

Rôle du tissu adipeux brun dans le développement de l'obésité génétique du rat Zucker obèse (fa/fa)

R. BAZIN, Dominique ETEVE, Francine DUPUY, Marcelle LAVAU

*Institut biomédical des Cordeliers, INSERM U177,
15, rue de l'École de Médecine, 75270 Paris Cedex 06.*

Summary. *Role of brown adipose tissue in the development of genetic obesity in the obese Zucker rat (fa/fa).*

The lipogenic capacity and thermogenic activity (assessed by GDP binding to mitochondria) of brown adipose tissue was studied in lean (Fa/fa) and obese (fa/fa) suckling Zucker rat pups 2 and 10 days old.

By 10 days of age, fat deposition, lipogenesis *in vivo* and fatty acid synthetase activity were 1.5 to 2-fold higher, whereas GDP binding to mitochondria was 40 % lower in pre-obese than in lean pups.

Compared with lean pups, 2-day old fa/fa pups showed a 60 % increase in triglyceride accumulation in interscapular brown adipose tissue and a 30 % decrease in GDP binding to mitochondria, while no change occurred in fatty acid synthetase activity.

These results strongly suggest that an impaired thermogenic activity in the brown adipose tissue of fa/fa pups could play a key role in the development of obesity. However, the concomitant increase in fat content in the brown adipose tissue of 2-day old pre-obese pups raises the question of the causal relationship between these two disorders.

Introduction.

Au cours de ces dernières années des observations faites dans plusieurs modèles expérimentaux ont conduit à attribuer au tissu adipeux brun un rôle dans le développement de l'obésité.

Le tissu adipeux brun est le siège d'un mécanisme qui permet le « découplage » des mitochondries et la dissipation d'énergie sous forme de chaleur (revue in Nicholls, 1979). Une protéine de poids moléculaire 32000 (Ricquier et Kader, 1976) dans la membrane interne de la mitochondrie contrôle ce mécanisme et possède la capacité de fixer spécifiquement les nucléotides puriques (GDP en particulier). La mesure de cette liaison a permis de mettre en évidence une diminution de la capacité de thermogenèse dans le tissu adipeux brun dans des modèles

d'obésités génétiques (Himms-Hagen et Desautels, 1978 ; Goodbody et Trayhurn, 1981 ; Holt et York, 1982). Le tissu adipeux brun pourrait donc jouer un rôle clef dans l'équilibre du bilan énergétique et le développement de l'obésité.

Chez le rat Zucker obèse, dès l'âge de 30 jours le tissu brun présente une importante activité lipogénétique susceptible de rendre compte de l'augmentation des dépôts lipidiques observés dans ce tissu (Lavau *et al.*, 1982). Cependant Holt et York (1982) ont mis en évidence dans le tissu brun du rat fa/fa de 6 semaines un défaut de la capacité de thermogénèse qui pourrait également expliquer l'altération de la composition du tissu. Néanmoins, à cet âge, d'autres anomalies importantes telles l'hyperinsulinémie (Zucker et Antoniadis, 1972) et l'hyperphagie (Stern et Johnson, 1977 ; Dilettuso et Wangness, 1977) sont déjà installées et pourraient expliquer l'hyperlipogénèse observée dans le tissu brun.

Afin de préciser les mécanismes responsables de ces altérations du tissu brun qui pourraient jouer un rôle important dans le développement de l'obésité du rat Zucker, nous avons étudié la lipogénèse et la capacité de thermogénèse dans ce tissu, avant le sevrage, lorsque peu d'anomalies sont encore installées.

Matériel et méthodes.

Les rats Zucker utilisés sont issus de notre propre élevage par croisements de mâles obèses (fa/fa) et de femelles témoins hétérozygotes (Fa/fa) non obèses. Après une légère anesthésie à l'éther, les rats subissent une biopsie de tissu adipeux brun interscapulaire (30 à 80 mg) puis sont remis à la mère et conservés jusqu'à la détermination ultérieure du génotype (7 à 8 semaines). L'activité de la synthétase des acides gras est mesurée par une technique spectrophotométrique (Halestrap et Denton, 1973) dans des surnageants (105 000 g) de l'homogénat de tissu. Les résultats sont exprimés en unités d'activité : 1 unité étant définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour catalyser la formation de 1 nanomole de produit/minute à 37 °C. Les lipides totaux du tissu sont déterminés par gravimétrie après extraction dans le chloroforme/méthanol (2 : 1, vol/vol) et les triglycérides par une méthode enzymatique (Boehringer). La lipogénèse *in vivo* est estimée par la mesure de l'incorporation du tritium de l'eau tritiée dans les acides gras selon une technique précédemment décrite (Lavau *et al.*, 1982). Les mitochondries du tissu adipeux brun sont préparées selon la méthode de Slinde *et al.* (1975), l'activité de la cytochrome c oxydase est mesurée par polarographie (Schnaitman *et al.*, 1967) et la liaison du GDP à l'aide de GDP tritiée selon la technique de Nicholls (1976) avec les modifications de Desautels *et al.* (1978). Les protéines sont déterminées par la méthode de Lowry *et al.* (1951). L'analyse statistique des résultats est faite par comparaison de groupes à l'aide du test t de Student.

Résultats.

La figure 1 montre une augmentation de 50 % de la teneur en lipides dans le tissu adipeux brun des animaux pré-obèses de 10 jours comparés à leurs témoins non obèses. A cet âge, l'activité de la synthétase des acides gras, l'une des enzy-

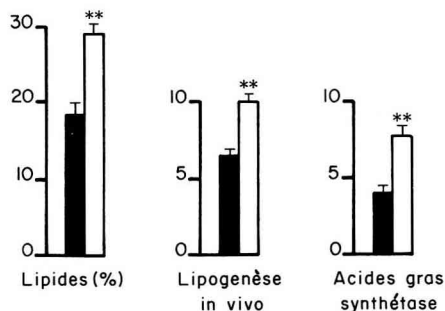


FIG. 1. — Teneur en lipides et capacité lipogénétique du tissu adipeux brun de rat Zucker de 10 jours. La lipogenèse *in vivo* est exprimée par $\mu\text{g at. }^3\text{H}/\text{heure par g de tissu délipidé}$. L'activité de la synthétase des acides gras est représentée en unités d'activité spécifique par mg de protéines du surnageant.

** $p < 0,01$ fa/fa versus Fa/fa.

Nombre d'animaux : 7, 13 et 12 témoins ; 9, 17 et 14 obèses pour les mesures respectives de la teneur en lipides, de la lipogenèse *in vivo* et de l'activité synthétase des acides gras.

mes clef de la lipogenèse, est augmentée de 90 % dans le tissu des pré-obèses. La mesure de la lipogenèse *in vivo* fait également apparaître un accroissement très significatif de la synthèse d'acides gras dans le tissu des fa/fa. Cependant, un calcul utilisant le facteur de 13,3 atomes de ^3H incorporés par molécule d'acide gras synthétisé (Windmueller et Spaeth, 1966) montre que l'augmentation de la lipogenèse chez les pré-obèses peut seulement rendre compte du dépôt de 1 à 2 mg de lipides par jour par g de tissu frais alors que celui-ci dépasse 10 mg par jour.

A l'âge de 2 jours (tabl. 1), il n'existe pas de différence d'activité de la synthétase des acides gras entre les deux génotypes tandis que l'accumulation de triglycérides dans le tissu brun est déjà très significativement augmentée chez les futurs obèses.

Parmi les autres mécanismes susceptibles de rendre compte de cet enrichissement en lipides du tissu brun, une diminution des oxydations dans le tissu doit être envisagée.

TABLEAU 1

Contenu en triglycérides et activité de la synthétase des acides gras dans le tissu adipeux brun de rats Zucker de 2 jours.

Génotype	Triglycérides %	Synthétase des acides gras (U/mg protéines)
Fa/fa	$14,1 \pm 1,2$ (16)	$16,1 \pm 1,0$ (10)
fa/fa	$22,6 \pm 1,4$ (21)	$16,4 \pm 1,3$ (9)

**

** $P < 0,01$ Fa/fa versus fa/fa.

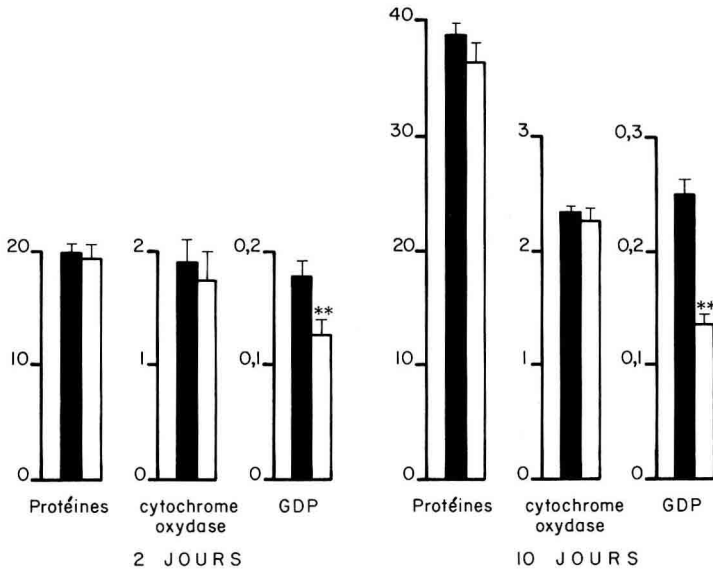


FIG. 2. — Quelques aspects de l'activité mitochondriale du tissu adipeux brun du rat Zucker de 2 et 10 jours. Les protéines représentent les protéines mitochondriales isolées par g tissu frais. L'activité cytochrome oxydase est exprimée par μ moles d'oxygène consommé par mg de protéines mitochondriales et la liaison du GDP par nanomole de GDP lié par mg de protéines mitochondriales.

** $p < 0,01$ fa/fa versus Fa/fa.

Nombre d'animaux : 7 et 15 témoins, 14 et 17 obèses respectivement à 2 et 10 jours.

La figure 2 présente quelques aspects de l'activité mitochondriale du tissu adipeux brun des rats Zucker. A 10 jours comme à 2 jours la quantité de protéines mitochondriales est la même dans les deux génotypes. Un doublement des protéines mitochondriales dans le tissu se produit entre 2 et 10 jours chez les fa/fa comme chez les Fa/fa. L'activité de la cytochrome c oxydase (marqueur de l'activité mitochondriale) reste identique dans les deux génotypes. La mesure de la liaison spécifique du GDP aux mitochondries montre que dès l'âge de 2 jours une diminution de 30 % de la liaison existe chez les pré-obèses comparés aux témoins. Cette différence s'accroît avec l'âge ; en effet, alors qu'à 10 jours chez les pré-obèses la capacité de liaison du GDP reste inchangée elle augmente de 40 % chez les témoins. Une analyse de Scatchard montre qu'il n'y a pas de modification de l'affinité ($K_d = 0,9 \pm 0,10 \mu M$ et $1,10 \pm 0,11 \mu M$ respectivement pour les témoins et les obèses) tandis que le nombre de sites de liaison chute de 270 pmoles/mg protéines chez les témoins à 150 pmoles chez les fa/fa.

Discussion.

Ces résultats montrent que dès l'âge de 10 jours, chez le rat pré-obèse il existe dans le tissu adipeux brun une importante activité lipogénétique. Ils confirment que l'augmentation de la capacité de lipogenèse déjà observée dans le tissu

adipeux blanc au même âge (Bazin et Lavau, 1982) est une expression précoce du génotype fa/fa, qui survient avant l'apparition de l'hyperphagie et de l'hyperinsulinémie. Cependant, ce mécanisme ne peut à lui seul rendre compte de l'importance des dépôts lipidiques observés dans le tissu adipeux brun. L'action de la lipoprotéine lipase, autre mécanisme susceptible de jouer un rôle dans l'augmentation du stockage des lipides peut être exclue dans le tissu brun puisque Boulangé *et al.* (1981) ont montré que l'activité de cette enzyme dans le tissu brun du rat de 2 semaines est plus faible chez le fa/fa que chez le Fa/fa. Ainsi, une diminution des mécanismes d'oxydation dans le tissu adipeux brun peut être envisagée pour expliquer l'altération observée dans la composition du tissu.

Ce travail montre que chez le jeune rat Zucker pré-obèse une réduction de la capacité de liaison du GDP aux mitochondries existe chez le jeune fa/fa dès l'âge de 2 jours. La liaison du GDP mesure l'importance de la voie de « proton conductance » spécifique des mitochondries du tissu brun et responsable de la production de chaleur dans ce tissu (Nicholls, 1976). Ainsi, la capacité de thermogenèse dans le tissu brun du fa/fa est très précocement diminuée. Ces résultats montrent que l'altération de la capacité de thermogenèse qui existe chez le jeune rat obèse de 6 semaines (Holt et York, 1982) est déjà présente chez le très jeune rat et pourrait jouer un rôle dans l'installation de l'obésité comme cela a déjà été suggéré dans les obésités génétiques de la souris ob/ob et db/db (Goodbody et Trayhurn, 1982, 1981). En effet, chez le très jeune animal, le tissu brun bien développé dès la naissance doit jouer un rôle important dans la production de chaleur et le maintien de la température interne. Planche *et al.* (1983) ont montré qu'il existe chez le rat Zucker pré-obèse un abaissement de la température interne, et un déficit de la dépense énergétique dès la première semaine de la vie. Une diminution de la production de chaleur dans le tissu adipeux brun du jeune fa/fa pourrait expliquer les altérations de la thermogenèse mises en évidence par ces auteurs au niveau de l'animal entier.

Cependant, notre travail ne permet pas d'attribuer au défaut très précoce de la capacité de thermogenèse un rôle primaire dans l'installation de l'obésité du rat Zucker. En effet, nous avons vu que dès l'âge de 2 jours, le tissu adipeux du pré-obèse est déjà plus riche en triglycérides. Un surdéveloppement très précoce des dépôts adipeux pourrait alors constituer une « couverture thermique » chez le jeune raton diminuant ainsi les besoins thermogéniques.

10^e Réunion du groupe Développement I.N.R.A.,
Rennes, 9-10 mai 1984.

Références

- BAZIN R., LAVAU M., 1982. Development of hepatic and adipose tissue lipogenic enzymes and insulinemia during suckling and weaning on to a high-fat diet in Zucker rats. *J. Lipid Res.*, **23**, 839-849.
- BOULANGÉ A., PLANCHE E., DE GASQUET P., 1981. Onset and development of hypertriglyceridemia in the Zucker rat fa/fa. *Metab. clin. Exp.*, **30**, 1045-1052.

- DESAUTELS M., ZAROR-BEHRENS G., HIMMS-HAGEN J., 1978. Increased purine nucleotide binding, altered polypeptide composition, and thermogenesis in brown adipose tissue mitochondria of cold acclimated rats. *Can. J. Biochem.*, **56**, 378-383.
- DILETTUSO B. A., WANGSNESS P. J., 1977. Effect of age on hyperphagia in the genetically obese Zucker rat. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **154**, 1-5.
- GOODBODY A. E., TRAYHURN P., 1981. GDP binding to brown adipose tissue mitochondria of diabetic-obese (db/db) mice. *Biochem. J.*, **194**, 1019-1022.
- GOODBODY A. E., TRAYHURN P., 1982. Studies on the activity of brown adipose tissue in suckling pre-obese ob/ob mice. *Biochim. biophys. Acta*, **680**, 119-126.
- HALESTRAP A. P., DENTON R. M., 1973. Insulin and the regulation of adipose tissue acetyl CoA carboxylase. *Biochem. J.*, **132**, 509-513.
- HIMMS-HAGEN J., DESAUTELS M., 1978. A mitochondrial defect in brown adipose tissue of the (ob/ob) mouse : reduced binding of purine nucleotides and failure to respond to cold by an increase in binding. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, **83**, 628-634.
- HOLT S., YORK D. A., 1982. The effect of adrenalectomy on GDP binding to brown adipose tissue mitochondria of obese rats. *Biochem. J.*, **208**, 819-822.
- LAVAU M., BAZIN R., KARAOGHLANIAN Z., GUICHARD C., 1982. Evidence for a high fatty acid synthesis activity in interscapular brown adipose tissue of genetically obese Zucker rats. *Biochem. J.*, **204**, 503-507.
- LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L., RANDALL R. J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- NICHOLLS D. G., 1976. Hamster brown adipose tissue mitochondria. Purine nucleotide control of the ion conductance of the inner membrane, the nature of the nucleotide binding site. *Eur. J. Biochem.*, **62**, 223-228.
- NICHOLLS D. G., 1979. Brown adipose tissue mitochondria. *Biochim. biophys. Acta*, **549**, 1-30.
- PLANCHE E., JOLIFF M., DE GASQUET P., LE LIEPVRE X., 1983. Evidence of a defect in energy expenditure in 7-day-old Zucker rat (fa/fa). *Am. J. Physiol.*, **245**, E 107-E 113.
- RICQUIER D., KADER J. C., 1976. Mitochondrial protein alteration in active brown fat : a sodium dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, **73**, 577-583.
- SCHNAITMAN C. V., ERWIN G., GREENAWALT J. W., 1967. The submitochondrial localization of monoamine oxydase. *J. Cell Biol.*, **32**, 719-735.
- SLINDE E., PEDERSEN J. I., FLATMARK T., 1975. Sedimentation coefficient and buoyant density of brown adipose tissue mitochondria of guinea pigs. *Anal. Biochem.*, **65**, 581-585.
- STERN J. S., JOHNSON P. R., 1977. Spontaneous activity and adipose cellularity in the genetically obese Zucker rat (fa/fa). *Metabolism*, **26**, 371-380.
- WINDMUELLER H. G., SPAETH A. E., 1966. Perfusion *in situ* with tritium oxide to measure hepatic lipogenesis and lipid secretion. Normal and orotic acid fed rats. *J. biol. Chem.*, **241**, 2891-2899.
- ZUCKER L. M., ANTONIADES H. N., 1972. Insulin and obesity in the Zucker genetically obese rat « Fatty ». *Endocrinology*, **90**, 1320-1330.
-