augmentation (11, 20, 21, 25-27, 30, 36), aucun effet (11, 24, 26, 35) ou une diminution (11, 124, 125). En ce qui a trait à notre étude, il n'a pas été possible de quantifier l'expression de l'adiponectine à partir des adipocytes humains. Le nombre de transcrits étant minime ou inférieur au seuil de détection peut être en cause. Le taux métabolique plus lent des adipocytes humains (comparativement à celui des 3T3-L1 et de nature murine) pourrait expliquer la raison pour laquelle le nombre de transcrit n'a pas été quantifiable. Il serait alors pertinent de quantifier les transcrits de l'adiponectine au niveau des préadipocytes humains différenciés pour une période supérieure à 2 semaines. Ces données obtenues à partir de préadipocytes humains différenciés permettraient de confirmer avec plus de certitude que l'effet des AGPI n-3 LC sur les concentrations d'adiponectine est effectivement à la base de sont expression génique et sous la régulation de PPAR $\gamma$ .

Une des fonctions biologiques principales de l'adiponectine réside dans sa capacité sensibilisatrice à l'insuline. Ses effets sont remarquables au niveau du foie et du muscle squelettique, deux organes grandement impliqués dans l'homéostasie du glucose. Premièrement, par l'entremise du PPAR $\alpha$ , l'adiponectine régule l'expression de gènes favorisant l'oxydation d'acides gras au niveau du muscle squelettique (113, 115) et du foie (113). Aussi, en activant une autre enzyme, l'AMPK, l'adiponectine augmente le recrutement des GLUT4 à la membrane des cellules du muscle squelettique (113) et diminue la production de glucose hépatique (117). Un autre tissu impliqué dans l'homéostasie du glucose est le tissu adipeux. Il serait alors pertinent de vérifier si la captation du glucose est améliorée chez les préadipocytes différenciés humains dont les concentrations d'adiponectine sont augmentées par les traitements aux AGPI n-3 LC. Ceci fut d'ailleurs observé à l'aide de cellules 3T3-L1 (134).

Finalement, les individus pouvant bénéficier des notions justifiées par cette étude sont particulièrement les gens obèses ayant des niveaux d'adiponectine plus faibles que la norme ou bien ayant déjà développé une résistance à l'insuline, vu les propriétés insulino-sensibilisatrices de l'adiponectine. Cependant, notre étude fut réalisée avec des préadipocytes provenant d'hommes et de femmes ayant un IMC inférieur à 24.9. Il serait donc plus approprié d'utiliser des adipocytes isolés d'individus démontrant des complications afin de déterminer si les AGPI n-3 LC ont les mêmes capacités d'induction de la sécrétion d'adiponectine sur celles-ci.

## CHAPITRE 7 : RÉFÉRENCES

---

1. Clarke SD. Dietary polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. *Annu Rev Nutr* 1994; **14**: 83.
2. Jump DB, Clarke SD, Thelen A, Liimatta M, Ren B, Badin M. Dietary polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. *Prog Lipid Res* 1996; **35**: 227.
3. Göttlicher M, Widmark E, Li Q, Gustafsson JA. Fatty acids activate a chimera of the clofibrilic acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89**: 4653.
4. Kliewer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble CS, et al. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94**: 4318-4323.
5. Himsworth HP. Dietetic factors influencing the glucose tolerance and the activity of insulin. *J Physiol* 1934; **81**: 29-48.
6. Marshall JA, Bessesen DH, Hamman RF. High saturated fat and low starch and fibre are associated with hyperinsulinaemia in a non-diabetic population: The San Luis Valley Diabetes Study. *Diabetologia* 1997; **40**: 430.

7. Parker DR, Weiss ST, Troisi R, Cassano PA, Vokonas PS, Landsberg L. Relationship of dietary saturated fatty acids and body habitus to serum insulin concentrations: The normative aging study. *Am J Clin Nutr* 1993; **58**: 129.
8. Maron DJ, Fair JM, Haskell WL. Saturated fat intake and insulin resistance in men with coronary artery disease. *Circulation* 1991; **84**: 2020.
9. Storlien LH, Kraegen EW, Chisholm DJ, Ford GL, Bruce DG, Pascoe WS. Fish oil prevents insulin resistance induced by high-fat feeding in rats. *Science* 1987; **237**: 885.
10. Siahianidou T, Margeli A, Lazaropoulou C, Karavitakis E, Papassotiriou I, Mandyla H. Circulating adiponectin in preterm infants fed Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids (LCPUFA)-supplemented formula - A randomized controlled study. *Pediatr Res* 2008; **63**: 428.
11. Itoh M, Suganami T, Satoh N, Tanimoto-Koyama K, Yuan X, Tanaka M, et al. Increased adiponectin secretion by highly purified eicosapentaenoic acid in rodent models of obesity and human obese subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; **27**: 1918-1925.
12. Nomura S, Shouzu A, Omoto S, Inami N, Ueba T, Urase F, Maeda Y. Effects of eicosapentaenoic acid on endothelial cell-derived microparticles, angiopoietins and adiponectin in patients with type 2 diabetes. *J Atheroscler Thromb* 2009; **16**: 83.
13. Krebs JD, Browning LM, McLean NK, Rothwell JL, Mishra GD, Moore CS, Jebb SA. Additive benefits of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and weight-loss in the

management of cardiovascular disease risk in overweight hyperinsulinaemic women. *Int J Obes* 2006; **30**: 1535.

14. Guebre-Egziabher F, Rabasa-Lhoret R, Bonnet F, Bastard JP, Desage M, Skilton MR, Vidal H, Laville M. Nutritional intervention to reduce the n-6/n-3 fatty acid ratio increases adiponectin concentration and fatty acid oxidation in healthy subjects. *Eur J Clin Nutr* 2008; **62**: 1287.

15. Das K, Lin Y, Widen E, Zhang Y, Scherer PE. Chromosomal localization, expression pattern, and promoter analysis of the mouse gene encoding adipocyte-specific secretory protein Acrp30. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **280**: 1120-1129.

16. Hotta K, Funahashi T, Bodkin NL, Ortmeyer HK, Arita Y, Hansen BC, et al. Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes* 2001; **50**: 1126-1133.

17. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **257**: 79-83.

18. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, et al. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 1999; **100**: 2473-2476.

19. Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 2001; **7**: 947-953.
20. Duda MK, O'shea KM, Lei B, Barrows BR, Azimzadeh AM, McElfresh TE, et al. Dietary supplementation with omega-3 PUFA increases adiponectin and attenuates ventricular remodeling and dysfunction with pressure overload. *Cardiovasc Res* 2007; **76**: 303-310.
21. Todoric J, Loffler M, Huber J, Bilban M, Reimers M, Kadl A, et al. Adipose tissue inflammation induced by high-fat diet in obese diabetic mice is prevented by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Diabetologia* 2006; **49**: 2109-2119.
22. Tandy S, Chung RW, Wat E, Kamili A, Berge K, Griinari M, Cohn JS. Dietary krill oil supplementation reduces hepatic steatosis, glycemia, and hypercholesterolemia in high-fat-fed mice. *J Agric Food Chem* 2009; **57**: 9339.
23. Shirouchi B, Nagao K, Inoue N, Ohkubo T, Hibino H, Yanagita T. Effect of dietary omega 3 phosphatidylcholine on obesity-related disorders in obese Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. *J Agric Food Chem* 2007; **55**: 7170.
24. Rossi AS, Lombardo YB, Lacorte JM, Chicco AG, Rouault C, Slama G, et al. Dietary fish oil positively regulates plasma leptin and adiponectin levels in sucrose-fed, insulin-resistant rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; **289**: R486-R494.
25. Perez-Matute P, Perez-Echarri N, Martinez JA, Marti A, Moreno-Aliaga MJ. Eicosapentaenoic acid actions on adiposity and insulin resistance in control and high-fat-

fed rats: role of apoptosis, adiponectin and tumour necrosis factor-alpha. *Br J Nutr* 2007; **97**: 389-398.

26. Neschen S, Morino K, Rossbacher JC, Pongratz RL, Cline GW, Sono S, et al. Fish oil regulates adiponectin secretion by a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-dependent mechanism in mice. *Diabetes* 2006; **55**: 924-928.

27. Flachs P, Mohamed-Ali V, Horakova O, Rossmeisl M, Hosseinzadeh-Attar MJ, Hensler M, Ruzickova J, Kopecky J. Polyunsaturated fatty acids of marine origin induce adiponectin in mice fed a high-fat diet. *Diabetologia* 2006; **49**: 394.

28. Kajikawa S, Harada T, Kawashima A, Imada K, Mizuguchi K. Suppression of hepatic fat accumulation by highly purified eicosapentaenoic acid prevents the progression of d-galactosamine-induced hepatitis in mice fed with a high-fat/high-sucrose diet. *Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids* 2009; **1791**: 281.

29. Saraswathi V, Gao L, Morrow JD, Chait A, Niswender KD, Hasty AH. Fish oil increases cholesterol storage in white adipose tissue with concomitant decreases in inflammation, hepatic steatosis, and atherosclerosis in mice. *J Nutr* 2007; **137**: 1776.

30. González-Pérez A, Horrillo R, Ferré N, Gronert K, Dong B, Morán-Salvador E, Titos E, Martínez-Clemente M, López-Parra M, Arroyo V, Clària J. Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by omega-3 fatty acids: a role for resolvins and protectins. *The FASEB journal* 2009; **23**: 1946.

31. Vemuri M, Kelley DS, Mackey BE, Rasooly R, Bartolini G. Docosahexaenoic acid (DHA) but not eicosapentaenoic acid (EPA) prevents trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (CLA)-induced insulin resistance in mice. *Metabolic syndrome and related disorders* 2007; **5**: 315.
32. Shirai N. Effects of simultaneous intakes of fish oil and green tea extracts on plasma, glucose, insulin, C-peptide, and adiponectin and on liver lipid concentrations in mice fed low- and high-fat diets. *Annals of Nutrition Metabolism* 2008; **52**: 241.
33. Kuda O, Jelenik T, Jilkova Z, Flachs P, Rossmeisl M, Hensler M, Kazdova L, Ogston N, Baranowski M, Gorski J, Janovska P, Kus V, Polak J, Mohamed-Ali V, Burcelin R, Cinti S, Bryhn M, Kopecky J. N-3 Fatty acids and rosiglitazone improve insulin sensitivity through additive stimulatory effects on muscle glycogen synthesis in mice fed a high-fat diet. *Diabetologia* 2009; **52**: 941.
34. Neschen S, Morino K, Dong J, Wang-Fischer Y, Cline GW, Romanelli AJ, Rossbacher JC, Moore IK, Regittnig W, Munoz DS, Kim JH, Shulman GI. n-3 Fatty acids preserve insulin sensitivity in vivo in a peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-dependent manner. *Diabetes* 2007; **56**: 1034.
35. Banga A, Unal R, Tripathi P, Pokrovskaya I, Owens RJ, Kern PA, Ranganathan G. Adiponectin translation is increased by the PPARgamma agonists pioglitazone and omega-3 fatty acids. *American journal of physiology: endocrinology and metabolism* 2009; **296**.

36. Robinson L. Docasahexaenoic Acid Upregulates Adiponectin and PPAR $\gamma$  in 3T3-L1 Adipocytes. *Obesity* 2007; **15**: A29.
37. Alberts B, Wilson J, Hunt T. *Biologie moléculaire de la cellule*, Flammarion Md'ecine-Sciences: Paris, 2004.
38. Lunn J, Theobald HE. The health effects of dietary unsaturated fatty acids. *Nutr Bull* 2006; **31**: 178.
39. Anonymous The nomenclature of lipids (recommendations 1976). IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. *J Lipid Res* 1978; **19**: 114-128.
40. Flachs P, Rossmeisl M, Bryhn M, Kopecky J. Cellular and molecular effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on adipose tissue biology and metabolism. *Clin Sci (Lond)* 2009; **116**: 1-16.
41. Panagiotakos DB, Tzima N, Pitsavos C, Chrysohoou C, Zampelas A, Toussoulis D, et al. The association between adherence to the Mediterranean diet and fasting indices of glucose homoeostasis: the ATTICA Study. *J Am Coll Nutr* 2007; **26**: 32-38.
42. Vessby B, Unsitupa M, Hermansen K, Riccardi G, Rivellese AA, Tapsell LC, Nälsén C, Berglund L, Louheranta A, Rasmussen BM, Calvert GD, Maffetone A, Pedersen E, Gustafsson IB, Storlien LH; KANWU Study. Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: The KANWU study. *Diabetologia* 2001; **44**: 312.

43. Soriguer F, Esteve I, Rojo-Martinez G, Ruiz de Adana MS, Dobarganes MC, García-Almeida JM, Tinahones F, Beltrán M, González-Romero S, Olveira G, Gómez-Zumaquero JM. Oleic acid from cooking oils is associated with lower insulin resistance in the general population (Pizarra study). *European journal of endocrinology* 2004; **150**: 33.
44. Feskens EJM. Diet and physical activity as determinants of hyperinsulinemia: The Zutphen Elderly Study. *Am J Epidemiol* 1994; **140**: 350.
45. Hun CS, Hasegawa K, Kawabata T, Kato M, Shimokawa T, Kagawa Y. Increased uncoupling protein2 mRNA in white adipose tissue, and decrease in leptin, visceral fat, blood glucose, and cholesterol in KK-A(y) mice fed with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in addition to linolenic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **259**: 85.
46. Flachs P, Horakova O, Brauner P, Rossmeisl M, Pecina P, Franssen-van Hal N, et al. Polyunsaturated fatty acids of marine origin upregulate mitochondrial biogenesis and induce beta-oxidation in white fat. *Diabetologia* 2005; **48**: 2365-2375.
47. Ruzickova J, Rossmeisl M, Prazak T, Flachs P, Sponarova J, Veck M, Tvrzicka E, Bryhn M, Kopecky J. Omega-3 PUFA of marine origin limit diet-induced obesity in mice by reducing cellularity of adipose tissue. *Lipids* 2004; **39**: 1177.
48. Raclot T, Groscolas R, Langin D, Ferré P. Site-specific regulation of gene expression by n-3 polyunsaturated fatty acids in rat white adipose tissues. *J Lipid Res* 1997; **38**: 1963.

49. Azain MJ. Role of fatty acids in adipocyte growth and development. *J Anim Sci* 2004; **82**: 916.
50. Couet C, Delarue J, Ritz P, Antoine JM, Lamisse F. Effect of dietary fish oil on body fat mass and basal fat oxidation in healthy adults. *Int J Obes* 1997; **21**: 637.
51. Kunesová M, Braunerová R, Hlavatý P, Tvrzická E, Stanková B, Skrha J, Hilgertová J, Hill M, Kopecký J, Wagenknecht M, Hainer V, Matoulek M, Parízková J, Zák A, Svacina S. The influence of n-3 polyunsaturated fatty acids and very low calorie diet during a short-term weight reducing regimen on weight loss and serum fatty acid composition in severely obese women. *Physiological Research* 2006; **55**: 63.
52. Mori TA, Bao DQ, Burke V, Puddey IB, Watts GF, Beilin LJ. Dietary fish as a major component of a weight-loss diet: Effect on serum lipids, glucose, and insulin metabolism in overweight hypertensive subjects. *Am J Clin Nutr* 1999; **70**: 817.
53. Roche HM, Gibney MJ. Effect of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids on fasting and postprandial triacylglycerol metabolism. *Am J Clin Nutr* 2000; **71**: 232S.
54. Friedberg CE, Janssen MJ, Heine RJ, Grobbee DE. Fish oil and glycemic control in diabetes: A meta-analysis. *Diabetes Care* 1998; **21**: 494.
55. Fasching P, Ratheiser K, Waldhäusl W, Rohac M, Osterrode W, Nowotny P, Vierhapper H. Metabolic effects of fish-oil supplementation in patients with impaired glucose tolerance. *Diabetes* 1991; **40**: 583.

56. Marchioli R. Dietary supplementation with N-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: Results of the GISSI-Prevenzione trial. *The Lancet* 1999; **354**: 447.
57. Kris-Etherton . Erratum: Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease (Circulation (2002) 106 (2747-2757)). *Circulation* 2003; **107**: 512.
58. Lombardo YB, Hein G, Chicco A. Metabolic syndrome: Effects of n-3 PUFAs on a model of dyslipidemia, insulin resistance and adiposity. *Lipids* 2007; **42**: 427.
59. Lombardo YB, Chicco AG. Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. A review. *J Nutr Biochem* 2006; **17**: 1.
60. Jucker BM, Cline GW, Barucci N, Shulman GI. Differential effects of safflower oil versus fish oil feeding on insulin-stimulated glycogen synthesis, glycolysis, and pyruvate dehydrogenase flux in skeletal muscle: A <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance study. *Diabetes* 1999; **48**: 134.
61. Simončíkova P, Wein S, Gasperikova D, Ukropec J, Certik M, Klimes I, Sebkova E. Comparison of the extrapancreatic action of gamma-linolenic acid and n-3 PUFAs in the high fat diet-induced insulin resistance [corrected]. *Endocr Regul* 2002; **36**: 143.
62. Delarue J, Couet C, Cohen R, Bréchet JF, Antoine JM, Lamisse F. Effects of fish oil on metabolic responses to oral fructose and glucose loads in healthy humans. *American journal of physiology: endocrinology and metabolism* 1996; **270**: E353.

63. Shils ME. *Modern nutrition in health and disease*, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, 1999.
64. United States. Agricultural Research Service. USDA national nutrient database for standard reference. 2006;.
65. Paul . McCance and Widdowson's 'The composition of foods': supplementary information and review of new compositional data. *Human nutrition.Applied nutrition* 1986; **40**: 287.
66. Simopoulos AP, Leaf A, Salem N Jr. Essentiality of and recommended dietary intakes for omega-6 and omega-3 fatty acids. *Annals of Nutrition Metabolism* 1999; **43**: 127.
67. Kolanowski W, Laufenberg G . Enrichment of food products with polyunsaturated fatty acids by fish oil addition. *European food research and technology* 2006; **222**: 472.
68. Trautwein EA. n-3 Fatty acids - Physiological and technical aspects for their use in food. *European journal of lipid science and technology* 2001; **103**: 45.
69. Kris-Etherton PM, Taylor DS, Yu-Poth S, Huth P, Moriarty K, Fishell V, Hargrove RL, Zhao G, Etherton TD. Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States. *Am J Clin Nutr* 2000; **71**: 179S.
70. Sanders TAB. Polyunsaturated fatty acids in the food chain in Europe. *Am J Clin Nutr* 2000; **71**: 176S.

71. Jump DB, Clarke SD. Regulation of gene expression by dietary fat. *Annu Rev Nutr* 1999; **19**: 63-90.
72. Hauner H. The new concept of adipose tissue function. *Physiol Behav* 2004; **83**: 653-658.
73. Fantuzzi G, Mazzone T. *Adipose tissue and adipokines in health and disease*, Humana Press: Totowa, N.J., 2007.
74. Björntorp, P. Adipose tissue distribution and function. *Int J Obes* 1991; **15 Suppl 2**: 67.
75. Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 1998; **78**: 783.
76. Pairault J, Green H. A study of the adipose conversion of suspended 3T3 cells by using glycerophosphate dehydrogenase as differentiation marker. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; **76**: 5138.
77. Umek RM, Friedman AD, McKnight SL. CCAAT-enhancer binding protein: A component of a differentiation switch. *Science* 1991; **251**: 288.
78. Altiock S, Xu M, Spiegelman BM. PPARgamma induces cell cycle withdrawal: inhibition of E2F/DP DNA-binding activity via down-regulation of PP2A. *Genes development* 1997; **11**: 1987.

79. Entenmann G, Hauner H. Relationship between replication and differentiation in cultured human adipocyte precursor cells. *American journal of physiology. Cell physiology* 1996; **270**: C1011.
80. MacDougald OA, Lane MD. Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu Rev Biochem* 1995; **64**: 345.
81. Mandrup S, Lane MD. Regulating adipogenesis. *The Journal of biological chemistry* 1997; **272**: 5367.
82. Kim JB, Spiegelman BM. ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes development* 1996; **10**: 1096.
83. Spiegelman BM, Farmer SR. Decreases in tubulin and actin gene expression prior to morphological differentiation of 3T3 adipocytes. *Cell* 1982; **29**: 53.
84. Weiner FR, Shah A, Smith PJ, Rubin CS, Zern MA. Regulation of collagen gene expression in 3T3-L1 cells. Effects of adipocyte differentiation and tumor necrosis factor alpha. *Biochemistry (N Y)* 1989; **28**: 4094.
85. Antras J, Hilliou F, Redziniak G, Pairault J. Decreased biosynthesis of actin and cellular fibronectin during adipose conversion of 3T3-F442A cells. Reorganization of the cytoarchitecture and extracellular matrix fibronectin. *Biology of the cell* 1989; **66**: 247.
86. Paulauskis JD, Sul HS. Cloning and expression of mouse fatty acid synthase and other specific mRNAs. Developmental and hormonal regulation in 3T3-L1 cells. *The Journal of biological chemistry* 1988; **263**: 7049.

87. Garcia de Herreros A, Birnbaum MJ. The regulation by insulin of glucose transporter gene expression in 3T3 adipocytes. *The Journal of biological chemistry* 1989; **264**: 9885.
88. Fève B, Emorine LJ, Briend-Sutren MM, Lasnier F, Strosberg AD, Pairault J. Differential regulation of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor protein and mRNA levels by glucocorticoids during 3T3-F442A adipose differentiation. *The Journal of biological chemistry* 1990; **265**: 16343.
89. Fève B, Emorine LJ, Lasnier F, Blin N, Baude B, Nahmias C, Strosberg AD, Pairault J. Atypical beta-adrenergic receptor in 3T3-F442A adipocytes. Pharmacological and molecular relationship with the human beta 3-adrenergic receptor. *The Journal of biological chemistry* 1991; **266**: 20329.
90. Bernlohr DA, Angus CW, Lane MD, Bolanowski MA, Kelly TJ Jr. Expression of specific mRNAs during adipose differentiation: Identification of an mRNA encoding a homologue of myelin P2 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; **81**: 5468.
91. Sfeir Z, Ibrahimi A, Amri E, Grimaldi P, Abumrad N. Regulation of FAT/CD36 gene expression: Further evidence in support of a role of the protein in fatty acid binding/transport. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1997; **57**: 17.
92. Greenberg AS, Egan JJ, Wek SA, Moos MC Jr, Londos C, Kimmel AR. Isolation of cDNAs for perilipins A and B: Sequence and expression of lipid droplet-associated proteins of adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; **90**: 12035.

93. KENNEDY GC. The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1953; **140**: 578-596.
94. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; **372**: 425.
95. Isse N, Ogawa Y, Tamura N, Masuzaki H, Mori K, Okazaki T, Satoh N, Shigemoto M, Yoshimasa Y, Nishi S, et al. Structural organization and chromosomal assignment of the human obese gene. *The Journal of biological chemistry* 1995; **270**: 27728.
96. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *The Journal of biological chemistry* 1995; **270**: 26746.
97. Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (adipose most abundant gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **221**: 286.
98. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 2002; **8**: 1288-1295.
99. Fasshauer M, Paschke R, Stumvoll M. Adiponectin, obesity, and cardiovascular disease. *Biochimie* 2004; **86**: 779.
100. Wang Y, Lam KS, Yau MH, Xu A. Post-translational modifications of adiponectin: mechanisms and functional implications. *Biochem J* 2008; **409**: 623-633.

101. Tsao TS, Tomas E, Murrey HE, Hug C, Lee DH, Ruderman NB, Heuser JE, Lodish HF. Role of Disulfide Bonds in Acrp30/Adiponectin Structure and Signaling Specificity: Different oligomers activate different signal transduction pathways. *The Journal of biological chemistry* 2003; **278**: 50810.
102. Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *The Journal of biological chemistry* 1996; **271**: 10697.
103. Ghai R, Waters P, Roumenina LT, Gadjeva M, Kojouharova MS, Reid KB, Sim RB, Kishore U. C1q and its growing family. *Immunobiology* 2007; **212**: 253.
104. Pajvani UB, Hawkins M, Combs TP, Rajala MW, Doebber T, Berger JP, et al. Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. *J Biol Chem* 2004; **279**: 12152-12162.
105. Aso Y, Yamamoto R, Wakabayashi S, Uchida T, Takayanagi K, Takebayashi K, et al. Comparison of serum high-molecular weight (HMW) adiponectin with total adiponectin concentrations in type 2 diabetic patients with coronary artery disease using a novel enzyme-linked immunosorbent assay to detect HMW adiponectin. *Diabetes* 2006; **55**: 1954-1960.
106. Fisher FF, Trujillo ME, Hanif W, Barnett AH, McTernan PG, Scherer PE, et al. Serum high molecular weight complex of adiponectin correlates better with glucose tolerance than total serum adiponectin in Indo-Asian males. *Diabetologia* 2005; **48**: 1084-1087.

107. Waki H, Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Uchida S, Kita S, et al. Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *J Biol Chem* 2003; **278**: 40352-40363.
108. Qiang L, Wang H, Farmer SR. Adiponectin secretion is regulated by SIRT1 and the endoplasmic reticulum oxidoreductase Ero1-L alpha. *Mol Cell Biol* 2007; **27**: 4698-4707.
109. Fruebis J. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**: 2005.
110. Waki H, Yamauchi T, Kamon J, Kita S, Ito Y, Hada Y, Uchida S, Tsuchida A, Takekawa S, Kadowaki T. Generation of globular fragment of adiponectin by leukocyte elastase secreted by monocytic cell line THP-1. *Endocrinology* 2005; **146**: 790.
111. Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2006; **116**: 1784.
112. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 2003; **423**: 762.

113. Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev* 2005; **26**: 439.
114. Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 2000; **106**: 171.
115. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med* 2001; **7**: 941.
116. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Imai Y, Shimozawa N, Hioki K, Uchida S, Ito Y, Takakuwa K, Matsui J, Takata M, Eto K, Terauchi Y, Komeda K, Tsunoda M, Murakami K, Ohnishi Y, Naitoh T, Yamamura K, Ueyama Y, Froguel P, Kimura S, Nagai R, Kadowaki T. Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis. *The Journal of biological chemistry* 2003; **278**: 2461.
117. Combs TP, Pajvani UB, Berg AH, Lin Y, Jelicks LA, Laplante M, Nawrocki AR, Rajala MW, Parlow AF, Cheeseboro L, Ding YY, Russell RG, Lindemann D, Hartley A, Baker GR, Obici S, Deshaies Y, Ludgate M, Rossetti L, Scherer PE. A Transgenic Mouse with a Deletion in the Collagenous Domain of Adiponectin Displays Elevated Circulating Adiponectin and Improved Insulin Sensitivity. *Endocrinology* 2004; **145**: 367.

118. Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rossetti L. Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest* 2001; **108**: 1875-1881.
119. Wu X, Motoshima H, Mahadev K, Stalker TJ, Scalia R, Goldstein BJ. Involvement of AMP-activated protein kinase in glucose uptake stimulated by the globular domain of adiponectin in primary rat adipocytes. *Diabetes* 2003; **52**: 1355.
120. Dietze-Schroeder D, Sell H, Uhlig M, Koenen M, Eckel J. Autocrine action of adiponectin on human fat cells prevents the release of insulin resistance-inducing factors. *Diabetes* 2005; **54**: 2003.
121. Yu JG, Javorschi S, Hevener AL, Kruszynska YT, Norman RA, Sinha M, et al. The effect of thiazolidinediones on plasma adiponectin levels in normal, obese, and type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 2002; **51**: 2968-2974.
122. Rasmussen JG, Christensen JH, Schmidt EB. Adiponectin and marine n-3 fatty acids in patients referred for coronary angiography. *Int J Cardiol* 2009; **135**: 248.
123. Kratz M, Swarbrick MM, Callahan HS, Matthys CC, Havel PJ, Weigle DS. Effect of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on plasma total and high-molecular-weight adiponectin concentrations in overweight to moderately obese men and women. *Am J Clin Nutr* 2008; **87**: 347.

124. Bueno AA, Oyama LM, de Oliveira C, Pisani LP, Ribeiro EB, Silveira VL, et al. Effects of different fatty acids and dietary lipids on adiponectin gene expression in 3T3-L1 cells and C57BL/6J mice adipose tissue. *Pflugers Arch* 2008; **455**: 701-709.
125. Lorente-Cebrián S, Pérez-Matute P, Martínez JA, Marti A, Moreno-Aliaga MJ. Effects of eicosapentaenoic acid (EPA) on adiponectin gene expression and secretion in primary cultured rat adipocytes. *J Physiol Biochem* 2006; **62**: 61.
126. Patel JV, Lee KW, Tomson J, Dubb K, Hughes EA, Lip GY. Effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids on metabolically active hormones in patients post-myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2007; **115**: 42-45.
127. Perez-Matute P, Perez-Echarri N, Martinez JA, Marti A, Moreno-Aliaga MJ. Eicosapentaenoic acid actions on adiposity and insulin resistance in control and high-fat-fed rats: role of apoptosis, adiponectin and tumour necrosis factor-alpha. *Br J Nutr* 2007; **97**: 389-398.
128. Wahli W, Braissant O, Desvergne B. Peroxisome proliferator activated receptors: transcriptional regulators of adipogenesis, lipid metabolism and more... *Chem Biol* 1995; **2**: 261-266.
129. Iwaki M, Matsuda M, Maeda N, Funahashi T, Matsuzawa Y, Makishima M, et al. Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes* 2003; **52**: 1655-1663.

130. Bouskila M, Pajvani UB, Scherer PE. Adiponectin: a relevant player in PPARgamma-agonist-mediated improvements in hepatic insulin sensitivity? *Int J Obes* 2005; **29**: S17.
131. Zieleniak A, Wojcik M, Wozniak LA. Structure and physiological functions of the human peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2008; **56**: 331-345.
132. Xu HE, Lambert MH, Montana VG, Parks DJ, Blanchard SG, Brown PJ, et al. Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol Cell* 1999; **3**: 397-403.
133. Chambrier C, Bastard JP, Rieusset J, Chevillotte E, Bonnefont-Rousselot D, Therond P, et al. Eicosapentaenoic acid induces mRNA expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Obes Res* 2002; **10**: 518-525.
134. Nugent C, Prins JB, Whitehead JP, Wentworth JM, Chatterjee VK, O'Rahilly S. Arachidonic acid stimulates glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes by increasing GLUT1 and GLUT4 levels at the plasma membrane. Evidence for involvement of lipoxygenase metabolites and peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* 2001; **276**: 9149-9157.
135. Hauner H, Entenmann G, Wabitsch M, Gaillard D, Ailhaud G, Negrel R, Pfeiffer EF. Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J Clin Invest* 1989; **84**: 1663.

136. Hauner H, Rohrig K, Spelleken M, Liu LS, Eckel J. Development of insulin-responsive glucose uptake and GLUT4 expression in differentiating human adipocyte precursor cells. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1998; **22**: 448-453.
137. Ryden M, Dicker A, van Harmelen V, Hauner H, Brunnberg M, Perbeck L, et al. Mapping of early signaling events in tumor necrosis factor-alpha -mediated lipolysis in human fat cells. *J Biol Chem* 2002; **277**: 1085-1091.
138. Björntorp P, Karlsson M, Pertoft H, Pettersson P, Sjöström L, Smith U. Isolation and characterization of cells from rat adipose tissue developing into adipocytes. *J Lipid Res* 1978; **19**: 316.
139. Hauner H, Schmid P, Pfeiffer EF. Glucocorticoids and insulin promote the differentiation of human adipocyte precursor cells into fat cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; **64**: 832.
140. Deslex S, Negrel R, Vannier C, Etienne J, Ailhaud G. Differentiation of human adipocyte precursors in a chemically defined serum-free medium. *Int J Obes* 1987; **11**: 19.
141. Wu Z, Bucher NL, Farmer SR. Induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBPbeta, C/EBPdelta, and glucocorticoids. *Mol Cell Biol* 1996; **16**: 4128.
142. MacDougald OA, Cornelius P, Lin FT, Chen SS, Lane MD. Glucocorticoids reciprocally regulate expression of the CCAAT/enhancer-binding protein alpha and delta

genes in 3T3-L1 adipocytes and white adipose tissue. *The Journal of biological chemistry* 1994; **269**: 19041.

143. Russell TR, Ho R. Conversion of 3T3 fibroblasts into adipose cells: triggering of differentiation by prostaglandin F<sub>2</sub>alpha and 1-methyl-3-isobutyl xanthine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976; **73**: 4516.

144. Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro.. *Mol Cell* 1999; **4**: 611.

145. Imbeault P. Environmental influences on adiponectin levels in humans. *Appl Physiol Nutr Metab* 2007; **32**: 505-511.

146. Mahaffey KR. Fish and shellfish as dietary sources of methylmercury and the omega-3 fatty acids, eicosahexaenoic acid and docosahexaenoic acid: risks and benefits. *Environ Res* 2004; **95**: 414-428.

147. Salonen JT, Seppanen K, Nyysönen K, Korpela H, Kauhanen J, Kantola M, et al. Intake of mercury from fish, lipid peroxidation, and the risk of myocardial infarction and coronary, cardiovascular, and any death in eastern Finnish men. *Circulation* 1995; **91**: 645-655.

148. Rice DC, Schoeny R, Mahaffey K. Methods and rationale for derivation of a reference dose for methylmercury by the U.S. EPA. *Risk Anal* 2003; **23**: 107-115.

149. Miller JR, Siripurkpong P, Hawes J, Majdalawieh A, Ro HS, McLeod RS. The trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid decreases adiponectin assembly by PPARgamma-dependent and PPARgamma-independent mechanisms. *J Lipid Res* 2008; **49**: 550.

150. Bendixen AC, Shevde NK, Dienger KM, Willson TM, Funk CD, Pike JW. IL-4 inhibits osteoclast formation through a direct action on osteoclast precursors via peroxisome proliferator-activated receptor gamma 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**: 2443.