

Université de Montréal

**Les mécanismes de régulation du métabolisme lipidique  
par les peptides QRFP (pyroglutamylated RF-amide  
peptides)**

par

Mukandila Mulumba

Faculté de pharmacie

Thèse présentée à la Faculté de pharmacie  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.) en sciences pharmaceutiques  
option pharmacologie

Décembre 2012

© Mukandila Mulumba, 2012

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Les mécanismes de régulation du métabolisme lipidique par les peptides QRFP  
(*pyroglutamylated RF-amide peptides*)

Présenté par :

Mukandila Mulumba

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Denis deBlois, président-rapporteur

Dr Huy Ong, directeur de recherche

Dre Sylvie Marleau, co-directeur

Dr David St-Pierre, membre du jury

Frédéric Picard, examinateur externe

Dr Denis deBlois, représentant du doyen de la FES

## Résumé

Plusieurs cibles thérapeutiques dans le développement de médicaments contre l'obésité visent une diminution de l'appétit et de la masse adipeuse et à augmenter la dépense énergétique. L'appétit et le métabolisme énergétique sont régulés par certains neuropeptides qui agissent au niveau du système nerveux central, notamment dans l'hypothalamus. Parmi ces neuropeptides, les peptides RF-amide ou QRFP (*pyroglutamylated RF-amide peptides*), ainsi nommés par la présence du motif conservé Arg-Phe-NH<sub>2</sub> dans le domaine C-terminal, induisent une hyperphagie et une augmentation de la masse adipeuse lorsqu'administrés par voie centrale. Les formes bioactives de ces peptides comprennent principalement 43 (QRFP-43) et 26 (QRFP-26) acides aminés. Outre les peptides QRFP, leurs récepteurs, les GPR103 de la famille des récepteurs à 7 passages transmembranaires couplés aux protéines G, sont exprimés dans l'hypothalamus. Plus récemment, des études ont montré la sécrétion de ces neuropeptides, et la présence du GPR103, dans le tissu adipeux. Cependant, le rôle de la voie signalétique (QRFP/GPR103) dans la régulation du métabolisme lipidique au niveau périphérique est peu connu. Les travaux de cette thèse ont porté sur la caractérisation des effets adipogéniques périphériques des neuropeptides QRFP.

En premier lieu, nos travaux ont montré que les adipocytes 3T3-L1 et les adipocytes murins isolés des dépôts adipeux blancs expriment le prépro-QRFP et uniquement le récepteur GPR103B, un des deux sous-types de récepteurs présents chez la souris. De plus, nous avons montré que l'expression du récepteur est régulée par une diète riche en lipides réduisant l'expression du prépro-QRFP, mais augmentant celle du GPR103B dans les dépôts lipidiques. Chez l'humain, les adipocytes de l'omentum expriment autant le GPR103 que le prépro-QRFP.

Nous avons de plus étudié la fonctionnalité du GPR103B dans les adipocytes 3T3-L1 par l'utilisation d'ARN interférents. Nous avons observé que ce récepteur médie les

effets adipogéniques des QRFPs en augmentant l'expression du récepteur nucléaire PPAR- $\gamma$  (*peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$* ) et le facteur de transcription C/EBP- $\alpha$  (*CCAAT-enhancer binding protein  $\alpha$* ) résultant en une accumulation des triglycérides. Nous avons aussi mis en évidence les effets anti-lipolytiques des QRFPs. En effet, les QRFP inhibent fortement la lipolyse induite avec l'isoprotérénol. L'étude des mécanismes moléculaires à l'origine des effets anti-lipolytiques du QRFP-43 a montré l'activation de la voie de signalisation PI3-K/PKB (phosphatidylinositol 3-kinase/protéine kinase B) en réponse à la stimulation du GPR103B. La réponse anti-lipolytique induite par le QRFP-43 est associée à une diminution de la phosphorylation de la périlipine A (PLIN1a) et de la lipase hormono-sensible (HSL). Nos études ont élucidé les mécanismes conduisant à l'inhibition de la phosphorylation de la PLIN1a en réponse à l'activation du GPR103B, impliquant l'inhibition de la migration de la cavéoline 1 et de la sous unité catalytique de la protéine kinase A (PKA) au niveau des gouttelettes lipidiques, ainsi que l'inhibition de l'activité des Src kinases et de la protéine kinase C (PKC).

En conclusion, nos travaux ont montré que les QRFP-43 et -26 exercent un effet adipogénique et anti-lipolytique dans les adipocytes, mettant ainsi en évidence le rôle des neuropeptides QRFPs dans la régulation du métabolisme lipidique au niveau adipocytaire.

**Mots-clés :** GPR103B, QRFP, adipogenèse, lipolyse, récepteurs couplés aux protéines G, protéines kinases

## Abstract

Anti-obesity therapies mostly focused on development of centrally-acting drugs, which also promote weight loss properties. Many studies have documented the relevance of neuroendocrine peptides in the hypothalamus and their influence on the regulation of energy balance. Some neuropeptides have been reported to be expressed and secreted by the adipose tissue where they modulate lipid metabolism, reflecting the importance between hypothalamus and adipose tissue. Among neuropeptides that regulate appetite, QRFP (pyroglutamylated RF-amide peptides) was reported to have hyperphagic properties associated with an increase of adipose mass over lean mass in mice. Both QRFP and its receptor GPR103 are expressed in the hypothalamus of many species. However, whether QRFP peptides and its receptor are involved in peripheral lipid metabolism is still unknown. This thesis focused on the peripheral effects of QRFP and the role of its receptor on adipose tissue.

The results presented here show that QRFP-43 and -26 have direct adipogenic effects on both 3T3-L1 adipocytes and isolated adipocytes from white adipose tissue (WAT). Indeed, we found that prepro-QRFP and the GPR103B receptor, which is one of the two GPR103 sub-types found in mice, are expressed in 3T3-L1 adipocytes and in WAT isolated adipocytes. When mice are fed with high-fat diet, prepro-QRFP expression was reduced whilst GPR103B was increased in different WAT. In human omental adipocytes, both prepro-QRFP and GPR103 are expressed. QRFP treatment on 3T3-L1 adipocytes inhibits isoproterenol (ISO) induced-lipolysis and promotes adipogenesis through fatty acid uptake and expression of key adipogenic transcription factors, PPAR- $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ) and C/EBP- $\alpha$  (CCAAT-enhancer binding protein  $\alpha$ ). The functionality of the GPR103B receptor was studied using short hairpin RNA to knock down its expression in 3T3-L1 adipocytes. Knockdown of GPR103B resulted in complete loss of QRFP peptides antilipolytic effects and fatty acid uptake. GPR103B signaling

pathways in antilipolytic effects of QRFP-43 were investigated using 3T3-L1 adipocytes model. Stimulation of GPR103B induced PI3-K/PKB (phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B) pathway. QRFP-43 attenuates lipolysis by inhibiting ISO induced-phosphorylation of perilipin A (PLIN1a) and hormone sensitive lipase (HSL). Moreover, we have underscored the mechanisms of GPR103B mediating inhibition of PLIN1a in 3T3-L1 adipocytes. Activation of GPR103B prevents the translocation of caveolin 1 and the catalytic subunit of PKA induced by ISO on lipid droplets. This latter mechanism is the result of the inhibition of Src kinases and PKC induced by ISO following QRFP-43 treatment in 3T3-L1 adipocytes.

In conclusion, the work conducted in this thesis demonstrates a new role of QRFP peptides and the receptor GPR103B as modulator of lipid metabolism in adipose tissue. We have also underscored GPR103B signaling pathways leading to inhibition of lipolysis in adipocytes.

**Keywords:** GPR103B, QRFP, adipogenesis, lipolysis, G-coupled receptors, protein kinase

## Table des matières

Résumé .....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux .....	xii
Liste des figures.....	xiii
Liste des abréviations.....	xv
Remerciements .....	xxii
Citations .....	xxiv
Chapitre I : INTRODUCTION .....	1
Considérations générales .....	2
1. Le tissu adipeux.....	3
1.1. Tissu adipeux blanc.....	3
1.2. Tissu adipeux brun.....	7
1.3. Tissu adipeux médullaire.....	8
1.4. Différenciation adipocytaire.....	8
1.4.1. Facteurs de transcription régulant la différenciation des adipocytes blancs	14
1.4.1.1. PPAR- $\gamma$ .....	14
1.4.1.2. Les C/EBPs .....	16
1.4.1.2.1. Les C/EBP- $\beta$ et - $\delta$ dans l'initiation de la différenciation .....	16
1.4.1.2.2. Le C/EBP- $\alpha$ dans la régulation de la différenciation .....	18

1.4.1.3.	SREBP-1c .....	19
1.4.2.	Autres facteurs impliqués dans la régulation de l'adipogenèse .....	20
1.4.2.1.	Les facteurs de transcription STAT .....	20
1.4.2.2.	Les facteurs Wnt .....	21
1.4.2.3.	Les facteurs de transcription KLF.....	21
1.4.2.4.	Les facteurs de transcription GATA2 et GATA3 .....	22
1.4.2.5.	Facteur-1 des préadipocytes (Pref-1) .....	23
1.4.2.6.	Le facteur de transcription Egr2 (Krox20).....	23
1.4.2.7.	Les facteurs de transcription FOX .....	23
1.4.3.	Hormones et autres facteurs régulant l'adipogenèse.....	25
1.4.3.1.	Les glucocorticoïdes.....	26
1.4.3.2.	L'insuline et l'IGF-1 (insulin growth factor-1).....	26
1.4.3.3.	L'hormone de croissance .....	27
1.4.3.4.	L'hormone thyroïdienne.....	27
1.4.3.5.	L'AMPc .....	28
1.4.3.6.	Le facteur nécrosant des tumeurs (TNF- $\alpha$ ).....	28
1.4.3.7.	L'acide rétinoïque .....	28
<b>2.</b>	<b>Le métabolisme des lipides dans le tissu adipeux blanc .....</b>	<b>30</b>
<b>2.1.</b>	<b>La lipogenèse <i>de novo</i>.....</b>	<b>30</b>
<b>2.2.</b>	<b>Source des triglycérides circulants .....</b>	<b>31</b>
2.2.1.	Hydrolyse des chylomicrons et des VLDL par la LPL.....	33
<b>2.3.</b>	<b>Transport des acides gras.....</b>	<b>35</b>



2.3.1.	Transport facilité des acides gras dans les adipocytes .....	35
2.3.1.1.	La protéine de liaison des acides gras de la membrane plasmique .....	36
2.3.1.2.	Le récepteur CD36 .....	36
2.3.1.3.	La cavéoline-1 .....	37
2.3.1.4.	La protéine de transport d'acides gras .....	38
<b>2.4.</b>	<b>La biosynthèse des triacylglycérols .....</b>	<b>39</b>
<b>2.5.</b>	<b>La lipolyse .....</b>	<b>41</b>
2.5.1.	La lipase hormono-sensible .....	43
2.5.1.1.	Propriétés enzymatiques et structure de la protéine .....	43
2.5.1.2.	Régulation de l'activité enzymatique .....	45
2.5.2.	La lipase adipeuse des triglycérides .....	47
2.5.2.1.	Propriétés enzymatiques et structure de la protéine .....	47
2.5.2.2.	Régulation de l'activité enzymatique .....	48
2.5.2.2.1.	Activation de l'ATGL par CGI-58 .....	48
2.5.2.2.2.	Inhibition de l'activité de l'ATGL par la protéine GOS2 .....	49
2.5.3.	La lipase des monoacylglycérols .....	50
2.5.4.	La périlipine A et les protéines de la famille PAT .....	50
2.5.4.1.	Structure du gène et de la protéine .....	53
2.5.4.1.1.	Régulation de la lipolyse par phosphorylation de PLIN1a .....	54
2.5.4.2.	La périlipine 2 .....	56
2.5.4.3.	Les périlipine 3 et 4 .....	56
2.5.4.4.	La périlipine 5 .....	56

2.5.5.	Autres protéines impliquées dans la lipolyse .....	57
2.5.5.1.	La cavéoline 1 au niveau des gouttelettes lipidiques .....	57
2.5.5.2.	La vimentine.....	58
2.5.5.3.	La protéine FABP4 .....	59
2.5.5.4.	Aquaporine 7.....	59
2.5.6.	Régulation de la lipolyse.....	60
2.5.6.1.	Activateurs de la lipolyse .....	60
2.5.6.1.1.	Les catécholamines.....	60
2.5.6.1.2.	Les mélanocortines.....	64
2.5.6.1.3.	Thyrotropine .....	66
2.5.6.1.4.	TNF- $\alpha$ .....	67
2.5.6.1.5.	Le peptide natriurétique des oreillettes (ANP).....	68
2.5.6.2.	Inhibiteurs de la lipolyse .....	70
2.5.6.2.1.	L'insuline.....	70
2.5.6.2.2.	L'adénosine .....	73
2.5.6.2.3.	Le neuropeptide Y et le peptide YY .....	73
2.5.6.2.4.	La prostaglandine E2.....	74
2.5.6.2.5.	L'acide nicotinique et les récepteurs d'acides hydroxy-carboxyliques 76	
2.5.6.2.6.	La ghréline et la désacyl-ghréline .....	77
2.5.6.2.7.	L'adiponectine.....	78

<b>3. La régulation du métabolisme énergétique par le système nerveux central et le QRFP .....</b>	<b>80</b>
<b>3.1. La régulation du métabolisme énergétique par le système nerveux central. 80</b>	
3.1.1. Régulation de l'appétit .....	81
3.1.1.1. Neurones NPY/AgRP, axe orexigène .....	82
3.1.1.2. Neurones POMC/CART, axe anorexigène .....	83
3.1.2. Régulation hypothalamique du métabolisme lipidique.....	83
3.1.3. La leptine et le métabolisme énergétique.....	86
<b>3.2. Les peptides QRFP (pyroglutamylated RF-amide peptides) .....</b>	<b>88</b>
3.2.1. Identification et structure du QRFP .....	88
3.2.2. Localisation, distribution et expression.....	92
3.2.3. Le GPR103, récepteur des QRFP.....	93
3.2.4. Propriétés physiologiques .....	96
3.2.4.1. Régulation de la sécrétion des hormones hypophysaires et stéroïdiennes	96
3.2.4.2. Régulation de la douleur .....	97
3.2.4.3. Régulation de la pression artérielle .....	98
3.2.4.4. Régulation de l'appétit .....	98
<b>Chapitre II : OBJECTIFS DE RECHERCHE .....</b>	<b>101</b>
<b>Chapitre III : RÉSULTATS.....</b>	<b>104</b>
<b>3.1. Mise en contexte du premier article .....</b>	<b>105</b>

<b>3.2. Article 1: A new role for GPR103b in the peripheral regulation of adipogenesis .....</b>	<b>106</b>
Abstract .....	107
Introduction .....	107
Results .....	109
Discussion .....	114
Materials and Methods .....	119
Acknowledgements .....	125
Abbreviations .....	126
Figure legends .....	127
References .....	130
Figures .....	137
Résultats supplémentaires .....	143
<b>3.3. Mise en contexte du deuxième article.....</b>	<b>146</b>
<b>3.4. Article 2: QRFP-43 inhibits lipolysis by preventing ligand-induced complex formation between perilipin A, caveolin-1, the catalytic subunit of protein kinase A and hormone sensitive lipase in 3T3-L1 adipocytes.....</b>	<b>147</b>
Abstract .....	148
Introduction .....	149
Materials and methods .....	151
Results .....	154
Discussion .....	158

Acknowledgments.....	162
Legends.....	163
References.....	166
Figures.....	172
<b>Chapitre IV : DISCUSSION.....</b>	<b>177</b>
<b>4.1. Le GPR103B est responsable des effets adipogéniques des peptides QRFP179</b>	
<b>4.2. L'obésité module l'expression du GPR103B et du prépro-QRFP.....</b>	<b>183</b>
<b>4.3. L'activation du GPR103B inhibe la mobilisation des lipides.....</b>	<b>184</b>
4.3.1. L'activation du GPR103B conduit à l'activation de la voie de PI3-K/Akt	185
4.3.2. Le GPR103B inhibe l'activité de la Src kinase et de PKC.....	188
<b>Chapitre V : CONCLUSION.....</b>	<b>191</b>
<b>PERSPECTIVES.....</b>	<b>192</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>196</b>

## Liste des tableaux

Tableau I. Différences anatomiques et fonctionnelles entre les tissus adipeux bruns et blancs.....	5
Tableau II. Principaux types cellulaires utilisés dans les études de différenciation .....	12
Tableau III. Facteurs régulant l'adipogenèse .....	25
Tableau IV. Protéines associées aux gouttelettes lipidiques en condition basale et stimulée .....	53
Tableau V. Séquences du QRFP-26/26RFa chez différentes espèces .....	91

## Liste des figures

Figure 1 : Répartition des différents dépôts adipeux chez l'humain et schéma de l'adipocyte .....	6
Figure 2: Origine des adipocytes des tissus adipeux blancs et bruns.....	10
Figure 3: Étapes de la différenciation des adipocytes blancs.....	11
Figure 4: Facteurs influençant la différenciation des préadipocytes en adipocytes.....	24
Figure 5: Lipogenèse <i>de novo</i> .....	31
Figure 6: Accumulation des triglycérides circulants.....	33
Figure 7: Transport des acides gras.....	35
Figure 8: Processus de biosynthèse des triglycérides.....	40
Figure 9: Enzymes impliquées dans l'hydrolyse des TG.....	42
Figure 10: Structure protéique de la lipase hormono-sensible.....	44
Figure 11: Structure des membres de la famille PAT.....	51
Figure 12: Activation de la PKA dans les adipocytes.....	61
Figure 13: Régulation de lipolyse dans un adipocyte blanc.....	62
Figure 14: Inhibition de la lipolyse par l'insuline.....	71
Figure 15: Schéma de cerveau de rongeur et des différentes parties du l'hypothalamus ....	81
Figure 16: Mécanisme d'activation de l'AMPK dans l'hypothalamus.....	85
Figure 17: Représentation schématique de l'activation de du récepteur OB-Rb de la leptine au niveau hypothalamique.....	87

Figure 18: Alignement de séquence du prépro-QRFP de différentes espèces .....	90
Figure 19: Comparaison des séquences du GPR103 humain, de rat (GPR103A) et de la poule.....	95
Figure 20: Schéma de l'approche dans les études des voies de signalisation induite par la GPR103B .....	187



## Liste des abréviations

A1R	récepteur de l'adénosine
ACC	l'acétyl-CoA carboxylase
ACS	<i>Acetyl-CoA synthetase</i>
ACSL	l'acyl CoA synthétase d'AG à chaîne longue ( <i>Acyl CoA synthetase long chain</i> )
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADRP	<i>adipocyte differentiation-related protein</i> ou adipophiline
AG	acides gras
AGCL	acides gras à chaîne longue
AGNE	acides gras non-estérifiés
AgRP	<i>agouti related peptide</i>
ALBP	<i>adipocyte lipid binding protein</i>
AMP	adénosine monophosphate
AMPc	AMP cyclique

AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
ANP	peptide natriurétique des oreillettes ( <i>atrial natriuretic peptide</i> )
AQP7	aquaporine 7
AR	récepteur adrénérgique ( <i>adrenergic receptor</i> )
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATGL	lipase adipeuse des triglycérides ( <i>adipose triglyceride lipase</i> )
ATP	adénosine triphosphate
BMPs	<i>bone morphogenetic protein</i>
C/EBP	<i>CCAAT-enhancer binding protein</i>
CaMK2	<i>Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependant protein kinase II</i>
CaMKK2	CaMK kinase
CART	<i>cocain- and anphetamine-related transcript</i>
Cav-1	Cavéoline 1
CD36	<i>cluster de différenciation 36</i>
CGI-58	<i>comparative gene identification-58</i>
CPT-1	carnitine palmitoyltransférase-1

DAG	diacylglycérol
DIO	<i>diet induced obesity</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FABP	protéine liant les acides gras ( <i>fatty acid binding protein</i> )
FAS	<i>fatty acid synthetase</i>
FAT	translocase des acides gras ( <i>fatty acid translocase</i> )
FATP	protéine de transport des acides gras ( <i>fatty acid transport protein</i> )
FSH	hormone folliculo-stimulante
FSV	fraction stroma-vasculaire
G0S2	<i>G0/G1 switch protein 2</i>
G3P	glycérol-3-phosphate
GHS-R1	<i>Growth Hormone secretagogue receptor</i>
GLUT-4	Transporteur du glucose 4 ( <i>glucose transporter</i> )
GPAT	glycérol-3-phosphate acyltransférase
GPR103	<i>G protein receptor 103</i>
GSK	<i>glycogen synthase kinase</i>
HC	hormone de croissance

HCA	acide hydroxycarboxylique ( <i>hydroxy-carboxylic acid</i> )
HDL	lipoprotéines à haute densité ( <i>high density lipoprotein</i> )
HODE	acide hydroxyoctadécadiénoïque
IGF-1	<i>insulin growth factor-1</i>
IMC	indice de masse corporelle
iNOS	oxyde nitrique synthase inductible ( <i>inducible nitric oxide synthase</i> )
IRS	substrat du récepteur de l'insuline ( <i>insulin receptor substrate</i> )
ISO	isoprotérénol
kDa	kilodalton
KLF	<i>Krüppel-like factor</i>
LDL	lipoprotéine de faible densité ( <i>low density lipoprotein</i> )
LDN	lipogénèse <i>de novo</i>
LH	hormone lutéinisante
LHA	aire latérale de l'hypothalamus ( <i>lateral hypothalamus area</i> )
LHS	lipase hormono-sensible
LPL	lipoprotéine lipase
MAG	monoacylglycérol

MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCR	récepteur des mélanocortines
MSH	hormone de stimulation des mélanocytes ou hormone mélanostimulante ( <i>melanocyte stimulating hormone</i> )
NA	noyau arqué
NPFF	neuropeptide FF
NPFF2	récepteur du neuropeptide FF
NPY	neuropeptide Y
OB-R	récepteur de la leptine
OXPAT	<i>oxidative-PAT</i>
PAT	Pérlipine, ADRP et TIP47
PDE3B	phosphodiesterase 3B
PEPCK	phosphoénolpyruvate carboxykinase
PGE2	prostaglandine E2
PI3-K	kinase-3 phosphoinositide ( <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i> )
PKA	protéine kinase A
PKA-c	sous-unité catalytique de PKA
PKC	protéine kinase C

PLIN	périlipine
POMC	proopiomelanocortine
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
Pref-1	facteur-1 des pré-adipocytes ( <i>preadipocyte facteur-1</i> )
PVN	noyau paraventriculaire ( <i>paraventricular nucleus</i> )
QRFP	<i>pyroglutamylated RF-amide peptides</i>
RFa	RF amide
RI	Récepteur de l'insuline
SCD1	stéaroyl-CoA désaturase 1
SNC	système nerveux central
SREBP	<i>sterol response element binding protein</i>
STAT	signal transducers and activators of transcription
TNF- $\alpha$	facteur de nécrose tumorale- $\alpha$ ( <i>tumor necrosis factor-<math>\alpha</math></i> )
TZD	thiazolidinediones
UCP-1	protéine découplante 1 ( <i>uncoupled protein</i> )
VLDL	lipoprotéine de très petite densité ( <i>very low density lipoprotein</i> )
VMN	noyau ventromédian ( <i>ventromedian nucleus</i> )

*À mon père, **Bernard***

*À ma mère, **Clémentine***

*À mes frères, **Fabrice (Fa), Glory et Christian***

*À mes sœurs, **Sarah et Ester***

*À Me **André Mbombo** ainsi que toute sa famille*

## Remerciements

*Ceci est l'aboutissement d'un long parcours. Même si je suis l'acteur principal dans cet acte, ce serait mentir si je disais que j'y suis parvenu tout seul. Sans votre soutien je crois je n'aurai pas pu arriver à ce stade. Alors je tiens à vous remercier pour tout.*

*Je tiens tout d'abord à remercier **les membres de ma famille** pour tous les sacrifices consentis depuis que nous nous sommes séparés, pour leur support moral et pour leurs encouragements. Cette thèse est en partie la vôtre aussi. Merci papa pour ton soutien à tous égards et je ne saurais les décrire. C'est quand même toute une vie là!! LOOOL. Saches que tu es une inspiration et un modèle pour moi. Merci maman!! Tes prières sont exaucées maintenant. Je ne saurai te remercier pour ce soutien spirituel que tu as donné et que tu continues encore à donner. Cette persévérance m'inspire. À mes frères et sœurs, Fa, Glory, Christian, Sarah et Esther. Merci pour tous, nos fous rires sur les études. Merci pour qui vous êtes. C'est un honneur d'être votre grand frère.*

*Merci à celle qui m'a soutenu de près. Ton soutien durant la rédaction m'a été précieux. Toujours là pour me poser les bonnes questions et vérifier que j'ai bien avancé dans la rédaction. Merci pour tes prières. Bien que tu sois arrivée vers la fin de cette thèse, tu as été d'un soutien ÉNORME. Je crois que j'aurai une vie heureuse avec toi. Je t'aime Prisscille.*

*Je tiens aussi à remercier **ma seconde famille** qui a bien voulu m'accueillir et m'encourager durant toutes mes études universitaires.*

*Je tiens à remercier tous mes amis qui prenaient de mes nouvelles et pour vos encouragements. Merci!!*



*Je tiens à remercier de façon particulière mon directeur de recherche, **Dr Huy Ong**, pour sa disponibilité, ses précieux conseils et son expertise qu'il bien a voulu me montrer. Merci de m'avoir fait confiance pour ce sujet de thèse. Travailler avec vous m'a beaucoup mis au défi afin de faire sortir le meilleur de moi-même.*

*Je remercie ma codirectrice, **Dre Sylvie Marleau**. Merci de m'avoir accueilli dans le laboratoire et de m'avoir initié à la recherche. Merci pour l'attention que vous avez montrée, non seulement à moi, mais à tous les membres du labo. Vous avez fait en sorte que le travail dans le labo ne soit pas qu'un lieu de recherche, mais une « famille ».*

*Merci aux membres des deux laboratoires pour votre aide, vos conseils et votre amitié.*

*Merci de tout mon cœur, de toute ma force et de toute mon âme à **mon Seigneur, l'Éternel**. Ses voies sont celles que je veux suivre. Comme le dit ce chant : « ...Alors entend mon cœur... je ne pourrai pas te dire combien je t'aime... » Ses plans sont ceux qui me dirigent.*

## Citations

*La folie, voilà ce qu'héritent les stupides, mais la connaissance est la couronne des gens réfléchis (Prov. 14 : 18).*

*Fais bien ce que tu as à faire (le doctorat) et le Seigneur t'ouvrira des portes.  
Alain Simba en 1999.*

## **Chapitre I : INTRODUCTION**

## Considérations générales

Au cours des dernières années, l'obésité est devenue un problème majeur de santé publique dans la plupart des pays occidentalisés. L'Organisation mondiale de la santé définit un obèse comme toute personne ayant un indice de masse corporelle (IMC) égal ou supérieur à 30 kg/m<sup>2</sup>. Au Canada, la population atteinte d'obésité a plus que doublé en près de 10 ans selon les données de Santé Canada. Le nombre d'obèses est en croissance chez les jeunes canadiens et canadiennes.

L'obésité se caractérise par un excès de la masse adipeuse, conséquence soit d'un problème génétique, soit d'une mauvaise alimentation (Hu *et al.*, 2001). Dans ce dernier cas, la consommation de nourriture à forte teneur calorique sous forme d'hydrates de carbone et/ou de lipides et l'adoption d'un mode de vie sédentaire sont la cause du développement de l'obésité (Ford *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2001). Ce type d'alimentation constitue un apport énergétique qui sera principalement stocké sous forme de triglycérides (TG) dans les adipocytes du tissu adipeux.

Récemment, des neuropeptides présentant un motif Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (Chartrel *et al.*, 2003; Takayasu *et al.*, 2006), nommés RF-amid ou QRFP (*pyroglutamylated RF-amide peptides*) ont montré des propriétés orexigènes et hyperphagiques chez plusieurs espèces, dont l'homme et la souris (Chartrel *et al.*, 2005; Chartrel *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2009b; Ukena *et al.*, 2010). Des études faites chez l'homme ont montré que ces peptides sont présents dans la circulation sanguine et que les taux sont augmentés chez des sujets souffrant d'anorexie (Galusca *et al.*, 2012). Ces propriétés suggèrent un rôle potentiel de ces peptides dans la régulation de l'adipogenèse, mais aucune étude à ce jour n'a montré la fonction adipogénique de ces peptides. Le but de cette thèse était d'étudier les effets périphériques de ces peptides sur la régulation de l'adipogenèse et de la mobilisation des TG au niveau des adipocytes. Plus particulièrement, nos études portent sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de la lipolyse et l'accumulation des TG par le QRFP.

Cette thèse sera présentée en 5 chapitres et les résultats seront présentés par articles. Nous introduirons les mécanismes de l'adipogenèse et la physiologie du tissu adipeux, dont la mobilisation (lipolyse) et le stockage (lipogenèse) des TG. Enfin, nous discuterons du rôle des neuropeptides, dont les QRFP, dans la régulation centrale de l'appétit, ce qui nous conduira à notre hypothèse de recherche et aux objectifs spécifiques de ce travail, de la présentation des résultats obtenus et de leur discussion.

## **1. Le tissu adipeux**

### **1.1. Tissu adipeux blanc**

Chez les mammifères, il existe trois types de tissu adipeux, le tissu adipeux blanc le tissu adipeux brun et le tissu adipeux médullaire. Le tissu adipeux blanc représente près de 95 % de la masse adipeuse totale et 10 à 20 % du poids corporel. Le tissu adipeux blanc est une variété du tissu conjonctif qui se caractérise principalement par des cellules (adipocytes) contenant généralement une seule gouttelette lipidique (uniloculaire) occupant la majeure partie du cytoplasme et quelques mitochondries ainsi qu'un noyau qui est excentrique (Cinti, 2005) (figure 1A). En plus des adipocytes qui sont tassés les uns contre les autres pour former des lobules, le tissu adipeux blanc contient d'autres types cellulaires dont des cellules mésenchymateuses multipotentes, macrophages, préadipocytes, fibroblastes et cellules endothéliales. Ces cellules constituent la fraction stroma-vasculaire (FSV) (Prunet-Marcassus *et al.*, 2006).

Le tissu adipeux blanc est le siège du maintien de l'homéostasie des lipides, car en effet, les adipocytes blancs sont capables d'emmagasiner les AG et de les libérer lors d'un besoin par l'organisme (voir tableau I). Cependant, sa fonction ne se limite pas seulement un organe de stockage, puisqu'il est aussi un organe sécréteur. En effet, le tissu adipeux produit de nombreuses protéines appelées adipokines qui agissent soit de manière autocrine/paracrine soit de manière endocrine afin de réguler le métabolisme énergétique. Anatomiquement, chaque lobule est irrigué par des capillaires permettant, entre autre, l'apport des substrats énergétiques et des messagers hormonaux aux

adipocytes et le transport d'adipokines par la circulation sanguine. La régulation de l'homéostasie lipidique est possible grâce à l'innervation sympathique et parasympathique du tissu. En effet, l'innervation sympathique contrôle la lipolyse via la libération d'adrénaline tandis que l'innervation parasympathique permet de réguler les fonctions endocrines et de stimuler les processus anaboliques (Kreier *et al.*, 2002). Ainsi par exemple, le tissu adipeux viscéral est sensible aux effets de l'insuline, car il est le tissu qui exprime le plus de protéines de la voie de signalisation de l'insuline par comparaison au tissu adipeux sous-cutané (Laviola *et al.*, 2006). La masse du tissu adipeux viscéral est positivement corrélée avec l'intolérance au glucose, la résistance à l'insuline et l'élévation des concentrations plasmatiques de TG et de cholestérol (Thorne *et al.*, 2002).

Le tissu adipeux est présent sous différentes formes de dépôts localisés dans différents sites anatomiques. On distingue les dépôts sous-cutanés (abdominal, glutéo-fémoral), viscéral (omental, mésentérique, péri-rénal ou retropéritonéal, gonadique et péri-cardiaque) et intramusculaire (Figure 1B). Le dépôt de l'omentum est compris entre l'estomac et la rate jusqu'à l'abdomen ventral tandis que le dépôt mésentérique est attaché aux intestins.

<b>Caractéristiques</b>	<b>Tissu adipeux brun</b>	<b>Tissu adipeux blanc</b>
<b><i>Fonction (métabolisme énergétique)</i></b>		
	Thermogénèse+++	Adipogénèse+++
	Biogénèse mitochondriale	Forte capacité de stockage (sous forme de TG)
	Faible capacité de stockage	Lipogénèse
	Peu ou pas de sécrétion d'adipokines	Lipolyse
		Sécrétion d'adipokines (leptine, adiponectine+++)
<b><i>Anatomiques</i></b>		
Localisation	Interscapulaire, paravertébrale, axillaire, cervicale, médiastinale	Sous-cutanée, abdominale, péricardique, cervicale, rétro-péritonéale
Couleur	Marron	Blanc-jaune
Vascularisation	Hypervascularisé	Normale
Innervation	Système sympathique (++++)	Système sympathique (++) et parasymphatique (+)
<b><i>Microscopie</i></b>		
Adipocyte	Polygonal	Polyédrique à sphérique
Taille	15-60 µm	25-200 µm (hypertrophie)
Noyau	Central	Refoulé à la périphérie
Gouttelettes lipidiques	Multiple, dispersées dans le cytoplasme	Unique ou 2-3 dont une grosse
Mitochondries	Abondantes, volumineuses et denses	Rares, petites, allongées
Autres cellules	Rares	Macrophages, lymphocytes, cellules endothéliales, fibroblastes

Tableau I. Différences anatomiques et fonctionnelles entre les tissus adipeux bruns et blancs. Tiré de (Cariou, 2012)

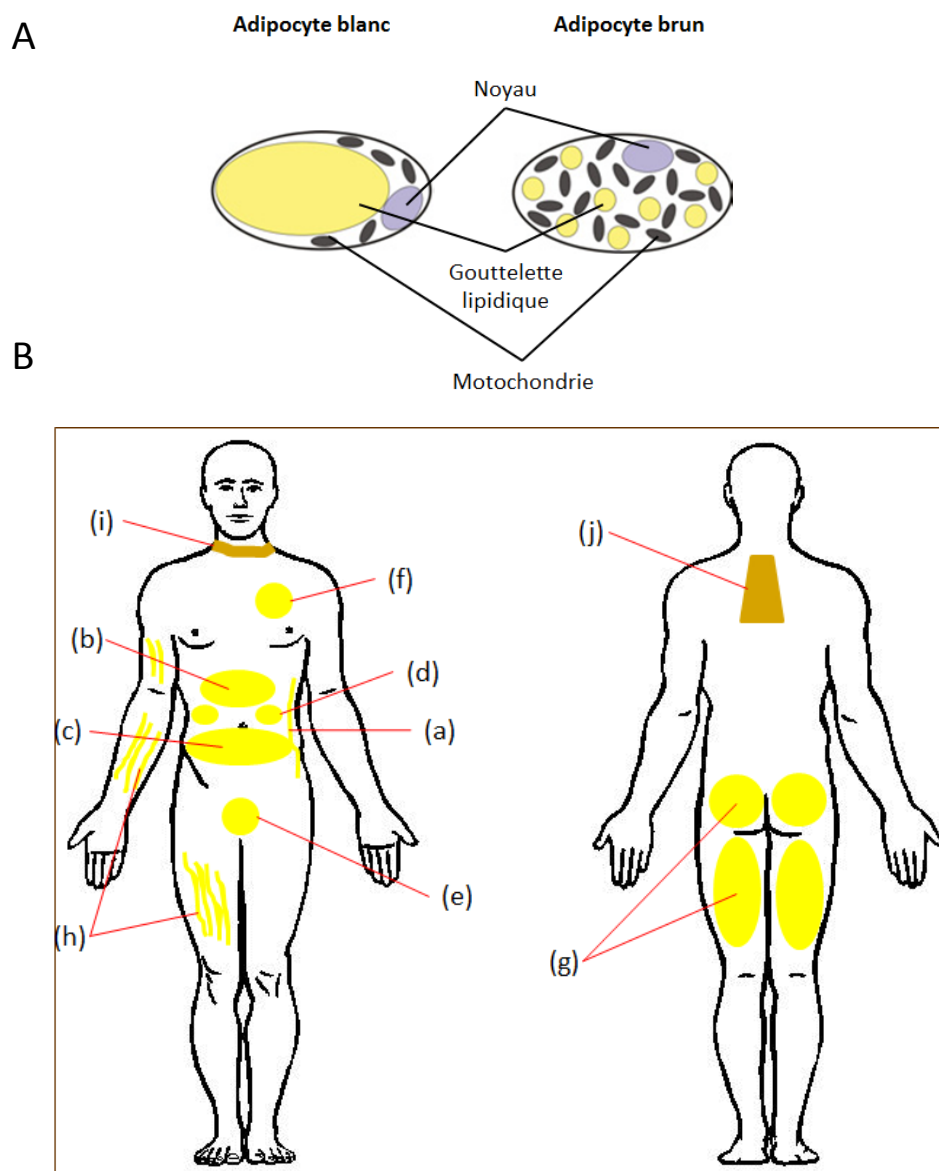


Figure 1 : Répartition des différents dépôts adipeux chez l'humain et schéma de l'adipocyte. Tiré de (Bjorndal *et al.*, 2011). A) structure de l'adipocyte. B) Dépôts adipeux sous-cutané abdominal (a), omental (b), mésentérique (c), péri-rénal ou rétro-péritonéal (d), gonadique (e), péri-cardique (f), glutéo-fémoral (g), intramusculaire (h), supra-claviculaire (i) et sous-scapulaire (j).



## 1.2. Tissu adipeux brun

L'adipocyte brun contient plusieurs gouttelettes lipidiques (multiloculaires) et beaucoup plus de mitochondries (Figure 1A et tableau I, ci-haut). Son noyau, contrairement à l'adipocyte blanc, peut être centrique. Le tissu adipeux brun est très vascularisé, ce qui lui confère, avec le grand contenu en mitochondrie, sa couleur brun-marron. Le tissu adipeux brun favorise la dissipation de l'énergie sous forme de chaleur, et est impliqué dans la thermogenèse adaptative sans frisson par opposition à la thermogenèse adaptative avec frisson qui est d'origine musculaire (Cannon & Nedergaard, 2004). La thermogenèse adaptative est provoquée par des changements environnementaux tels que le froid et la fièvre. La production de la chaleur par l'adipocyte brun est liée à l'activité de la protéine découplante (UCP-1, *uncoupled protein 1*) trouvée dans la membrane interne de la mitochondrie. Cette protéine favorise la rentrée des protons produits lors de la respiration mitochondriale ( $\beta$ -oxydation) de l'espace inter-membranaire vers la matrice mitochondriale. La diffusion de la chaleur produite dans l'organisme est facilitée par les nombreux vaisseaux sanguins qui irriguent le tissu adipeux brun. Mis à part cette vascularisation, le tissu adipeux brun est aussi innervé par le système sympathique qui régule la thermogenèse. Ainsi la libération d'adrénaline favorise, d'une part, la lipolyse des TG afin de générer des AG qui seront des substrats pour la production de la chaleur, et d'autre part, elle augmente l'expression de l'UCP-1 (Cannon & Nedergaard, 2004). Chez l'humain, le tissu adipeux brun est très exprimé chez le nouveau-né (1 à 5 % du poids corporel) et diminue progressivement à l'âge adulte (Virtanen & Nuutila, 2011). Chez le nouveau-né, on retrouve le tissu adipeux brun au niveau cervical, médiastinal et péri-rénal (Nedergaard *et al.*, 2007). Chez l'adulte, il a été récemment rapporté la présence du tissu adipeux brun au niveau cervical, supra-claviculaire, sous-scapulaire ainsi qu'au niveau thoracique, dans les régions péricardique et médiastinale (Gelfand *et al.*, 2005; Sacks *et al.*, 2009) (Figure 1).

Récemment, un nouveau type de tissu adipeux brun, dit tissu adipeux beige a été identifié. Contrairement aux adipocytes bruns, l'expression de l'UCP-1 est faible dans

les adipocytes beiges, mais le fait de les traiter par des  $\beta_3$ -agonistes induit une augmentation de l'expression de l'UCP-1 et la thermogénèse (Wu *et al.*, 2012a). Il s'avère que le tissu adipeux brun identifié chez l'humain adulte est en fait le tissu adipeux beige. Les adipocytes de ce tissu ne proviennent pas des myoblastes comme c'est le cas des adipocytes bruns (voir section différenciation), mais plutôt des adipoblastes (Wu *et al.*, 2012a; Pisani *et al.*, 2011). Les adipocytes beiges seraient des adipocytes blancs convertis en adipocytes capables de la thermogénèse et exprimant de la protéine UCP-1 (Pisani *et al.*, 2011). Le groupe de Spiegelman a identifié une hormone musculaire, l'irisine, capable d'induire cette conversion (Wu *et al.*, 2012a).

### **1.3. Tissu adipeux médullaire**

Le tissu adipeux médullaire est principalement retrouvé dans la moelle osseuse. Il est plus approprié de parler d'adipocytes médullaires que de tissu adipeux, car en effet, ils font partie du stroma médullaire de la moelle osseuse (Laharrague *et al.*, 1999).

### **1.4. Différenciation adipocytaire**

L'adipogenèse est le processus par lequel certaines cellules d'origine mésenchymateuse se différencient d'abord en préadipocytes; puis, ces derniers se différencient en adipocytes. L'adipogenèse se divise en deux étapes, la première étant l'étape de la détermination qui consiste en l'engagement (ou conversion) des cellules souches multipotentes en des cellules préadipocytaires. Les préadipocytes sont des cellules qui ont perdu la capacité de se différencier en d'autres types cellulaires. La deuxième étape est le processus de différenciation des préadipocytes en adipocytes, qui est caractérisée par des changements séquentiels dans la transcription de certains gènes spécifiques qui déterminent le phénotype de l'adipocyte (blanc ou brun). Ceci implique, dans le cas de la différenciation des adipocytes blancs, une activation et une transactivation de plusieurs familles de facteurs de transcription dont SREBP-1c (*sterol response element binding protein 1c*), C/EBP (*CCAAT-enhancer binding protein*) et PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor*) suite à une stimulation hormonale conduisant à un changement de la morphologie cellulaire (Green & Kehinde, 1975).

Les adipocytes proviennent des cellules souches embryonnaires multipotentes mésenchymateuses ayant la capacité de se convertir en cellules mésodermiques de type adipoblastes (Zuk *et al.*, 2002; Zuk *et al.*, 2001), ostéoblastes (Ohsumi *et al.*, 1991), chondroblastes (Awad *et al.*, 2004) ou myoblastes (Mizuno *et al.*, 2002). Les adipoblastes, qui sont des cellules unipotentes de la lignée adipogénique, peuvent être induits en préadipocytes (Zuk *et al.*, 2002; Zuk *et al.*, 2001). Les adipocytes blanc et brun proviennent de cellules progénitrices différentes. Ainsi, les adipocytes blancs proviennent des cellules mésodermiques de type adipoblaste tandis que les adipocytes bruns proviennent de cellules progénitrices de type myocyte qui expriment le facteur de transcription myogénique Myf5 (*myogenic factor 5*) (Timmons *et al.*, 2007). La différenciation de ces cellules en adipocytes bruns est sous la régulation des facteurs de différenciation, dont BMP7 (*bone morphogenetic protein 7*) et PRDM 16 (*PR-domain containing protein*) qui régulent l'expression de PGC-1 (*PPAR- $\gamma$  coactivator*) et UCP-1 (Fruhbeck *et al.*, 2009) (Figure 2). Ces deux facteurs de différenciation sont importants dans l'acquisition du phénotype d'adipocyte brun. En effet, des expériences ont montré d'une part, que l'inhibition de l'expression de PRDM 16 dans les cellules progénitrices provenant des souris Myf5<sup>+/+</sup> conduit à leur différenciation en myocytes (Seale *et al.*, 2008) et, d'autre part, la surexpression de BMP7 dans les préadipocytes induit leur différenciation en adipocytes bruns ainsi que l'expression de PGC-1, UCP-1 et même PRDM 16 (Tseng *et al.*, 2008). Toutefois, la séquence dans l'expression de ces deux facteurs de transcription n'a pas encore été déterminée.

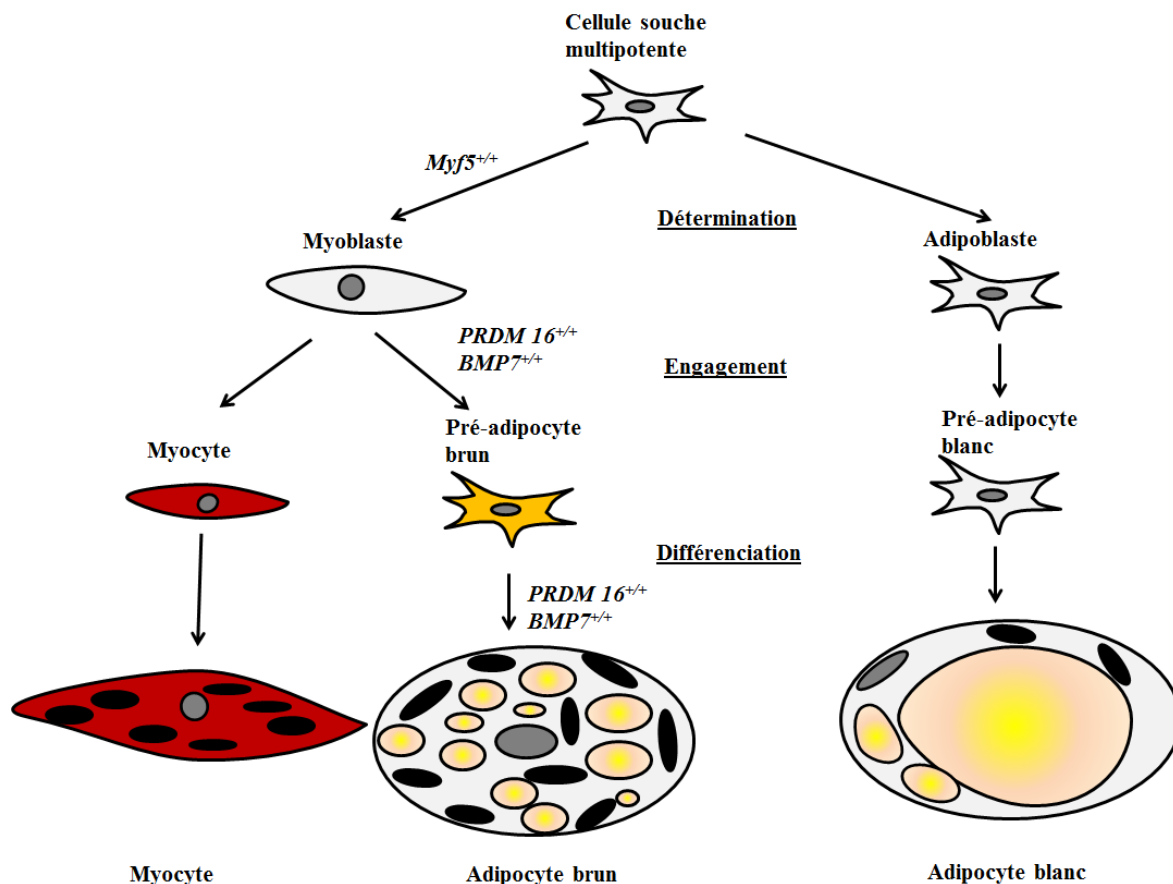


Figure 2: Origine des adipocytes des tissus adipeux blancs et bruns. Traduit et modifié de (Langin, 2010). BMP7 : *bone morphogenetic protein 7*, Myf5 : *myogenic factor 5* et PRDM 16 : *PR-domain containing protein*.

Les étapes de la différenciation en adipocytes blancs ont été déterminées chez les lignées cellulaires murines immortalisées telles que les préadipocytes 3T3-L1, 3T3-F442A, 3T3-C2 et les Ob1771. Les cellules 3T3-L1 et 3T3-F442A sont des cellules clonales isolées de cellules 3T3 dérivées d'embryons de souris Swiss de 17 à 19 jours (Green & Kehinde, 1976; Green & Kehinde, 1975; Green & Meuth, 1974). Plusieurs lignées cellulaires et des cultures primaires des cellules isolées de la fraction FSV ont été utilisées (Tableau II). Les cellules 3T3-L1 constituent le modèle cellulaire le plus étudié pour la compréhension du processus de différenciation adipocytaire. Ces cellules sont des préadipocytes unipotents de type fibroblastique (Figure 2). Dans ce modèle, la conversion des préadipocytes en adipocytes peut être résumée en 4 étapes : 1) la

prolifération cellulaire, 2) l'arrêt de la croissance suite à la confluence, 3) l'expansion clonale suite à une induction hormonale (engagement) et 4) l'arrêt de la croissance et maturation (Figures 2 et 3).

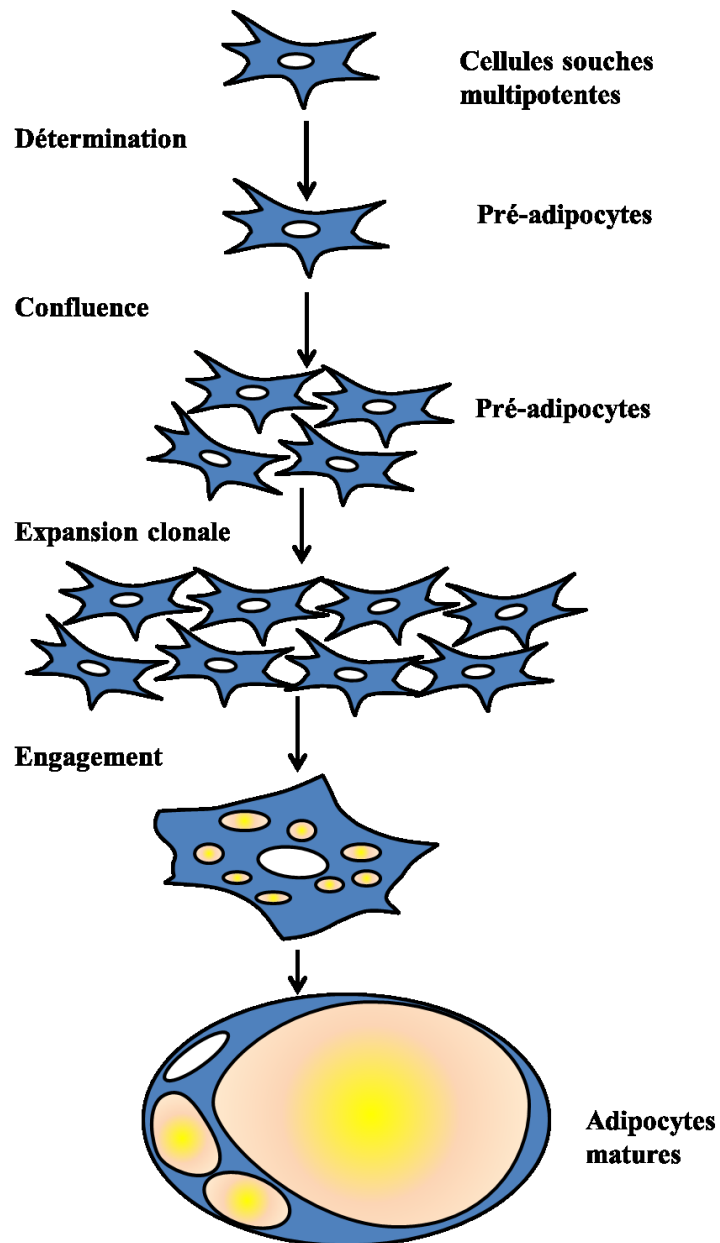


Figure 3: Étapes de la différenciation des adipocytes blancs. Traduit et modifié de (Feve, 2005).

<b>Lignées cellulaires</b>	<b>Origine/Étape de développement</b>	<b>Agents d'induction</b>	<b>Références</b>
Cellules ES	Blastocytes de souris	Acide rétinoïque	(Dani <i>et al.</i> , 1997)
CH3 10T1/2	Embryons de souris	5-azacytidine	(Konieczny & Emerson, Jr., 1984)
TA1	Dérivées des cellules 10T1/2 traitées avec la 5-azacytidine (agent de déméthylation)	10 % SVF, insuline et Dex	(Chapman <i>et al.</i> , 1984)
3T3-L1	Dérivées des embryons désagrégés de souris de 17 à 19 jours	10 % SVF, insuline (fortes concentrations), MIX et Dex	(Rubin <i>et al.</i> , 1978)
3T3-F442A	Idem	10 % SVF, insuline	(Moustaid <i>et al.</i> , 1990; Spiegelman <i>et al.</i> , 1983)
Ob1771	Proviennent de cellules précurseurs présentes dans le TA épидидymaire des souris <i>ob/ob</i>	8 % de SVF, insuline et T3	(Gharbi-Chihi <i>et al.</i> , 1981)
<b>Cultures primaires</b>	<b>Source/Âge</b>	<b>Agents d'induction</b>	<b>Références</b>
Rat	Sous-cutané, épидидymaire, rétro-péritonéal/nouveau-nés, âgés de 4 semaines ou adultes	Insuline (en faibles concentrations avec 10 % de SVF ou en forte concentration, mais sans sérum)	(Deslex <i>et al.</i> , 1987a; Gregoire <i>et al.</i> , 1990)
Souris	Sous-cutané/8 à 12 jours	Insuline, HDL, Dex sans sérum	(Litthauer & Serrero, 1992)
Humain	Abdominal sous-cutané /âges variables	Insuline (fortes concentrations) avec glucocorticoïdes	(Deslex <i>et al.</i> , 1987b; Hauner <i>et al.</i> , 1989)

Tableau II. Principaux types cellulaires utilisés dans les études de différenciation. Traduit et modifié de (Gregoire *et al.*, 1998).SVF, Sérum de veau foetal; MIX, méthylisobutylxanthine; Dex, dexaméthasone; HDL, lipoprotéine de haute densité; T3, 3,3', 5-triiodothyronine; TA : tissu adipeux.

La différenciation est initiée lorsque les préadipocytes en culture atteignent la confluence (contact), ce qui a pour conséquence l'arrêt de la prolifération cellulaire. Les cellules sont alors au cycle cellulaire G<sub>1</sub>S (Richon *et al.*, 1997). L'arrêt de la

prolifération lorsque les cellules sont en phase G<sub>1</sub>S est primordial à la différenciation. En effet, il a été montré que d'une part, des cultures primaires de préadipocytes pouvaient se différencier sans atteindre la confluence, car ces cellules sont en phase G<sub>1</sub>S. D'autre part, des préadipocytes 3T3-F442A mis en suspension après avoir atteints la confluence parvenaient aussi à se différencier (Pairault & Green, 1979).

L'ajout d'agents d'induction dans le milieu de culture (Tableau II) permet aux cellules d'entrer dans un autre cycle cellulaire de 24 à 36 heures appelé expansion clonale mitotique pendant lequel ces cellules font deux mitoses après avoir atteint la confluence (Bernlohr *et al.*, 1985; Scott *et al.*, 1982). Cette division cellulaire est nécessaire afin de permettre aux différents facteurs de transcription d'accéder à l'ADN et d'initier la transcription des gènes adipogéniques (Scott *et al.*, 1982). Des études ont montré que l'inhibition de la synthèse de l'ADN lors de l'expansion clonale prévient la différenciation des préadipocytes 3T3-F442A et Ob1771 en adipocytes (Kuri-Harcuch & Marsch-Moreno, 1983; Amri *et al.*, 1986). En bloquant la réplication de l'ADN avec la cytosine arabinoside, un agent intercallant de l'ADN, une diminution de 95 % de la réplication de l'ADN et une inhibition de la conversion en adipocytes ont été observés (Kuri-Harcuch & Marsch-Moreno, 1983). L'étape de l'expansion clonale s'accompagne aussi d'une activation des gènes impliqués dans la synthèse *de novo* de TG (détaillée dans la section 2.1) avec, comme conséquence, l'apparition de petites gouttelettes lipidiques (Kuri-Harcuch & Marsch-Moreno, 1983).

D'un point de vue moléculaire, la différenciation se traduit par l'expression des gènes dits adipogéniques qui permettent à la cellule de remplir sa fonction, à savoir la régulation du métabolisme lipidique. Ainsi par exemple l'expression des gènes dont les protéines sont impliquées dans le transport d'AG ne sont pas exprimés dans les préadipocytes, mais sont présents dans des adipocytes matures. Certains gènes tel que ceux exprimant des protéines de la lipogenèse *de novo* (LDN) atteignent le maximum de leur expression durant les premières étapes de la différenciation (engagement) et sont par la suite soit réprimés soit diminués. De manière générale, l'expression de ces gènes est sous le contrôle des facteurs de transcription qui sont eux même activés par des

hormones telles que l'insuline, les hormones thyroïdiennes et l'hormone de croissance. Dans les sections suivantes, nous énumérerons les facteurs de transcription importants ainsi que les hormones régulant la différenciation des adipocytes blancs.

### **1.4.1. Facteurs de transcription régulant la différenciation des adipocytes blancs**

Plusieurs familles de facteurs de transcription ayant des modes d'activation différents jouent des rôles-clés dans le processus de différenciation adipocytaire en régulant l'expression de gènes spécifiques permettant à l'adipocyte de remplir ses fonctions dans le métabolisme lipidique. Ces facteurs incluent les facteurs de transcription C/EBP- $\alpha$ , - $\beta$  et - $\delta$ , SREBP-1c et les récepteurs nucléaires PPAR- $\gamma$ 2 et - $\delta$ . Ces trois familles de facteurs sont les plus importantes dans le processus de différenciation et agissent de façon synergique et séquentielle dans la transcription des gènes adipogéniques. Toutefois, c'est le récepteur nucléaire PPAR- $\gamma$ 2 qui est l'élément central dans la différenciation du tissu adipeux blanc, car il régule la transcription d'un grand nombre de gènes. Dans cette section nous décrirons les caractéristiques des principaux facteurs de transcription et de quelques autres facteurs impliqués dans le processus de différenciation des adipocytes blancs.

#### **1.4.1.1. PPAR- $\gamma$**

Les PPAR (*Peroxisome proliferator-activated receptor* ou récepteurs activées par les proliférateurs de peroxisome) sont des récepteurs nucléaires activés par les ligands de nature lipidique tels les acides hydroxyoctadécadiénoïque-9 et -13, (9- et 13-HODE) (Nagy *et al.*, 1998). Trois isotypes PPAR ont été identifiés et présentent un profil d'expression tissulaire différent. Ainsi le PPAR- $\alpha$  est plus exprimé au niveau du foie, tissu adipeux brun, muscle squelettique et cœur où il participe au catabolisme des AG (Auboeuf *et al.*, 1997). Le PPAR- $\delta$  est exprimé dans les tissus capables de mobiliser les lipides tels que le tissu adipeux, le petit intestin, le cœur et le muscle squelettique (Braissant *et al.*, 1996; Bastie *et al.*, 1999). Dans le tissu adipeux, le PPAR- $\delta$  est détecté dans les préadipocytes en prolifération et son niveau d'expression est



augmenté même après l'atteinte de la confluence. Il favorise l'expression de PPAR- $\gamma$  dans les préadipocytes traités avec l'acide linoléique (Bastie *et al.*, 1999). Le PPAR- $\gamma$  présente 2 isoformes, PPAR- $\gamma$ 1 et PPAR- $\gamma$ 2, produites suite à l'activation de promoteurs alternatifs au niveau du même gène et par épissage différentiel du transcrit. PPAR- $\gamma$ 1 est hautement exprimé dans le tissu adipeux, le côlon et, moindrement au niveau du muscle, foie, cœur et rein, tandis que PPAR- $\gamma$ 2 est exprimé uniquement dans le tissu adipeux (Kubota *et al.*, 1999; Tontonoz *et al.*, 1994). Au niveau du tissu adipeux, le PPAR- $\gamma$  régule l'expression de plusieurs gènes dont le *Fat/Cd36* (*fatty acid translocase* : facilitateur du transport d'acides gras), l'*Acs* (*Acyl-CoA synthetase*), et l'*Albp* (*adipocyte lipid binding protein*) (Michalik & Wahli, 1999). L'activité des PPAR- $\gamma$  est spécifiquement induite par les composés antidiabétiques, les thiazolidinediones (TZD) et par les ligands naturels tels que la 15-désoxy- $\Delta$ 12-14-prostaglandine J2 (15d-PGJ2) (Kliwer *et al.*, 1995; Forman *et al.*, 1995) et les acides 9- et 13-HODE (Marx *et al.*, 1999).

Le PPAR- $\gamma$  est induit pendant l'expansion clonale et atteint un niveau maximal lorsque la différenciation est terminée. L'expression de PPAR- $\gamma$  induit l'arrêt de la croissance lors de l'expansion clonale des préadipocytes (Altiok *et al.*, 1997). Le rôle de PPAR- $\gamma$ 2 dans la régulation de l'adipogenèse a été démontré par des expériences de perte et de gain de fonctionnalité. La déficience en PPAR- $\gamma$  chez les souris est létale au stade embryonnaire (Barak *et al.*, 1999; Rosen *et al.*, 1999). L'induction de la différenciation de fibroblastes embryonnaires ou de cellules souches embryonnaires de souris déficientes en PPAR- $\gamma$ 2 n'était pas possible *in vitro* (Rosen *et al.*, 1999; Barak *et al.*, 1999). Par contre, les souris déficientes en PPAR- $\gamma$  spécifiquement au niveau du tissu adipeux sont viables mais présentent une lipodystrophie (He *et al.*, 2003). Il en est de même pour les souris hétérozygotes (PPAR- $\gamma$ <sup>+/-</sup>) qui présentent une diminution de la masse adipeuse et une diminution de la taille des adipocytes (Kubota *et al.*, 1999). Les travaux de Chawla et ses collaborateurs ont montré qu'un ligand non sélectif du PPAR (WY14,643, ligand de PPAR- $\alpha$  et - $\gamma$ ), même sans ajout du cocktail de différenciation, peut induire la différenciation des préadipocytes en adipocytes après sept jours de

traitement (Chawla & Lazar, 1994; Chawla *et al.*, 1994). Ces observations sont accompagnées d'une hausse importante des niveaux d'expression de PPAR- $\gamma$ . Le traitement de cultures primaires de préadipocytes humains provenant du tissu adipeux sous-cutané par la troglitazone, une thiazolidinedione (TZD) ou le 15d-PGJ<sub>2</sub> sur induit leur différenciation en adipocytes (Adams *et al.*, 1997). Par contre, lorsque l'activité transcriptionnelle de PPAR- $\gamma$  est réduite par la surexpression d'un dominant négatif dans les préadipocytes, une inhibition de la différenciation induite par les TZDs est observée (Gurnell *et al.*, 2000). À l'opposé, la surexpression de PPAR- $\gamma$ 2 dans les préadipocytes de la lignée de NIH-3T3 augmente leur différenciation en adipocytes en présence des ligands de PPAR- $\gamma$  et de stimuli hormonaux (dexaméthasone, isobutylméthylxanthine et insuline) (Tontonoz *et al.*, 1994).

#### 1.4.1.2. Les C/EBPs

Les facteurs de transcription C/EBPs font partie de la superfamille bZIP (*basic leucine zipper*) comprenant un domaine de liaison à l'ADN (région basique) et un domaine de dimérisation (motif de leucine zipper) dans la partie C-terminale, ainsi qu'un domaine d'activation de la transcription dans la partie N-terminale. Six membres de la famille des facteurs de transcription C/EBPs ont été identifiés et les adipocytes en expriment trois, soit les C/EBP- $\alpha$ , - $\beta$  et - $\delta$  (Darlington *et al.*, 1998). Leur expression varie dans le temps pendant la différenciation (Cao *et al.*, 1991). Ainsi, les facteurs de transcription C/EBP- $\beta$  et - $\delta$  sont exprimés précocement pendant la différenciation, juste après la stimulation hormonale tandis que le C/EBP- $\alpha$  est exprimé tardivement (Yeh *et al.*, 1995; Cao *et al.*, 1991). Le facteur C/EBP- $\alpha$  est responsable de la transcription de certains marqueurs adipocytaires, tels que le transporteur du glucose (GLUT-4) (Kaestner *et al.*, 1990), la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK), le récepteur de l'insuline (McKeon & Pham, 1991) et la leptine (Hwang *et al.*, 1996).

##### 1.4.1.2.1. Les C/EBP- $\beta$ et - $\delta$ dans l'initiation de la différenciation

Les C/EBP- $\beta$  et - $\delta$  sont exprimés de façon précoce au cours de la différenciation (Yeh *et al.*, 1995; Cao *et al.*, 1991). En effet, il a été montré que l'expression des

C/EBP- $\beta$  et - $\delta$  était induite immédiatement, tandis que celle du C/EBP- $\alpha$  était retardée de 3 à 4 jours, après l'initiation de la différenciation (Cao *et al.*, 1991). Les ARNm de C/EBP- $\beta$  et - $\delta$  augmentent de manière transitoire au cours de la différenciation dans les préadipocytes, avec une expression maximale 2 jours après le début de la différenciation. Cependant, 4 jours suivant le début de la différenciation, l'expression de C/EBP- $\beta$  est réduite de 50 % tandis que celle de C/EBP- $\delta$  est fortement réduite, voire nulle (Cao *et al.*, 1991). Cet événement coïncide avec l'induction de l'expression de C/EBP- $\alpha$  (Lane *et al.*, 1999). Des études ultérieures ont montré que C/EBP- $\beta$  et - $\delta$  étaient responsables de l'induction de l'expression de C/EBP- $\alpha$  et de PPAR- $\gamma$  (Yeh *et al.*, 1995; Zhu *et al.*, 1995; Clarke *et al.*, 1997).

Des études *in vitro* ont montré que l'expression de C/EBP- $\delta$  et de C/EBP- $\beta$  augmente en réponse à la dexaméthasone (Dex) et au méthylisobutylxanthine (MIX), respectivement (Wu *et al.*, 1996; Yeh *et al.*, 1995). En effet, la surexpression de C/EBP- $\beta$  dans les préadipocytes NIH-3T3, en présence d'un cocktail d'induction ne contenant pas de MIX, induit fortement la différenciation de ces cellules (Wu *et al.*, 1996). Ceci s'accompagne d'une augmentation de l'expression de PPAR- $\gamma$  (Wu *et al.*, 1995). Dans les préadipocytes 3T3-L1, la surexpression de C/EBP- $\beta$  seule, et non celle de C/EBP- $\delta$ , est suffisante pour induire la différenciation de ces cellules en l'absence de Dex et MIX (Yeh *et al.*, 1995). Ceci suggère que C/EBP- $\delta$  joue un rôle mineur dans la différenciation tandis que le C/EBP- $\beta$  est essentiel.

Le rôle de C/EBP- $\beta$  et  $\delta$  dans l'initiation de la différenciation a aussi été montrée par des études de perte de fonctionnalité. Les souris déficientes en C/EBP- $\beta$  ne survivent que quelques semaines après leur naissance et présentent une lipodystrophie (Tanaka *et al.*, 1997). Les préadipocytes provenant des embryons des souris *C/ebp- $\beta$ <sup>-/-</sup>* ne se différencient pas en présence du cocktail inducteur et présentent des faibles niveaux d'expression de PPAR- $\gamma$  et de C/EBP- $\alpha$  par comparaison aux préadipocytes embryonnaires de souris de type sauvage (Tanaka *et al.*, 1997). Les souris double déficientes en C/EBP- $\beta$  et C/EBP- $\delta$  ont un faible taux de survie et présentent une masse adipeuse epididymaire très réduite comparativement aux souris de type sauvage

(Tanaka *et al.*, 1997). Les fibroblastes embryonnaires isolés de ces souris ne se différencient pas et n'expriment pas de PPAR- $\gamma$  et de C/EBP- $\alpha$ .

#### 1.4.1.2.2. *Le C/EBP- $\alpha$ dans la régulation de la différenciation*

Différentes approches ont montré le rôle de C/EBP- $\alpha$  dans la différenciation adipocytaire notamment dans la régulation de l'expression des gènes impliqués dans la maturation et dans la réponse à l'insuline (Kaestner *et al.*, 1990; Christy *et al.*, 1989; Lane *et al.*, 1996). Dans les 3T3-L1 et les NIH-3T3 adipocytes, le C/EBP- $\alpha$  régule l'activité des promoteurs de la leptine (Hwang *et al.*, 1996), du GLUT4 (Kaestner *et al.*, 1990), de la stéaryol-CoA désaturase (SCD1) et du récepteur de l'insuline (McKeon & Pham, 1991). En inhibant l'expression de C/EBP- $\alpha$  par l'utilisation d'ARN antisens, la différenciation des préadipocytes 3T3-L1 est considérablement réduite ainsi que l'accumulation des lipides et l'expression des marqueurs spécifiques (Lin & Lane, 1992). Par contre, la surexpression de ce facteur de transcription chez des fibroblastes de différentes lignées cellulaires induit leur différenciation en l'absence de stimulateurs hormonaux (Freytag *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 1993).

Le rôle du facteur de transcription C/EBP- $\alpha$  dans la maturation des adipocytes a été défini suite à des observations faites chez des souris déficientes en C/EBP- $\alpha$ . Ces dernières meurent 8 heures après la naissance des suites d'une hypoglycémie, et présentent une lipodystrophie caractérisée par une absence d'accumulation de lipides au niveau du tissu adipeux (Wang *et al.*, 1995). Une administration de glucose permet toutefois à ces souris de survivre jusqu'à 36 heures après leur naissance. Les observations morphologiques des adipocytes des souris déficientes en C/EBP- $\alpha$  révèlent que ces cellules ne possèdent pas de gouttelettes lipidiques. Anatomiquement, ces souris ne possèdent pas de tissu adipeux blanc. Cependant, *in vitro*, les préadipocytes des souris déficientes en C/EBP- $\alpha$  se différencient normalement en adipocytes en présence de ligands de PPAR, seulement lorsqu'on surexprime le PPAR- $\gamma$ , car ces cellules n'ont pas de PPAR- $\gamma$  endogène (Wu *et al.*, 1999). Une autre particularité de ces adipocytes est qu'ils sont incapables de répondre à la stimulation du transport du glucose par l'insuline

et l'expression du récepteur de l'insuline est fortement réduite (Wu *et al.*, 1999). Des études récentes, chez des souris dont le C/EBP- $\alpha$  a été aboli après la naissance, ont montré une diminution de la masse du tissu adipeux blanc, confirmant ainsi le rôle de C/EBP- $\alpha$  dans la maturation des adipocytes (Yang *et al.*, 2005). Dans les adipocytes blancs, C/EBP- $\alpha$  et le PPAR- $\gamma$  agissent de façon synergique pour induire la transcription des gènes codant pour les protéines impliquées dans le maintien du phénotype adipocytaire (Shao & Lazar, 1997; Tontonoz *et al.*, 1994).

Contrairement aux C/EBP- $\beta$  et - $\delta$ , qui sont abondamment exprimés pendant la phase d'expansion clonale, le C/EBP- $\alpha$  est exprimé après l'arrêt de cette phase. En effet, C/EBP- $\alpha$  possède une activité anti-mitotique en favorisant l'expression de l'inhibiteur de la kinase cycline-dépendante (CKI ou p21), inhibiteur d'une enzyme importante dans le déclenchement du cycle cellulaire (Timchenko *et al.*, 1996; Cram *et al.*, 1998). L'augmentation de l'expression de p21 conduit à l'inhibition de la phosphorylation du suppresseur de la protéine du rétinoblastome (pRB) permettant ainsi aux cellules de sortir de la phase G<sub>1</sub> du cycle cellulaire (Hiebert *et al.*, 1992). En effet, lorsque C/EBP- $\alpha$  est exprimé dans les préadipocytes, il prévient la mitose post-confluence (Umek *et al.*, 1991).

#### 1.4.1.3. SREBP-1c

Le SREBP-1c ou ADD1 (*adipocyte determination and differentiation factor 1*) fait partie de la famille de facteurs de transcription hélice-boucle-hélice. Les SREBPs sont codés par 2 gènes, SREBP-1 et SREBP-2. Un épissage alternatif de SREBP-1 conduit à l'expression de deux isoformes, SREBP-1a et -1c (Shimomura *et al.*, 1998). Dans les adipocytes, le SREBP-1c induit la transcription des gènes tels que l'ACC-1 (*acetyl-CoA carboxylase*) et la FAS (*fatty acid synthetase*), impliqués dans la biosynthèse *de novo* des triglycérides (Shimomura *et al.*, 1998).

L'expression de SREBP-1c est détectée 24 heures après l'initiation de la différenciation par des stimuli hormonaux et elle s'accompagne d'une induction de l'expression de FAS dans les préadipocytes NIH-3T3 (Kim & Spiegelman, 1996).

Toutefois, la surexpression de SREBP-1c dans ces cellules n'est pas suffisante pour les convertir en adipocytes (Kim & Spiegelman, 1996). Par contre la surexpression d'un dominant négatif dans les préadipocytes inhibe la différenciation, en particulier la LDN nécessaire à la formation de premières gouttelettes lipidiques (Kim & Spiegelman, 1996). L'expression et l'activation de SREBP-1c ne sont pas seulement nécessaires à l'induction de la LDN, mais régulent l'activité transcriptionnelle de PPAR- $\gamma$ . En fait, il a été suggéré que le SREBP-1c régule l'activation de PPAR- $\gamma$  en induisant la production des ligands des PPAR- $\gamma$  (Kim *et al.*, 1998b). Au-delà de la régulation de l'activité des PPAR- $\gamma$ , l'activité du SREBP-1c augmente la transcription des PPAR- $\gamma$  dans les préadipocytes 3T3-L1 (Fajas *et al.*, 1999).

## **1.4.2. Autres facteurs impliqués dans la régulation de l'adipogénèse**

### **1.4.2.1. Les facteurs de transcription STAT**

La famille des facteurs de transcription STAT (*signal transducers and activators of transcription*) comprend 7 protéines qui sont activées par phosphorylation sur des résidus tyrosine en réponse à la stimulation des récepteurs dont les récepteurs des cytokines et de l'hormone de croissance (HC). L'activation des STATs conduit à leur translocation au noyau où ils lient l'ADN et régulent la transcription. Les STAT1, -3 et -5 sont présents dans les préadipocytes et les adipocytes, mais seule l'expression de STAT1, -5A et -5B augmente fortement lors de la différenciation (Stephens *et al.*, 1996; Stewart *et al.*, 1999; Harp *et al.*, 2001). L'inhibition des STAT5A avec des oligonucléotides inhibe la différenciation induite par l'HC chez les cellules 3T3-F442A (Yarwood *et al.*, 1999). À l'opposé, la surexpression de STAT5A induit la différenciation en absence d'HC (Shang & Waters, 2003). Par contre, la surexpression de STAT5B n'induit pas la différenciation en adipocytes des cellules NIH-3T3 (Floyd & Stephens, 2003). L'expression des STAT5 est observée après l'ajout du cocktail de différenciation et elle précède l'expression de PPAR- $\gamma$  chez les 3T3-L1 préadipocytes (Baugh, Jr. *et al.*, 2007; Floyd & Stephens, 2003). En effet, il a été démontré que STAT5A et -5B augmentent l'activité de C/EBP- $\beta$  et - $\delta$  au niveau du

promoteur du gène de PPAR- $\gamma$ , augmentant ainsi l'activité transcriptionnelle de PPAR- $\gamma$  (Kawai *et al.*, 2007).

#### 1.4.2.2. Les facteurs Wnt

Les facteurs Wnt sont des protéines de signalisation sécrétées et qui agissent de façon autocrine/ou paracrine afin de réguler la croissance et la différenciation cellulaire (Cadigan & Nusse, 1997; Logan & Nusse, 2004). Les voies de signalisation induites par les Wnts via les récepteurs *frizzled* impliquent une inhibition de la GSK-3 $\beta$  (*glycogen synthase kinase*) qui est localisée dans un complexe multi-protéique comprenant la  $\beta$ -caténine (Logan & Nusse, 2004). Au niveau moléculaire, l'activation de GSK-3 $\beta$  conduit à la phosphorylation et à la dégradation de la  $\beta$ -caténine tandis que son inhibition conduit à la translocation de la  $\beta$ -caténine dans le noyau (Behrens *et al.*, 1998). Wnt10b est très exprimé dans les préadipocytes, mais son expression décline rapidement avec l'initiation de la différenciation (Bennett *et al.*, 2002). Wnt10b jouerait un rôle dans le maintien des cellules au stade non-différentié via la voie Wnt/ $\beta$ -caténine (Ross *et al.*, 2000). En effet, une surexpression de Wnt, ou une mutation de la  $\beta$ -caténine au site de phosphorylation de GSK-3 $\beta$ , ou encore une inhibition de l'activité de GSK-3 $\beta$  conduisent à une inhibition de la différenciation des préadipocytes, caractérisée par l'inhibition de l'expression de PPAR- $\gamma$  et C/EBP- $\alpha$  (Ross *et al.*, 2000; Bennett *et al.*, 2002). La répression complète de  $\beta$ -caténine au premier jour d'induction de la différenciation coïncide avec l'induction de l'expression de C/EBP- $\beta$  et de PPAR- $\gamma$  (Moldes *et al.*, 2003). Il a été démontré que la surexpression de PPAR- $\gamma$  inhibe l'expression de  $\beta$ -caténine dans les cellules 3T3-L1, ce qui conduit à l'induction de la différenciation (Moldes *et al.*, 2003).

#### 1.4.2.3. Les facteurs de transcription KLF

Les facteurs de transcription KLF (*Krüppel-like factor*) sont des régulateurs transcriptionnels de la liaison à l'ADN et jouent un rôle dans la régulation de la prolifération, de la différenciation et du développement cellulaire. Dans la différenciation des cellules 3T3-L1 en adipocytes, il a été démontré que les KLF-2, -3, -

4, -5 et -15 jouent des rôles différents, mais tout aussi importants. KLF-2 est très exprimé dans les préadipocytes et une surexpression constitutive inhibe l'expression de PPAR- $\gamma$  sans affecter l'expression de C/EBP- $\beta$  et  $-\delta$ . Cette inhibition de l'expression est due au fait que KLF-2 inhibe l'activité du promoteur de PPAR- $\gamma$ 2 (Banerjee *et al.*, 2003). KLF-3 réprime l'adipogenèse en recrutant des corépresseurs au C/EBP- $\alpha$  (Sue *et al.*, 2008). KLF-4 active la différenciation en transactivant le promoteur de C/EBP- $\beta$  (Birsoy *et al.*, 2008). Son expression est détectée dans les 30 minutes suivant l'ajout du cocktail inducteur dans les cellules 3T3-L1 (Birsoy *et al.*, 2008). KLF-5 est requis pour la différenciation et son expression dans les préadipocytes est induite dans les premières phases de la différenciation. Son expression est induite par C/EBP- $\beta$  et  $-\delta$  et agit de concert avec ces derniers afin d'activer le promoteur de PPAR- $\gamma$  (Oishi *et al.*, 2008; Oishi *et al.*, 2005). Contrairement aux autres KLF, l'expression de KLF-15 n'est pas transitoire, mais elle est augmentée durant la différenciation des 3T3-L1 en adipocytes. Son inhibition, soit par l'utilisation d'un dominant négatif, soit par l'utilisation d'ARNi, réduit l'expression de PPAR- $\gamma$  (Mori *et al.*, 2005) et bloque l'adipogenèse et l'accumulation des lipides (Nagare *et al.*, 2011). KLF-15 et C/EBP- $\alpha$  agissent en synergie afin d'augmenter l'activité du promoteur de PPAR- $\gamma$ 2 (Mori *et al.*, 2005; Nagare *et al.*, 2011).

#### 1.4.2.4. Les facteurs de transcription GATA2 et GATA3

Les facteurs de transcription GATA2 et GATA3 sont des protéines en forme de doigts de zinc exprimées dans les préadipocytes dont l'expression diminue pendant la maturation des adipocytes. L'expression constitutive de GATA2 et GATA3 inhibe la différenciation et maintient les cellules sous forme de préadipocytes. Ceci est dû au fait qu'ils réduisent l'activité du promoteur de PPAR- $\gamma$  (Tong *et al.*, 2000). De plus il a été observé une diminution de l'expression de GATA2 et GATA3 dans le tissu adipeux blanc des souris génétiquement obèses (Tong *et al.*, 2000). Ces protéines inhibent C/EBP- $\alpha$  et  $-\beta$  en formant un complexe avec ces protéines, permettant ainsi pour inhiber la différenciation et de maintenir des cellules 3T3-F442A et NIH-3T3 au stade de préadipocytes (Tong *et al.*, 2005).



#### 1.4.2.5. Facteur-1 des préadipocytes (Pref-1)

Le Pref-1 (*preadipocyte facteur-1*) est une protéine transmembranaire de la famille des protéines ayant des domaines répétés EGF-like (facteur de croissance de l'épiderme). Il est exprimé de façon constitutive dans les préadipocytes en prolifération, ce qui permet leur maintien sous cette forme (Smas & Sul, 1996; Smas & Sul, 1993). Lors de la différenciation des 3T3-L1, l'expression de Pref-1 est complètement inhibée (Smas & Sul, 1996). Les souris déficientes en Pref-1 développent une obésité et présentent un retard de croissance (Moon *et al.*, 2002). Au contraire, les souris transgéniques exprimant Pref-1 dans le tissu adipeux présentent une masse adipeuse réduite par comparaison aux souris témoins (Lee *et al.*, 2003).

#### 1.4.2.6. Le facteur de transcription Egr2 (Krox20)

Egr2 (*early growth response 2*) est un autre facteur de transcription ayant un motif en doigt de zinc qui n'est pas exprimé dans les cellules 3T3-L1 différenciées, mais qui est exprimé transitoirement dans les préadipocytes 3T3-L1 après une induction hormonale (Chen *et al.*, 2005). La surexpression dans les préadipocytes 3T3-L1 conduit à une initiation de la différenciation sans traitement hormonal coïncidant avec l'expression et la transactivation du promoteur de C/EBP- $\beta$  (Chen *et al.*, 2005). En fait Egr2 s'associe avec KLF-4 pour lier le promoteur de C/EBP- $\beta$  et permettre son expression (Chen *et al.*, 2005).

#### 1.4.2.7. Les facteurs de transcription FOX

Les facteurs de transcription FOX (*Forkhead Box*) jouent un rôle dans le processus de différenciation en activant ou en réprimant d'autres facteurs de transcription (Carlsson & Mahlapuu, 2002). Trois membres de la famille Fox dont FoxA2, FoxO1 et FoxC2 sont impliqués dans le processus de différenciation. FoxA2 inhibe la différenciation en induisant l'expression de Pref-1 (Boney *et al.*, 1996). L'expression de FoxO1 diminue pendant la différenciation adipocytaire et cette diminution coïncide avec l'expression de PPAR- $\gamma$  et C/EBP- $\alpha$  et avec la fin de l'expansion clonale (Nakae *et al.*, 2003). Quant à FoxC2, il a été montré qu'une

expression constitutive de cette protéine dans les préadipocytes 3T3-L1 bloque la différenciation en inhibant l'expression des gènes régulés par PPAR- $\gamma$  (Davis *et al.*, 2004), en réduisant l'expression de C/EBP- $\beta$  et en induisant l'expression de Wnt10b (Gerin *et al.*, 2009). L'expression d'un dominant négatif induit la différenciation des cellules NIH-3T3 sans nécessiter la présence de ligands de PPAR- $\gamma$  (Gerin *et al.*, 2009).

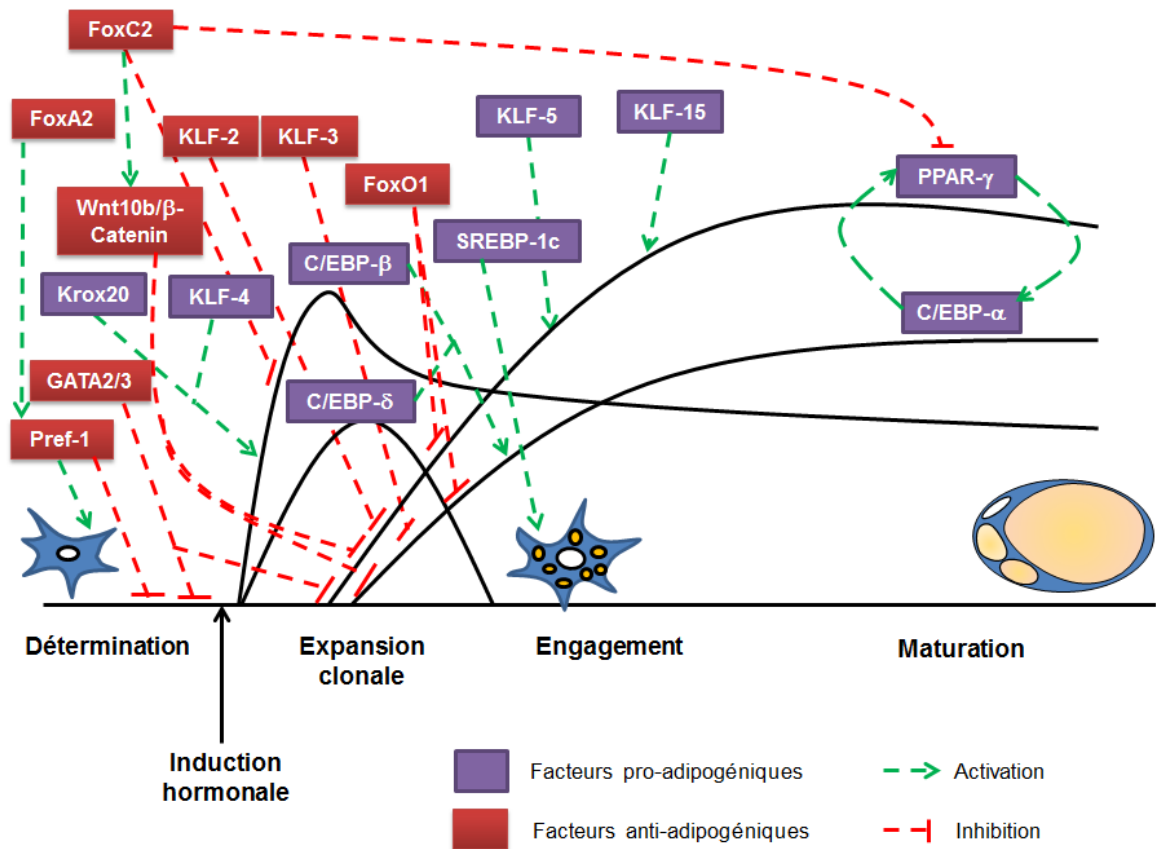


Figure 4: Facteurs influençant la différenciation des préadipocytes en adipocytes. Tiré et modifié de (Lefterova & Lazar, 2009). C/EBP : *CCAAT-enhancer binding protein*; Fox : *Forkhead Box*; KLF: *Krüppel-like factor*; Krox20 ou Egr2 : *early growth response 2*, Pref-1: facteur-1 des préadipocytes; PPAR- $\gamma$ : *peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$* .

### 1.4.3. Hormones et autres facteurs régulant l'adipogenèse

Le processus de différenciation requiert certains facteurs exogènes qui sont, soit des hormones, soit des cytokines soit des facteurs de croissance, et qui exercent un contrôle sur l'initiation de la différenciation adipocytaires (Hausman *et al.*, 2001; Morrison & Farmer, 2000). Ces facteurs exercent leurs contrôles soit en accélérant la différenciation soit en l'inhibant (Tableau III). Les études *in vitro* sur des modèles cellulaires ont permis de comprendre leurs modes d'action. De manière générale, leurs actions se traduisent par la modulation de certains facteurs de transcription énumérés ci-haut.

	Facteurs pro-adipogéniques	Facteurs anti-adipogéniques
<b>Hormones</b>	Hormone de croissance (Yarwood <i>et al.</i> , 1999), Prolactine (Nanbu-Wakao <i>et al.</i> , 2000) Insuline (Kim <i>et al.</i> , 1998a), T3 (Ying <i>et al.</i> , 2007) Glucocorticoïdes (Wu <i>et al.</i> , 1996) Prostaglandine J2 (Kliwer <i>et al.</i> , 1995) Angiotensinogène (Jones <i>et al.</i> , 1997)	Déhydroépiandrostérone (DHEA) (Rice <i>et al.</i> , 2010) Endothéline (Bhattacharya & Ullrich, 2006) Résistine Prostaglandines F2 $\alpha$ (Chang <i>et al.</i> , 2012) Angiotensine II (Janke <i>et al.</i> , 2002)
<b>Cytokines et facteurs de croissance</b>	IGF1 ( <i>insulin-like growth factor 1</i> ) LIF ( <i>leukaemia inhibitory factor</i> ) FGF10 ( <i>fibroblast growth factor 10</i> ) BMPs MCSF ( <i>macrophage colony stimulating factor</i> ) Adiponectine	EGF ( <i>epidermal growth factor</i> ) PDGF ( <i>platelet-derived growth factor</i> ) TGF- $\alpha$ et $\beta$ ( <i>transforming growth factor</i> ) bFGF ( <i>basic fibroblast growth factor</i> ) TNF- $\alpha$ Interleukine 1, 6 et 8, Interféron $\gamma$
<b>Molécules de signalisation</b>	AMPc, H2O2 (à faibles doses) Ras et Erk1 et 2 (à un stade précoce et transitoire) MAP Kinase p38 Phosphatidy-inositol 3-kinase Protéine kinase B	Protéine kinase C MAP kinase Erk1 et 2 (à un stade tardif) AMP-activated protein kinase (AMPK) c-Jun amino-terminal kinases (JNK)

Tableau III. Facteurs régulant l'adipogenèse. Traduit et modifié de (Dodson *et al.*, 2010).

#### 1.4.3.1. Les glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes activent l'expression de C/EBP- $\delta$  (Cao *et al.*, 1991) et PPAR- $\gamma$  (Wu *et al.*, 1996) via leur récepteur nucléaire présent dans les préadipocytes humains (Joyner *et al.*, 2000). Chez les cellules NIH-3T3 et 3T3-L1, l'ajout de la dexaméthasone conduit à la répression de l'expression de Pref-1 et à l'activation de l'expression de C/EBP- $\beta$  et - $\delta$ , qui sont nécessaires à la transactivation de PPAR- $\gamma$  (Smas *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 1996; MacDougald *et al.*, 1994). Les mécanismes d'action des glucocorticoïdes sur la différenciation dépendent de la 11 $\beta$ -HSD1 (*11- $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1*), une enzyme qui convertit la cortisone (inactive) en cortisol (actif) (Masuzaki *et al.*, 2001; Morton *et al.*, 2004; Stewart & Tomlinson, 2002). Autant les préadipocytes que les adipocytes expriment cette enzyme (Napolitano *et al.*, 1998). La déficience de cette enzyme dans le tissu adipeux blanc de souris entraîne une réduction de l'adiposité (Stewart & Tomlinson, 2002). *In vitro*, l'inhibition de l'activité de 11 $\beta$ -HSD1 par une approche pharmacologique ou par une approche d'ARN interférents (ARNsi) chez les préadipocytes 3T3-L1 bloque leur différenciation (Liu *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007).

#### 1.4.3.2. L'insuline et l'IGF-1 (insulin growth factor-1)

L'insuline est une hormone importante dans le processus de différenciation, car elle permet l'induction d'une série de facteurs de transcription, notamment le SREBP-1c et le PPAR- $\gamma$  (Kim *et al.*, 1998a). L'action de l'insuline dans l'induction de l'adipogenèse se fait via l'activation du récepteur de l'IGF-1 exprimé dans les préadipocytes (Rubin *et al.*, 1978; Smith *et al.*, 1988). L'ajout de l'insuline dans le milieu après la période d'induction conduit à l'accumulation de lipides dans les adipocytes. Ceci est dû au fait que l'insuline est un puissant inducteur de la LDN en favorisant l'internalisation du glucose (voir section 1.4.1) et l'expression d'enzymes lipogéniques tels que la FAS (Kim *et al.*, 1998a), la SCD-1 (*stearoyl-CoA desaturase*) (Shimomura *et al.*, 1998; Chong *et al.*, 2008), la ACS (*acetyl-CoA synthetase*) (Shimomura *et al.*, 1992). Lors de l'initiation de la différenciation, l'ajout de l'insuline dans le cocktail d'induction lors d'expériences *in vitro* conduit à l'activation de la GSK-

3 $\beta$  qui, elle, va permettre phosphoryler le C/EBP- $\beta$ . Cette phosphorylation correspond à une augmentation de son activité transcriptionnelle dans les préadipocytes 3T3-L1 (Tang *et al.*, 2005). Ceci favorise l'entrée des cellules dans la phase de l'expansion clonale (Tang *et al.*, 2003; Prusty *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 1996).

#### **1.4.3.3. L'hormone de croissance**

L'HC est une composante majeure du sérum bovin utilisé dans la différenciation des lignées cellulaires (Nixon & Green, 1984). Elle exerce un effet anti-prolifératif et favoriserait la conversion des préadipocytes de différentes lignées en adipocytes (Yarwood *et al.*, 1999; Doglio *et al.*, 1986; Catalioto *et al.*, 1992). Il a été démontré que l'HC initie l'adipogenèse chez les cellules 3T3-F422A en activant la voie Jak-2 (Janus kinase)/STAT5 (Yarwood *et al.*, 1999). En effet, le fait de bloquer cette voie dans les préadipocytes, soit par l'utilisation d'oligonucléotides antisens contre Jak-2 et STAT5 (Yarwood *et al.*, 1999), soit par l'expression d'un mutant de STAT5A (Kawai *et al.*, 2007), inhibe la différenciation en conséquence d'une réduction de l'expression de PPAR- $\gamma$ . Contrairement aux préadiocytes de lignée cellulaire, l'HC inhibe la différenciation des préadipocytes primaires de rat et humain tout en simulant la prolifération (Wabitsch *et al.*, 1996). En fait, dans ces cellules, l'HC ne favorise pas l'arrêt de l'expansion clonale nécessaire à l'initiation de la différenciation.

#### **1.4.3.4. L'hormone thyroïdienne**

La triiodothyronine (T3) est la forme la plus active des hormones thyroïdiennes tandis que la lévothyroxine (T4 ou L-thyroxine) est la plus abondante en circulation. La déiodation de la T4 dans le tissu soit par la déiodinase de type I ou II (DI ou DII) produit du T3. Il a été montré que l'expression chez les préadipocytes 3T3-L1 du dominant négatif du récepteur TR- $\alpha$ 1 de la T3 bloque la différenciation et réprime l'expression de PPAR- $\gamma$  (Ying *et al.*, 2007).

#### 1.4.3.5. L'AMPc

Dans les études utilisant les lignées cellulaires, le MIX, un inhibiteur non sélectif des phosphodiesterases, est utilisé pour augmenter les niveaux intracellulaires de l'AMPc. Comme nous l'avons déjà mentionné, le MIX induit l'expression du C/EBP- $\beta$  (Cao *et al.*, 1991) et du PPAR- $\delta$  (Hansen *et al.*, 2001) lors de l'initiation de la différenciation. L'augmentation des niveaux intracellulaires de l'AMPc conduit aussi à l'activation du facteur de transcription dépendant de l'AMPc, le CREB, qui joue un rôle important dans l'adipogenèse (Reusch *et al.*, 2000). En effet, l'expression d'une forme de dominant négatif de CREB dans les préadipocytes 3T3-L1 bloque leur différenciation initiée avec le cocktail d'induction, tandis que l'expression d'une forme constitutivement active est suffisante à elle seule pour induire la différenciation (Reusch *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2004a).

#### 1.4.3.6. Le facteur nécrosant des tumeurs (TNF- $\alpha$ )

Le TNF- $\alpha$  joue un rôle dans le métabolisme des lipides notamment en régulant l'adipogenèse des préadipocytes, la lipogenèse et la lipolyse des adipocytes. Il a été démontré, dans des adipocytes murin et humain, que le TNF- $\alpha$  diminue l'expression de PPAR- $\gamma$  et C/EBP- $\alpha$ , inhibant ainsi l'adipogenèse (Xing *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 1992). Outre le fait qu'il inhibe l'activité de PPAR- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$  bloque l'engagement des cellules souches à devenir des préadipocytes (Xing *et al.*, 1997). Les souris *Tnf- $\alpha$ <sup>-/-</sup>* nourries avec une diète normale gagnent du poids, principalement de la masse adipeuse. La surexpression de TNF- $\alpha$  dans le tissu adipeux de ces souris prévient l'augmentation de cette adiposité (Xu *et al.*, 2002).

#### 1.4.3.7. L'acide rétinoïque

À des concentrations supraphysiologiques (0.1 à 10 mM), l'acide rétinoïque inhibe la différenciation des lignées cellulaires et des cellules primaires (Dimaculangan *et al.*, 1994; Suryawan & Hu, 1997). Ses effets passent par l'inhibition de l'induction de C/EBP- $\alpha$  (Schwarz *et al.*, 1997) et - $\beta$  et de PPAR- $\gamma$  (Xue *et al.*, 1996), via l'activation des récepteurs de l'acide rétinoïque (RAR, *retinoic acid receptor*) (Xue *et al.*, 1996).

Récemment, des études ont élucidé les mécanismes d'inhibition de la différenciation par l'acide rétinoïque. D'une part, l'acide rétinoïque via son récepteur RAR favorise l'expression d'un co-répresseur qui interagit avec C/EBP- $\beta$ , bloquant ainsi sa capacité de liaison à l'ADN (Marchildon *et al.*, 2010). D'autre part, il favorise l'expression de Pref-1 et de KLF-2 qui répriment l'expression de PPAR- $\gamma$  (Berry *et al.*, 2012).

## **2. Le métabolisme des lipides dans le tissu adipeux blanc**

Lors de la prise d'un repas, l'excès d'énergie est principalement emmagasiné sous forme de TG (également appelés triacylglycérols, TAG) dans le tissu adipeux, principalement dans les adipocytes. Les sources d'énergie proviennent principalement des lipides en circulation après une prise alimentaire ou des substrats non lipidiques tels que le glucose. Les lipides alimentaires sont emmagasinés dans les chylomicrons et transportés vers le tissu adipeux où ils seront stockés, tandis que le glucose qui sera converti dans le foie et le tissu adipeux en TG. La formation de TG à partir du glucose constitue la LDN. Les TG formés dans le foie sont sécrétés et transportés vers le tissu adipeux dans des VLDL (lipoprotéines de très faible densité). Le stockage nécessite une hydrolyse de ces TG au niveau des capillaires du tissu adipeux et un transport à travers la membrane via des transporteurs spécifiques dans l'adipocyte. Lors d'une demande en énergie, les TG sont alors hydrolysés (lipolyse) et libérés sous forme d'AG non estérifiés (AGNEs) et de glycérol.

### **2.1. La lipogenèse *de novo***

Lors de l'apport énergétique suite à une prise alimentaire, l'excès de glucides est converti en AG qui peuvent être incorporés dans les triglycérides par le processus de LDN dans le tissu adipeux ou dans le foie (Girard *et al.*, 1994). Dans le foie, ceci conduit à la synthèse des VLDL (lipoprotéines de très petite densité) qui transportent les TG qui seront accumulés dans le tissu adipeux, par exemple, après hydrolyse par la lipoprotéine lipase (LPL). La LDN requiert une dépense d'énergie et sa contribution dans le stockage des TG au niveau des adipocytes n'est que minimale (moins de 20 %) (Strawford *et al.*, 2004; Hellerstein, 1999), par comparaison à la LDN dans le foie qui contribue pour près de 50 %. Des études *in vitro* ont montré que la LDN au niveau des adipocytes ainsi que les enzymes-clés sont régulées tant par les nutriments que par les hormones, telles que l'insuline et le glucagon. Les enzymes-clés de la LDN sont l'acétyl-CoA carboxylase (ACC1), FAS et la SCD1 (Chong *et al.*, 2008; Kersten, 2001)



(Figure 5). Dans les tissus adipeux, la LDN est plus importante dans les adipocytes de petite taille (naissants) que dans les adipocytes matures (Roberts *et al.*, 2009). Dans les adipocytes naissants, l'expression des gènes codant pour les protéines impliquées dans le transport d'AG est faible comparée à l'expression des gènes de la LDN (Minehira *et al.*, 2004; Diraison *et al.*, 2002).

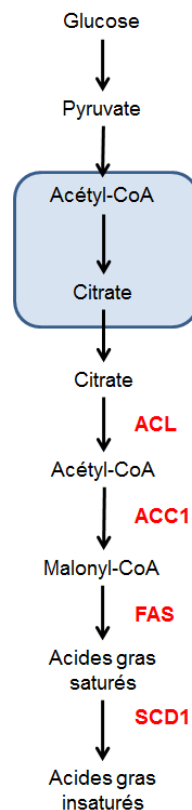


Figure 5: Lipogenèse *de novo*. Traduit et modifié de (Roberts *et al.*, 2009). ACC1 : acétyl-CoA carboxylase 1; ACL : *acetyl-CoA liase*; FAS : *fatty acid synthetase*; SCD1 : stéaroyl-CoA désaturase 1.

## 2.2. Source des triglycérides circulants

L'alimentation est la principale source de TG emmagasinés dans le tissu adipeux. Les TG contenus dans l'alimentation sont d'abord hydrolysés par les lipases pancréatiques et les sels biliaires et ensuite, le glycérol et les AG sont incorporés dans

des micelles pour être absorbés par les cellules épithéliales de la microvillosité intestinale (entérocytes). Une fois internalisés, les AG sont acylés et combinés à des monoglycérides pour former des TG. Ces derniers sont ensuite associés à l'apolipoprotéine B48 (apo-B48) pour former les chylomicrons natifs qui seront sécrétés dans la circulation sanguine (Figure 6). Une fois dans la circulation sanguine, ces chylomicrons vont subir une maturation avec l'ajout des apo-E et -CII avant d'être transportés, soit vers les tissus utilisateurs des TG tel que le muscle squelettique, soit vers les tissus de stockage des TG tels que le tissu adipeux et le foie (LaRosa *et al.*, 1970; Voshol *et al.*, 2009).

Les TG circulants peuvent provenir aussi des glucides contenus dans l'alimentation. Ces glucides sont captés dans le foie et dans le tissu adipeux blanc où ils sont transformés en TG par la LDN (voir section 2.1). Les TG formés dans le foie sont ensuite emmagasinés dans les lipoprotéines de très faible densité (VLDL) constituées des apo-B100, -AV et -E (O'Brien *et al.*, 2005; Voshol *et al.*, 2009), avant d'être sécrétés dans la circulation. Ces différentes sources de TG pourront être acheminées vers le tissu adipeux où ils seront emmagasinés. Au niveau du tissu adipeux, ils sont hydrolysés par la LPL en AGNEs; ces derniers sont transportés dans l'adipocyte via des transporteurs.

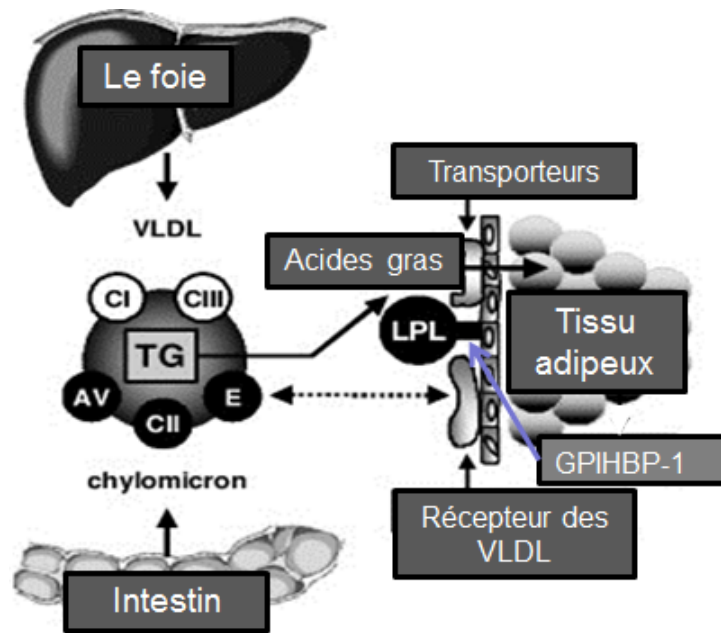


Figure 6: Accumulation des triglycérides circulants. Traduit et modifié de (Voshol *et al.*, 2009). AV : apolipoprotéine -AV; CI, CII, CIII : apolipoprotéine -CI, -CII, -CIII; E : apolipoprotéine -E.

### 2.2.1. Hydrolyse des chylomicrons et des VLDL par la LPL

Les TG contenus dans les VLDL et dans les chylomicrons sont hydrolysés par la LPL à la surface des cellules endothéliales des capillaires pour en libérer les AGNEs et le glycérol. Le glycérol libéré sera métabolisé dans le foie tandis qu'une grande proportion des acides gras est captée par les adipocytes (Lafontan, 2008). L'hydrolyse des TG contenus dans les chylomicrons conduit à la formation des reliquats de chylomicrons qui sont éliminés de la circulation sanguine par le foie (LaRosa *et al.*, 1970). Quant aux VLDL, une fois que le contenu en TG est hydrolysé, vont devenir plus denses en transférant leur contenu en apo-E et apo-A vers les HDL. Tout comme les chylomicrons, les VLDL vont former des reliquats qui seront captés et recyclés dans le foie (Berneis & Krauss, 2002).

La LPL, une glycoprotéine de 448 acides aminés, est produite et sécrétée par les adipocytes au niveau du tissu adipeux (ainsi qu'au niveau du cœur et des muscles). Elle migre vers la lumière des capillaires où elle se lie par des interactions ioniques avec des

glycosaminoglycanes à la surface des cellules endothéliales (Braun & Severson, 1992). Les mécanismes de liaison des particules riches en TG et de l'activation de la LPL commencent à être élucidés. Il est de plus en plus évident que l'activation complète de la LPL dépend, d'une part de sa liaison avec ses cofacteurs, l'apolipoprotéine-CII (apo-CII) et apo-AV et d'autre part, de sa liaison avec la protéine GPIHBP-1 (*glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1*) (Figure 6).

L'apo-CII est principalement retrouvée dans les chylomicrons (Hoffmann & Stoffel, 1996; LaRosa *et al.*, 1970). Olivecrona et Beisiegel ont montré *in vitro* que l'hydrolyse des chylomicrons provenant des patients déficients en apo-CII par la LPL n'était possible qu'après l'ajout d'apo-CII exogène (Olivecrona & Beisiegel, 1997). L'apo-AV est contenue autant dans les VLDL que dans les chylomicrons ainsi que dans les HDL (lipoprotéines à haute densité) (O'Brien *et al.*, 2005). Des expériences *in vitro* ont montré que l'hydrolyse des VLDL-TG par la LPL recombinante n'est élevée que lorsque les VLDL sont enrichis avec l'apo-AV recombinante (Fruchart-Najib *et al.*, 2004). *In vivo*, il a été observé chez les souris transgéniques surexprimant l'apo-AV humaine des taux plasmatiques de TG six fois inférieurs à ceux des souris témoins (Pennacchio *et al.*, 2001; van der Vliet *et al.*, 2002) tandis que chez les souris déficientes en apo-AV, ces taux sont quatre fois élevés par comparaison aux souris témoins (Pennacchio *et al.*, 2001).

Un autre élément essentiel à l'activation de la LPL est la présence de la protéine GPIHBP-1 à la surface basolatérale des cellules endothéliales capillaires du tissu adipeux, du cœur et du muscle squelettique. Cette protéine joue un rôle important dans l'hydrolyse des TG contenus dans les chylomicrons (Beigneux *et al.*, 2007; Davies *et al.*, 2010), étant impliquée dans le transport de la LPL à travers les cellules endothéliales (Davies *et al.*, 2010). En effet, chez les souris déficientes en GPIHBP-1, la LPL n'est pas exprimée à la surface des cellules endothéliales capillaires, mais se retrouve dans l'espace sous-endothélial entourant les adipocytes et les myocytes (Davies *et al.*, 2010). Ces souris présentent des taux plasmatiques de chylomicrons très élevés rendant le plasma très visqueux (Beigneux *et al.*, 2007).

## 2.3. Transport des acides gras

Une fois hydrolysés, les AG libérés sous-forme d'AG à chaîne longue (AGCL) peuvent diffuser passivement au travers la membrane plasmique, mais cela nécessite une forte concentration. Ce processus est relativement rapide ( $< 5$  ms) tel que mesuré sur des préparations de vésicules membranaires munies d'une seule bicouche en phase aqueuse (Hamilton, 2003). Cependant, la présence de protéines membranaires et les faibles concentrations plasmatiques en AGCL, appuient l'hypothèse d'un transport facilité des AGCL par les protéines (Figure 7) (Simard *et al.*, 2008).

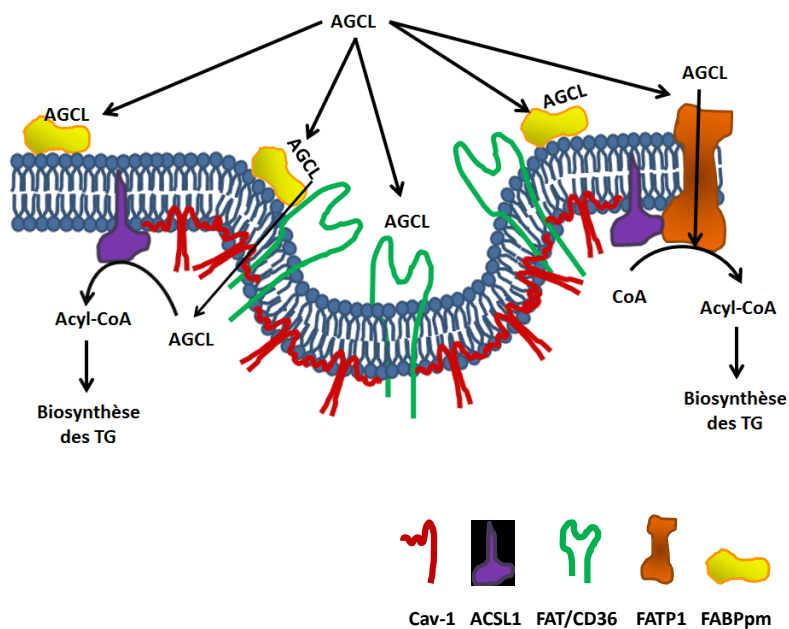


Figure 7: Transport des acides gras. Tiré et traduit de (Thompson *et al.*, 2010). AGCL : acides gras à chaîne longue; ACSL1 : *Acyl CoA synthetase long chain*; Cav-1 : cavéoline 1; FABPpm: *fatty acid binding protein plasma membrane*; FAT/CD36 : *fatty acid translocase*; FATP1 : *fatty acid transport protein 1*; TG : triglycérides

### 2.3.1. Transport facilité des acides gras dans les adipocytes

Trois protéines ont été identifiées dans le transport des AGCL : la protéine de liaison des AG de la membrane plasmique (FABPpm, *plasma membrane fatty acid binding protein*), le CD36 et la protéine de transport d'acides gras (FATP1, *fatty acid*

*transport protein-1*). En plus de ces trois protéines, la cavéoline-1 (Cav-1) joue un rôle essentiel dans la facilitation du transport. Cette protéine est une composante des cavéoles membranaires, qui sont des invaginations de la membrane plasmique. C'est dans ces régions que l'on retrouve de fortes concentrations d'AG en vue d'être transportés dans les adipocytes (Simard *et al.*, 2009; Meshulam *et al.*, 2006).

### **2.3.1.1. La protéine de liaison des acides gras de la membrane plasmique**

La FABPpm est une protéine de 43 kDa exprimée à la surface membranaire de plusieurs cellules, dont les adipocytes (Figure 7). Cette protéine joue un rôle dans la capture d'AG provenant de l'hydrolyse des TAG contenus dans les VLDL et les chylomicrons. Les premières études décrivant le rôle de la FABPpm dans la capture des AG ont utilisé des anticorps anti-FABPpm sur les adipocytes 3T3-L1 matures. Les résultats ont montré qu'il y a une diminution de moitié du captage de l'oléate, un AGCL, sans changement dans le captage de l'octanate, un AG à chaîne moyenne (Zhou *et al.*, 1992). Cependant, la fonction de FABPpm dans le captage d'AGCL semble dépendante de la présence du CD36, puisque l'inhibition spécifique du CD36 par sulfo-N-succinimidyl oléate abolit complètement le captage du palmitate chez les adipocytes 3T3-L1 (Chabowski *et al.*, 2005).

### **2.3.1.2. Le récepteur CD36**

Le CD36 est une glycoprotéine de 88 kDa faisant partie de la famille des récepteurs scavenger de classe B (SR-B) multifonctionnelle qui peut lier des molécules aussi diverses que la thrombospondine-1, les AGCL, l'amyloïde  $\beta$ , le collagène et les LDL oxydées (Febbraio & Silverstein, 2007). Cette protéine est très exprimée dans les tissus impliqués dans le métabolisme des AG tels que les tissus musculaire, cardiaque, adipeux, le foie et l'intestin (Coburn *et al.*, 2001; Drover *et al.*, 2008). Les premières études ayant montré le rôle du CD36 dans le transport des AGCL ont été réalisées par des études de liaison. Le CD36 purifié à partir du tissu adipeux ne liait que les AGCL tels que l'oléate, le palmitate, l'arachidonate et le linoléate (Hajri *et al.*, 2002). Par la suite, des études de perte et gain de fonctionnalité ont renforcé cette observation. Ainsi,

l'expression du CD36 dans les fibroblastes Ob17PY, qui sont dépourvus de cette protéine, augmente significativement le captage et le transport d'AGCL (Ibrahimi *et al.*, 1996). Les souris transgéniques surexprimant le CD36 dans le muscle ont moins de dépôt adipeux et de faibles taux circulants de triglycérides, d'AGNE et de VLDL (Ibrahimi *et al.*, 1999). Les souris déficientes en CD36 présentent, quant à elles, des taux de transport d'AG et d'incorporation dans les TG réduits de plus de la moitié dans les muscles, le cœur et le tissu adipeux (Coburn *et al.*, 2000; Coburn *et al.*, 2001). Ces souris présentent des taux plasmatiques d'AGNE, de cholestérol dans les HDL et de triglycérides élevés (Febbraio *et al.*, 1999). L'inactivation du gène *Cd36* tant chez les adipocytes 3T3-L1 que chez les préadipocytes 3T3-F442A conduit à la diminution du captage et du transport (Lobo *et al.*, 2009; Sfeir *et al.*, 1999).

Le CD36 est localisé dans les cavéoles, qui constituent des radeaux lipidiques au niveau de la membrane plasmique (Figure 7), dans le réticulum endoplasmique et dans les vésicules intracellulaires ainsi qu'au niveau des mitochondries (Chabowski *et al.*, 2005; Pohl *et al.*, 2004). La présence du CD36 dans ces radeaux est nécessaire à son activité de facilitateur du transport d'AG dans les adipocytes (Pohl *et al.*, 2004; Pohl *et al.*, 2005). En effet, le CD36 interagirait avec la Cav-1, une protéine de structure des cavéoles. Des travaux avec des fibroblastes provenant des embryons de souris déficientes en Cav-1, ainsi qu'avec des cellules 3T3-L1 différenciées dont les cavéoles ont été perturbées par un traitement à la cyclodextrine ont montré que le captage et la translocation des acides gras sont réduits en raison de l'absence du CD36 au niveau de la membrane plasmique qui demeure dans le pool intracellulaire (Ring *et al.*, 2006; Pohl *et al.*, 2005).

### **2.3.1.3. La cavéoline-1**

Les cavéolines (Cav) sont des protéines structurales de 22 kDa dans les cavéoles, qui elles sont des microdomaines dans la membrane plasmique riche en cholestérol (Figure 7). Les membranes des adipocytes sont riches en cavéoles et expriment les 3 isoformes de cavéoline (1, 2 et 3). Les travaux de Pohl (2004) réalisés sur des adipocytes de type 3T3-L1 dont les cavéoles ont été perturbées soit par

l'utilisation de la cyclodextrine soit par l'expression d'un dominant négatif Cav-3, ont montré que ces adipocytes internalisent 50 % moins d'acide oléique radioactif (Pohl *et al.*, 2004). Les souris déficientes en Cav-1 présentent des taux circulants de TG et d'AGNEs élevés et elles sont résistantes à l'obésité induite par une diète riche en lipides (Razani *et al.*, 2002). En fait, les adipocytes provenant de ces souris sont incapables d'emmagasiner les AG.

Comme nous l'avons déjà mentionné, la Cav-1 est colocalisée avec le CD36 au niveau de la membrane plasmique et jouerait un rôle indirect dans le transport d'AGCL. Cependant, les études menées par le groupe de Pilch ont montré que les Cav-1 ont un rôle direct dans le transport des AGCL (Meshulam *et al.*, 2006). En effet, en utilisant des cellules HEK 293 (*human embryonic kidney*) surexprimant la Cav-1, ils ont montré que l'oléate couplé à un traceur fluorescent s'accumulait dans les cavéoles et était transporté par diffusion passive au travers la membrane par des mécanismes de flip-flop (Simard *et al.*, 2009; Meshulam *et al.*, 2006), sachant que ces cellules ont un très faible taux de métabolisme lipidique.

#### **2.3.1.4. La protéine de transport d'acides gras**

La famille des FATPs comprend 6 membres, mais seulement les FATP1 et 4 sont exprimées au niveau des adipocytes (Schaffer & Lodish, 1994). La FATP1, une protéine intégrale de la membrane qui faciliterait un mouvement bidirectionnel des AGCL (Richards *et al.*, 2003) (Figure 7). Le rôle de la FATP1 dans le transport des AGCLs a été démontré dans le modèle de souris transgéniques surexprimant la protéine dans le cœur. Ces souris présentent une forte accumulation d'AGCL et une augmentation du métabolisme lipidique (Chiu *et al.*, 2005). Les souris déficientes en FATP1 sont résistantes à l'obésité induite suite à une diète riche en lipide (Kim *et al.*, 2004). *In vitro*, l'inactivation de FATP1 dans les adipocytes 3T3-L1 par transfection lentivirale d'ARNsh a conduit à une réduction de 15 % de la synthèse de TG et à une réduction de 25 % de l'accumulation des acides palmitique et oléique radioactifs en condition basale. En condition stimulée, l'inactivation de FATP1 a complètement aboli l'accumulation induite par l'insuline (Lobo *et al.*, 2007). Au contraire, l'inactivation de



FATP4 n'a pas affecté l'accumulation d'AGCL dans les adipocytes 3T3-L1 (Lobo *et al.*, 2007).

La FATP1 possède aussi une activité acyl-CoA synthétase qui se fait au niveau de la membrane plasmique (Ost *et al.*, 2005). Des expériences de mutagenèse dirigée, notamment dans la région de liaison de l'ATP de cette protéine, ont montré que l'activité acyl-CoA synthétase ainsi que le transport d'AG sont inhibés dans les cellules mutantes (Stuhlsatz-Krouper *et al.*, 1998). Cette mutation n'affecte pas la localisation de la FATP1 au niveau de la membrane (Stuhlsatz-Krouper *et al.*, 1998).

## **2.4. La biosynthèse des triacylglycérols**

Une fois dans les adipocytes, les AGCL sont acylés en vue de leur incorporation dans les TG. La protéine responsable de cette acylation est l'acyl CoA synthétase d'AG ACSL1 (Richards *et al.*, 2006; Gargiulo *et al.*, 1999). L'ACSL1 est une protéine ancrée cytosolique ancrée dans la membrane plasmique qui catalyse l'estérification des AGCL par la coenzyme A (activité acyl-CoA synthétase) (Figure 7) (Brasaemle *et al.*, 2004; Gargiulo *et al.*, 1999). Une surexpression de l'ACSL1 augmente de 6 fois l'accumulation du traceur lipidique fluorescent (BODIPY) (Gargiulo *et al.*, 1999), tandis que l'inhibition de l'activité de l'ACSL1 par la triacsine C, un analogue non estérifiable d'AG polyinsaturé dans les adipocytes 3T3-L1 (Hall *et al.*, 2003), réduit considérablement et de manière dose-dépendante l'accumulation d'AG (Richards *et al.*, 2006). De plus, l'invalidation de l'ACSL dans les adipocytes 3T3-L1 a permis de démontrer le rôle que joue cette enzyme dans la ré-estérification des AG. En effet, l'accumulation des AG dans ces cellules n'est pas altérée tandis que l'efflux des AGNEs est considérablement augmenté (Lobo *et al.*, 2009). Après l'étape de l'acylation, les acyl-CoA serviront de substrats pour la synthèse des TG. Cette synthèse requiert le glycérol-3-phosphate (G3P) en plus des acyl-CoA. Le G3P servant à la synthèse des TG provient normalement de la phosphorylation du glycérol par la glycérokinase. Mais l'activité de cette enzyme est très négligeable dans les adipocytes. Le G3P est donc produit majoritairement à partir du glucose à travers les étapes de la

glycolyse et la glycéronéogenèse (Reshef *et al.*, 2003; Gorin *et al.*, 1969), cette dernière étant la voie de biosynthèse du G3P à partir des précurseurs autres que le glucose. Dans le tissu adipeux, la glycéronéogenèse est la principale voie de production du G3P et de la synthèse de TG (90 % contre 10 % pour la glycolyse) (Nye *et al.*, 2008a). L'enzyme-clé dans cette voie est la phosphoénolpyruvate carboxykinase cytosolique (PEPCK-C) (Figure 8). Les deux voies, la glycolyse et la glycéronéogenèse conduisent à la formation d'un intermédiaire commun, la phospho-dihydroxyacétone qui sera convertie en G3P par la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (GPDH). Le G3P ainsi formé est successivement estérifié jusqu'à la formation des TAG par différentes enzymes dont les glycérol-3-phosphate acyltransférases (GPAT), les acylglycérol-3-phosphate acyltransférases (AGPAT) et les diacylglycérol acyltransférases (DGAT) (Figure 8).

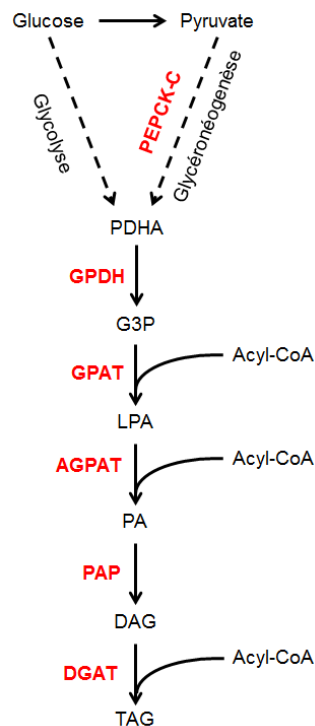


Figure 8: Processus de biosynthèse des triglycérides. Traduit et modifié de (Large *et al.*, 2004). AGPAT: acylglycérol-3-phosphate acyltransférase; DAG : diacylglycérol; DGAT: diacylglycérol acyltransférase; GPDH : Glycérol-3-phosphate déshydrogénase; G3P : glycérol-3-phosphate; GPAT: glycérol-3-phosphate acyltransférase; LPA : acide lysophosphatidique; PA : acide phosphatidique ; PAP : acide phosphatidique

phosphatase; PDHA: phospho-dihydroxyacétone; PEPCK-C: phosphoénopyruvate carboxykinase cytosolique.

## 2.5. La lipolyse

La lipolyse est le processus d'hydrolyse des TG stockés dans le tissu adipeux pour libérer des AGNE nécessaires à l'apport énergétique dans différents tissus. Ce processus est unique à l'adipocyte. Le phénomène de lipolyse se déclenche lorsqu'il y a une demande en énergie (exercice physique) ou en cas de carence (lors d'un jeûne) (Henderson *et al.*, 2007). Lors du processus de lipolyse, il y a libération d'une molécule de glycérol et de trois molécules d'AGNE. Le glycérol est libéré complètement dans la circulation, car l'adipocyte ne peut le réutiliser étant dépourvu de l'enzyme glycérol kinase qui catalyse la réaction de formation du G3P (Nye *et al.*, 2008b). Dans le foie, qui contient cette enzyme, le glycérol va servir de substrat pour la LDN des TG. Des molécules d'AGNE produites lors de la lipolyse, environ 80 % vont être libérées et le reste sera ré-estérifié et emmagasiné dans les adipocytes. Dans les tissus utilisateurs tels que les muscles squelettique et cardiaque, les AGNE seront captés, transportés, estérifiés et utilisés comme carburant dans les mitochondries pour la production d'énergie par le processus de  $\beta$ -oxydation.

Le processus de lipolyse est très complexe et régulé étroitement par différentes hormones et médiateurs tels que les catécholamines et l'insuline, mais aussi par les peptides natriurétiques (Sengenès *et al.*, 2000), l'hormone thyroïdienne (Laugwitz *et al.*, 1996), les mélanocortines (Boston, 1999) et l'adénosine (Szkudelski *et al.*, 2009), entre autres.

Au niveau moléculaire, il est généralement admis que l'activation de la lipolyse conduit à l'activation par phosphorylation de la lipase hormono-sensible (LHS) et de la lipase adipeuse des triglycérides (ATGL, *adipose triglyceride lipase*) ainsi qu'au remodelage des protéines qui entourent les gouttelettes lipidiques dont les protéines de la famille de PAT (pénilipine A; ADRP pour *adipocyte differentiation-related protein*;

TIP47 pour *tail interacting protein 47*) (Miura *et al.*, 2002), des protéines S3-12 et OXPAT (*oxidative-PAT*). Le membre le plus connu de cette famille est la périlipine A (PLIN1a) dont la régulation par phosphorylation permet l'hydrolyse des TG contenus dans les gouttelettes (Brasaemle *et al.*, 2004). La phosphorylation de la PLIN1a donne accès à l'hydrolyse des TAG par des lipases.

L'hydrolyse des TG dépend de l'activité de trois lipases : la LHS, l'ATGL (aussi appelée desnutrine) et la lipase des monoacylglycérols (LMG) (Figure 9). L'ATGL et la LHS sont à elles seules responsables de 95 % de l'activité hydrolase dans les adipocytes (Schweiger *et al.*, 2006). L'ATGL est responsable de la première étape de l'hydrolyse des TG c'est-à-dire la conversion des TG en DAG. La LHS est responsable de l'hydrolyse des DAG en MAG tandis que la LMG est responsable de l'hydrolyse des MAG en glycérol (Holm *et al.*, 2000) (Figure 9).

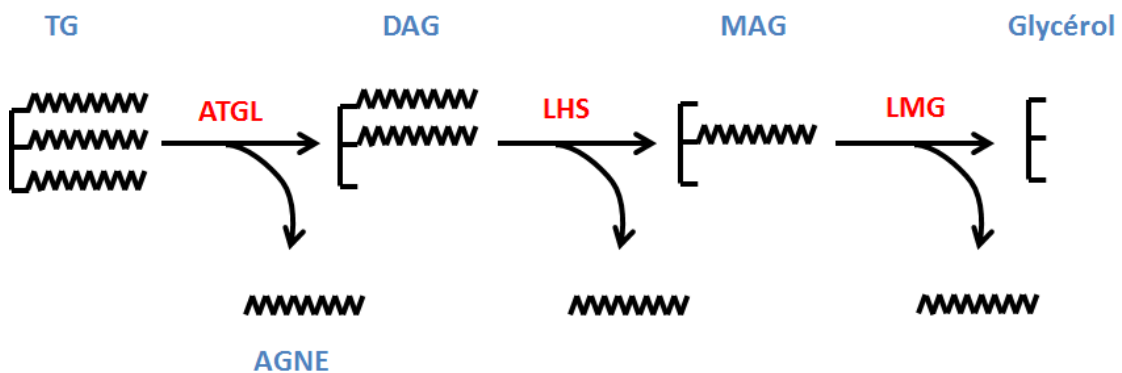


Figure 9: Enzymes impliquées dans l'hydrolyse des TG. Tiré et modifié de (Wang *et al.*, 2008). AGNE, AG non estérifiés; ATGL, triglycéride lipase adipocytaire; DAG, diacylglycérol; LHS, lipase hormono-sensible; LMG, lipase des monoacylglycérols; MAG, monoacylglycérol; TG, triglycérides

Le processus de lipolyse est étudié depuis des décennies et les étapes conduisant à l'hydrolyse des TAG sont très documentées. Dans cette section, nous allons décrire les intervenants majeurs dans le processus de lipolyse, notamment les enzymes impliquées

dans l'hydrolyse des TAG ainsi que leur régulation et les protéines de la famille PAT. Ensuite nous allons décrire les mécanismes de régulation de la lipolyse.

### **2.5.1. La lipase hormono-sensible**

La LHS a été découverte initialement dans le tissu adipeux blanc des mammifères comme étant une enzyme inductible pendant le jeûne ou lors du catabolisme (Bjorntorp & Furman, 1962; Vaughan *et al.*, 1964). La LHS a longtemps été considérée comme l'enzyme de l'hydrolyse des TG au niveau des adipocytes. Il est vrai qu'*in vitro*, la LHS purifiée des adipocytes de rat hydrolyse aussi bien les TG, les DAG que les MAG (Fredrikson *et al.*, 1981) et elle hydrolyse aussi les esters de cholestérol (Cook *et al.*, 1982) et les esters de rétinol (Wei *et al.*, 1997). Le ratio des vitesses relatives de l'hydrolyse sont de l'ordre de 1:10:1:4:2 pour les TG, DAG, MAG, esters de cholestérol et les esters de rétinol, respectivement.

#### **2.5.1.1. Propriétés enzymatiques et structure de la protéine**

La LHS est une protéine cytoplasmique d'environ 84 kDa dont le gène codant est située sur le chromosome 19q13.2 chez l'humain (Holm *et al.*, 1988) tandis que chez la souris, il est situé sur le chromosome 7 (Warden *et al.*, 1993). Le gène *Lhs* comporte 9 exons séparés par 8 introns et chaque exon exprime un domaine différent de la LHS. Ainsi, l'exon 6 transcrit le domaine catalytique de la LHS qui contient la séquence consensus aux lipases (GX SXG), dont la sérine 423 est nécessaire à son activité (Contreras *et al.*, 1996). L'exon 8 transcrit pour le domaine régulateur de la LHS avec les sites de phosphorylation au niveau des sérines 563, 565 et 660, tandis que l'exon 9 transcrit pour le domaine de liaison lipidique (Holm *et al.*, 1994) (Figure 10). La LHS est exprimée dans différents tissus tels que les tissus adipeux blanc et brun, la glande mammaire, les macrophages, le tissu musculaire, le pancréas et les testicules (Reue *et al.*, 1997; Mulder *et al.*, 1999; Mairal *et al.*, 2002).

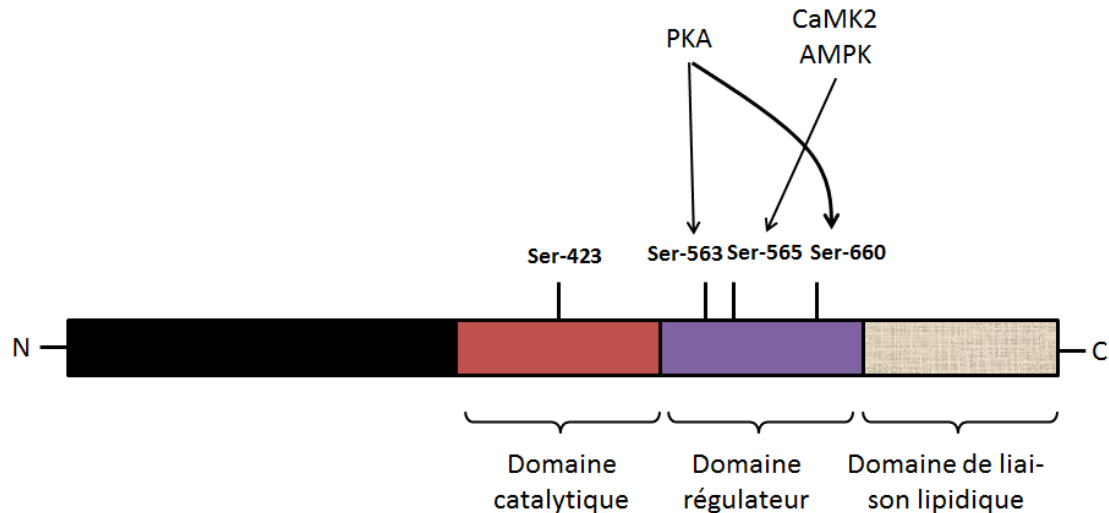


Figure 10: Structure protéique de la lipase hormono-sensible. Modifié de (Holm *et al.*, 2000). AMPK : *AMP-activated protein kinase*, CaMK2 : *Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependant protein kinase II*, PKA : protéine kinase A.

La structure de la protéine comprend une région N-terminale de 36 kDa environ ainsi qu'une région C-terminale (résidus 324 à 768) organisée en hélices- $\alpha$  et en feuillets- $\beta$ . La fonction de la région N-terminale (résidus 1 à 323 très conservés entre les espèces) (Osterlund *et al.*, 1999) n'est pas encore totalement déterminée et il est possible que cette région soit impliquée dans les interactions avec d'autres protéines telles que la PLIN1a ou ALBP (Shen *et al.*, 2001). La région C-terminale comprend les domaines catalytiques, de régulation et de liaison lipidique (Figure 10) (Smith *et al.*, 1993). Le domaine catalytique de 18 kDa (compris entre les résidus 333 et 499) est responsable de l'activité lipase de la LHS (Tsujita *et al.*, 1989). Ce domaine comprend un résidu Ser-423 nécessaire à l'activité de la LHS. En effet, des expériences par mutagenèse dirigée ont montré l'importance de cette sérine dans l'activité hydrolase de la LHS comparativement à la mutation des autres sérines (Holm *et al.*, 1994). Le domaine de régulation de 11.5 kDa compris entre les résidus 499 et 669 comporte les différents sites de phosphorylation (Smith *et al.*, 1996). Le domaine de liaison lipidique contient des acides aminés très hydrophobes qui sont probablement responsables de la liaison avec les lipides (Osterlund *et al.*, 1997; Holm *et al.*, 1994).

### 2.5.1.2. Régulation de l'activité enzymatique

La régulation de l'activité de la LHS a été très étudiée et documentée depuis plusieurs années. Toutes ces recherches ont montré que son activation est due la phosphorylation sur des sites spécifiques par la protéine kinase A (PKA) dépendant de l'AMPc. L'activation de la PKA répond généralement à des stimulations par des hormones cataboliques telles que l'adrénaline, engendrant une cascade qui conduit à l'augmentation des taux intracellulaires d'AMPc (voir section 2.5.6) (Steinberg & Huttunen, 1972). En plus de la PKA, d'autres kinases sont impliquées dans la régulation de l'activité de la LHS, notamment ERK (*Extracellular signal-regulated kinase*) (Greenberg *et al.*, 2001), la GSK-4 (Olsson *et al.*, 1986), l'AMPK (*AMP-activated protein kinase*) et la CaMK2 (*Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependant protein kinase II*) (Garton *et al.*, 1989).

Initialement, les études avaient identifié seulement deux sites de phosphorylation (Belfrage *et al.*, 1980) sur la LHS. Le premier site, situé au niveau du résidu Ser-563 de la LHS de rat (Ser-552 chez l'humain), était considéré comme un site régulateur. Ce site est phosphorylé autant par la PKA que par la GSK-4 (Stralfors & Belfrage, 1983; Olsson *et al.*, 1986). Le deuxième site, situé au niveau de la Ser-565 de la séquence de rat (Ser-554 chez l'humain) était considéré comme un site de phosphorylation par la CaMK2 et l'AMPK (Garton *et al.*, 1989), quoique ce site ne semble pas influencer directement l'activité de la LHS. Toutefois, la phosphorylation de ces deux sites serait mutuellement exclusive. En effet, il a été observé que la phosphorylation de la Ser-565 diminuait lorsque celle de la Ser-563 augmentait, notamment lors de la stimulation de la lipolyse par les catécholamines (Garton *et al.*, 1989). Cette observation a été confirmée dans plusieurs études. Dans l'une d'elles, l'utilisation de l'AICAR comme stimulus de l'AMPK sur des adipocytes primaires de rat entraîne une diminution de la phosphorylation de la Ser-563 induite par les catécholamines (Sullivan *et al.*, 1994). Dans une autre étude, l'expression d'une forme constitutivement active d'AMPK dans les adipocytes de la lignée des 3T3-L1 réduit fortement la lipolyse induite par les agonistes des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques ( $\beta$ -AR). Inversement, l'expression d'un dominant négatif de l'AMPK dans des adipocytes 3T3-L1 ou des adipocytes provenant

des souris AMPK<sup>-/-</sup> ont montré que la lipolyse y était augmentée après stimulation avec l'isoprotérénol (Daval *et al.*, 2005). Ces résultats suggéraient que la phosphorylation de la Ser-563 était responsable de l'activité de la LHS. Toutefois, ce rôle dans l'activation de la LHS a été remis en cause après la découverte de deux autres sites de phosphorylation par la PKA, les sérines 659 et 660 chez le rat (649 et 650 chez l'humain) (Krintel *et al.*, 2008; Watt *et al.*, 2006). En effet, des travaux de mutation dirigée de la Ser-563 ont montré que la phosphorylation de cette dernière n'est pas importante dans l'activation de la LHS (Anthonsen *et al.*, 1998). Par contre, la mutation des sites Ser-649 et/ou Ser-650 de la LHS humaine conduit à une perte complète de l'activité lipase *in vitro* (Krintel *et al.*, 2008). Dans les adipocytes 3T3-L1, la mutation des résidus Ser-659 et Ser-660 a conduit à une perte de l'activité lipase et à une réduction de la migration de la LHS vers les gouttelettes lipidiques (Su *et al.*, 2003). La migration de la LHS vers les gouttelettes est nécessaire pour son activité lipase lors de la lipolyse, car cette enzyme est principalement cytosolique (Sztalryd *et al.*, 2003). Toutefois, l'activité lipase de la LHS dépend de la phosphorylation de la PLIN1a (voir section 2.5.4), protéine qui entoure les gouttelettes (Sztalryd *et al.*, 2003; Su *et al.*, 2003). Miyoshi et ses collaborateurs (Miyoshi *et al.*, 2006) ont montré, en utilisant des fibroblastes embryonnaires de souris déficientes en PLIN1a que la LHS migrait bien vers les gouttelettes, mais qu'aucune hydrolyse des DAG n'y était observée.

Un autre site de phosphorylation activateur de la LHS (Ser-600 chez le rat et Ser-589 chez l'humain) a été mis en évidence dans les adipocytes en utilisant des inhibiteurs pharmacologiques de la kinase ERK (Greenberg *et al.*, 2001). Environ 30 % de lipolyse induite par une stimulation des  $\beta$ -AR dépend de l'activation de ERK (Greenberg *et al.*, 2001).

L'activité de la LHS est aussi régulée par déphosphorylation par des protéines phosphatases (PP) sérine/thréonine. Les études connues sur les mécanismes de déphosphorylation de la LHS n'ont porté que sur les sérines 563 et 565 (Olsson & Belfrage, 1987; Wood *et al.*, 1993). Des expériences *in vitro* ont montré que la Ser-565 est la cible de la PP2A seulement (Olsson & Belfrage, 1987) tandis que la Ser-563 est la



cible de la PP1 et de la PP2A (Wood *et al.*, 1993), deux phosphatases abondamment exprimées dans les adipocytes de rat.

## 2.5.2. La lipase adipeuse des triglycérides

### 2.5.2.1. Propriétés enzymatiques et structure de la protéine

L'ATGL fut découverte lorsque les études sur des souris *Lhs*<sup>-/-</sup> ont montré la présence d'une lipolyse basale chez les adipocytes isolés de ces dernières. En effet, la LHS était auparavant considérée comme l'enzyme limitante pour l'hydrolyse des TAG. En 2004, trois groupes différents ont identifié l'enzyme responsable de cette lipolyse basale comme étant la desnutrine (Villena *et al.*, 2004) ou l'ATGL (Zimmermann *et al.*, 2004) ou encore la phospholipase A2-zéta (connu sous PNPLA2, *patatin-like phospholipase domain containing protein 2*) (Jenkins *et al.*, 2004). L'ATGL est responsable de la première étape de l'hydrolyse des TAG conduisant à la formation d'une molécule de DAG et d'une molécule d'AGNE (Figure 9) (Zimmermann *et al.*, 2004). Zimmermann et ses collaborateurs ont étudié son activité en utilisant des extraits protéiques provenant de cellules HepG2 transfectées avec l'ADNc de l'ATGL humaine (Zimmermann *et al.*, 2004). En incubant les extraits de ces cellules avec la trioléine (un TG) et/ou la dioléine (un DAG) radioactives, ils ont montré que cette enzyme était six fois plus active pour l'hydrolyse de la trioléine que de la dioléine. Villena et ses collaborateurs ont montré que l'expression d'ATGL humaine dans les cellules COS-7 réduisait de 40 % le contenu en TG dans ces cellules (Villena *et al.*, 2004). En fait, l'ATGL ne possède pas de réactivité pour les DAG, les MAG et les esters de cholestérol (Zimmermann *et al.*, 2004).

Les gènes de l'ATGL chez l'humain et chez la souris codent pour une protéine de 504 et 486 acides aminés, respectivement. Chez l'humain, le gène *Atgl* est situé sur le chromosome 11q15.5 et contient 10 exons (Fischer *et al.*, 2007). La présence de messenger de l'ATGL est détectée dans presque tous les tissus, mais avec une prépondérance dans les tissus adipeux blanc et brun (Kim *et al.*, 2006). L'expression de l'ATGL est augmentée au cours de la différenciation dans le modèle adipocytaire de

3T3-L1 et elle est induite par la dexaméthasone (Villena *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2009). Les recherches chez la souris ont permis d'identifier la présence d'un élément de réponse de PPAR $\gamma$  sur le promoteur du gène (Kim *et al.*, 2006).

### 2.5.2.2. Régulation de l'activité enzymatique

Contrairement à la LHS dont l'activité est régulée par phosphorylation, l'ATGL n'est pas phosphorylée par la PKA, du moins directement (Zimmermann *et al.*, 2004). Néanmoins, il a été observé que l'ATGL humaine est phosphorylée aux sites Ser-404 et Ser-428 (Bartz *et al.*, 2007), quoique l'importance de cette phosphorylation reste à déterminer. N'étant pas directement phosphorylée par la PKA, les recherches ont montré que l'ATGL est en fait activée par une interaction avec son coactivateur, CGI-58 (*Comparative gene identification-58*), et que cette interaction permet sa migration du cytosol vers les gouttelettes lipidiques (Lass *et al.*, 2006). A l'opposé, l'interaction de l'ATGL avec la protéine G0S2 (*G0/G1 switch protein 2*) inhibe son activité (Yang *et al.*, 2010).

#### 2.5.2.2.1. Activation de l'ATGL par CGI-58

Le rôle de CGI-58, aussi connu sous l'appellation de ABHD5 ( *$\alpha/\beta$ -hydrolase domain-containing protein 5*), dans le métabolisme des lipides fut mis en évidence par les travaux de Lefevre et ses collaborateurs qui ont montré que les mutations dans les gènes *Cgi-58* et *Atgl* sont la cause de l'apparition du syndrome de Chanarin–Dorfman (Lefevre *et al.*, 2001). Ce syndrome est une maladie autosomique récessive causée par une accumulation des lipides neutres ou TG dans différents tissus (peau, muscle, foie, système nerveux central). Ce syndrome se caractérise par une ichtyose (peau sèche couverte de squames) et une réduction de l'activité lipolytique chez ces patients (Judge *et al.*, 1994). Du point de vue moléculaire, deux types de mutation ont été observés chez les patients souffrant de ce syndrome. La première mutation est observée dans la région N-terminale de CGI-58 affectant son interaction avec l'ATGL (Lass *et al.*, 2006; Gruber *et al.*, 2010). La deuxième mutation, quant à elle, affecte la migration de l'ATGL vers les gouttelettes lipidiques et est localisée dans la région C-terminale de l'ATGL

(Zimmermann *et al.*, 2004; Schweiger *et al.*, 2008). Les mutations dans la région C-terminale de l'ATGL n'affectent pas son interaction avec la protéine CGI-58 (Fischer *et al.*, 2007).

En condition basale, la protéine CGI-58 est associée à la PLIN1a au niveau des gouttelettes lipidiques (section 2.5.4) tandis que l'ATGL est située dans le cytosol (Yamaguchi *et al.*, 2006b; Yamaguchi *et al.*, 2004; Subramanian *et al.*, 2004b; Granneman *et al.*, 2007). Lorsque la lipolyse est stimulée par les catécholamines, la protéine CGI-58 se dissocie de la PLIN1a après la phosphorylation de cette dernière sur les résidus Ser-492 et Ser-517 pour ensuite interagir avec l'ATGL, favorisant ainsi sa migration vers les gouttelettes (Granneman *et al.*, 2009; Miyoshi *et al.*, 2007; Yamaguchi *et al.*, 2007; Subramanian *et al.*, 2004b). Récemment, deux nouvelles études ont rapporté une interaction entre le CGI-58 et l'ATGL avec un membre de la famille de PLIN (Wang *et al.*, 2011; Granneman *et al.*, 2011), la périlipine 5 (PLIN5) aussi connue sous les noms de OXPAT et LSDP5 (*lipid storage droplet protein 5*), cette dernière étant très exprimée dans les tissus à haute capacité oxydative tels que le tissu adipeux brun et les muscles squelettique et cardiaque (voir section 2.5.4.4) (Dalen *et al.*, 2007; Wolins *et al.*, 2006).

#### 2.5.2.2.2. *Inhibition de l'activité de l'ATGL par la protéine G0S2*

La protéine G0S2 a été initialement identifiée dans les cellules mononucléaires, lors du passage de la phase G<sub>0</sub> à G<sub>1</sub> du cycle cellulaire (Russell & Forsdyke, 1991). Cette protéine est fortement exprimée dans le tissu adipeux blanc et le foie et dans une moindre mesure, dans le muscle squelettique, les reins et les ovaires (Lu *et al.*, 2010). Dans les adipocytes 3T3-L1, la protéine G0S2 forme avec l'ATGL un complexe dans le cytosol par une interaction entre le domaine hydrophobe de la protéine G0S2 et la région N-terminale de l'ATGL (Lu *et al.*, 2010; Cornaciu *et al.*, 2011). L'inhibition de l'expression de cette protéine par ARNsi dans les adipocytes 3T3-L1 augmente la lipolyse basale et potentialise la lipolyse lorsque stimulée (Lu *et al.*, 2010). Après stimulation de la lipolyse par l'isoprotérénol, un agoniste  $\beta$ , le complexe G0S2-ATGL

migre vers les gouttelettes où il est activé par la protéine CGI-58 (Yang *et al.*, 2010; Cornaciu *et al.*, 2011).

### **2.5.3. La lipase des monoacylglycérols**

La LMG catalyse la dernière étape de l'hydrolyse des TG afin de produire une molécule d'AGNE et du glycérol (Figure 9). Elle est exprimée de façon ubiquitaire dans presque tous les tissus (Karlsson *et al.*, 1997). Contrairement aux lipases décrites ci-haut, il n'y a pas d'évidence que l'activité de la LMG soit régulée de façon hormonale (Fredrikson *et al.*, 1986). Il existe un modèle animal de déficience en LMG qui permet d'étudier son rôle physiologique. Ces souris présentent des taux plasmatiques de glycérol et de TG faibles et une masse adipeuse inchangée. Toutefois, ces souris sont insensibles à une diète induisant la résistance à l'insuline (Taschler *et al.*, 2011).

### **2.5.4. La périlipine A et les protéines de la famille PAT**

L'observation d'un adipocyte blanc par microscopie révèle la présence de vésicules ou gouttelettes lipidiques qui occupent près des deux tiers de la cellule. Chaque gouttelette est entourée de protéines et d'une couche de phospholipides et présente un noyau très hydrophobe contenant des molécules estérifiées (TG, esters de cholestérol, esters de rétinol) (Tauchi-Sato *et al.*, 2002). Quatre groupes ont mené des études protéomiques des gouttelettes lipidiques dans différentes lignées cellulaires, dont les adipocytes de type 3T3-L1. Ils ont montré que la gouttelette est constituée d'une très grande variété de protéines impliquées dans le métabolisme des lipides, la signalisation et l'organisation du cytosquelette, et même des chaperones (Tableau IV) (Brasaemle *et al.*, 2004; Fujimoto *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004; Umlauf *et al.*, 2004).

En 1991, Greenberg et ses collaborateurs ont été les premiers à identifier une protéine associée aux gouttelettes et qui est très abondante dans les adipocytes du gras épидidymaire de rat qu'ils ont nommé la PLIN1a (Greenberg *et al.*, 1991). Cette protéine de 64 kDa est exprimée dans les cellules 3T3-L1 différenciées, mais pas dans les préadipocytes (Greenberg *et al.*, 1991). L'analyse comparative de l'ADNc de la PLIN1a avec les séquences nucléotidiques dans les bases de données a permis

l'identification de deux autres membres partageant des similitudes de séquence (Figure 11) et la même habileté à se fixer aux gouttelettes lipidiques. Ainsi la PLIN2 (ADRF ou adipophiline) et la PLIN3 (TIP47) (Brasaemle *et al.*, 1997b) forment avec la PLIN1a les premiers membres de la famille PAT. Par la suite, deux autres protéines furent ajoutées à cette famille, il s'agit de la PLIN 4 (S3-12) (Wolins *et al.*, 2003; Scherer *et al.*, 1998) et la PLIN 5 (OXPAT ou LSDP5 ou encore MLDP pour *myocardial lipid droplet protein*) (Yamaguchi *et al.*, 2006a; Dalen *et al.*, 2007). Notons que depuis 2010, il y a eu une uniformisation des noms des différents membres de la famille PAT (Kimmel *et al.*, 2010). Ainsi, l'abréviation PLIN désigne la protéine tandis que les chiffres désignent les différents membres de la famille PAT. Pour ce qui est des variantes de la PLIN1, elles sont nommées comme PLIN1a, PLIN1b, PLIN1c et PLIN1d, pour les périlipines A, B, C et D, respectivement.

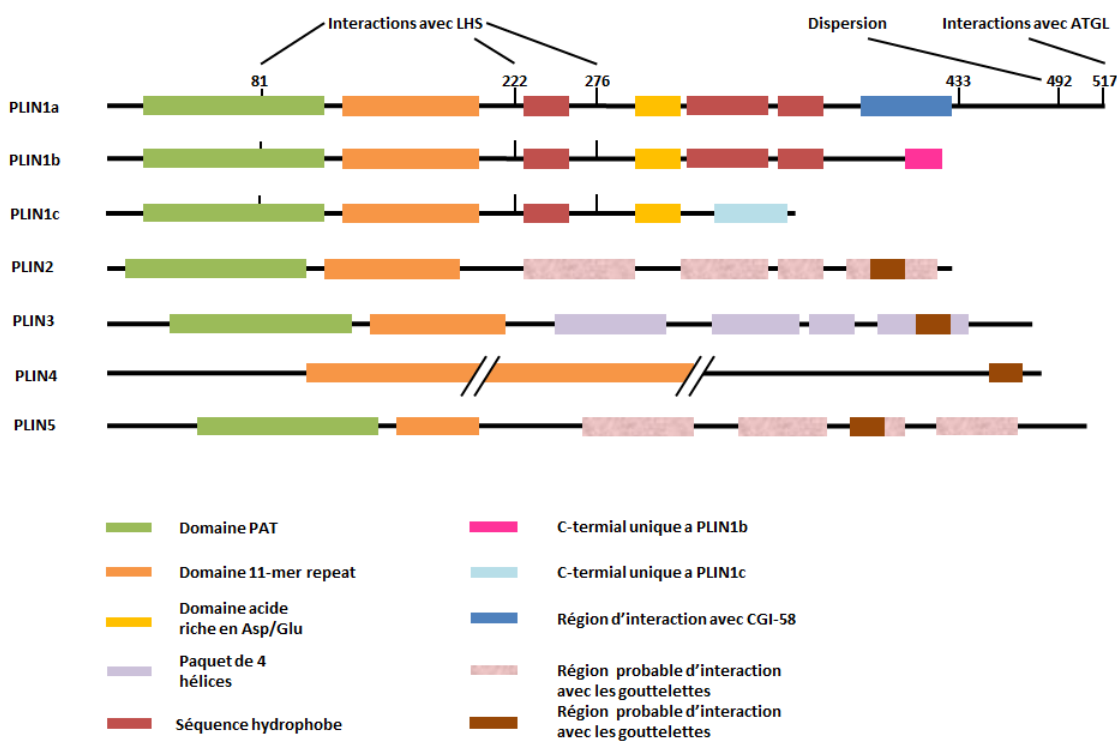


Figure 11: Structure des membres de la famille PAT. Traduit de (Bickel *et al.*, 2009).  
 PLIN : périlipine; périlipine 2 : ADRF, *adipose differentiation-related protein*;  
 périlipine 3 : TIP47, *tail interacting protein 47*; périlipine 4 : protéine S3-12; périlipine  
 5 : LSDP5, *lipid storage droplet protein*.

<b>Identification</b>	<b>Poids moléculaire <i>kDa</i></b>
<b><i>Protéines connues</i></b>	
Adipophiline (ADRP)	46.9
Périlipine A	55.9
Périlipine 4	140.2
Périlipine 3	47.3
Vimentine	53.7
<b><i>Métabolisme des lipides ou transport</i></b>	
17- $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase type 7	33.7
ACSL1 ( <i>Acyl CoA synthetase long chain 1</i> )	78.9
ACSL3	81.5
ACSL4	75.6
ALDH3B1 ( <i>Aldehyde dehydrogenase</i> )	50.6
CGI-58 ( <i>comparative gene identification-58</i> )	39.5
LHS (lipase hormono-sensible)	84.0
<i>Lanosterol synthase</i>	84.4
<i>Short-chain dehydrogenase/reductase member 1</i>	34.5
<i>NAD(P)-dependent steroid dehydrogenase-like</i>	40.9
<b><i>Protéines diverses</i></b>	
<i>Ancient ubiquitous protein</i>	46.5
BiP ( <i>Binding immunoglobulin protein</i> )	72.5
Calnexine	68.0
CGI-49 ( <i>comparative gene identification-49</i> )	47.7
CGI-58	39.5
Diaphorase 1	34.3
<i>Fat-specific gene 27</i>	27.5
HSP 70	71.0
Ribophorine I	68.6
<i>Expressed sequence AI462440</i>	52.8

<b>Identification</b>	<b>Poids moléculaire <i>kDa</i></b>
FSP27 ( <i>Fat-specific protein</i> )	27.5
Rab14	24.1
Rab18	23.3
Rab5c	22.4
Rab7	23.8
Tubuline $\beta$ 5	50.1
Protéine tumorale D54 (hD54)	24.1
<b><i>Contaminants probables</i></b>	
<i>ATP synthase <math>\beta</math>-subunit</i>	56.3
<i>B-cell receptor-associated protein 37</i>	33.3
Collagène, type IV, $\alpha$ 3	185.8
Collagène, type VI, $\alpha$ 2	42.2
Collagène, type VI, $\alpha$ 3	288.2
CD36	53.1
LPL (Lipoprotéine lipase)	52.8
<i>Polymerase I and transcript release factor</i>	43.9
Pyruvate carboxylase	130.3

Tableau IV. Protéines associées aux gouttelettes lipidiques en condition basale et stimulée. Traduit et modifié de (Brasaemle *et al.*, 2004).

#### **2.5.4.1. Structure du gène et de la protéine**

En 1992, le séquençage du gène *Plin1* et l'analyse de son ADNc ont permis d'identifier l'ADNc de la PLIN1b qui provient d'un épissage alternatif de l'ARNm de PLIN1a chez le rat. PLIN1a et PLIN1b sont exprimés au niveau des intestins, de la peau, de l'estomac, du cerveau, des poumons, du foie, des reins et des testicules (Lu *et*

*al.*, 2001; Servetnick *et al.*, 1995). Mais c'est au niveau des tissus adipeux blanc et brun qu'elles sont le plus exprimées (Tansey *et al.*, 2001; Greenberg *et al.*, 1993). La PLIN1a est plus abondante que la PLIN1b dans les tissus adipeux (Greenberg *et al.*, 1993) et dans les cellules stéroïdogènes (Londos *et al.*, 1996; Londos *et al.*, 1995). Les deux protéines ne sont différentes que dans la région C-terminale (Figure 11) (Greenberg *et al.*, 1993). Le groupe de Kimmel (Lu *et al.*, 2001) a identifié deux autres variantes de l'ARNm de PLIN1a traduisant pour deux protéines, PLIN1c et PLIN1d, de 347 et 244 acides aminés, respectivement. Par hybridation *in situ*, l'expression des ARNm PLIN1c et PLIN1d n'a été détectée que dans les testicules de souris, principalement dans les cellules stéroïdogènes (Lu *et al.*, 2001).

La structure de la protéine comporte un domaine riche en acides glutamate et aspartique commun aux PLIN1a, 1 b et 1c (Figure 11) (Lu *et al.*, 2001). PLIN comporte aussi trois domaines très hydrophobes (H1, H2 et H3) qui lui permettent de cibler les gouttelettes lipidiques et de s'y ancrer (Subramanian *et al.*, 2004a; Garcia *et al.*, 2003). Il est à noter que seules PLIN1a et 1 b possèdent les trois domaines hydrophobes tandis que la PLIN1c ne possède que le domaine H1. Tous les membres de la famille de la PLIN, à l'exception de PLIN4, contiennent dans leur région N-terminale un domaine PAT constitué de structures hélices  $\alpha$ /feuillet  $\beta$  et d'un domaine « *11-mer repeat* » (Hickenbottom *et al.*, 2004). PLIN4 (protéine S3-12) n'est formée que de « *33-mer repeats* ». Les propriétés de la structure hélices  $\alpha$ /feuillet  $\beta$  et du domaine « *11-mer repeat* » ne sont pas encore connues.

#### 2.5.4.1.1. Régulation de la lipolyse par phosphorylation de PLIN1a

Tout comme la LHS, la PLIN1a est un substrat de la PKA lors de la stimulation de la lipolyse dans les adipocytes. En effet, lors de son identification par le groupe de Londos en 1991, il a été démontré que la PLIN1a était poly-phosphorylée après stimulation de la lipolyse et que cette phosphorylation était nécessaire à l'activité lipase dans les 3T3-L1 différenciées et dans les adipocytes blancs isolés de rat (Greenberg *et al.*, 1991; Brasaemle *et al.*, 1997a). Ces sites de phosphorylation sont les sérines 81, 222, 276, 433, 492 et 517 (Lu *et al.*, 2001). Il a été suggéré que PLIN1a agit comme une



barrière, protégeant les gouttelettes dans des conditions basales et favorisant l'encrage des lipases à la surface des gouttelettes après stimulation de la lipolyse (Brasaemle *et al.*, 2000; Langin *et al.*, 1993). En effet, dans des conditions lipolytiques, la migration de la LHS vers les gouttelettes des fibroblastes embryonnaires de souris déficientes en PLIN1a est réduite (Sztalryd *et al.*, 2003). Il en est de même avec la transfection de la LHS dans les cellules CHO, la LHS ne migrant au niveau des gouttelettes que lorsqu'il y a co-transfection avec la PLIN1a. Les extraits protéiques des cellules transfectées montrent toutefois une activité lipase de la LHS par des essais *in vitro*, ce qui confirme le rôle de la PLIN1a comme étant une barrière pour les gouttelettes (Sztalryd *et al.*, 2003).

L'importance des différents sites de phosphorylation sur la PLIN1a commence à être élucidée. Ainsi, il a été démontré par mutagenèse dirigée que la phosphorylation des sérines 81, 222 et 276 est responsable de l'interaction entre la PLIN1a et la LHS ainsi que de l'hydrolyse des TG dans les cellules NIH-3T3 et 3T3-L1 différenciées (Zhang *et al.*, 2003; Granneman *et al.*, 2007). Toutefois, la mutation sur ces trois résidus ne suffit pas à abolir complètement la lipolyse induite par la forskoline (environ 70 % de réduction) dans les cellules NIH-3T3 différenciées. Individuellement, la mutation des sérines 81, 222 ou 276 n'a pas d'effets significatifs sur la lipolyse induite par la forskoline. Les sérines 433, 492 et 517, quant à elles, sont impliquées dans la régulation de l'activité hydrolytique de l'ATGL (Zhang *et al.*, 2003; Miyoshi *et al.*, 2007; Granneman *et al.*, 2009). Les travaux de Miyoshi (Miyoshi *et al.*, 2007; Miyoshi *et al.*, 2006) chez des fibroblastes embryonnaires de souris déficientes en PLIN1a ont montré que la mutation de la sérine 517 ou celle des sérines 433, 492 et 517 en trio abolit complètement la lipolyse (Miyoshi *et al.*, 2007). La mutation de la Ser-517, combinée à un traitement par un ARNi contre la LHS, a permis d'identifier clairement la Ser-517 comme étant responsable de la liaison et de l'activité hydrolytique de l'ATGL (Miyoshi *et al.*, 2007). La Ser-492 est impliquée dans l'interaction de la PLIN1a avec le co-activateur CGI-58 et dans le remodelage des gouttelettes lipidiques. En effet, la mutation de cette sérine dans les adipocytes 3T3-L1 abolit l'interaction PLIN1a/CGI-58 et conduit à la fragmentation de la vacuole lipidique en plusieurs micro-gouttelettes

(Brasaemle *et al.*, 2009; Miyoshi *et al.*, 2007; Granneman *et al.*, 2009). Ceci suggère un rôle de la PLIN1a dans le maintien de la forme des vacuoles lipidiques. La Ser-433 n'est pas importante dans la lipolyse, car en effet, la mutation de celle-ci n'a aucun effet sur la lipolyse (Granneman *et al.*, 2009).

#### **2.5.4.2. La périlipine 2**

La PLIN2 est une protéine de 50 kDa dont le transcrit a été considéré comme un indice de différenciation adipocytaire (Jiang & Serrero, 1992). La protéine est associée avec les petites gouttelettes lipidiques, notamment lors de l'apparition de celles-ci au cours de la différenciation adipocytaire (Brasaemle *et al.*, 1997b; Londos *et al.*, 1999). Dans les adipocytes de souris déficientes en PLIN1a, la PLIN2 est augmentée et la remplace autour des gouttelettes lipidiques. Toutefois, elle ne remplit pas la même fonction que la PLIN1a lors de la lipolyse basale ou stimulée par les catécholamines (Tansey *et al.*, 2001).

#### **2.5.4.3. Les périlipine 3 et 4**

La PLIN3 est impliquée dans la liaison des gouttelettes naissantes ainsi que dans la détermination de leur taille et leur nombre (Wolins *et al.*, 2001; Bell *et al.*, 2008). En effet, dans la lignée cellulaire hépatique AML12, l'invalidation de PLIN3 par ARNsi réduit la grosseur des gouttelettes et augmente leur nombre (Bell *et al.*, 2008). Aucune fonction de PLIN3 n'a été documentée à ce jour dans la lipolyse.

La PLIN4, contrairement aux autres membres de la famille PAT, ne contient pas de domaine PAT (Figure 11). Dans les adipocytes 3T3-L1, la PLIN4 est cytosolique tandis que pendant l'accumulation, elle est localisée au niveau périphérique (région de la membrane) (Wolins *et al.*, 2003).

#### **2.5.4.4. La périlipine 5**

La PLIN5 est exprimée dans les tissus spécialisés dans la  $\beta$ -oxydation tels que le tissu adipeux brun ainsi que les muscles squelettique et cardiaque. Lorsqu'ils sont co-transfectés dans les cellules CHO, les protéines ATGL, CGI-58 et PLIN5 forment un

complexe au niveau des gouttelettes (Wang *et al.*, 2011). La région en C-terminale de la PLIN5 serait impliquée dans les interactions avec ATGL et CGI-58 ainsi que dans la formation du complexe ATGL-CGI-58-PLIN5 (Granneman *et al.*, 2011). La stimulation de la lipolyse conduit à la phosphorylation de la PLIN5, ce qui permet une interaction directe entre ATGL et CGI-58 favorisant l'hydrolyse des TAG (Wang *et al.*, 2011).

### **2.5.5. Autres protéines impliquées dans la lipolyse**

En plus des protéines et enzymes directement associées aux gouttelettes lipidiques et à l'hydrolyse de TG dans les adipocytes, certaines protéines cytosoliques et membranaires telles que la FABP4 et l'aquaporine 7 (AQP7) jouent des rôles dans le transport intracellulaire et transmembranaire des produits de la lipolyse. D'autres protéines telles que la Cav-1 et la vimentine facilitent l'association des enzymes lipolytiques avec les gouttelettes lipidiques et la transduction du signal (Brasaemle *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2008). Plusieurs études ont montré le rôle de ces protéines dans la modulation de la lipolyse.

#### **2.5.5.1. La cavéoline 1 au niveau des gouttelettes lipidiques**

La Cav-1 est une protéine abondamment exprimée dans les adipocytes, étant une composante de la membrane plasmique. Elle est aussi localisée sur les gouttelettes lipidiques (Pilch *et al.*, 2007). En plus d'être impliquée dans le transport des AG comme nous l'avons décrit dans la section 2.3.1.3, la Cav-1 joue aussi un rôle dans la lipolyse, notamment dans la transduction du signal. En effet, une diminution de la lipolyse induite par le CL-316,243, un  $\beta_3$ -agoniste, a été observée chez des adipocytes isolés de souris déficientes en Cav-1 par comparaison aux adipocytes de souris de type sauvage. L'analyse moléculaire a révélé que la PLIN1a des adipocytes de souris déficientes en Cav-1 n'était pas phosphorylée après l'induction de la lipolyse, malgré le fait qu'une forte activité de la PKA ait été détectée dans les extraits protéiques de ces cellules (Cohen *et al.*, 2004). Ceci s'explique par le fait que la Cav-1 favorise la formation d'un complexe contenant la sous-unité  $\alpha$  catalytique de PKA (PKA-cat) (Razani *et al.*, 1999) et PLIN1a à la surface des gouttelettes lipidiques, ce qui n'est pas détecté dans les

adipocytes de souris déficientes en Cav-1 (Cohen *et al.*, 2004). Des études *in vivo* et *in vitro*, notamment sur des cellules HEK 293T, ont démontré que la Cav-1 interagissait avec PKA $\alpha$ -cat au niveau de son domaine C-terminal (Razani & Lisanti, 2001; Razani *et al.*, 1999).

La migration de la Cav-1 de la membrane vers les gouttelettes dans les adipocytes a été observée et serait dépendante de l'activation des kinases Src (Blouin *et al.*, 2008; Le *et al.*, 2006) et de la protéine kinase C (PKC) (Oka *et al.*, 1997; Le *et al.*, 2006).

#### **2.5.5.2. La vimentine**

La vimentine est une protéine de la famille des filaments intermédiaires du cytosquelette qui a un rôle important dans le maintien des organelles dans le cytoplasme cellulaire dont les gouttelettes lipidiques (Lieber & Evans, 1996; Brandes *et al.*, 1993). Après l'induction de la lipolyse, cette protéine est associée avec les gouttelettes lipidiques dans les adipocytes (Brasaemle *et al.*, 2004). Les travaux de Kumar ont documenté le rôle de l'assemblage des filaments de vimentine dans la transduction du signal des  $\beta_3$ -AR et l'activation de ERK1/2 dans les adipocytes (Kumar *et al.*, 2007). Il a été montré qu'une stimulation des  $\beta_3$ -AR chez des adipocytes C3H10T1/2 et 3T3-L1 permet le recrutement de la kinase Src sur le domaine riche en proline de la région C-terminale du récepteur, ce qui conduit à l'activation de ERK1/2 (Kumar *et al.*, 2007; Robidoux *et al.*, 2006). Une perturbation des filaments de vimentine par le  $\beta,\beta'$ -iminodipropionitrile, un agent neurotoxique qui détruit les neurofilaments intermédiaires sans affecter les filaments d'actine, conduit à une réduction de 40 % de la lipolyse induite par le CL-316,243 et à l'inhibition de l'activation de ERK1/2 (Kumar *et al.*, 2007). De plus, il a été montré que la LHS est associée à la vimentine dans des conditions de stimulation de la lipolyse par les agonistes  $\beta$  sur des adipocytes isolés de souris et que cette association est nécessaire à la translocation de la LHS (Shen *et al.*, 2010). Ces résultats ont été confirmés par des expériences avec des adipocytes isolés de

souris déficientes en vimentine chez lesquelles il a été observé une faible translocation de la LHS vers les gouttelettes (Shen *et al.*, 2010). Toutefois le mécanisme par lequel la LHS lierait la vimentine reste encore à être déterminé.

### 2.5.5.3. La protéine FABP4

La protéine FABP4 aussi appelée aP2 (*adipocyte protein-2*) ou encore ALBP est une protéine très exprimée dans les adipocytes qui a pour rôle le transport intracellulaire des AG (Matarese & Bernlohr, 1988). Elle facilite aussi bien l'accumulation des AG que la lipolyse en transportant les AGNEs dans la cellule (Coe *et al.*, 1999). Les premières études décrivant le rôle de ce transporteur intracellulaire ont été faites chez des souris FABP4<sup>-/-</sup>. Les adipocytes de ces souris possèdent quatre fois plus d'AGNEs que les adipocytes de souris de type sauvage et la lipolyse basale est réduite de 40 % (Coe *et al.*, 1999). La lipolyse stimulée par l'isoprotérénol est aussi réduite 40 % (Coe *et al.*, 1999). La réduction de la relâche du glycérol et des NEFA des adipocytes de souris déficientes en FABP4 n'est pas due à une altération de l'expression de la LHS ou de PLIN1a (Scheja *et al.*, 1999). Des données obtenues par la technique de transfert d'énergie de fluorescence par résonance (FRET, *fluorescence resonance energy transfert*) suggèrent que la FABP4 lie la LHS seulement sous sa forme phosphorylée et que ce complexe migre vers la gouttelette (Smith *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2004).

### 2.5.5.4. Aquaporine 7

L'aquaporine 7 (AQP7) est une protéine formant un canal au niveau de la membrane plasmique, facilitant le passage aussi bien du glycérol que de l'eau dans les adipocytes. Les études chez des souris déficientes AQP7 montrent qu'elles présentent de faible taux plasmatiques de glycérol même après traitement par des agonistes  $\beta$ . De plus, le contenu en TG des adipocytes de ces souris est élevé, probablement dû à l'expression de la glycérol kinase (Hibuse *et al.*, 2005). Ces résultats expliquent l'obésité observée chez ces souris. A ce jour, peu d'études ont été faites afin de déterminer les mécanismes de régulation de ce canal si ce n'est que l'expression de

cette protéine est augmentée pendant le jeûne (Walker *et al.*, 2007) et qu'elle est diminuée par l'activation de PKA (Fasshauer *et al.*, 2003).

## 2.5.6. Régulation de la lipolyse

### 2.5.6.1. Activateurs de la lipolyse

#### 2.5.6.1.1. Les catécholamines

Le tissu adipeux blanc est très innervé de neurones des systèmes nerveux sympathique et parasympathique. Ces terminaisons nerveuses libèrent des neurotransmetteurs dont la noradrénaline et l'adrénaline qui régulent la lipolyse via les récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$  (Kreier *et al.*, 2002). Les deux types de récepteurs contrôlent les niveaux intracellulaires d'AMPc et par le fait même l'activité de la kinase dépendante de l'AMPc, la PKA. La PKA est une enzyme tétramérique composée de deux sous-unités catalytiques associées à deux sous-unités régulatrices (Figure 12). Il existe 4 formes de la sous-unité régulatrice, R1A, R1B, R2A et R2B, dont le profil d'expression varie suivant les tissus. Ainsi dans les tissus adipeux blancs expriment principalement la sous-unité R2B (Mantovani *et al.*, 2009).

Les  $\beta$ -AR sont des membres de la famille de récepteurs à sept passages transmembranaires couplés aux protéines G. Il existe trois sous-types de ce récepteur,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 et  $\beta$ 3 (Dixon *et al.*, 1986). Le tissu adipeux blanc chez l'humain exprime principalement les récepteurs  $\beta$ 1 et  $\beta$ 2 (Mauriege *et al.*, 1988) tandis que chez les rongeurs, le sous-type  $\beta$ 3 est plus abondant, autant dans le tissu adipeux blanc que brun. Les  $\beta$ -AR sont couplés à la protéine Gs qui stimule l'activité de l'adénylate cylase. Cette enzyme est responsable de la conversion de l'ATP en AMPc. Ainsi l'activation des  $\beta$ -AR par la liaison des ligands conduit à une augmentation des concentrations intracellulaires d'AMPc (Steinberg & Huttunen, 1972). Les molécules d'AMPc formées vont se lier aux sous-unités régulatrices R2B de la PKA, favorisant ainsi la dissociation et l'activation des sous-unités catalytiques de celle-ci (Figure 12). L'activation de la PKA conduit à la phosphorylation de PLIN1a (Lu *et al.*, 2001) et de la LHS (Watt *et al.*,

2006; Belfrage *et al.*, 1980). La phosphorylation de la Ser-492 de PLIN1a permet de libérer CGI-58 qui pourra s'associer à l'ATGL. Cette association favorise la migration de l'ATGL vers les gouttelettes lipidiques et permet ainsi d'initier la première étape de l'hydrolyse des TG. Parallèlement, la phosphorylation de la LHS sur la Ser-660 va favoriser la migration de celle-ci vers les gouttelettes et permettre ainsi la formation d'un complexe catalytique comprenant la PLIN1a, la Cav-1, la PKA-c et la LHS (Cohen *et al.*, 2004; Brasaemle *et al.*, 2004). Ceci initie la deuxième étape de l'hydrolyse des TG, soit l'hydrolyse des DAG par la LHS (Figure 13).

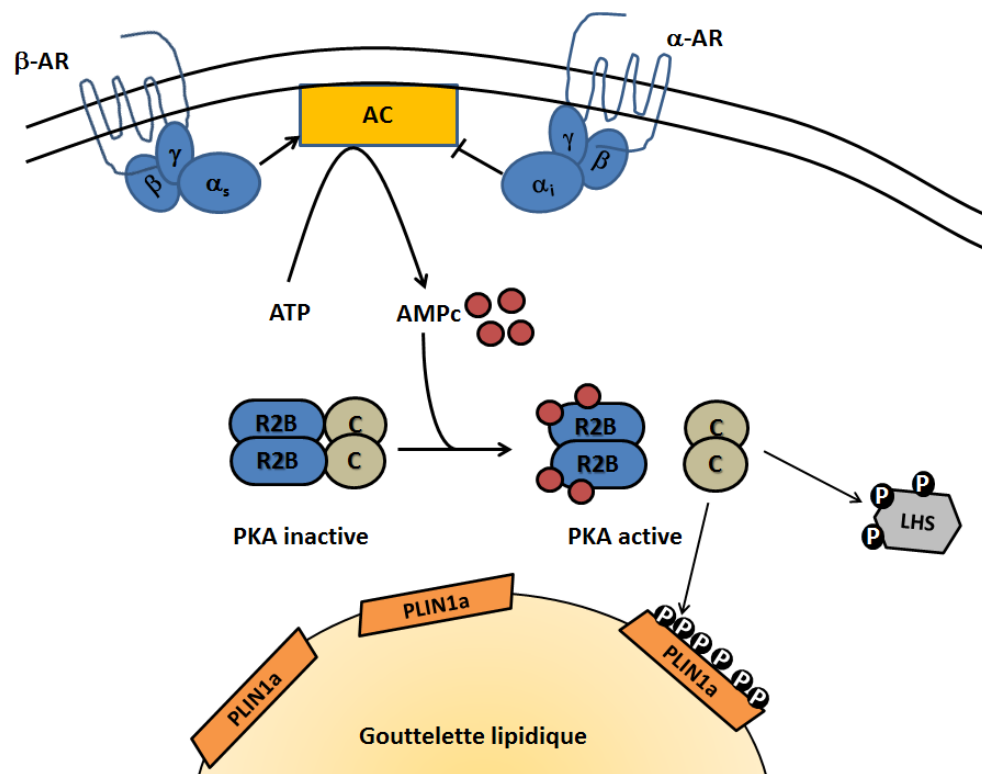


Figure 12: Activation de la PKA dans les adipocytes. Inspiré de (Wang *et al.*, 2008). AC : adénylate cyclase;  $\alpha$ - et  $\beta$ -AR : récepteur  $\alpha$ - et  $\beta$ -adrénergique; AMPc : adénosine monophosphate cyclique; ATP : adénosine triphosphate; C : sous-unité catalytique de la PKA; LHS : lipase hormono-sensible; P : phosphorylation; PKA : protéine kinase A; PLIN1a : périlipine A; R2B : sous-unité régulatrice 2B de la PKA.

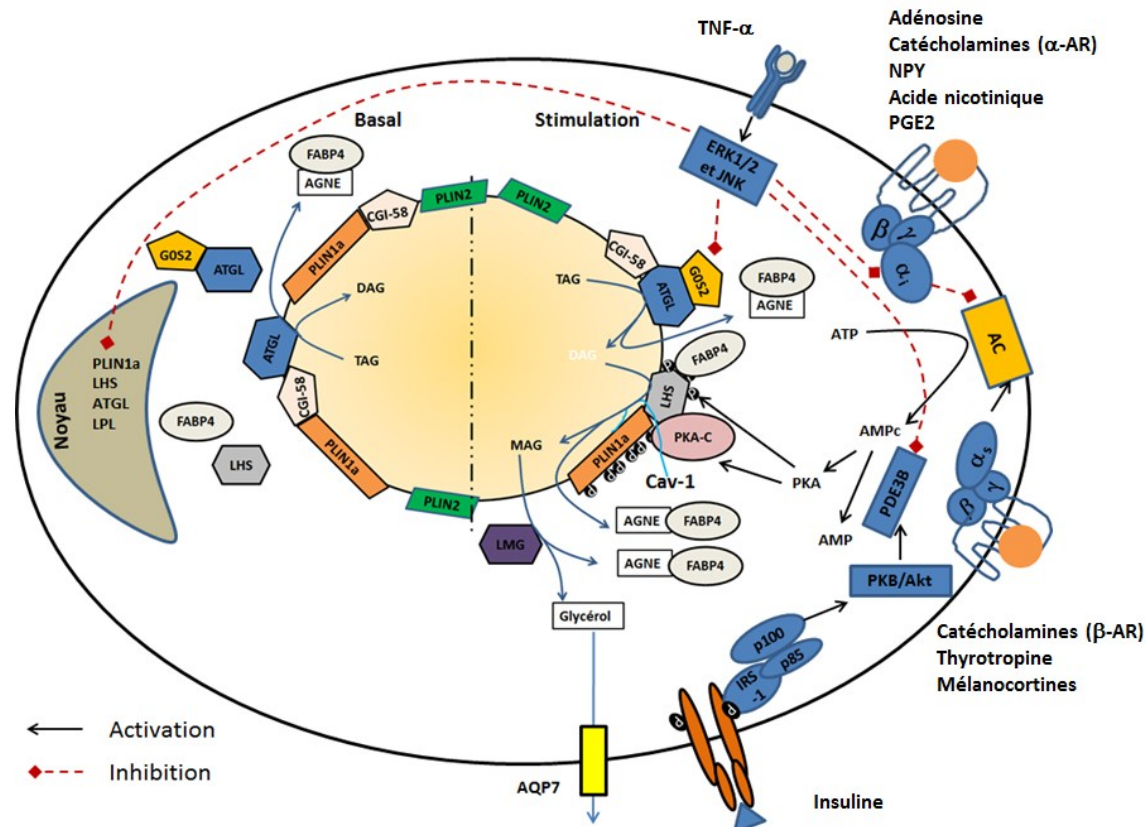


Figure 13: Régulation de lipolyse dans un adipocyte blanc. Inspiré de (Duncan *et al.*, 2007). AC, adénylate cyclase; AGNE, acides gras non-estérifiés; ATGL, triglycérade lipase adipocytaire; AMP, adénosine monophosphate; AMPc, AMP cyclique; AQP7, aquaporine 7; ATP, adénosine triphosphate; Cav-1, cavéoline 1; IRS-1, *insulin receptor substrate 1*; FABP4, *fatty acid binding protein-4*, LHS, lipase hormono-sensible; LMG, lipase des monoacylglycérol; NPY, neuropeptide Y; PDE3B, phosphodiesterase 3B; PGE2, prostaglandine E2; PLIN; PKA; PKA-c, sous-unité catalytique de PKA.



Chez la souris, la stimulation des  $\beta_3$ -AR d'adipocytes isolés conduit aussi à l'activation des MAP kinases dont ERK. Cette voie compterait pour environ 30 % de la lipolyse induite par les agonistes  $\beta_3$ -AR (Greenberg *et al.*, 2001). De plus, la stimulation des  $\beta_3$ -AR conduit aussi au recrutement et à l'activation des kinases Src (Robidoux *et al.*, 2006). Il a été démontré que l'activation de cette voie est nécessaire à la translocation de Cav-1 (Li *et al.*, 1996) et à la phosphorylation de PLIN1a (Cohen *et al.*, 2004).

En plus d'activer la voie de la PKA, la stimulation des  $\beta$ -AR des adipocytes 3T3-L1 active la voie de la PKC (Fricke *et al.*, 2004). La lipolyse induite par la PKC est toutefois modérée comparée à celle induite par l'activation de la PKA. L'activation des voies PKA et PKC sont indépendante l'une de l'autre, mais ces deux voies agissent en synergie sur la relâche du glycérol (Fricke *et al.*, 2004). L'activation de la PKC, tout comme la PKA, conduit à la phosphorylation de la LHS, mais pas à celle de PLIN1a (Fricke *et al.*, 2004).

Chez l'humain, la stimulation de la lipolyse dépend du type de dépôt adipeux. Les adipocytes humains expriment les récepteurs  $\alpha_{2A}$ ,  $\beta_1$  et  $\beta_2$  qui ont des effets contraires sur la lipolyse. En effet, les récepteurs  $\alpha_{2A}$  inhibent la lipolyse tandis que les  $\beta_{1/2}$  la stimulent (Figures 11 et 12) (Lafontan & Langin, 2009). La réponse des tissus adipeux aux catécholamines va dépendre de la densité des différents récepteurs adrénergiques exprimés à la surface des adipocytes, de leur affinité et de la transduction du signal en aval des récepteurs (Ramis *et al.*, 2006; Dicker *et al.*, 2004; Pedersen *et al.*, 2004). Mauriege et ses collaborateurs ont montré que les adipocytes provenant des dépôts adipeux sous-cutanés fémoral et abdominal expriment une forte densité de  $\alpha_{2A}$ -AR (Mauriege *et al.*, 1987). Le traitement par une faible concentration d'adrénaline induit un effet anti-lipolytique, effet qui est renversé avec une forte concentration d'adrénaline (Mauriege *et al.*, 1987). Par contre, les adipocytes du dépôt omental

expriment plus les  $\beta$ -AR et sont ainsi plus susceptibles à une lipolyse induite par l'adrénaline (Mauriege *et al.*, 1987; Stich *et al.*, 2000). Physiologiquement, les adipocytes isolés des dépôts sous-cutanés sont plus hypertrophiés et moins sensibles à la lipolyse induite par les catécholamines, mais plus sensibles à l'insuline (Salans *et al.*, 1973; Weyer *et al.*, 2000).

Les AGNEs provenant du tissu adipeux viscéral sont directement déversés dans la veine porte pour être dirigés vers le foie. Ils sont la cause de l'intolérance au glucose et de la résistance à l'insuline (Jensen, 1997; Ramis *et al.*, 2006). Cependant, c'est le tissu adipeux sous-cutané abdominal qui contribue majoritairement aux taux systémiques d'AGNEs (près de 80 % d'AGNEs circulants), contrairement au tissu viscéral, qui ne contribue que pour 20 % (Nielsen *et al.*, 2004; Jensen, 1997; Koutsari & Jensen, 2006). Cette large contribution du tissu adipeux sous-cutané abdominal est observée dans des conditions normales, c'est-à-dire, lorsqu'il n'y a pas de stimulation de la lipolyse dans les adipocytes. En effet, dans les adipocytes isolés du dépôt sous-cutané abdominal, la lipolyse basale est plus élevée que dans les adipocytes du dépôt adipeux viscéral (Tchernof *et al.*, 2006; Jacobsson & Smith, 1972). Ceci pourrait être dû au fait que les adipocytes du dépôt sous-cutané abdominal expriment plus l'ATGL et la LHS que les adipocytes du dépôt viscéral (Berndt *et al.*, 2008; Reynisdottir *et al.*, 1997). Toutefois, en comparant l'index de lipolyse des adipocytes provenant des deux dépôts, c'est-à-dire la différence entre la lipolyse stimulée et la lipolyse basale, il a été montré que cet index est élevé chez les adipocytes du dépôt viscéral comparés à ceux du dépôt sous-cutané abdominal (Tchernof *et al.*, 2006; Jacobsson & Smith, 1972).

#### 2.5.6.1.2. Les mélanocortines

Les mélanocortines comprennent l'hormone  $\alpha$  de stimulation des mélanocytes ou hormone mélanostimulante ( $\alpha$ -MSH, *melanocyte stimulating hormone*) et l'adrenocorticotrophine (ACTH, *adrenocorticotrophin hormone*). Elles sont les produits

du clivage protéolytique de la proopiomélanocortine (POMC). Il existe cinq sous-types de récepteurs de mélanocortine (MC1R à MC5R) (Barrett *et al.*, 1994), mais seuls les récepteurs MC2R et MC5R sont exprimés par les adipocytes murins et les cellules 3T3-L1 (Cho *et al.*, 2005; Boston, 1999; Boston & Cone, 1996). MC2R et MC5R sont des récepteurs couplés à la protéine  $G_{\alpha s}$ , qui lorsqu'activés, stimulent la lipolyse en stimulant l'adénylate cyclase chez les adipocytes primaires de souris et les cellules 3T3-L1 différenciées (Boston, 1999). Du point de vue de la stimulation de l'adénylate cyclase et de la lipolyse, l'ACTH est plus puissante que la  $\alpha$ -MSH (Boston, 1999). Ceci serait dû au fait que les deux hormones activent des voies différentes pour induire la lipolyse. Dans les cellules 3T3-L1 différenciées, le traitement par des inhibiteurs spécifiques de la voie ERK1/2 inhibe la lipolyse induite par la  $\alpha$ -MSH tandis que la lipolyse induite par l'ACTH n'est pas inhibée (Cho *et al.*, 2005; Moller *et al.*, 2011). En fait, il a été montré que l'activation du récepteur MC5 avec des ligands spécifiques tels que l' $\alpha$ -MSH et le PG-901 n'induit qu'une très faible augmentation des concentrations intracellulaires d'AMPc comparativement à la stimulation du récepteur MC2 par l'ACTH chez les adipocytes 3T3-L1 (Moller *et al.*, 2011; Boston, 1999). Par contre, ces ligands de MC5R induisent fortement la phosphorylation de ERK1/2. De plus, l'ACTH possède une plus grande affinité pour le récepteur MC2 que pour le récepteur MC5, contrairement à la  $\alpha$ -MSH, qui présente une très faible affinité pour le récepteur MC2 (Moller *et al.*, 2011; Boston, 1999). Ceci explique la faible induction de la lipolyse par la  $\alpha$ -MSH, observée chez les adipocytes isolés de rat. Ces cellules expriment plus le récepteur MC2 (Moller *et al.*, 2011).

Une autre mélanocortine, la Lys- $\gamma$ 3-MSH, un peptide de 16 kDa dérivé du clivage en C-terminal de POMC, induit fortement la lipolyse dans les 3T3-L1 différenciées. Cette induction est accompagnée de la phosphorylation de la LHS et de la PLIN1a. Toutefois, le récepteur induisant ces effets n'est pas encore connu (Harmer *et al.*, 2008).

Chez l'humain, c'est le récepteur MC1 qui est le plus exprimé dans les biopsies adipeuses et les lignées cellulaires d'adipocytes humains, mais son activation avec un agoniste sélectif n'induit pas la lipolyse (Hoch *et al.*, 2008).

#### 2.5.6.1.3. Thyrotropine

La thyrotropine (TSH, *thyroid stimulating hormone*) induit la lipolyse dans les adipocytes de la lignée de 3T3-L1 et aussi celle des adipocytes blancs humains. Le récepteur de la TSH (TSHr) est un récepteur couplé à la protéine G<sub>αs</sub> favorisant la stimulation de la lipolyse par la TSH dans les cellules 3T3-L1 différenciés. Cette stimulation s'accompagne de la phosphorylation de la LHS et de la PLIN1a (Gagnon *et al.*, 2010; Thrush *et al.*, 2012). Ainsi, une inhibition de l'activité de la PKA conduit à une diminution de la lipolyse stimulée par la TSH et à une réduction de la phosphorylation de la LHS et de la PLIN1a. Chez l'humain, les effets de la TSH sur la lipolyse sont mitigés. Par exemple, chez les patients ayant subi une thyroïdectomie, l'administration de la TSH recombinante humaine n'induit une augmentation de 53 % des taux circulants d'AGNEs que chez les sujets ayant un IMC supérieur à 30 kg/m<sup>2</sup> (Gagnon *et al.*, 2010). Ou encore, la TSH ne stimule la relâche du glycérol que dans les adipocytes isolés de nouveau-nés âgés de quatre à dix semaines d'âge, pas au-delà, et chez les adultes (Marcus *et al.*, 1988; Vizek *et al.*, 1979). Il semblerait que pendant la période néonatale, la TSH soit l'hormone stimulatrice de la lipolyse (Marcus *et al.*, 1988). En effet, les tests avec la noradrénaline ont montré que cette dernière ne stimule pas la lipolyse des adipocytes de bébés de moins de dix semaines. Ceci s'explique par le fait que le TSHr est très fortement exprimé chez les adipocytes d'enfants en bas âge par comparaison aux adultes tels que détectés par buvardage de northern (*northern blot*) (Janson *et al.*, 1998).

#### 2.5.6.1.4. *TNF- $\alpha$*

Le  $\text{TNF-}\alpha$  est une protéine aussi sécrétée par les adipocytes, mais c'est majoritairement les macrophages de la fraction FSV du tissu adipeux qui en secrètent. En effet, une infiltration de macrophages dans le tissu adipeux blanc est associée à un état d'obésité. Ces cellules produisent de nombreuses cytokines pro-inflammatoires en quantité élevée dont le  $\text{TNF-}\alpha$ , conduisant au développement d'une inflammation locale et de la résistance à l'insuline.

Le  $\text{TNF-}\alpha$  lie deux types de récepteur,  $\text{TNFR1}$  et  $\text{TNFR2}$ , tous deux exprimés par les adipocytes (Lewis *et al.*, 1991). Mais il a été démontré que c'est l'activation du  $\text{TNFR1}$  qui induit les effets lipolytiques et ceux liés à la régulation de la sensibilité à l'insuline dans les adipocytes. En effet, la déficience en  $\text{TNFR1}$ , et non celle en  $\text{TNFR2}$ , améliore la sensibilité à l'insuline dans les adipocytes *in vitro* (Sethi *et al.*, 2000). Des études avec des cellules embryonnaires de souris  $\text{TNFR1}^{-/-}$  et de souris double-déficientes  $\text{TNFR1}^{-/-}\text{R2}^{-/-}$ , ont montré que le  $\text{TNF-}\alpha$  n'induit pas la lipolyse contrairement aux cellules embryonnaires de souris  $\text{TNFR2}^{-/-}$ .

Les effets du  $\text{TNF-}\alpha$  sur l'induction de la lipolyse ont été documentés sur des adipocytes de lignées cellulaires et sur des adipocytes isolés murins ou humains. Dans tous les cas, le  $\text{TNF-}\alpha$  a induit la lipolyse qu'après six heures de traitement ou plus. Un traitement de 24 heures des adipocytes 3T3-L1 avec 10 ng/ml de  $\text{TNF-}\alpha$  conduit à une augmentation de la lipolyse (Rahn *et al.*, 2000). Cette lipolyse est dépendante de l'activation de la PKA puisque l'inhibition de la PKA avec H89, un inhibiteur spécifique de la PKA, abolit complètement la lipolyse induite par le  $\text{TNF-}\alpha$ . Parallèlement, le traitement au  $\text{TNF-}\alpha$  a réduit de 50 % l'expression de la phosphodiesterase 3B (PDE3B) et de la protéine  $G_{\alpha i}$  chez les adipocytes isolés de souris (Gasic *et al.*, 1999). L'effet du  $\text{TNF-}\alpha$  sur l'expression de la protéine  $G_{\alpha i}$  n'a pas été observé chez les adipocytes humains traités pendant 48 heures par comparaison aux

adipocytes murins (Ryden *et al.*, 2004). Toutefois, l'induction de la lipolyse par le TNF- $\alpha$  dans ces adipocytes humaines est associée à une diminution de l'expression génique et protéique de PLIN1a (Ryden *et al.*, 2004). Outre l'inhibition de l'expression de la PDE3B et de la protéine G $\alpha_i$ , le TNF- $\alpha$  inhibe l'expression génique et protéique de PLIN1a par l'activation des cascades des MAP kinases dont ERK1/2 et JNK (*c-jun-NH<sub>2</sub>-terminal kinase*) chez les adipocytes humains et murins (Figure 13). À l'appui, l'inhibition de l'expression de la PLIN1a par le TNF- $\alpha$  est renversée par un traitement avec des inhibiteurs spécifiques de ERK1/2 et JNK (Ryden *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2003). Récemment, les travaux de Lien et de ses collaborateurs ont montré que le TNF- $\alpha$  induit la lipolyse des cellules 3T3-L1 différenciées en stimulant l'expression de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS, *inducible nitric oxide synthase*) et la synthèse de l'oxyde nitrique. L'augmentation des concentrations intracellulaires d'oxyde nitrique active la voie guanylyl cyclase menant à la phosphorylation de la LHS après seulement quatre heures de stimulation au TNF- $\alpha$  (Lien *et al.*, 2009). Une autre étude a montré qu'un traitement à court terme par le TNF- $\alpha$  réduit considérablement l'expression de la protéine G0S2, un inhibiteur endogène de l'ATGL (voir section 2.4.2), favorisant ainsi la liaison du co-activateur CGI-58 à l'ATGL (Yang *et al.*, 2011).

#### 2.5.6.1.5. *Le peptide natriurétique des oreillettes (ANP)*

L'ANP (*atrial natriuretic peptide*) est un membre de la famille des peptides natriurétiques (ANP, BNP, CNP et DNP) initialement isolé par de Bold et ses collaborateurs à partir des granules de sécrétion de l'oreillette au début des années 80 (de Bold *et al.*, 1981). Ce peptide cause une réponse diurétique et natriurétique lorsqu'il est injecté chez des rats (de Bold *et al.*, 1981). L'ANP se lie sur 2 types de récepteur, NPR-A et NPR-B qui forment chacun des dimères après la liaison du ligand. NPR-A et NPR-B sont des récepteurs dotés d'une activité guanylyl cyclase (Maack, 1992). De ce fait, la liaison de l'ANP entraîne une augmentation de la formation du

GMPc (guanosine monophosphate cyclique), qui induit des réponses cellulaires par l'activation de protéine kinases GMPc-dépendantes (PKGs) (Maack, 1992). NPR-C est dépourvu du domaine intracellulaire et est impliqué dans la clairance des peptides natriurétiques (Maack, 1992). Ces deux récepteurs sont exprimés dans les reins, les glandes corticosurrénales et les adipocytes (Okamura *et al.*, 1988).

Chez le rat, des études de liaison ont montré que l'ANP liait les membranes des adipocytes avec un  $K_D$  de 0,72 nM (Jeandel *et al.*, 1989; Okamura *et al.*, 1988) et en plus, des sites de liaisons ont été détectés dans des compartiments intracellulaires (Jeandel *et al.*, 1989). Bien que l'ANP soit capable d'induire une accumulation de GMPc dans les adipocytes de rats, la lipolyse n'y est toutefois pas induite (Jeandel *et al.*, 1989). En effet, il a été démontré que l'ANP n'induit la lipolyse que chez les primates et pas chez les autres espèces (Sengenès *et al.*, 2002).

Chez des adipocytes isolés du tissu adipeux sous-cutané abdominal de l'humain, l'ANP de même que le BNP induisent la lipolyse avec des  $CE_{50}$  (concentration efficace 50) de 9,8 et 8,3 nM, respectivement (Sengenès *et al.*, 2000). L'induction de la lipolyse par l'ANP est accompagnée d'une forte accumulation intracellulaire de GMPc et par l'activation de PKG sans toutefois conduire à l'activation de la PDE3B (Sengenès *et al.*, 2000; Moro *et al.*, 2004), ce qui suggère que cette voie n'est pas inhibée par l'insuline, comme c'est le cas pour les agonistes  $\beta$ -AR (voir section 2.5.6.2.1) L'induction de la lipolyse par l'ANP conduit à la phosphorylation de la LHS et de la PLIN1a (Sengenès *et al.*, 2003).

Il a été rapporté que l'exercice physique conduit à une augmentation de la lipolyse dans le tissu adipeux sous-cutané abdominal des hommes non obèses et que cette lipolyse est aussi bien induite par l'ANP que par les catécholamines (Moro *et al.*, 2006). Chez les sujets obèses, la lipolyse stimulée par l'exercice physique ne dépend

que de l'induction par l'ANP et non par les catécholamines, tel que montré par une administration du tertatolol, un antagoniste des  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -AR (Moro *et al.*, 2008).

### **2.5.6.2. Inhibiteurs de la lipolyse**

#### *2.5.6.2.1. L'insuline*

Lors d'un apport en nourriture, l'insuline sécrétée par le pancréas augmente en circulation et inhibe la lipolyse tant basale que celle stimulée par les catécholamines. Tout comme dans le cas des catécholamines, les mécanismes d'inhibition de la lipolyse par l'insuline sont bien documentés. L'insuline lie son récepteur (RI) qui est sous forme de dimère ayant plusieurs sites de phosphorylation dans le domaine cytoplasmique. Le RI est un membre de la famille des récepteurs tyrosine kinase composés d'un domaine extracellulaire de liaison, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine catalytique intracellulaire sous sa forme monomère (Figure 14). La liaison de l'insuline à son récepteur engendre donc une dimérisation de celui-ci qui conduit à une auto-phosphorylation du domaine intracellulaire et une phosphorylation des substrats du récepteur (IRS1 et 2). Une fois phosphorylés, les IRS serviront de protéines d'ancrage pour les protéines ayant un domaine d'homologie SH-2 telles que la kinase-3 phosphoinositide (PI3-K, *phosphatidylinositol 3-kinase*), par sa sous-unité p85. PI3-K induit la phosphorylation de Akt qui, à son tour, va activer la PDE3B (Figure 14) (Wijkander *et al.*, 1998). La PDE3B, qui est la forme la plus abondante dans les adipocytes murins (Degerman *et al.*, 1998), est responsable de l'hydrolyse de l'AMPc en 5'-AMP, ce qui conduit à l'inactivation de PKA (Zhang *et al.*, 2005a).



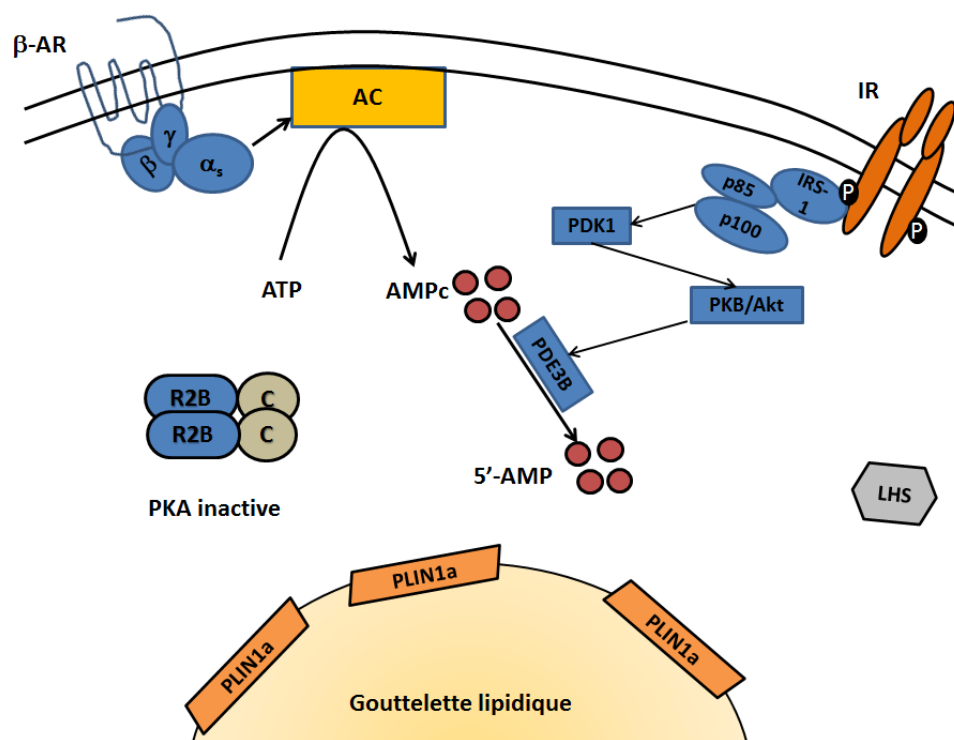


Figure 14: Inhibition de la lipolyse par l'insuline. Inspiré de (Wang *et al.*, 2008). AC : adénylate cyclase;  $\beta$ -AR : récepteur  $\beta$ -adrénergique; 5'-AMP : 5'-adénosine monophosphate; AMPc : adénosine monophosphate cyclique; ATP : adénosine triphosphate; C : sous-unité catalytique de la PKA; RI : récepteur de l'insuline; IRS-1 : substrat du récepteur de l'insuline; LHS : lipase hormono-sensible; P : phosphorylation; PDE3B : phosphodiesterase 3B; PDK-1 : *Phosphoinositide-dependent kinase-1*; PKA : protéine kinase A; PKB : protéine kinase B; PLIN1a : périlipine A; R2B : sous-unité régulatrice 2B de la PKA.

Les travaux de Lam au début des années 90 furent les premières études à montrer que l'inhibition de l'activité de la PI3-K par la wortmannine, un composé d'origine fongique, chez les adipocytes 3T3-L1 et les adipocytes primaires abolissait l'effet anti-lipolytique de l'insuline (Lam *et al.*, 1994). Il en est de même lorsque la lipolyse est stimulée par l'isoprotérénol, la réponse anti-lipolytique de l'insuline est

renversée par la wortmannine dans les adipocytes isolés du gras épipidymaire de rat (Moule *et al.*, 1997). L'inhibition de la PI3-K conduit à une réduction l'activité de l'Akt induite par l'insuline (Wijkander *et al.*, 1997; Moule *et al.*, 1997).

Les premières études montrant l'implication de la PDE3B dans les effets anti-lipolytiques de l'insuline remontent au début des années 90 (Degerman *et al.*, 1990). Il a été observé que l'insuline, dans des conditions basales ou stimulées par les catécholamines, activait de façon importante la PDE3B par phosphorylation et que cela s'accompagnait d'une diminution des taux intracellulaires d'AMPc dans les cellules 3T3-L1 différenciées et les adipocytes isolés de rat (Vasta *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1991; Manganiello *et al.*, 1991). Dans la recherche des mécanismes conduisant à l'activation de la PDE3B, Rahn et ses collaborateurs ont montré, en utilisant la wortmannine sur des adipocytes isolés de rat, que l'induction de l'activité de la PDE3B par l'insuline est dépendante de l'activation de la PI3-K (Rahn *et al.*, 1994). Eriksson et ses collaborateurs ont montré que les effets anti-lipolytiques de l'insuline sur la lipolyse induite par la noradrénaline dans des adipocytes isolés de rat étaient complètement bloqués par un inhibiteur sélectif de PDE3B, OPC3911 (Eriksson *et al.*, 1995). Par la suite, les travaux de Wijkander et ses collaborateurs ont montré que la PKB/Akt est la kinase responsable de l'activation de la PDE3B dans les adipocytes isolés de rat en montrant, par chromatographie sur colonne, que la PDE3B co-élue avec l'Akt (Wijkander *et al.*, 1998). Récemment, diverses études ont montré que la PDE3B est localisée dans le réticulum endoplasmique et au niveau de la couche intracellulaire de la membrane plasmique, notamment dans les cavéoles (Berger *et al.*, 2009; Ahmad *et al.*, 2009; Ahmad *et al.*, 2007; Nilsson *et al.*, 2006). Dans les adipocytes primaires de rats et les cellules 3T3-L1 différenciées, la PDE3B est co-localisée avec la Cav-1 et la perturbation des cavéoles par un traitement à la  $\beta$ -cyclodextrine, ou une répression de l'expression de la Cav-1 par ARNsi, induit une perte d'activité de la PDE3B (Ahmad *et al.*, 2009; Nilsson *et al.*, 2006). Ainsi, l'activation du récepteur à l'insuline conduit à la

formation d'un macro-complexe protéique qui contient PDE3B activée, IRS-1, Cav-1, la sous-unité p85 de PI3-K et Akt dans les compartiments internes (réticulum endoplasmique/Golgi) des cellules 3T3-L1 différenciées (Ahmad *et al.*, 2009; Ahmad *et al.*, 2007).

#### 2.5.6.2.2. *L'adénosine*

L'adénosine et les agonistes synthétiques du récepteur A<sub>1</sub> ont été rapportés pour exercer des effets anti-lipolytiques. Le récepteur A<sub>1</sub> est un récepteur couplé à la protéine G<sub>i</sub>, inhibitrice de l'activité de l'adénylate cyclase, conduisant à une diminution de l'activité de la PKA. Ce récepteur est très exprimé au niveau des adipocytes et son activité conduit à l'inhibition de la lipolyse (Figure 13) (Dhalla *et al.*, 2003). L'adénosine est aussi produite par les adipocytes et agirait de façon autocrine/paracrine (Dhalla *et al.*, 2003). Dans les des adipocytes murins et humains, le traitement par l'adénosine déaminase, une enzyme qui hydrolyse l'adénosine endogène, augmente la lipolyse (Johansson *et al.*, 2008; Heseltine *et al.*, 1995; Schwabe & Ebert, 1974). L'adénosine et les agonistes du récepteur A<sub>1</sub> semblent ne pas avoir d'effets sur la lipolyse basale, mais leurs effets anti-lipolytiques sont observés seulement lorsque la lipolyse est induite par les catécholamines (Schoelch *et al.*, 2004; Heseltine *et al.*, 1995). De plus, il a été rapporté que les effets anti-lipolytiques de l'adénosine sont additifs à ceux de l'insuline dans les adipocytes (Szkudelski *et al.*, 2009; Johansson *et al.*, 2008; Dhalla *et al.*, 2007).

#### 2.5.6.2.3. *Le neuropeptide Y et le peptide YY*

Le neuropeptide Y (NPY) est un neurotransmetteur présent dans le cerveau et les nerfs du système nerveux sympathique ayant des propriétés orexigènes (Kalra & Kalra, 2004a). Le peptide YY (PYY) par contre, est un peptide sécrété par les cellules entérochromaffines du pancréas, le petit intestin et le colon. Il est sécrété sous deux formes, PYY1-36 et PYY3-36, tous deux ayant des propriétés anorexigènes (Batterham

*et al.*, 2002). Le NPY et le PYY inhibent de façon importante la lipolyse induite après un traitement par l'adénosine déaminase des adipocytes isolés de l'humain et du chien (Castan *et al.*, 1992; Valet *et al.*, 1990). Le NPY inhibe la lipolyse aussi bien basale que celle induite par l'isoprotérénol dans des adipocytes murins (Yang *et al.*, 2008; Labelle *et al.*, 1997) et 3T3-L1 (Bradley *et al.*, 2005). Cet effet anti-lipolytique est aboli en traitant ces cellules avec la toxine pertussique, suggérant l'implication de la protéine G<sub>i</sub> (Valet *et al.*, 1990). Des études de PCR (*polymerase chain reaction*) ont montré les adipocytes sous-cutanés et viscéraux d'origine humaine, murine et canine expriment trois sous-types du récepteur de NPY, le Y1, Y4 et Y5 tandis que des études de liaison ont montré que le NPY lie préférentiellement le récepteur Y1 (Serradeil-Le *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2008) et le PYY le récepteur Y2 (Castan *et al.*, 1992; Batterham *et al.*, 2002). Dans les adipocytes 3T3-L1, seul le récepteur Y1 est exprimé (Gericke *et al.*, 2009). Toutefois, des données récentes contredisent les effets du NPY sur la lipolyse stimulée dans les adipocytes 3T3-L1. En effet, le NPY potentialise la lipolyse induite par l'ISO, mais il demeure inefficace sur la lipolyse basale (Li *et al.*, 2012). Cette potentialisation de la lipolyse induite par l'ISO se caractérise par un par un rehaussement de la phosphorylation de la LSH. Li et ses collaborateurs expliquent cette différence est due aux concentrations d'ISO utilisées. Avec des concentrations d'ISO inférieures 50 nM, le NPY potentialise la lipolyse tandis qu'à des concentrations supérieure à 50 nM, le NPY inhibe la lipolyse (Li *et al.*, 2012; Valet *et al.*, 1990; Bradley *et al.*, 2005).

#### 2.5.6.2.4. *La prostaglandine E2*

La prostaglandine E2 (PGE<sub>2</sub>) est le principal médiateur lipidique synthétisé et sécrété par le tissu adipeux blanc. La PGE<sub>2</sub> est synthétisée à partir de l'acide arachidonique par l'action enzymatique des cyclooxygénases (COX) -1 et -2, et de la PGE<sub>2</sub> synthase. L'action de la COX-2 sur l'acide arachidonique produit un

intermédiaire, la PGH<sub>2</sub> (prostaglandine H<sub>2</sub>), qui est commune pour la synthèse de des PG<sub>I<sub>2</sub></sub>, PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , PGD<sub>2</sub> et la PGE<sub>2</sub> (Funk, 2001). Dans les adipocytes primaires du tissu épидидymaire de souris, l'inhibition spécifique de la COX-2 conduit à une inhibition de la synthèse de la PGE<sub>2</sub> et à une augmentation de la lipolyse basale (Fain *et al.*, 2000a). L'inhibition de la lipolyse dans ces conditions-ci est caractérisée par une diminution de la protéine PLIN1a et une augmentation de la LHS dans les adipocytes 3T3-L1 (Wu *et al.*, 2012b). Les effets de la PGE<sub>2</sub> sur la lipolyse sont bien documentés. La PGE<sub>2</sub> est sécrétée par l'adipocyte et agit de façon autocrine/paracrine via son récepteur (EP). Des quatre sous-types du récepteur qui existent, le récepteur EP3, couplé à la protéine G <sub>$\alpha$ i</sub>, est le plus abondant dans les adipocytes murins (Jaworski *et al.*, 2009). La PGE<sub>2</sub> inhibe la lipolyse induite par les catécholamines dans les adipocytes épидидymaires de rats (Girouard & Savard, 1998; Richelsen & Pedersen, 1987), de souris (Fain *et al.*, 2000b) et dans les adipocytes isolés du tissu adipeux sous-cutané humain (Richelsen, 1988; Richelsen *et al.*, 1984).

Des études récentes ont mis en évidence le rôle de la phospholipase A<sub>2</sub> (AdPLA, *adipose-specific phospholipase A<sub>2</sub>*), une enzyme exclusivement exprimée dans les adipocytes qui catalyse la réaction de libération des AG en position *sn*-2 des phospholipides enrichis en acide arachidonique (Duncan *et al.*, 2008; Jaworski *et al.*, 2009). Les adipocytes isolés des dépôts gonadique et inguinal des souris AdPLA<sup>-/-</sup> ont une lipolyse basale et stimulée élevée (Jaworski *et al.*, 2009). La réduction de la PGE<sub>2</sub> due à la perte de la fonction AdPLA cause une diminution de la signalisation par le récepteur EP3 qui s'accompagne d'une accumulation d'AMPc intracellulaire et d'une activation de la PKA (Jaworski *et al.*, 2009). Ces souris sont résistantes à une obésité induite suite à une diète riche en lipides.

#### 2.5.6.2.5. *L'acide nicotinique et les récepteurs d'acides hydroxy-carboxyliques*

L'acide nicotinique (niacine) est une forme de vitamine B (B3) qui a été pendant des années utilisée pour le traitement de dyslipidémies. Les traitements par l'acide nicotinique diminuent les facteurs de risques athérogéniques en réduisant les VLDL-cholestérol, LDL-cholestérol, et les TG et augmentant le HDL-cholestérol. Le récepteur de l'acide nicotinique est un récepteur couplé à la protéine  $G_{\alpha i}$ . En 2003, trois groupes différents ont identifié le récepteur orphelin PUMA-G (*protein upregulated in macrophages by interferon-gamma*) de même que la variante humaine, le récepteur HM74 comme le récepteur de l'acide nicotinique (Tunaru *et al.*, 2003; Soga *et al.*, 2003; Wise *et al.*, 2003). Ce récepteur, maintenant connu sous le nom de récepteur GPR109, est très exprimé au niveau du tissu adipeux. Il existe deux sous-types de ce récepteur, le GPR109A (HCA2 ou HM74A) et GPR109B (HCA3 ou HM74B). Ces récepteurs font partis de la famille des récepteurs d'acides hydroxy-carboxyliques (HCA pour *hydroxy-carboxylic acid*) qui comprend le GPR81 (HCA1) (Blad *et al.*, 2011). Le GPR81 est activé par le lactate (2-hydroxy-propanoate), le récepteur GPR109A par l'acide nicotinique et les corps cétoniques tels que le  $\beta$ -hydroxy-butyrate ( $\beta$ -OHB) et le récepteur GPR109B par les intermédiaires de la  $\beta$ -oxydation, notamment l'acide 3-hydroxy-octanoïque (Blad *et al.*, 2011).

Dans les adipocytes de souris et les adipocytes 3T3-L1, l'acide nicotinique et le  $\beta$ -OHB inhibent la lipolyse en régulant l'activité de l'adénylate cyclase (Zhang *et al.*, 2005b; Taggart *et al.*, 2005). Une perfusion d'acide nicotinique chez des rats pendant une période de cinq heures conduit à une diminution des taux plasmatiques d'AGNEs tandis qu'une perfusion de 24 heures augmente les taux plasmatiques d'AGNEs (Oh *et al.*, 2011). Ceci est dû au fait que l'acide nicotinique inhibe l'expression de la PDE3B dans le tissu adipeux lorsqu'administré à long terme (Oh *et al.*, 2011). Dans les adipocytes de lignées humaine et murine ainsi que dans les adipocytes isolés de souris

et de rat, le lactate inhibe la lipolyse à des concentrations physiologiques (1 mM) en activant le GPR81, conduisant ainsi à une inhibition de l'activité de l'adénylate cyclase et à une réduction de la production d'AMPc (Liu *et al.*, 2009a; Ahmed *et al.*, 2010).

#### 2.5.6.2.6. *La ghréline, la désacyl-ghréline et les peptides gastro-intestinaux*

La ghréline, un peptide de 28 acides aminés octanoylé sur la sérine en position 3, est une hormone gastrique qui augmente en circulation après un jeûne ou une restriction prolongée de nourriture. En plus de ses propriétés sécrétagogues de l'hormone de croissance, la ghréline stimule l'appétit et module la balance énergétique au niveau du système nerveux central en activant les neurones orexigènes et la sécrétion de NPY dans l'hypothalamus. Les effets de la ghréline au niveau central sont médiés par l'activation du récepteur GHS-R1a (*growth hormone secretagogue receptor type 1a*). En circulation, la ghréline est présente majoritairement (90 %) sous une forme non octanoylée (désacyl-ghréline). Toutefois, l'estérification sur la sérine 3 est nécessaire pour l'activation du récepteur GHS-R1a. Même si la désacyl-ghréline ne lie pas le récepteur GHS-R1a, plusieurs effets biologiques de ce peptide ont été rapportés, dont la stimulation de l'accumulation de lipides (Rodriguez *et al.*, 2009) et de l'adipogenèse (Thompson *et al.*, 2004) ainsi que des effets cardioprotecteurs. Ceci suggère que la désacyl-ghréline agit via un récepteur qui n'est pas encore identifié.

La ghréline et la désacyl-ghréline inhibent la lipolyse induite par l'ISO dans les adipocytes isolés de rats (Muccioli *et al.*, 2004). Dans cette étude, Muccioli et ses collaborateurs ont rapporté qu'un traitement de 3 heures avec la ghréline ou la désacyl-ghréline inhibe la lipolyse induite par l'ISO de façon dose-dépendante. Ils n'ont pas détecté l'expression de GHS-R1a sur les adipocytes et ont suggéré que les effets anti-lipolytiques de la ghréline et de la désacyl-ghréline passent par l'activation d'un autre récepteur étant donné que les deux peptides compétitionnent pour le même site de liaison sur des membranes d'adipocytes de rats (Muccioli *et al.*, 2004). Cependant, Choi

et ses collaborateurs avaient aussi rapporté une inhibition de la lipolyse par la ghréline et avaient pu détecter l'expression du récepteur GHS-R1a sur les adipocytes de rats (Choi *et al.*, 2003). Les effets anti-lipolytiques de ces deux peptides passeraient par l'activation de la voie Akt/PDE3B, tel que démontré par les travaux de Baragli et ses collaborateurs (Baragli *et al.*, 2011). En effet, le traitement par les inhibiteurs de l'Akt et de la PDE3B, de même que l'utilisation d'un analogue non-hydrolysable de l'AMPc, inhibe les effets anti-lipolytiques de la ghréline et de la désacyl-ghréline dans des adipocytes de rat stimulés par l'ISO ou la forskoline (Baragli *et al.*, 2011).

À l'opposé, la ghréline ne semble pas avoir d'effets anti-lipolytiques chez les adipocytes humains (Kos *et al.*, 2009; Vestergaard *et al.*, 2008). Seule la désacyl-ghréline inhibe la lipolyse dans les adipocytes isolés des dépôts sous-cutanés abdominaux chez la femme (Kos *et al.*, 2009). Une perfusion de ghréline chez l'homme induit une lipolyse qui est indépendante de la sécrétion de l'HC (Vestergaard *et al.*, 2008).

D'autres hormones impliquées dans la mobilité gastro-intestinale ont montré des propriétés adipogéniques et dans le métabolisme lipidiques. Ainsi par exemple, la motiline, sécrétée par les cellules M de la muqueuse duodeno-jejunale inhibe la libération des AGNEs dans les adipocytes 3T3-L1 (Miegueu *et al.*, 2013a). L'amyline, libérée en même temps que l'insuline par les cellules béta des îlots pancréatiques, inhibe la lipolyse basale dans les adipocytes primaires et 3T3-L1 (Miegueu *et al.*, 2013b). La sécrétine, elle, est relâchée par les cellules S du duodenum en réponse à l'absorption intestinale des AGLC et des AG à chaîne moyenne. Elle inhibe aussi la lipolyse basale (Miegueu *et al.*, 2013a). Cependant, les mécanismes d'inhibition de ces peptides ne sont pas encore connus.

#### 2.5.6.2.7. *L'adiponectine*



L'adiponectine (AdipoQ) est une adipokine qui joue un rôle dans le métabolisme des lipides et des glucides, en améliorant la sensibilité à l'insuline au niveau des tissus musculaires et adipeux (Yamauchi *et al.*, 2002). En circulation sanguine, l'adiponectine est présente sous forme globulaire à haut poids moléculaire (Fruebis *et al.*, 2001). Les récepteurs, AdipoR1 et AdipoR2, sont présents dans presque tous les tissus. L'adipocyte n'est pas la seule source d'adiponectine car les cardiomyocytes en sécrètent aussi (Pineiro *et al.*, 2005). Les observations décrivant le rôle de l'adiponectine dans la lipolyse proviennent du fait que les taux plasmatiques d'AGNEs sont très élevés chez les souris AdipoQ<sup>-/-</sup> à jeun que chez les souris de type sauvage. En effet, la stimulation des  $\beta_3$ -AR par un agoniste spécifique tel que le BRL37344, a montré que les adipocytes de souris déficientes en AdipoQ sécrètent plus de glycérol et d'AGNEs que les adipocytes de souris de type sauvage (Qiao *et al.*, 2011). La surexpression d'adiponectine chez les souris de type sauvage et la ré-expression de l'adiponectine chez les souris déficientes ont montré que cette adipokine inhibe la lipolyse en atténuant la phosphorylation de la LHS au niveau de la Ser-660 et dans les adipocytes isolés. Cette atténuation de la phosphorylation serait le résultat de l'inhibition de l'expression de la PKA-cat tel qu'observé chez les souris surexprimant l'AdipoQ (Qiao *et al.*, 2011). Chez les adipocytes 3T3-L1, les effets anti-lipolytiques de l'adiponectine sont médiés par l'activation de l'AdipoR1 (Qiao *et al.*, 2011). Chez les adipocytes humains provenant des sujets non obèses, l'adiponectine inhibe aussi la lipolyse en activant l'AMPK (Wedellova *et al.*, 2011), ce qui n'est pas le cas chez les adipocytes d'origine murine (Qiao *et al.*, 2011). En résumé, la réponse anti-lipolytique de l'AdipoQ médiée par l'AdipoR1 dans les adipocytes réduit l'activité de la LHS conséquente à l'inactivation de la PKA-cat dans les adipocytes.

### **3. La régulation du métabolisme énergétique par le système nerveux central et le QRF**

#### **3.1. La régulation du métabolisme énergétique par le système nerveux central**

Le système nerveux central (SNC) joue un rôle important dans la régulation du métabolisme énergétique en général et dans la régulation de l'appétit et du métabolisme lipidique en particulier. Cette régulation se fait par des signaux hormonaux (ghréline, insuline, leptine, etc.), neuronaux, et nutritifs (glucose, AG) (Kalra & Kalra, 2004b; Kalra *et al.*, 1999). Certains signaux, qui sont principalement issus de la périphérie, informent le SNC sur l'état énergétique de l'organisme. Ceci influence généralement le comportement de l'individu (ajustement de la prise de nourriture) ainsi que le métabolisme lipidique périphérique. Une région du SNC, l'hypothalamus, est fortement impliquée dans la régulation de la prise de nourriture et du métabolisme lipidique (Kalra & Kalra, 2004b).

L'hypothalamus est constitué de grappes neuronales, appelées noyaux, formant des circuits interconnectés par des projections axonales. La sensibilité de ces noyaux aux hormones et aux nutriments conduit à des modulations de l'expression, de la sécrétion et de l'activité de certains neurotransmetteurs. Parmi les structures qui compose l'hypothalamus, le noyau paraventriculaire (PVN, *paraventricular nucleus*), le noyau dorsomédian (DMN, *dorsomedian nucleus*), l'aire latérale (LHA, *lateral hypothalamus*) et l'aire ventromédiane (VMH, *ventromedian hypothalamus*) sont impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique. La région VMH est constituée du noyau arqué (NA) et du noyau ventromédian (VMN, *ventromedian nucleus*) (Figure 15).

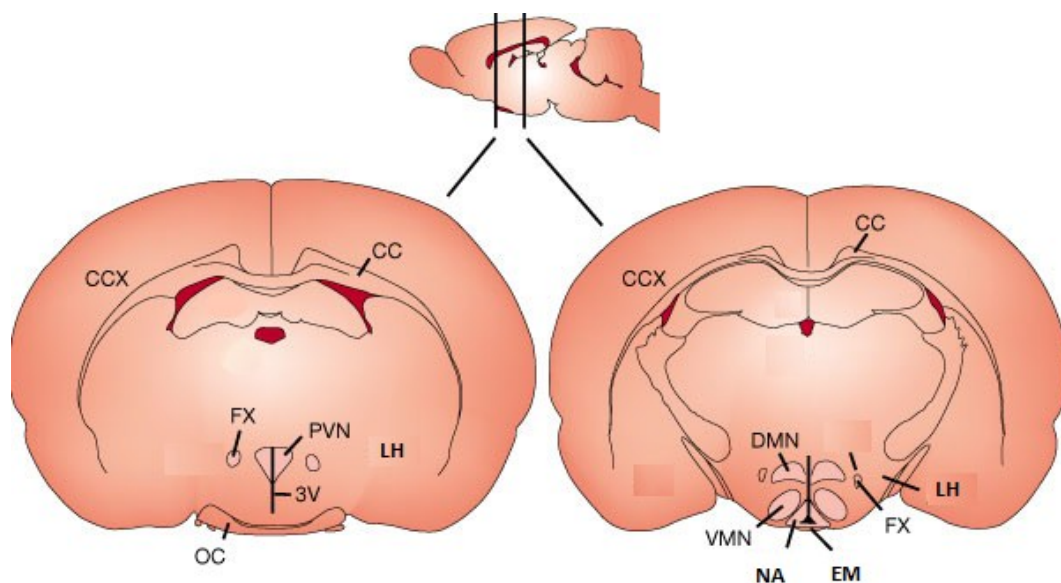


Figure 15: Schéma de cerveau de rongeur et des différentes parties de l'hypothalamus. Traduit et modifié de (Schwartz *et al.*, 2000). 3V (3ème ventricule), CC (corps calleux), CCX (cortex cérébral), DMN (*dorsomedian nucleus*), FX (fornix), EM (éminence médiane), NA (noyau arqué), OC (chiasma optique), PVN (noyau paraventriculaire), VMH (*ventromedian hypothalamus*), .

### 3.1.1. Régulation de l'appétit

Le NA est important dans la régulation de l'appétit en particulier par sa proximité du troisième ventricule. Il se trouve à l'interface du liquide céphalorachidien et de la circulation sanguine. Cette particularité fait en sorte que cette région est en contact avec les signaux (ghréline, leptine, etc.) qui influencent le comportement alimentaire (Cone *et al.*, 2001). Une autre particularité du NA est que l'on y retrouve une grande diversité de neurotransmetteurs dont le NPY, AgRP (*Agouti related peptide*), POMC et CART (*cocain- and amphetamine-related transcript*). De plus le NA est en contact, au travers les projections neuronales, avec les autres noyaux hypothalamiques.

Deux populations de neurones sont retrouvées dans le NA, les neurones qui co-expriment les peptides NPY et l'AgRP impliqués dans la stimulation de l'appétit, ainsi que les neurones qui co-expriment les peptides POMC et CART, ces derniers impliqués dans l'inhibition de l'appétit. Les signaux qui stimulent l'appétit et qui diminuent la dépense d'énergie (ghréline, QRFP, etc) ont donc tendance à activer la sécrétion de NPY et AgRP des neurones NPY/AgRP et/ou inhiber la voie POMC/CART. Inversement, les signaux qui inhibent la prise de nourriture (leptine), stimulent la sécrétion de POMC et CART des neurones POMC/CART qui s'accompagnent d'une augmentation de la dépense d'énergie (Lopez *et al.*, 2007; Morton *et al.*, 2006).

#### **3.1.1.1. Neurones NPY/AgRP, axe orexigène**

De nombreuses études ont montré l'implication des neurones NPY/AgRP du NA dans la régulation de l'appétit. En effet, des injections intra-cérébroventriculaires (i.c.v.) de NPY augmentent la prise de nourriture chez les rats et les souris (Billington *et al.*, 1991). Cette hyperphagie est accompagnée d'une diminution de la dépense d'énergie, favorisant ainsi l'anabolisme. Une administration continue de NPY conduit au développement de l'obésité chez les rats (Zarjevski *et al.*, 1993). De même, une augmentation de l'expression et de la sécrétion de NPY dans le NA a été observée chez le modèle génétique de souris obèse *ob/ob* (Schwartz *et al.*, 1996). Des récepteurs du NPY, c'est le récepteur Y5 qui semble médier les effets du NPY dans la régulation de l'appétit (Schaffhauser *et al.*, 1997). Bien que le NPY soit un neurotransmetteur du signal de l'appétit chez beaucoup d'espèces, il a été montré que la réduction de l'expression du NPY par ARN antisens chez les souris ne conduit pas à la réduction de l'appétit (Schaffhauser *et al.*, 1997). Ceci est dû au fait que l'AgRP compense la réduction du NPY. En effet, une injection i.c.v. d'AgRP chez des souris a montré que ce neuropeptide a des propriétés hyperphagiques conduisant au développement de l'obésité (Rossi *et al.*, 1998). Ces propriétés ont été confirmées chez les souris AgRP

transgéniques (Ollmann *et al.*, 1997). Du point de vue moléculaire, des expériences chez des rats ont montré que l'AgRP antagonise les effets de la  $\alpha$ -MSH sur les récepteurs MC3 et MC4 (Rossi *et al.*, 1998; Ollmann *et al.*, 1997).

Les neurones NPY ont des projections dans le PVN et la LHA (Fetissov *et al.*, 2004). Elles projettent aussi dans le NA où elles connectent avec les neurones POMC (Horvath *et al.*, 1997). Les neurones NPY secrètent aussi un autre neurotransmetteur, le GABA, qui inhibe la sécrétion de POMC (Horvath *et al.*, 1997).

### **3.1.1.2. Neurones POMC/CART, axe anorexigène**

La  $\alpha$ -MSH est la principale hormone sécrétée par les neurones POMC. Comme nous l'avons déjà dit dans la section 2.5.6.1.2, la  $\alpha$ -MSH est le produit du clivage protéique de POMC. Le principal sous-type de récepteur de la  $\alpha$ -MSH au niveau hypothalamique est le MC4 (Butler & Cone, 2002). La fonction des neurones POMC a été mise en évidence dans des expériences *in vivo* sur des souris ayant reçues des agonistes MC4R de manière i.c.v. Ces expériences ont montré une réduction de la prise de nourriture ainsi qu'une réduction des masses corporelle et adipeuse (Fan *et al.*, 1997). Plus tard, des expériences avec des souris déficientes en MC4R ont montré que celles-ci sont hyperphagiques et développent l'obésité (Butler & Cone, 2002). Ces observations confirment le rôle de la  $\alpha$ -MSH dans l'inhibition de l'appétit. Chez l'humain, il existe des mutations dans le gène *Mc4r* qui seraient responsables du développement de l'obésité (Farooqi & O'Rahilly, 2007).

### **3.1.2. Régulation hypothalamique du métabolisme lipidique**

De nombreuses études ont documenté le rôle crucial de l'hypothalamus dans la régulation du métabolisme lipidique. Ces études s'accordent sur le fait que l'AMPK hypothalamique joue un rôle important dans le mécanisme de régulation de l'appétit et

du métabolisme lipidique (Blanco Martinez de *et al.*, 2011). La fonction de l'AMPK au niveau cellulaire est d'agir comme senseur intracellulaire d'énergie qui est activé lorsque le ratio AMP:ATP augmente. En d'autres termes, l'augmentation de la concentration intracellulaire de l'AMP, qui est synonyme de consommation d'ATP, active l'AMPK. Cette activation a pour conséquence de réduire les voies de consommation d'ATP et de favoriser les voies de production, telles que la  $\beta$ -oxydation. Physiologiquement, une activation de l'AMPK au niveau de l'hypothalamus se traduit par une diminution de la dépense d'énergie et une augmentation de la prise de nourriture (Figure 16).

L'AMPK est un complexe hétérodimérique comprenant une sous-unité catalytique  $\alpha$  et deux sous-unités régulatrices  $\beta$  et  $\gamma$  (Figure 16). L'AMPK est activée par phosphorylation sur le résidu Thr-172 de sa sous-unité  $\alpha$  par plusieurs kinases dont LKB1 et CaMKK2 (*CaMK-kinase*) (Woods *et al.*, 2005; Sanders *et al.*, 2007). Au niveau périphérique, notamment au niveau du tissu musculaire et du tissu adipeux brun, l'activation de l'AMPK favoriserait la  $\beta$ -oxydation des lipides. En fait, l'AMPK inactive l'ACC par phosphorylation et empêche ainsi la formation du malonyl-CoA (Figure 16). Ce dernier est un inhibiteur endogène de la CPT-1 (carnitine palmitoyltransférase) qui a pour rôle de permettre le transfert des acyls-CoA dans la mitochondrie où ils serviront de substrats pour la  $\beta$ -oxydation.

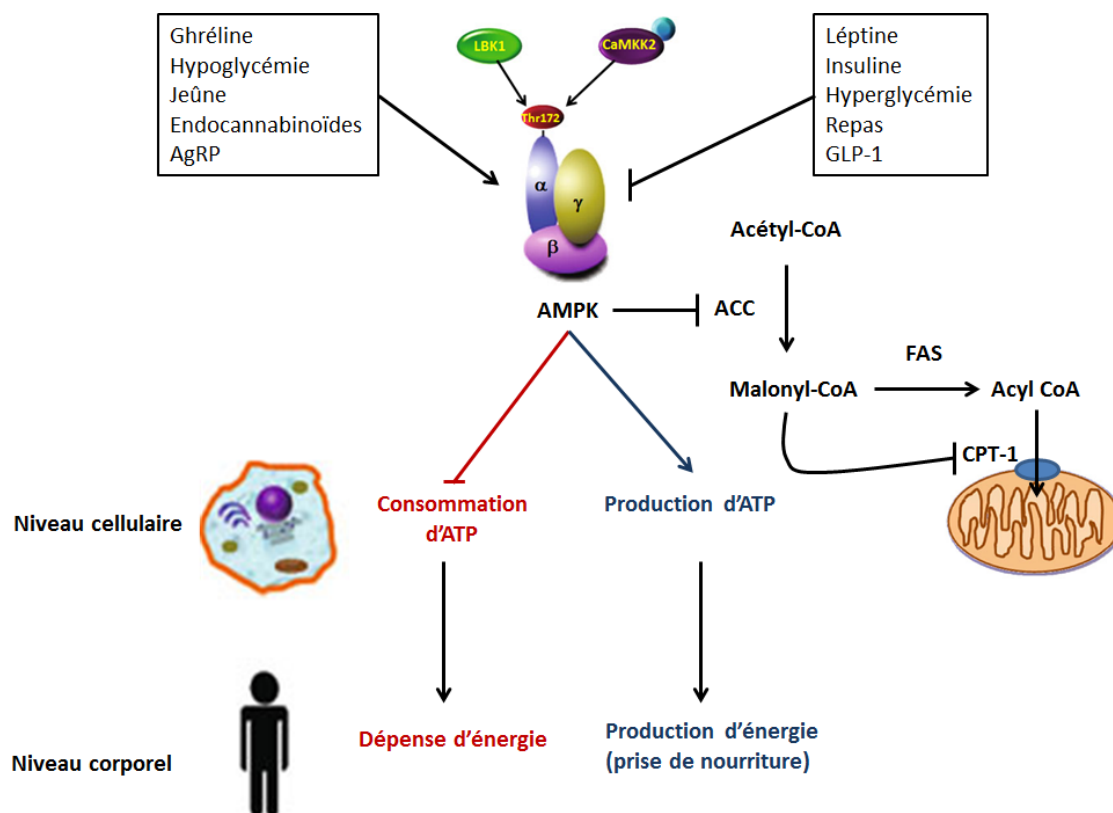


Figure 16: Mécanisme d'activation de l'AMPK dans l'hypothalamus. Traduit et modifié de (Blanco Martinez de *et al.*, 2011). ACC : acétyl-CoA carboxylase, AgRP : *agouti related peptide*, AMPK : *AMP-activated protein kinase*, ATP : adénosine triphosphate, CPT-1 : carnitine palmitoyltransférase-1, FAS : *fatty acid synthetase*, GLP-1 : *Glucagon-like peptide-1*.

Plusieurs études ont montré que le métabolisme lipidique ( $\beta$ -oxydation) est un mécanisme crucial dans la régulation de l'homéostasie énergétique, impliquant principalement les enzymes AMPK, ACC, FAS et CPT-1 (Lage *et al.*, 2008). La leptine, par exemple, diminue l'activité de l'AMPK dans le NA et le PVN. De même, l'expression d'un dominant négatif de la sous-unité  $\alpha$  de l'AMPK dans l'hypothalamus réduit la prise de nourriture et induit une perte de poids, tandis que l'expression d'une

forme constitutivement active induit des effets inverses (Minokoshi *et al.*, 2004). Ces résultats ont confirmé des données antérieures qui avaient montré que l'administration intrapéritonéale (i.p.) de la cérulénine ou du composé C75, des inhibiteurs de la FAS, induit une accumulation du malonyl-CoA dans l'hypothalamus de souris. Ce traitement conduit à une réduction de l'expression des neurotransmetteurs NPY/AgRP et à une augmentation de celle de POMC/CART menant à une diminution de la prise de nourriture (Loftus *et al.*, 2000). Le fait de bloquer l'activité de la FAS conduit à une augmentation des concentrations du malonyl-CoA, ce qui cause une inhibition de l'activité de la CPT-1 et une diminution de la prise de nourriture (Hu *et al.*, 2003). De même, une ablation par ARN antisens de la CPT-1 hypothalamique résulte en une diminution de la prise de nourriture (Wolfgang *et al.*, 2006; Obici *et al.*, 2003). La diminution de la prise de nourriture est aussi observée suite à l'activation de l'ACC ou à l'inhibition de l'AMPK dans les neurones NPY/AgRP. Ceci conduit à l'inhibition de l'expression et de la sécrétion de NPY (Dhillon *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2007).

### **3.1.3. La leptine et le métabolisme énergétique**

La leptine est un exemple de peptide provenant d'un tissu périphérique et qui régule l'appétit. La leptine est une adipokine sécrétée par les adipocytes qui a montré des propriétés anorexigènes lorsque injectée chez des rongeurs. Les effets de la leptine sont médiés par son récepteur (OB-R), qui est un membre de la famille des récepteurs des cytokines de classe 1 caractérisée par la cascade de signalisation impliquant JAK2 (*Janus kinase*) et STAT3 (*signal transducer and activator of transcription-3*) (Vaisse *et al.*, 1996). Le récepteur OB-R se subdivise en six sous-types de différentes longueurs et c'est la forme la plus longue du récepteur (OB-Rb) qui est exprimée dans l'hypothalamus. Dans le NA, la leptine inhibe directement les neurones NPY/AgRP et les neurones NPY/GABA tandis qu'elle stimule les neurones POMC/CART (Cowley *et al.*, 2001). Outre ses effets sur les neurones NPY/AgRP et POMC/CART, l'inhibition



de l'appétit par la leptine conduit à l'inactivation de l'AMPK dans le NA et le PVN. En effet, une injection dans la LHA ou une injection i.c.v. de leptine produit des effets anorexigènes traduits par une augmentation l'activité de l'ACC et par une diminution celle de l'AMPK hypothalamique chez les souris (Gao *et al.*, 2007; Minokoshi *et al.*, 2004). À l'opposé, une injection i.c.v. de leptine à des souris exprimant la forme active de l'AMPK dans l'hypothalamus, résulte en une perte des effets associés à la leptine (Figure 17) (Minokoshi *et al.*, 2004).

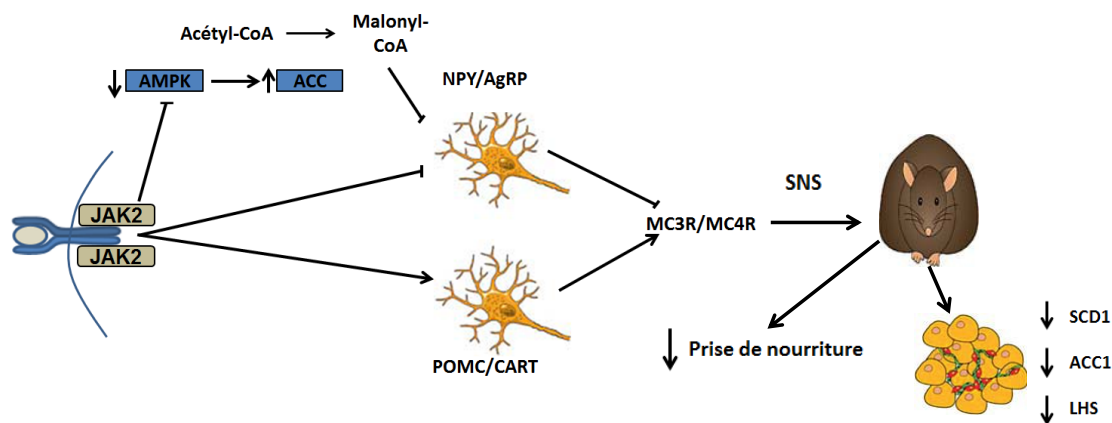


Figure 17: Représentation schématique de l'activation de du récepteur OB-Rb de la leptine au niveau hypothalamique. Traduit et modifié de (Dieguez *et al.*, 2011). ACC: acétyl-CoA carboxylase, AgRP: *agouti related peptide*; AMPK: *AMP-activated protein kinase*; ATP : adénosine triphosphate; CART : *cocaine- and amphetamine-related transcript*; CPT-1 : carnitine palmitoyltransférase-1; FAS: *fatty acid synthetase*; JAK : *Janus kinase*; NPY : neuropeptide Y; POMC: proopiomelanocortine; MCR : récepteur des mélanocortines; SNS : système nerveux sympathique

Au-delà de ses effets sur l'appétit, l'injection de la leptine au niveau central modifie aussi le métabolisme périphérique des lipides. Ainsi, une infusion i.c.v. de leptine dans l'hypothalamus chez les rats conduit à une inhibition de la lipogenèse dans

le tissu adipeux blanc caractérisée par une diminution de l'expression de la SCD-1, de l'ACC1 (voir section 2.1 et figure 5) et de la LHS dans ce tissu ainsi que de l'UCP-1 dans le tissu adipeux brun (Buettner *et al.*, 2008; Gallardo *et al.*, 2007; Tajima *et al.*, 2005). L'effet inhibiteur de la leptine sur la lipogenèse est complètement perdu lorsque les rats subissent une dénervation sympathique du tissu adipeux, suggérant l'implication du système nerveux sympathique pour relayer les effets centraux de la leptine (Buettner *et al.*, 2008).

## **3.2. Les peptides QRFP (pyroglutamylated RF-amide peptides)**

### **3.2.1. Identification et structure du QRFP**

Au cours des deux dernières décennies, des peptides ayant dans la partie C-terminale un motif distinct et conservé en acides aminés (Arg-Phe-NH<sub>2</sub>) ont été identifiés chez les invertébrés (Chartrel *et al.*, 2002), dont le *Caenorhabditis elegans* (Li *et al.*, 1999). Ces peptides ont été classifiés dans la famille des peptides RFamides (RFa). Chez les vertébrés et les mammifères en particulier, quelques peptides ont été clonés notamment les neuropeptides FF (NPFF) et AF (NPAF), le PrRP (*prolactin-releasing peptide*) (Hinuma *et al.*, 1998), les kisspeptines (Ohtaki *et al.*, 2001) et RFRP-1/GnIH (*gonadotropin-inhibitory hormone*) (Tsutsui *et al.*, 2000; Hinuma *et al.*, 2000). En 2003, trois groupes de recherche ont identifié chez l'humain, le rat et la souris un peptide de 26 acides aminés dont la séquence est homologue à celle identifié chez la grenouille (Chartrel *et al.*, 2003; Fukusumi *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2003b). Ce peptide fait partie de la famille des RFamides. Il a été nommé 26RFa (pour peptide RFamide de 26 acides aminés) ou QRFP-26 (pour *queue RF peptide 26*) ou P518 (pour peptide 518). Le domaine C-terminal des peptides QRFP présente une homologie avec la Met-

enképhaline-amide (YGGFMRFamide), un dérivé des enképhalines (Fukusumi *et al.*, 2003).

Afin d'identifier le QRFP-26, le groupe de Zhang (Egido *et al.*, 2007) a utilisé une approche informatique. Avec l'algorithme d'homologie peptidique (PepPat) (Jiang *et al.*, 2003a) ils ont cherché dans la base de données du génome humain les protéines ou exons contenant un motif Arg-Phe-Gly[Lys-Arg]. Dans ce motif, la séquence Gly[Lys-Arg] correspond au signal de digestion par les protéases de pro-hormones ainsi qu'à l'amidation après le résidu Gly (Figure 18). Les candidats retenus ne devaient contenir que la séquence de peptide signal qui permet à une protéine synthétisée d'être dirigée vers les compartiments intracellulaires. Cette méthode leur a permis d'identifier un pro-peptide de 126 acides aminés, le précurseur du QRFP-26/26RFa chez l'homme et chez la souris. Par la même approche, le groupe de Fujino (Fukusumi *et al.*, 2003) a identifié et cloné l'ADNc des précurseurs du 26RFa nommé prépro-QRFP chez l'humain, le rat, la souris et le bœuf. Le groupe de Vaudry (Chartrel *et al.*, 2003) a utilisé une approche différente pour identifier le QRFP-26/26RFa. Sachant que le cerveau de grenouille renferme une grande quantité de neuropeptides, ils en ont purifié les extraits protéiques par HPLC (chromatographie liquide à haute performance) en phase inverse. Les fractions recueillies ont ensuite été dosées par des essais immunoradiologiques. L'analyse par spectroscopie de masse des séquences immunoréactives a mis en évidence deux peptides qui ont servi à l'identification du prépro-QRFP chez l'humain et chez le rat. Récemment, des homologues du QRFP-26 ont été clonés du cerveau d'oiseaux, notamment de la caille (Ukena *et al.*, 2010), de la poule (Ukena *et al.*, 2010) du diamant mandarin (Tobari *et al.*, 2011) ainsi que du poisson rouge (Liu *et al.*, 2009b) (Tableau V).

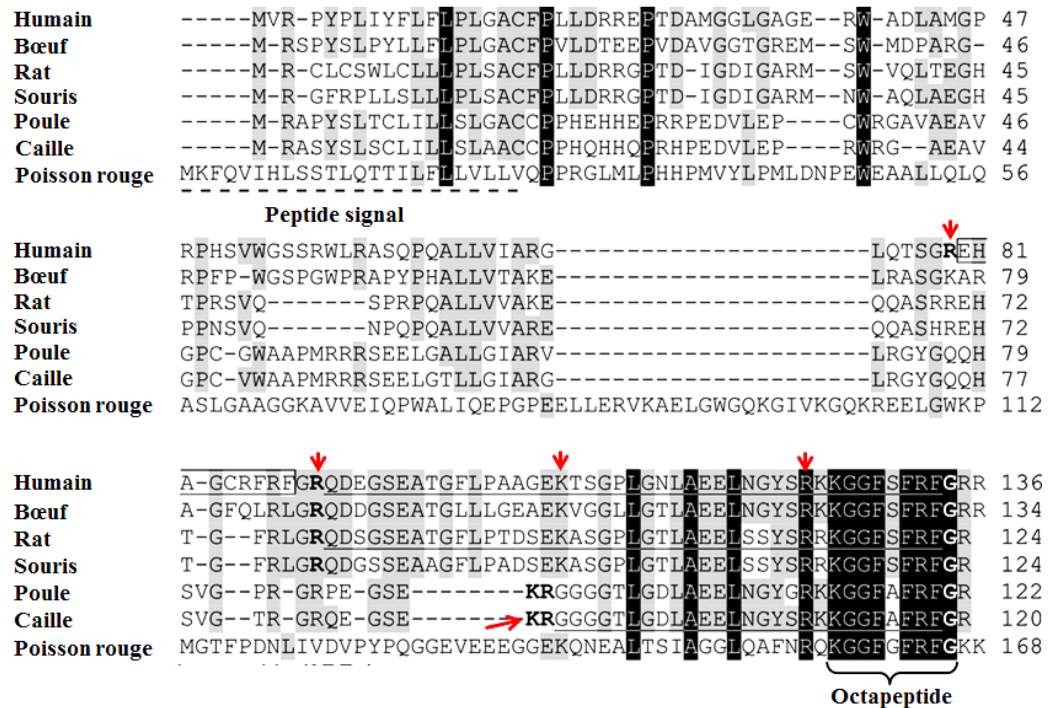


Figure 18: Alignement de séquence du prépro-QRFP de différentes espèces. Traduit de (Ukena *et al.*, 2011). Régions conservées (boîtes grises et noires), site de clivage dibasique Lys-Arg (KR) ou monobasique Arg (R) (flèches rouges). Séquence du QRFP-43/43RFa humaine et de rat (souligné).

Espèce	Longueur du prépro-QRFP	Séquences	% d'homologie avec l'humain
Humain	136	<i>TSGPLGNLAEELNGYSRKKGGFSFRF-NH<sub>2</sub></i>	100
Bœuf	134	<i>VGLLGLTAEELNGYSRKKGGFSFRF-NH<sub>2</sub></i>	85
Rat/Souris	124	<i>ASGPLGTLAEELSSYSRRKGGFSFRF-NH<sub>2</sub></i>	80
Grenouille	138	<i>VG TALGSLAEELNGYNRKKGGFSFRF-NH<sub>2</sub></i>	77
Caille	120	<i>GGGGTLGD LAEELNGYSRKKGGFAFRF-NH<sub>2</sub></i>	78
Poule	122	<i>GGGGTLGD LAEELNGYGRKKGGFAFRF-NH<sub>2</sub></i>	74
Diamant mandarin	152	<i>SGTLGNLAE EINGYNRRKGGFTFRF-NH<sub>2</sub></i>	73
Poisson rouge	168	<i>QNEALTSIAGGLQAFNRQKGGFGFRF-NH<sub>2</sub></i>	43

Tableau V. Séquences du QRFP-26/26RFa chez différentes espèces. Traduit et modifié de (Chartrel *et al.*, 2011)

Le prépro-QRFP chez les mammifères présente plusieurs sites monobasiques R (Arg) susceptibles d'engendrer, lors de sa protéolyse des formes différentes (Figure 18) (Seidah *et al.*, 1998). Ceci explique la présence d'un peptide de 43 acides aminés (QRFP-43/43RFa) dans les extraits hypothalamiques humains et de rats (Bruzzone *et al.*, 2006; Takayasu *et al.*, 2006). Dans des expériences *in vitro*, il a été démontré que le QRFP-43 est produit dans les cellules CHO transfectées avec l'ADNc du prépro-QRFP humain (Fukusumi *et al.*, 2003). À part cette forme, la séquence du QRFP-26 contient un site de protéolyse susceptible de générer un fragment QRFP-26<sub>(20-26)</sub>, tandis que le prépro-QRFP lui-même, contient des sites de protéolyse (Arg-79 et Arg-90) pouvant générer un fragment de 9 acides aminés (QRFP-9/9RFa) (Figure 18). Toutefois, de tels

fragments n'ont jamais pu être détectés *in vivo* et *in vitro*. Chez les oiseaux, le prépro-QRFP contient un site dibasique KR (Lys-Arg) qui constitue un site préférentiel pour les protéases de pro-hormones, engendre un peptide de 27 acides aminés identifié chez la caille (Ukena *et al.*, 2010; Tobari *et al.*, 2011). Par contre, chez les mammifères et les poissons, la séquence de QRFP-26 est précédée d'une Lys qui n'est pas un site pour les protéases. Les mécanismes menant à la formation de QRFP-26 demeurent inconnus.

Dans une solution de méthanol, le QRFP-26 adopte une conformation hélice- $\alpha$  (Pro4 à Arg17) flanquée de régions désorganisées en N- et C-terminal (Thuau *et al.*, 2005). Dans l'eau, l'hélice- $\alpha$  se forme entre les résidus 6 et 15. La région formant l'hélice- $\alpha$  est très conservée chez les amphibiens et les mammifères tandis que la région « octapeptide » en C-terminal est très conservée entre les espèces (Tableau V et Figure 18).

### **3.2.2. Localisation, distribution et expression**

Les études menées par différents groupes en utilisant les techniques d'hybridation *in situ* ou de RT-PCR (*reverse transcription*-PCR) ont montré que le prépro-QRFP est principalement exprimé au niveau central dans l'hypothalamus. Chez les mammifères, l'expression de l'ARNm a été observée dans le VMN, le PVN et la LHA (Takayasu *et al.*, 2006; Bruzzone *et al.*, 2006; Chartrel *et al.*, 2003; Fukusumi *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2003b). Chez les oiseaux, le transcrit du prépro-QRFP est localisé dans le noyau latéral antérieur de l'hypothalamus (Ukena *et al.*, 2010) tandis que chez les poissons, l'expression du prépro-QRFP est forte dans le thalamus et l'hypothalamus (Tobari *et al.*, 2011). Par les approches d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie, il a été possible d'identifier et de localiser les neurones -ainsi que leur projection dans le cerveau. Ainsi chez l'humain, les neurones qui expriment le prépro-QRFP se retrouvent principalement dans le PVN et le VMN de l'hypothalamus ainsi que dans la corne dorsale et latérale de la moelle épinière (Bruzzone *et al.*, 2006). Chez le rat, les

neurones prépro-QRFP ont été détectés dans le NA, la LHA, le VMN et le noyau rétro-chiasmatique (Kampe *et al.*, 2006; Fukusumi *et al.*, 2003; Chartrel *et al.*, 2003; Bruzzone *et al.*, 2007). Chez la souris par contre, les neurones prépro-QRFP sont détectés dans le VMN et la LHA (Takayasu *et al.*, 2006). Chez les oiseaux, les neurones prépro-QRFP sont détectés dans la LHA, le VMN et le noyau antérieur chez le diamant mandarin (Tobari *et al.*, 2011) tandis que chez la caille et la poule, le prépro-QRFP est exprimé dans le noyau antérieur seulement (Ukena *et al.*, 2010).

En plus de son expression abondante au niveau central, le prépro-QRFP est aussi exprimé chez les mammifères au niveau des tissus périphériques tels que les testicules, la prostate, les poumons, les reins, la glande thyroïde, le tissu adipeux blanc et la rate (Zhang *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2003b; Fukusumi *et al.*, 2003). Au niveau central, l'expression du prépro-QRFP semble être augmentée lors d'un jeûne de 48 heures et plus chez le poisson (Liu *et al.*, 2009b) et chez la souris (Takayasu *et al.*, 2006).

### 3.2.3. Le GPR103, récepteur des QRFP

Les peptides QRFP ont été identifiés comme des ligands endogènes du récepteur couplé aux protéines G jadis orphelin, le GPR103 (AQ27 ou SP9155) (Fukusumi *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2003b; Lee *et al.*, 2001). En 2003, Fukusumi et de ses collaborateurs ont identifié le GPR103 en cherchant un récepteur qui pouvait lier la Met-enképhaline-amide (Fukusumi *et al.*, 2003). Le GPR103 présente une homologie de 50 % avec le récepteur du neuropeptide FF (NPFF2 ou GPR74), le récepteur de l'orexine (OX2) et celui de la cholécystokinine (CCK) (Jiang *et al.*, 2003b; Fukusumi *et al.*, 2003).

Des essais de liaison compétitive sur des membranes de CHO transfectées avec le GPR103 humain ont montré que le QRFP-43 est plus puissant ( $CI_{50} = 0,52$  nM) que le QRFP-26 ( $CI_{50} = 3,2$  nM) (Fukusumi *et al.*, 2003). Les mêmes expériences ont montré que la région C-terminale (octapeptide) des QRFP est importante pour la liaison au récepteur. Donc, plus le peptide est allongé dans la région N-terminale, plus il est

puissant (Fukusumi *et al.*, 2003). De plus, lorsque la fonction amide est changée pour une fonction hydroxyle, le QRFP-26 perd son pouvoir de compétition ( $CI_{50} = 1200$  nM) (Fukusumi *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2003b).

L'ADNc du GPR103 a été isolé chez les mammifères (Adams *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2003b; Fukusumi *et al.*, 2003) et chez les oiseaux (Tobari *et al.*, 2011; Ukena *et al.*, 2010). Le GPR103 est un récepteur à sept passages transmembranaires (Figure 19) dont la longueur varie de 425 à 433 acides aminés selon les espèces. La structure du récepteur est très conservée entre les espèces. Des essais sur des cellules HEK et des CHO transfectées avec le GPR103 humain ont montré que les QRFP induisent une augmentation des concentrations intracellulaires de  $Ca^{2+}$  et une inhibition de l'AMPc, suggérant que le récepteur est couplé à la protéine  $G_{\alpha q}$  et/ou  $G_{\alpha i}$  (Takayasu *et al.*, 2006; Fukusumi *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2003b). Cependant, chez des cellules isolées de la région antérieure de l'hypophyse, le traitement au QRFP-26 induit une augmentation des concentrations intracellulaires de l'AMPc (Chartrel *et al.*, 2003). Les mécanismes conduisant à l'augmentation des taux d'AMPc dans ces cellules n'ont pas encore été déterminés.



<b>Humain</b>	<b>MQALNITPEQFSRLLRDHNLTREQFIALYRLRPLVYTPPELPGRAKLALVLTGVLIFALALFGNALVFYVV</b>	70
<b>Rat</b>	<b>MQALNITAEQFSRLLSAHNLTREQFIHRYGLRPLVYTPPELPPARAKVAEALAGALIFALALFGNSLVIYVV</b>	70
<b>Poule</b>	<b>MRSLNITPEQFAQLLRDNNVTREQFIALYGLQPLVYVPELPGRTKVAEVLICVLIFFALTFLGNCLVLYVV</b>	70
	<b>DTM 1</b>	
<b>Humain</b>	<b>TRSKAMRTVTNIFICSLALSDLLITFFCIIPVTMLQNISDNWLGGAFTICKMVPFVQSTAVVTEILTMTCIA</b>	140
<b>Rat</b>	<b>TRSKAMRTVTNIFICSLALSDLLIAFFCIIPVTMLQNISDKWLGGAFTICKMVPFVQSTAVVTEILTMTCIA</b>	140
<b>Poule</b>	<b>TRSRAMRTVTNIFICSLALSDLLIAFFCVPTMLQNISSEWLGGAFTICKMVPFVQSTAVVTEILTMTCIA</b>	140
	<b>DTM 2</b>	<b>DTM 3</b>
<b>Humain</b>	<b>VERHQGLVHPEFKMKWQYTNRRRAFTMLGVVWLVAVIVGSPMWHVQOLEIKYDFLYEKEHICCLEEWTSFVH</b>	210
<b>Rat</b>	<b>VERHQGLVHPEFKMKWQYTRRAFTILGVVWLAALIVGSPMWHVQRLLEIKYDFLYEKEHICCLEEWASPVH</b>	210
<b>Poule</b>	<b>VERHQGLVHPLKMKWQYTNKRAFTMLGIVWLLAIVGSPMWHVQRLLEIKYDFLYEKEVHICCLEEWASPTY</b>	210
	<b>DTM 4</b>	
<b>Humain</b>	<b>QKIYTFILVILFLLPLMVMLIILYSKIGYELWIKKRVGDSVLRITIHGKEMSKIARKKKRAVIMMVTVVA</b>	280
<b>Rat</b>	<b>QRIYSTFILVILFLLPLVVMVLVLYSKIGYELWIKKRVGDSALQTIHGKEMSKIARKKKRAVIMMVTVVA</b>	280
<b>Poule</b>	<b>QKIYTFILVILFLLPLIIMLFLYTKIGYELWIKKRVGDASVLRITIHGSEMSKISRKKKRAVIMMVTVVF</b>	280
	<b>DTM 5</b>	
<b>Humain</b>	<b>LFAVCWAPFHVVHMMIEYSNFEKEYDDVTIKMIFAVQIIGFNSNSICNPIVYAFMNENFKKNVLSAVCYC</b>	350
<b>Rat</b>	<b>LFAACWAPFHVVHMMVEYSNFEKEYDDVTIKMVEFAVAQTIIGFNSNSICNPIVYAFMNENFKKNVLSAVCYC</b>	350
<b>Poule</b>	<b>LFAVCWAPFHIHMMMEYSNFEKQYDDVTIKMIFAVQIIGFNSNSICNPIVYAFMNENFKKNVLSAIFCF</b>	350
	<b>DTM 6</b>	<b>DTM 7</b>
<b>Humain</b>	<b>IVNKTFSPAQRHGNSGITIMRKKAKESLRENPVEETKGEAFSDGNIEVKLCEQTEEKKKLKRHLALFRSE</b>	420
<b>Rat</b>	<b>IVKESSTPARKPGNSGISMMQKRAKLSRPQRPVEETKGDTFSDASIDVKLCEQPREKRQLKRQLAFFSSE</b>	420
<b>Poule</b>	<b>VVKENASPTRQLGNSGITIMRRQKAGDSQRAPTDSDEARREAFSDGNIEVKFCQPSSKRNLKRHLTLFSS</b>	420
<b>Humain</b>	<b>LAENSPLD SGH</b>	431
<b>Rat</b>	<b>LSENFSGSHEL</b>	433
<b>Poule</b>	<b>ELPAHSASAQ</b>	430

Figure 19: Comparaison des séquences du GPR103 humain, de rat (GPR103A) et de la poule. DTM, domaine transmembranaire (souligné), boîtes noires et grises, régions conservées entre les espèces. Traduit et modifié de (Ukena *et al.*, 2011).

Chez la souris et chez le rat, deux types de récepteurs ont été identifiés, à savoir le GPR103A et le GPR103B (Takayasu *et al.*, 2006; Kampe *et al.*, 2006). Le GPR103B de rat a une homologie de 78 % avec la GPR103A et de 82 % avec le GPR103 humain, tandis que l'homologie entre le GPR103A de rat et le GPR103 humain est de 84 % (Kampe *et al.*, 2006). Chez la souris, le GPR103A a une homologie de 79 et 75 % avec le GPR103 humain et le GPR103A de rat, respectivement, tandis que l'homologie entre les GPR103A et GPR103B est de 83 % (Takayasu *et al.*, 2006). Les études de compétition ont montré que le QRFP-43 inhibe de façon similaire la liaison du peptide

radioactif sur des membranes de COS-7 transfectées transitoirement avec le GPR103A ou le GPR103B de souris (CI<sub>50</sub> de 38 et 32 nM, respectivement) (Takayasu *et al.*, 2006). Le QRFP-43 est plus puissant pour l'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca<sup>2+</sup> dans les cellules HEK transfecetées avec le GPR103B que le GPR103A de souris (EC<sub>50</sub> de 61 et 93 nM, respectivement) (Takayasu *et al.*, 2006).

### 3.2.4. Propriétés physiologiques

#### 3.2.4.1. Régulation de la sécrétion des hormones hypophysaires et stéroïdiennes

En plus de stimuler l'appétit (voir la section 3.2.4.4), il a été rapporté que l'administration du QRFP module les hormones sexuelles et les hormones stéroïdiennes. L'administration i.c.v. des QRFPs augmente les taux plasmatiques de la LH (hormone lutéinisante) et de la FSH (hormone folliculo-stimulante) chez les rongeurs (Patel *et al.*, 2008; Navarro *et al.*, 2006). Cependant, deux études ont rapporté des effets contraires des QRFP sur la stimulation de la sécrétion de la LH et de la FSH au niveau hypophysaire. Dans l'étude de Patel et ses collaborateurs, l'augmentation des taux de ces hormones n'était pas due à un effet direct des QRFPs sur l'hypophyse. Dans cette étude, aucune modulation de la sécrétion la LH ni de la FSH de n'a été observée après quarante minutes de traitement par le QRFP-43 (2 nmol) sur des morceaux du lobe antérieur de l'hypophyse de rat mâle. Seule la sécrétion de la GnRH (gonadolibérine ou *gonadotrophin releasing hormone*) a été augmentée. La même observation a été faite chez des lignées cellulaires sécrétrices de GnRH (Patel *et al.*, 2008). Dans l'étude de Navarro et ses collaborateurs, les QRFP-26, -43 et QRFP<sub>(20-26)</sub> (1 nmol) ont augmenté directement la sécrétion de la LH et de la FSH de lobes antérieurs de l'hypophyse de rats après une heure et plus de traitement (Navarro *et al.*, 2006). De plus, les QRFPs potentialisent la sécrétion de la LH et la FSH induite par la GnRH sur des explants de lobes antérieurs de l'hypophyse. Contrairement à l'étude de Patel, l'administration i.c.v. de ces peptides n'augmente pas les taux plasmatiques de ces hormones (Navarro *et al.*,

2006). Ces différences peuvent être dues à la durée du traitement et aux concentrations utilisées. Ainsi, les effets directs sur la sécrétion des hormones LH et FSH dépendent de la durée du traitement, tandis que les taux plasmatiques dépendent de la dose utilisée (Navarro *et al.*, 2006). L'administration i.p. des QRFPs chez les rongeurs n'a eu aucun effet sur les concentrations plasmatiques de LH et FSH (Patel *et al.*, 2008; Navarro *et al.*, 2006). Chez le poisson par contre, l'administration i.p. du QRFP-26 augmente les taux plasmatiques de la LH (Liu *et al.*, 2009b).

Les QRFPs ont montré des propriétés sécrétrices de la prolactine (PRL) et de l'HC chez les primates. Lorsqu'administrés par voies i.v., les QRFP-43 et -26 augmentent les taux plasmatiques de la PRL chez les primates (Wahab *et al.*, 2012). Par contre, l'augmentation de la sécrétion de l'HC n'a été observée que chez primates traités avec le QRFP-26 (Qaiser *et al.*, 2012). Chez ceux traités avec le QRFP-43, une diminution de la sécrétion de l'HC a été observée. Cette différence n'est pas encore expliquée.

Chez le rat, la forte expression du GPR103 au niveau des glandes surrénales suggère un effet des QRFP sur la sécrétion des hormones stéroïdiennes (Fukusumi *et al.*, 2003). En effet, l'administration i.v. du QRFP-43 chez le rat augmente de façon dépendante de la dose les taux plasmatiques d'aldostérone, mais pas ceux de la testostérone et de la corticostérone (Patel *et al.*, 2008; Fukusumi *et al.*, 2003). De même, l'administration i.v. des QRFP-43 et -26 ne module pas les taux plasmatiques de la testostérone chez les primates, probablement dû au fait qu'il n'y a pas de changement de la sécrétion de la LH (Wahab *et al.*, 2012).

#### **3.2.4.2. Régulation de la douleur**

La présence du GPR103 et du QRFP-26 a été détectée dans la moelle épinière, notamment dans la corne dorsale de la moelle épinière et dans le noyau thalamique (Bruzzone *et al.*, 2007; Bruzzone *et al.*, 2006). Ces régions du cerveau contrôlent la

douleur. Le QRFP-26, lorsqu'administré par voies intrathécale et i.c.v., a un effet analgésique sur la douleur d'origine inflammatoire, mais n'a aucun effet sur la douleur d'origine thermique (Yamamoto *et al.*, 2009; Yamamoto *et al.*, 2008). De plus, le QRFP-26 atténue aussi l'allodynie mécanique (douleur causée par un stimulus qui normalement ne produit pas de douleur) causée par la ligature du nerf sciatique (Yamamoto *et al.*, 2011).

#### **3.2.4.3. Régulation de la pression artérielle**

Le fait que des transcrits du GPR103 ont été identifiés dans des régions du cerveau contrôlant la fonction cardiaque tel le noyau du tractus solitaire, suggère que les QRFPs moduleraient la fonction cardiaque (Navarro *et al.*, 2006). En effet, des injections i.c.v. de QRFP-43 à des souris conduisent à une augmentation de près de deux heures de la pression artérielle et du rythme cardiaque (Takayasu *et al.*, 2006). Chez des rats anesthésiés, l'administration i.v. du QRFP-26 ou des fragments QRFP<sub>(8-26)</sub> et QRFP<sub>(19-26)</sub> augmente le rythme cardiaque et la pression artérielle (Fang *et al.*, 2009). De plus, les fragments QRFP<sub>(8-26)</sub> et QRFP<sub>(19-26)</sub> induisent des augmentations dépendantes de la dose de la pression artérielle et du rythme cardiaque. Toutefois, l'effet sur la pression artérielle suivant l'administration du QRFP-26 est biphasique, c'est-à-dire que le peptide induit une hypotension suivie d'une hypertension. L'hypotension engendrée par le QRFP-26 n'est pas altérée par une vagotomie cervicale ou par les antagonistes  $\alpha$ - et  $\beta$ -AR, tandis que l'hypertension et l'augmentation du rythme cardiaque sont atténués.

#### **3.2.4.4. Régulation de l'appétit**

Les premières propriétés physiologiques décrites après la découverte des QRFPs étaient leur capacité à stimuler l'appétit. Ce qui est confirmé par le fait qu'une forte expression du prépro-QRFP a été rapportée dans les régions du cerveau contrôlant l'appétit, notamment le VMN et la LHA de l'hypothalamus. De plus, le GPR103 est

aussi exprimé dans ces régions en plus d'être exprimé dans d'autres régions du cerveau tel que le noyau du tractus solitaire (Bruzzone *et al.*, 2007). Les expériences menées *in vivo* ont en effet confirmé le rôle des peptides QRFP dans la régulation de l'appétit. Ainsi chez les oiseaux, tout comme chez les poissons, l'administration du QRFP-26 induit aussi une augmentation de la prise de nourriture (Tobari *et al.*, 2011; Ukena *et al.*, 2010), tandis chez les rongeurs, les effets d'une injection i.c.v. de QRFP varient suivant le type de diète et de souche de l'espèce. Par exemple, lorsque les souris de background CD1 albinos sont privées de la moitié de leur ration quotidienne de nourriture pendant 18 heures, l'injection i.c.v. du QRFP-26 provoque une augmentation de la prise de nourriture pendant les deux premières heures suivant l'injection (Chartrel *et al.*, 2003). Lorsque les mêmes souris ont accès à la moitié de leur ration quotidienne de nourriture 8 heures avant l'expérience, l'injection des peptides QRFP-26, QRFP-43 ou QRFP<sub>(20-26)</sub> induit une augmentation de la prise de nourriture pendant les 60 premières minutes suivant l'injection (do Rego *et al.*, 2006). Chez des souris C57BL/6J, les injections i.c.v. de QRFP-43 et -26 induisent aussi une augmentation de la prise de nourriture les deux premières heures suivant les injections (Takayasu *et al.*, 2006). Un traitement chronique par le QRFP-43 pendant treize jours exacerbe la prise de nourriture lorsque les souris C57BL/6J sont sous diète riche en lipides. Ces souris développent une hyperphagie et l'obésité, caractérisées par une augmentation des taux plasmatiques d'insuline, de leptine et de cholestérol total, ainsi que par des concentrations de TG hépatiques élevées et par une diminution de la thermogénèse (Moriya *et al.*, 2006). Ces observations suggèrent un rôle des QRFPs dans la régulation du métabolisme énergétique.

Chez les rats Sprague-Dawley qui ne sont pas à jeun, l'administration i.c.v. du QRFP-26 entraîne une augmentation de la prise de nourriture les deux heures suivant l'injection (Kampe *et al.*, 2006). De plus, les effets d'une administration du QRFP-26 sur la prise de nourriture ne sont observés que lorsque les injections sont faites pendant la période diurne. Chez les rats Wistar à jeun pendant 18 heures, l'administration du

QRFP-26 produit une augmentation de la prise de nourriture pendant presque six heures suivant l'injection i.c.v. (Lectez *et al.*, 2009). Chez les rats Long-Evans soumis à une diète riche en lipides, les QRFPs stimulent la prise de nourriture pendant quatre heures suivant l'injection i.c.v. des peptides, tandis qu'ils n'ont aucun effet orexigène lorsque les rats sont soumis à une diète normale (Primeaux, 2011; Primeaux *et al.*, 2008).

De manière générale, les effets orexigènes des QRFP sont dépendants de l'expression du NPY au niveau hypothalamique (Lectez *et al.*, 2009; Takayasu *et al.*, 2006). En effet, le traitement des explants hypothalamiques de rats avec du QRFP-26 inhibe la production de la POMC et la sécrétion de la  $\alpha$ -MSH induites par la leptine tandis qu'il stimule l'expression et la sécrétion du NPY (Lectez *et al.*, 2009). En présence des antagonistes des récepteurs Y1 et Y5, l'effet inhibiteur du QRFP-26 sur la production de la POMC et la sécrétion de la  $\alpha$ -MSH induites par la leptine est renversé. De plus, l'administration i.c.v. d'un antagoniste du récepteur Y1 de NPY réduit considérablement la prise de nourriture induite par le QRFP-43 chez la souris (Takayasu *et al.*, 2006).

Récemment, des expériences effectuées chez l'humain ont montré des modulations dans les taux plasmatiques de QRFP-26 durant le cycle circadien chez des femmes souffrant de troubles de l'appétit (Galusca *et al.*, 2012). Il a été constaté que chez les patientes souffrant d'anorexie nerveuse, les taux plasmatiques de QRFP-26 sont élevés comparés à ceux des sujets normaux. Les taux de QRFP-26 chez ces patientes sont particulièrement élevés avant un repas, puis ils baissent lentement entre les repas. Les patientes souffrant de boulimie ont les mêmes taux plasmatiques que les sujets normaux et ces taux ne changent pas entre les repas.

## **Chapitre II : OBJECTIFS DE RECHERCHE**

Comme nous l'avons mentionné dans notre introduction, les peptides QRFPs exercent des effets orexigènes lorsqu'administrés au niveau central. Outre ces effets orexigènes, un traitement par les QRFPs entraîne une hyperphagie tant chez les souris que chez le rat (Moriya *et al.*, 2006; Primeaux *et al.*, 2008). Cette hyperphagie est exacerbée lorsque ces animaux sont soumis à une diète riche en lipides. Chez les souris, une augmentation de la masse adipeuse a été observée lorsque le QRFP-43 est administré de façon chronique pendant deux semaines (Moriya *et al.*, 2006). Cette augmentation s'accompagne d'une augmentation des taux plasmatiques d'insuline, de leptine et de cholestérol total, ainsi que des concentrations hépatiques de triglycérides et d'une diminution de la thermogénèse (Moriya *et al.*, 2006). Curieusement, les taux plasmatiques d'AGNEs ne sont pas augmentés chez les souris, malgré le fait qu'elles soient sous diète riche en lipides. De plus, dans une situation d'obésité tant chez la souris que chez le rat, l'expression du prépro-QRFP est augmentée dans l'hypothalamus (Takayasu *et al.*, 2006; Primeaux *et al.*, 2008). Cette augmentation est aussi observée lorsque ces animaux sont mis à jeun (Primeaux *et al.*, 2008). Toutes ces observations suggèrent un rôle des QRFP dans la régulation du métabolisme lipidique au niveau du tissu adipeux.

La régulation du métabolisme des lipides implique une modulation de l'accumulation des triglycérides et également de leur mobilisation dans l'adipocyte. Le contrôle de ce processus implique le SNC dont certains neuropeptides, en plus d'agir au niveau de l'hypothalamus, agissent directement dans le tissu adipeux (Kalra & Kalra, 2004b; Kalra *et al.*, 1999). Ainsi, des neuropeptides tels que le NPY et la  $\alpha$ -MSH modulent directement le métabolisme des lipides au niveau du tissu adipeux. En effet comme mentionné dans l'introduction, le NPY inhibe la lipolyse aussi bien basale que celle stimulée par chez des adipocytes isolés humains (Serradeil-Le *et al.*, 2000; Valet *et al.*, 1990), murins (Yang *et al.*, 2008; Margareto *et al.*, 2000; Labelle *et al.*, 1997) et chez les adipocytes 3T3-L1 (Bradley *et al.*, 2005). En plus de ses effets anti-



lipolytiques, le NPY induit la prolifération et l'adipogenèse des pré-adipocytes des tissus adipeux abdominaux favorisant ainsi le développement de l'obésité (Yang *et al.*, 2008; Kuo *et al.*, 2007).

Compte tenu du rôle des QRFPs dans la régulation métabolique au niveau central, nous nous sommes intéressés aux effets potentiels que peuvent avoir les peptides QRFP sur le métabolisme des lipides au niveau périphérique ainsi qu'aux mécanismes d'action impliqués. Notre hypothèse générale est que les peptides QRFPs exercent des effets adipogéniques médiés par le récepteur GPR103 au niveau du tissu adipeux en stimulant l'accumulation des TG et en inhibant la mobilisation de ces TG. Les objectifs des travaux de cette thèse visent donc :

- 1) À documenter les effets adipogéniques des peptides QRFPs au niveau du tissu adipeux blanc, plus spécifiquement :
  - a) La modulation de l'accumulation et/ou la mobilisation des triglycérides,
  - b) La caractérisation du récepteur GPR103B, exprimé sur les adipocytes et médiant leurs effets,
  - c) La modulation des gènes impliqués dans le processus d'adipogenèse,
  - d) La distribution du prépro-QRFP et de son récepteur dans les différents dépôts adipeux,
- 2) À élucider les voies de signalisation impliquées dans l'inhibition de la lipolyse par les QRFPs impliquant la cascade de signalisation PI3-K/Akt/PDE3B et le rôle de la CAV-1.

## **Chapitre III : RÉSULTATS**

### 3.1. Mise en contexte du premier article

Notre laboratoire s'intéressait à caractériser le récepteur de la désacyl-ghréline ainsi qu'à ses propriétés adipogéniques. En effet, plusieurs propriétés adipogéniques de la désacyl-ghréline ont déjà été rapportées (voir section 2.4.1.2.6) alors que son récepteur n'a pas encore été caractérisé. Dans le but d'identifier le récepteur de la désacyl-ghréline, la stratégie adoptée a été l'approche par photomarquage covalent avec un dérivé photoactivable radioactif de la désacyl-ghréline. Le photomarquage des membranes d'adipocytes 3T3-L1 a permis d'identifier un complexe ligand-récepteur de 54 kDa qui, après protéolyse limitée et séparation des fragments par HPLC couplé à une spectroscopie de masse a permis d'identifier le GPR103 comme site de liaison. Cependant, les études de compétition ont montré que la désacyl-ghréline ne lie pas ce récepteur, car elle ne déplace pas la liaison du ligand endogène, le QRFP.

Le premier article vise à caractériser le récepteur GPR103 au niveau adipocytaire dans la régulation périphérique de l'adipogenèse et du métabolisme lipidique.

Ma contribution expérimentale dans les travaux réalisés est présentée dans les figures 1, 2, 3 et 4 de l'article. Cette contribution consiste en :

- La mise au point de la technique de PCR en temps réel pour l'expression de différents gènes (figures 1, 3 et 4)
- La mise au point de l'accumulation d'acides gras et expériences de lipolyse (figures 2 et 3)
- La détection du récepteur GPR103b dans les adipocytes (figures 1 et 3)
- La détermination des rôles des QRFP dans le développement de l'obésité chez les souris (figure 4)
- La détermination de l'effet du TNF- $\alpha$  sur l'expression de QRFP (figure supplémentaire)

En plus d'avoir réalisé les expériences ci-dessus, j'ai contribué à la rédaction et à la révision de l'article publié

### **3.2. Article 1: A new role for GPR103b in the peripheral regulation of adipogenesis**

Article publié dans la revue *Molecular Endocrinology* 24: 1615 – 1625. 2010

**Mukandila Mulumba<sup>1</sup>, Christian Jossart<sup>1</sup>, Riccarda Granata, Davide Gallo, Emanuel Escher, Ezio Ghigo, Marc J. Servant, Sylvie Marleau and Huy Ong\***

Faculty of Pharmacy (M.M., C.J., M.J.S., S.M., H.O.), Université de Montréal C.P. 6128, Succursale Centre-Ville, Québec, Canada, H3C 3J7; Laboratory of Molecular and Cellular Endocrinology (R.G., D.G., E.G.), Department of Internal Medicine, University of Turin, Corso Dogliotti 14, 10126 Turin, Italy; Department of Pharmacology (E.E.), Faculty of Medicine, Université de Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

<sup>1</sup> M. M. and C. J. contributed equally to this work and should be considered as joint first authors.

Short title:

GPR103b is involved in peripheral adipogenesis

Key words: GPR103, G-protein-coupled receptor, adipogenesis, QRFP, adipocyte, 3T3-L1

## **Abstract**

The activation of G protein-coupled receptor 103 (GPR103) by its endogenous peptidic ligands, QRFPs, is involved in the central regulation of feeding by increasing food intake, body weight, and fat mass after intracerebroventricular injection in mice. However, the role of GPR103 in regulating peripheral metabolic pathways has not yet been explored. The present study aimed to investigate the role of GPR103 in adipogenesis and lipid metabolism using 3T3-L1 adipocyte cells. Our results show that differentiated 3T3-L1 cells expressed the GPR103b subtype mRNA and protein, as well as QRFP mRNA. QRFP-43 and -26 induced an increase in triglyceride accumulation of 50 and 41%, respectively, and elicited a dose-dependent increase in fatty acid uptake, by up to ~ 60% at the highest concentration, in 3T3-L1 differentiated cells. QRFP-43 and -26 inhibited isoproterenol (ISO)-induced lipolysis in a dose-dependent manner, with  $IC_{50}$ s of  $2.3 \pm 1.2$  and  $1.1 \pm 1.0$  nM, respectively. The expression of genes involved in lipid uptake (FATP1, CD36, LPL, ACSL1, PPAR- $\gamma$  and C/EBP- $\alpha$ ), were increased by 2-3-fold following treatment with QRFP. The effects of QRFP on ISO-induced lipolysis and fatty acid uptake were abolished when GPR103b was silenced. In a mouse model of diet-induced obesity, the expression of GPR103b in epididymal fat pads was elevated by 16-fold whereas that of QRFP was reduced by 46% compared to lean mice. Furthermore, QRFP was bioactive in omental adipocytes from obese individuals, inhibiting ISO-induced lipolysis in these cells. Our results suggest that GPR103b and QRFP work in an autocrine/paracrine manner to regulate adipogenesis.

## **Introduction**

The deorphanized G protein-coupled receptor 103 (GPR103) (1;2) is known to be activated by its endogenous peptide agonists QRFPs (3;4), a 43 amino acid pyroglutamylated RFamide peptide and its constitutive C-terminal part QRFP-26 (also known as 26RFa). In rodents, the activation of GPR103 by intracerebroventricular administration of QRFP peptides results in orexigenic activity (3;5;6). In addition to an increase in fat mass and body weight, long-term central administration of QRFP leads to reduced thermogenesis (6). Besides stimulating food intake, an effect which appears to be exacerbated when the animals are fed a high-fat diet (6;7), GPR103 receptors and QRFP have been shown to be involved in regulating behavioral arousal, blood pressure (5), bone formation (8), gonadotropic axis (9), aldosterone secretion (4), insulin secretion (10) and analgesia (11). However, whether GPR103 and QRFP may also exert metabolic effect at the periphery has not been investigated.

The orexigenic response of QRFP mediated through GPR103 signaling involves central neuropeptide Y (NPY) pathways (5;12). The GPR103 receptor shares significant sequence identity with NPF2, neuropeptide Y-Y2 and galanin-R1 receptors (1). Two subtypes of GPR103 have been identified in rodents, mGPR103a and mGPR103b, while only one receptor has been identified in human, hGPR103 (5). Rodent subtypes feature differential expression: whereas mGPR103a is mainly distributed to the central nervous system, retina, thymus, liver, kidney and bladder, mGPR103b is expressed in multiple tissues, predominantly in nuclei of the hypothalamus regulating appetite (13). QRFP peptides are expressed in multiple tissues, predominantly in brain (14), but also in peripheral tissues including white adipose tissue (WAT) (13). Interestingly, other members of the RFamide peptides family, including the neuropeptides FF, AF and SF, were found to modulate adipose tissue differentiation (15), adipocyte metabolism (16) and to regulate food intake (17;18). In the present study, we investigated whether

GPR103b plays a regulatory role in adipogenesis following its activation by QRFP peptides.

To this aim, the expression of GPR103b and QRFP in 3T3-L1 adipocytes has been assayed by quantitative real-time PCR (qPCR) along with flow cytometry for GPR103b detection by immunofluorescence in differentiated 3T3-L1 adipocytes. Functional lipolysis assays and determination of triglyceride accumulation were performed, along with gene expression profiles of adipogenic transcription factors and fatty acid (FA) transporters. The involvement of GPR103b in these cellular responses has been confirmed by gene silencing using retrovirus infection. In vivo expression profiles of mGPR103b and QRFP were documented in mouse adipose tissues following a high fat feeding regimen. In addition, the physiological relevance of GPR103b in human adipose tissue metabolism has been investigated with isoproterenol (ISO)-induced lipolysis experiments in human omental adipocytes. Our findings support that GPR103b and QRFP might regulate adipogenesis through an autocrine/paracrine mechanism.

## **Results**

### **Expression profile of GPR103 receptors and QRFP in 3T3-L1 cells**

The mRNA expression of GPR103 receptor subtypes was investigated in 3T3-L1 pre-adipocytes and differentiated adipocytes by RT-PCR. We found that the mRNA levels of GPR103b, and not those of GPR103a, are induced in a time-dependent manner after initiation of 3T3-L1 cell differentiation (Fig. 1A and B). Increased mRNA levels correlated with increased GPR103b receptor expression as assessed by flow cytometry

(Fig. 1C). Low levels of QRFP mRNA were detected in 3T3-L1 pre-adipocytes (Fig. 1A), which increased by 5-fold ( $P < 0.05$ ) at day 4 after the induction of differentiation and appeared to plateau thereafter (Fig. 1D).

### **Effects of GPR103 activation by QRFP peptides on adipogenesis and lipolysis in differentiated 3T3-L1**

To assess the potential role of GPR103b on 3T3-L1 differentiation, cells were incubated in the presence of QRFP-43 or -26 (10 nM) during 4 days, from day 2 after the induction of differentiation. At the end of the incubation period, neutral lipids were stained with ORO and quantified by optical densitometry. Our results show that QRFP peptides increased intracellular triglyceride content, as shown by increased ORO staining (Fig. 2A) by 1.4- (QRFP-26) and 1.5- (QRFP-43) fold ( $P < 0.01$ ), whereas 167 nM insulin induced a 1.2-fold ( $P < 0.05$ ) elevation (Fig. 2B).

To assess whether the observed increase in triglyceride content in QRFP-treated adipocytes was associated with increased lipid uptake, we investigated the effect of the peptides on FA uptake. We first determined LPL activity, inasmuch as the latter is responsible for the generation of FA from circulating triglyceride-rich lipoproteins. Insulin (167 nM), used as a positive control (19), increased LPL activity by 3.2-fold ( $P < 0.01$ ) compared to vehicle on day 2 following the induction of differentiation of 3T3-L1 adipocytes (Fig. 2C). In comparison, incubation with 10 and 1000 nM QRFP-26 resulted in a significant 2- ( $P < 0.05$ ) and 2.4-fold ( $P < 0.01$ ) increase in LPL activity, respectively (Fig. 2C). FA uptake was investigated using a  $C_{12}$ -BODIPY FA. Incubation of differentiated adipocytes with insulin (167 nM) for 2 h resulted in a  $53 \pm 10\%$  ( $P < 0.01$ ) increase in FA uptake compared to vehicle (Fig. 2D), whereas QRFP-43 and -26 (10 nM) treatment resulted in a  $27 \pm 3$  and  $31 \pm 2\%$  ( $P < 0.05$ ) increase in FA uptake compared to vehicle, respectively. High concentrations (1000 nM) of QRFP-43 and -26



(Fig. 2D) further increased FA uptake by  $62 \pm 5$  and  $58 \pm 6\%$  ( $P < 0.01$ ), respectively, supporting a role for GPR103b in regulating FA uptake in 3T3-L1 adipocytes.

We next investigated the role of GPR103b on differentiated adipocyte functional response, using ISO-induced lipolysis. Neither QRFP-43 nor QRFP-26 had an effect on basal lipolysis (data not shown), however both peptides inhibited ISO-elicited lipolysis in a dose-dependent manner, with  $IC_{50}$ s of  $2.3 \pm 1.2$  and  $1.1 \pm 1.0$  nM, respectively (Fig. 2E). In contrast, QRFP-28n, which displays weak affinity for GPR103 (4), had not effect on ISO-induced lipolysis (Fig. 2E).

### **Effects of GPR103b silencing on QRFP-dependent responses in differentiated 3T3-L1 adipocytes**

To determine the involvement of GPR103b in mediating the effects of QRFP on adipocytes, we used retroviral-delivered shRNA to knockdown the expression of GPR103b in 3T3-L1 adipocytes. As shown in Figure 3A and B, an infection with a shRNA sequence specific for GPR103b (shGPR103b) decreased the expression of GPR103b by 67% ( $P < 0.05$ ), at the mRNA level, and by 46% ( $P < 0.05$ ) at the protein level, compared to an infection with the empty vector (pRS-Neo). Interestingly, an infection with a non-targeting shRNA (shcontrol) increased the mRNA of GPR103b without affecting its protein expression. The knockdown of GPR103b did not affect 3T3-L1 differentiation compared to empty vector and non-targeting shRNA infections as shown by ORO staining of differentiated cells (Fig. 3C). The decrease in GPR103b immunofluorescence following specific shRNA infection is shown by a left shift in the fluorescence histogram compare to empty vector and non-targeting shRNA infections (Fig. 3D). Specific GPR103b knockdown abolished the increase in FA uptake as shown in Fig. 3E. Neither control infections, with empty vector or non-targeting shRNA sequence, did modulate QRFP-43 and -26 abilities to increase FA uptake. The

GPR103b knockdown did not affect insulin-mediated FA uptake which was used as a positive control. These results suggest that triglyceride accumulation and FA uptake induced by QRFP-43 and -26 in differentiated adipocytes are mediated by the GPR103b receptor. Furthermore, specific GPR103b knockdown abolished the antilipolytic effects of QRFP-43 and -26 on ISO-induced lipolysis (Fig. 3F). In agreement, an infection with the empty vector or non-targeting shRNA did not affect the antilipolytic effect of QRFP peptides on ISO-induced lipolysis. In the latter case, both QRFP-43 and -26 inhibited ISO-induced lipolysis in a dose-dependent manner, supporting that the inhibitory effect of QRFP on beta-adrenergic agonist-stimulated lipolysis is GPR103b-dependent.

### **GPR103b activation increases adipogenic genes in 3T3-L1 adipocytes**

Using qPCR analysis, we tested the expression of adipogenic genes in differentiated 3T3-L1 adipocytes incubated for 2 d with 10 nM QRFP-26 or QRFP-43. The expression of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) and CCAAT/enhancer binding protein- $\alpha$  (C/EBP- $\alpha$ ), as transcription factors involved in adipocyte differentiation was quantified, as well as that of CD36 and fatty acid transport protein-1 (FATP1) as long-chain FA transporters, of LPL, involved in lipid uptake, and of acyl-CoA synthetase long-chain family member 1 (ACSL1), involved in intracellular triglyceride formation. Treatments with QRFP-43 and QRFP-26 increased the expression of PPAR- $\gamma$  by 2.2- and 1.7-fold ( $P < 0.05$ ), of C/EBP- $\alpha$  by 2.7- and 2.4-fold ( $P < 0.05$ ), of CD36 by 3.0- and 2.2-fold ( $P < 0.01$ ), of LPL by 2.9- ( $P < 0.05$ ) and 2.0-fold, of FATP1 by 2.6- ( $P < 0.01$ ) and 2.1-fold ( $P < 0.01$ ) and of ACSL1 by 3.7- ( $P < 0.01$ ) and 2.6-fold ( $P < 0.01$ ), respectively, over non-treated differentiated 3T3-L1 adipocytes (Fig. 4A). Treatment of empty vector and non-targeting shRNA infected 3T3-L1 cells has also shown a significant increase of the expression of PPAR- $\gamma$ , C/EBP- $\alpha$ , CD36, LPL, FATP1 and ACSL1. However, specific knockdown of GPR103b abolished the induction of these genes by QRFP (Fig. 4B). Rosiglitazone treatment (10

$\mu\text{M}$ ) was used as a positive control for the induction of these genes (Supplemental data Fig. 1)

### **Effect of diet-induced obesity on GPR103b and QRFP expression in adipose tissue depots**

To determine the relevance of GPR103b and QRFP pathway in vivo, we investigated their expression levels in different adipose tissue depots in a mouse model of diet-induced obesity (DIO). Using qPCR, we measured the mRNA levels of both GPR103b and QRFP in epididymal, perirenal and inguinal (subcutaneous) fat depots from mice fed a high fat diet or normal diet for 24 weeks. DIO increased by 16-fold the expression of GPR103b in epididymal fat depots compared to mice fed a normal diet, while no significant increase was found in perirenal and inguinal fat depots (Fig. 5A). In contrast, DIO decreased the expression of QRFP by  $46 \pm 0.2\%$  ( $P < 0.05$ ) in epididymal,  $58 \pm 0.3\%$  in perirenal and  $69 \pm 0.3\%$  ( $P < 0.05$ ) in inguinal fat depots (Fig. 5A). Fat depots are heterogeneous in their cell composition. To confirm that DIO was associated with changes in QRFP/GPR103b expression in adipocytes, epididymal adipocytes from mice fed normal chow or HFD for 18 weeks were isolated and mRNA levels were determined. DIO increased GPR103b expression by 5.2-fold ( $P < 0.01$ ) in isolated adipocytes, whereas QRFP expression was decreased by 60%, as observed for the epididymal fat (Fig. 5B).

### **QRFP-induced GPR103 activation inhibits ISO-induced lipolysis in human omental adipocytes**

Adipocytes obtained from human omental fat were found to express hGPR103 mRNA (Fig. 6A). The effect of QRFP-43 was then investigated on ISO-induced lipolysis in human omental adipocytes. ISO increased lipolysis by 3-fold over control, as assessed by glycerol release in the culture medium, after 2 h incubation (Fig. 6B). QRFP-43 dose-dependently counteracted the lipolytic effect of ISO, by significantly reducing glycerol release. Interestingly, at the highest concentration tested (100 nM), QRFP-43 antilipolytic effect, although being less potent, was similar to that exerted by 100 nM insulin, which was used as positive control. By contrast, whereas insulin showed antilipolytic action even in the absence of ISO, QRFP-43 alone had no effect. These results suggest that GPR103 counteracts lipolysis in human omental adipocytes by inhibiting ISO-induced glycerol release.

## **Discussion**

In the present study, G protein-coupled receptor 103b and its ligands, QRFP-43 and -26, have been identified as new peripheral regulators of adipogenesis. Indeed, the RFamide peptides QRFP-43 and -26, known for their role in the central regulation of appetite (3;6), are now shown to function as adipogenic factors in peripheral WAT. We also show that the GPR103b subtype, previously identified as a hypothalamic receptor with orexigenic activity (3), is expressed in WAT. Its physiological relevance is supported by specific changes in gene expression levels following long-term high fat feeding in mice and the differential expression pattern of the QRFP/GPR103b receptor pathway in different fat depots. Human omental fat also expresses the GPR103 receptor, and QRFP-43 relevantly inhibits ISO-induced lipolysis in human adipocytes.

The growing problem of obesity has forced investigators to focus on adipocytes as target. The quest for a cure for this condition has allowed the discovery and characterization of new GPCR peptidic ligands expressed and released by adipocytes that play a role in adipogenesis in an autocrine/paracrine manner. Among these, some are peptides also known for their central orexigenic effect, like NPY working through NPY1R (20) and NPY2R (21), and ghrelin working through GHS-R1a (22). These peptides increase adipogenesis to yield a global anabolic effect in agreement with their orexigenic attributes. Using an *in vitro* model, e.g. the 3T3-L1 cell line, a well-established reliable model of adipogenesis (23), we examined the mRNA expression levels of GPR103b and QRFP before and following the induction of adipocyte differentiation. Whereas differentiated 3T3-L1 adipocytes express exclusively the GPR103b receptor, but not the GPR103a receptor subtype, neither subtypes were present in preadipocytes. Yet, the expression of GPR103b and QRFP, as measured by qPCR, increased during adipocyte differentiation. These data correlated with the detection of GPR103b protein expression measured by flow cytometry immunofluorescence in differentiated 3T3-L1 adipocytes.

The activation of GPR103b by QRFP was found to increase intracellular triglyceride accumulation in 3T3-L1 cells which have been committed toward differentiation as shown by a ~1.5-fold increase in ORO-stained lipid droplets in QRFP-treated cells. In contrast, no effect of QRFP has been observed in non-differentiated 3T3-L1 cells, in accordance with the absence of GPR103b in naive preadipocytes (data not shown). Both QRFP-26 and -43 regulated triglyceride metabolism in mature 3T3-L1 adipocytes, as shown by a potent antilipolytic action on ISO-induced lipolysis. The QRFP-28n fragment, which features weak binding affinity for GPR103 (4), was unable to inhibit ISO-induced lipolysis, thereby supporting a specific role for GPR103 in mediating the effect of QRFP. Using a retroviral-delivered shRNA to knock down

GPR103b, we demonstrated that both QRFP-43 and -26 could not inhibit ISO-induced lipolysis neither stimulate FA uptake in GPR103b knockdown cells. Overall, these results suggest that GPR103b promote anabolism by increasing fat storage and by decreasing triglyceride hydrolysis in adipocytes. These observations suggest that QRFP may play a role in triglyceride metabolism similar to that of NPY and ghrelin. Indeed, both ghrelin (22;24) and NPY (25) have been reported to inhibit ISO-induced lipolysis in isolated fat cells. In addition, both NPY and ghrelin have been reported to increase adipogenesis (21;26) and food intake (27-29). In contrast, other RFamide peptides like NPFF, NPAF and NPSF were shown to inhibit, rather than increase, adipocyte differentiation, by upregulating the expression of Id3, a transcription factor that inhibits adipogenesis (15).

The role of LPL in catalyzing the hydrolysis of lipoproteins to generate free fatty acids that can be transported in adipocytes following an anabolic process is well established. LPL is regulated by hormones and nutrients in a tissue-specific manner (30-32). Among the hormones involved in the regulation of LPL activity, insulin was shown to regulate LPL activity in adipocytes by post-transcriptional and post-translational mechanisms (19;33;34). Insulin decreases the intracellular pool of LPL and increases the cell surface-associated LPL released by heparin (33). Heparin-releasable LPL activity was increased significantly following treatment of 3T3-L1 adipocytes with QRFP-26. This increase of LPL activity promoted by QRFP was less than that mediated by insulin with a 3.4-fold increase in heparin-releasable LPL activity, in agreement with previous studies (19). In parallel to this observation, LPL activity within 3T3-L1 cells decreased after insulin and QRFP-26 treatment (data not shown). However, LPL mRNA expression was upregulated by QRFP, suggesting a regulatory effect of QRFP on LPL expression and release. The LPL activity correlated with FA uptake and storage in adipocytes. Using RNA interference, Gonzalez and Orlando (35) demonstrated that a 50% loss of LPL activity led to a reduction of 80% in intracellular lipids. The relevancy

of increased LPL activity by QRFP is confirmed by an increase in the cellular uptake of fluorescent free FA (C<sub>12</sub>-BODIPY) in 3T3-L1 adipocytes, as measured by flow cytometry (Fig. 2D). This increased cellular uptake of lipids was associated with an increase in FA transport proteins, CD36 and FATP1, mRNA levels that have been involved in the process of FA uptake in adipocytes (36). QRFP also induced the increase of ACSL1 expression, an enzyme which converts intracellular free long-chain FA into fatty acyl-CoA esters (37-39). This increase of ACSL1 correlated with the effect of QRFP on the increased expression of key transcription factors, such as PPAR- $\gamma$  and C/EBP- $\alpha$  (Fig. 4), which control the expression of proteins involved in adipogenesis (40-42). In agreement, the upregulation of adipogenic genes by QRFP was inhibited when GPR103b was knocked down. Taken together, these data suggest that genes involved in the storage of lipids within adipocytes are upregulated in a GPR103b-dependent manner following a treatment with QRFP.

Our results show that the expression of GPR103b and QRFP are modulated in a state of obesity. In a mouse model of DIO, a model mimicking the most prevalent type of human obesity (43), the expression of GPR103b was strikingly increased in epididymal fat tissue compared to mice fed a normal diet, while no difference was observed in perirenal and inguinal fat tissues (Fig. 5A). The expression of GPR103b followed the same pattern in adipocytes isolated from epididymal fat tissue of DIO mice. This observation supports a role for GPR103b in metabolically active fat tissue such as abdominal fat, while its function appears to be less apparent in subcutaneous (inguinal) fat tissue, with a limited role in triglyceride metabolism (44). Using the same DIO mouse model, QRFP gene expression levels were found to be decreased in epididymal, perirenal and inguinal fat tissues as well as in isolated adipocytes from HFD fed mice. The downregulation of QRFP mRNA in a state of obesity suggests that the expression of this peptide may be decreased by proinflammatory cytokines like

TNF- $\alpha$ , as shown in differentiated 3T3-L1 cells (supplemental data Fig. 2), in a similar manner to that of adiponectin in a state of obesity (45;46).

The unique human form of GPR103 is expressed in omental fat tissue and appears to mediate an inhibitory effect on ISO-induced lipolysis as documented in human isolated adipocytes. This inhibition was similar to that seen with ISO-induced lipolysis in 3T3-L1 cells. Interestingly, in contrast to insulin, QRFP did not show any effect on basal lipolysis of human omental adipocytes.

The pathophysiological relevancy of GPR103b in obesity has not been determined so far. A mouse with a gene deletion for GPR103a has been generated (8), but their body weight was normal. This is in agreement with the fact that GPR103a is not expressed in murine adipocytes. It also suggests that the role of GPR103a in the hypothalamus could be less important than that of GPR103b in the regulation appetite. Along that line, a GPR103b-deficient or a QRFP-deficient mouse would be helpful to assess the relative role of QRFP peptides in obesity. Insights regarding the intracellular pathways activated by GPR103, including cAMP production (3), pertussis toxin-sensitive  $G_{\alpha i}$ -protein (10) and  $G_{\alpha q}$ -protein (calcium mobilisation) pathways (5) have been proposed in different cell types. Additional studies will be necessary to delineate the signaling pathways mediating the acute antilipolytic effect associated with GPR103b activation in adipocytes.

In this work, we reported a novel role for GPR103b as a peripheral modulator of adipogenesis that could function with QRFPs in an autocrine/paracrine manner. Nevertheless, more exhaustive *in vivo* studies are needed to confirm GPR103b and QRFP as potential targets for the treatment of obesity.



## **Materials and Methods**

### **Animals**

All experimental protocols were approved by the Institutional Animal Ethics Committee of the Université de Montréal, in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines for use of experimental animals and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (A5213-01). Wild type C57BL/6 mice were weaned at 4 weeks old and put on either normal chow (D12450B, 10% calories from fat) or a high fat diet (HFD, 60% kcal from fat, D12492), from Research Diets Inc. (New Brunswick, NJ) for 18 or 24 weeks as a model of diet-induced obesity. At 22 or 28 weeks old, mice were sacrificed by CO<sub>2</sub> asphyxiation and adipose tissues from perirenal, inguinal and epididymal depots were collected and kept at -80 C until RNA extraction.

### **Materials**

QRFP peptides were obtained from a custom synthesis at the W.M. Keck Biotechnology Resource Center (New Haven, CT). Insulin, dexamethasone, adenosine, ISO, FA-free BSA (A7030), Oil Red O (ORO) and 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) were from Sigma-Aldrich Canada Ltd (Oakville, Ontario, Canada). Cell culture media, fetal bovine serum (FBS), TRIzol and PCR reagents were from Invitrogen (Burlington, Ontario, Canada). Rabbit IgG isotype control was from US Biological (Swampscott, MS). R-phycoerythrin goat anti-rabbit IgG and C<sub>12</sub>-BODIPY 3823 were from Molecular Probes Inc. (Eugene, OR). Rosiglitazone was from Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI).

### **Cell Culture**

Murine 3T3-L1 preadipocytes (CL-173) were obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA). At confluence (designated as day 0), differentiation

was induced by culturing cells with DMEM supplemented with 10% FBS, 167 nM (1  $\mu$ g/mL) insulin, 1  $\mu$ M dexamethasone and 0.5 mM IBMX for 3 days (day 3). Differentiated cells were then cultured in DMEM with 10% FBS containing 167 nM insulin for 2 days (day 5). Cells were then maintained in DMEM with 10% FBS for an additional 2 days (day 7).

### **mRNA expression of GPR103b during 3T3-L1 differentiation**

Total RNA was extracted with Trizol LS reagent and treated with DNase I Amplification Grade according to manufacturer's instructions. cDNA was synthesized from DNase-treated total RNA with random primers and M-MLV reverse transcriptase. For RT-PCR, primers for GPR103a, sense: 5'-TCT TTG GCA ACT CTC TGG TCA TC-3', antisense: 5'-CTT CGG GTA GTG TAC TGC CAC T-3'; GPR103b, sense: 5'-CGA TAT CAA GTG GTG TGA ACA GCC-3', antisense: 5'-GGG TCT CTT GTA GCC CAG GT-3'); QRFP, sense: 5'-TCT GCC GTC CTT ACC ATC TCA-3', antisense: 5'-TCT CAG GAC TGT CCC AAA GGA G-3' and RNA 18S, sense 5'-GGA CCA GAG CGA AAG CAT TTG CC-3', antisense TCA ATC TCG GGT GGC TGA ACG C-3') were used to assess mRNA expression levels at different stages during 3T3-L1 adipocytes differentiation, using Taq DNA polymerase. PCR products were separated on 1.5% agarose gel. qPCR of GPR103b and  $\beta$ -actin (sense: 5'-ATTACTGCTCTGGCTCCTA-3', antisense: 5'-TCTGCTGGAAGGTGGACA-3') were performed using a Platinum SYBR Green Supermix-UDG with Rox. Gene expression levels were quantified by SYBR Green real-time PCR using Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Mortlake, New South Wales, Australia). GPR103b mRNA levels were normalized to  $\beta$ -actin mRNA and relative gene expression was calculated using the comparative Ct ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) method. Data are presented relative to the expression found in hypothalamus. A detailed description of primer sequences are found in supplemental data Table 1.

### **Detection of GPR103b by flow cytometry immunofluorescence in 3T3-L1 adipocytes**

GPR103b was detected by a polyclonal rabbit anti-mouse GPR103b antibody generated in our laboratory by using the peptide GPR103b (Glu<sup>400</sup> to Cys<sup>414</sup>) coupled to keyhole limpet hemocyanin as immunogen. The specific anti-GPR103b immunoglobulins were purified by affinity on 6% cross-linked agarose coupled to the GPR103b (Glu<sup>400</sup> to Cys<sup>414</sup>) peptide. Trypsinized 3T3-L1 adipocytes were fixed with 2% formaldehyde in PBS and permeabilized with 0.5% Tween 20 in 0.02% BSA-PBS. Cells were first stained with rabbit anti-mouse GPR103b IgG (or pre-immune purified IgG and rabbit IgG isotype used as controls) (20 µg/ml in permeabilization buffer) and then with R-phycoerythrin goat anti-rabbit IgG (4 µg/ml in permeabilization buffer). Fluorescence intensity was measured by flow cytometry with a FACSCalibur Becton Dickinson flow cytometer (BD; San Jose, CA) and the results were analyzed using CellQuest software (BD).

### **ORO staining**

At day 2 of differentiation, 3T3-L1 cells were cultured in DMEM with 10% FBS and incubated with 167 nM insulin and 10 nM QRFP-43 or QRFP-26 for 4 days. Cells were fixed for 1 h with 10% buffered formalin and stained with a solution of 0.6% (w/v) ORO in 60% isopropanol for 1 h. Cells were then washed 3 times, alternating between 60% isopropanol and water, and then photographed using Axio Imager microscope (Carl Zeiss Inc., Thornwood, NY). ORO stain was then eluted with isopropanol and quantified by measuring the optical density at 510 nm. The results are expressed as fold increase over control.

**Fatty acid uptake (BODIPY 3823)**

4,4-difluoro-5-methyl-4-bora-3a-diaza-3-indacene-3-dodecanoic acid (C<sub>12</sub>-BODIPY 3823)-labeled FA was used for measuring long-chain FA uptake in differentiated 3T3-L1 adipocytes. Cells were starved for 1 h and then incubated with QRFP peptides (0.1, 10 and 1000 nM). After 2 h of treatment, cells were washed with PBS, and incubated with PBS containing 20 μM FA-free BSA (Sigma A8806) and 10 μM C<sub>12</sub>-BODIPY-labeled FA for 2 min at 37°C. Cells were then washed extensively with PBS containing 0.1% BSA. Cells were suspended in cold DMEM buffered with 25 mM HEPES to pH 7.5 for cytometric analysis. BODIPY fluorescence intensity was measured by flow cytometry with a FACSCalibur flow cytometer and the results were analyzed using CellQuest software.

**Lipoprotein lipase (LPL) enzyme activity assay**

Two days after the induction of differentiation, 3T3-L1 cells were incubated in DMEM supplemented with 5% of heat inactivated (55°C for 30 min) FBS for 24 h. Cells were then incubated, or not, with 167 nM insulin and QRFP-26 (10 and 1000 nM) for 2 days. Heparin (10 UI/ml) was added to the incubation media, which was collected after 30 min. The heparin-releasable LPL activity was measured with the LPL activity kit (Roar Biomedical Inc., New York, NY) using a non-fluorescent substrate emulsion that becomes intensely fluorescent upon interaction with LPL, according to the manufacturer's instructions. Results are expressed as fold increase of relative enzyme activity normalized to DNA content.

**Lipolysis experiments**

3T3-L1 adipocytes were incubated at 37 C for 1 h with serum free DMEM containing 200 nM adenosine as described by Viswanadha and Londos (47). The inhibitory effect of QRFP (preincubated for 30 min) on ISO-induced lipolysis in 3T3-

L1 adipocytes was assessed in DMEM supplemented with 2% FA-free BSA containing adenosine deaminase (1 U/ml). After 30 min stimulation with ISO, the incubation medium was collected for free glycerol measurement using the free glycerol reagent (Sigma F6428) and total protein by the BCA protein assay (Pierce, Rockford, IL, USA). The amount of glycerol released was calculated as  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  protein and expressed as a percentage of ISO-induced lipolysis. The lipolysis index was calculated as follow: (sample free glycerol concentration – basal concentration)/ (ISO-elicited free glycerol concentration – basal concentration).

### **Knockdown of GPR103b in 3T3-L1 adipocytes**

Specific short hairpin RNA (shRNA) constructs against mouse GPR103b were custom made by Origene Technologies (Rockville, MD). HuSH 29-mer for GPR103b were provided in the pRS plasmid driven by U6-RNA promoter. Selection of a single shRNA sequence for the production of retrovirus was based on the ability of the sequence to silence the expression of GPR103b mRNA in HEK293T cells transiently cotransfected with pFLAG-CMV2-mGPR103b generated in house. The targeted sequence selected for retrovirus production was 5'-CATTGTCCAGTGCCTGCCATTGTGACA-3'. Retroviruses (Moloney Murine Leukemia Virus) were produced by transfecting HEK293T Phoenix Amphi cells (Orbigen, San Diego, CA) with the pRS-shRNA plasmids using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Medium containing infectious retroviruses was harvested 36 h after transfection, centrifuged to remove cell debris and filtered on a 0.45  $\mu\text{m}$  filter. The infection of 3T3-L1 preadipocytes with shGPR103b retroviruses has been carried out by adding retrovirus to the culture cells in the presence of 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Polybrene for 2 **days**. Control cells were infected with an empty vector retrovirus (pRS-Neo) and a non-targeting shRNA retrovirus (shcontrol). Infected cells were selected for their stable

integration of the shRNA with 5 µg/mL puromycin. Infected 3T3-L1 cells were then differentiated in adipocytes as described above.

### **Isolation of primary adipose cells from mouse fat pads**

For primary adipocytes isolation, epididymal, perirenal and inguinal fat pads were minced and digested in Krebs-Ringer-Bicarbonate-Hepes buffer (20 mM Hepes pH 7.4, 120 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 24 mM NaHCO<sub>3</sub>) saturated with CO<sub>2</sub> and containing 6 mM glucose, 1% BSA and type 2 collagenase (2 mg/g tissue) (Sigma C6885). The cell suspension was filtered through a nylon mesh and isolated adipocytes were washed 3 times with warm Krebs-Ringer-Bicarbonate-Hepes buffer containing 1% BSA. The adipocytes were kept at -80°C until RNA extraction.

### **Human subjects**

Adipose tissue samples were obtained from obese adult subjects undergoing laparoscopic anti-obesity surgery. Specimens of adipose tissue (2–5 g) from the abdominal omental region were obtained at the beginning of surgery (n = 5). No selection was made for age, sex, or BMI. Age was between 40-50 years. These subjects were included for studies on adipocyte differentiation. The study protocol was approved by the Local Ethical Committee (Department of Internal Medicine, University of Turin) and all subjects gave their written informed consent.

### **Expression of hGPR103 and lipolysis experiments in human omental adipocytes**

Adipose tissue was minced into small pieces and digested at 37 C for 2 h in DMEM/Ham's F12 medium with 750 µg/ml type 1 collagenase (Sigma-Aldrich, Milan, Italy). The tissue was then diluted with PBS and filtered through a 100 µm nylon mesh.

The stromal cells were separated from the floating mature adipocytes by centrifugation. Total RNA was extracted as described above and GPR103 mRNA was detected by RT-PCR in human omental mature adipocytes using the primers, sense: 5'-TAG GAT CAC CCA TGT GGC ACG T-3' and antisense 5'-AAG AGA GCC ACC ACT GTC ACC ATC-3', as previously described (10). The PCR products were analyzed on a 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide. Amplification of human  $\beta$ -actin mRNA served as internal control, sense: 5'-GGT CAT CTT CTC GCG GTT GGC CTT GGG GT-3', antisense: 5'-CCC CAG GCA CCA GGG CGT GAT-3'. For lipolysis experiments, 40  $\mu$ l of mature adipocytes were then collected and transferred into a 96-well plate containing 100  $\mu$ l of Lipolysis Assay Kit Buffer (Zen-Bio, Research Triangle Park, NC) in the presence or absence of either QRFP-43 (1, 10, 100 nM) or insulin (100 nM). After 40 min, lipolysis was induced by addition of ISO (1  $\mu$ M) for 80 min. Following the manufacturer's instructions, 50  $\mu$ l of medium were then transferred into a new 96-well plate for glycerol measurement. Results are expressed as % of glycerol release in the basal condition used as control.

### **Statistical analysis**

Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Data were analyzed using nonlinear regression analysis software PRISM (GraphPad, San Diego, CA) and significance was tested using a one-way ANOVA with Dunnett's post-test.  $P < 0.05$  was considered as statistically significant. For expression in isolated adipocytes and in different fat pads, an unpaired *t student* test was used.

### **Acknowledgements**

The authors would like to thank Petra Pohankova for her skilful technical assistance.

**Abbreviations**

ACSL1, acyl-CoA synthetase long-chain family member 1; C/EBP- $\alpha$ , CCAAT/enhancer binding protein-  $\alpha$ ; DIO, diet-induced obesity; FA, fatty acid; FATP1, fatty acid transport protein-1; FBS, fetal bovine serum; HFD, high fat diet; IBMX, 3-isobutyl-1-methylxanthine; ISO, isoproterenol; LPL, lipoprotein lipase; ORO, Oil Red O; PPAR-  $\gamma$ , peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ ; qPCR, quantitative real-time PCR; shRNA, short hairpin RNA; WAT, white adipose tissue.



## Figure legends

**Figure 1. Expression of GPR103b and QRFP during 3T3-L1 differentiation.** A, Ethidium bromide-stained agarose gel for visualization of RT-PCR amplification products derived from 3T3-L1 cells. 3T3-L1 cells were induced to differentiate at confluence (designated day 0) as described in the material and methods section. PCR amplification products of hypothalamus were used as positive controls. PCR products were resolved on 1.5% agarose gels. B, qPCR of GPR103b during 3T3-L1 cell differentiation. Data are presented as fold change relative to hypothalamic expression set to 1 (n=3). C, Detection of GPR103b in differentiated 3T3-L1 cells by flow cytometry immunofluorescence. The histogram shows pre-immune control fluorescence (black), IgG isotype control fluorescence (blue) and specific GPR103b fluorescence (red) (n=4). D, Quantitative real time PCR of pre-QRFP during 3T3-L1 differentiation. Data are presented as fold change relative to hypothalamic expression set to 1 (n=3). ND: not detected; \*,  $P < 0.05$  and \*\*,  $P < 0.01$  vs. day 0.

**Figure 2. Effects of QRFPs peptides on triglyceride accumulation, LPL activity, FA uptake and lipolysis.** A, Triglyceride accumulation by ORO staining of 3T3-L1 adipocytes. At day 2 of differentiation, 3T3-L1 cells were treated or not with insulin (167 nM), QRFP-43 or -26 (10 nM) for 4 days. B, Quantitative analysis of ORO staining. Stained Oil Red O was eluted with isopropanol and quantified by measuring the optical density at 510 nm (n=3). Oil Red O data are expressed as fold increase (mean  $\pm$  SEM) over control (vehicle-treated). C, Heparin-releasable activity in day 2 differentiated 3T3-L1 cells treated with insulin (INS, 167 nM) and QRFP-26 (10 and 1000 nM) for 2 more days. (n=3). D, Bar graphs in percent change ( $\pm$  SEM) in mean fluorescence intensity over fluorescence in vehicle-treated cells set at 100%, as assessed

by flow cytometry of  $C_{12}$ -BODIPY-labeled FA uptake in 3T3-L1 adipocytes starved 1 h and then treated 2 h with insulin (INS, 167 nM) or QRFP peptides (10 and 1000 nM) (n=4). E) Dose-response curve of inhibition of ISO-induced lipolysis by QRFP. ISO + QRFP-43 (square), ISO + QRFP-26 (triangle) and ISO + QRFP-28n (circle) in differentiated 3T3-L1 cells. QRFP-43 and -26 inhibited the lipolytic effect of ISO in a dose-dependent manner. Data are expressed as lipolysis index (sample free glycerol concentration – basal concentration)/(ISO-elicited free glycerol concentration – basal concentration) (n=3). \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01 vs. vehicle.

**Figure 3. Effects of GPR103b silencing on QRFP-dependent responses in differentiated 3T3-L1**

A, qPCR of GPR103b in 3T3-L1 infected with shRNAs. Expression in non-targeting shRNA cells (shcontrol) and specific GPR103b shRNA cells (shGPR103b) are presented as fold change relative to empty vector (pRS-Neo) expression set to 1 (n=4). B, Bar graphs of protein detection in percent change ( $\pm$  SEM, n=4) in mean fluorescence intensity over fluorescence in empty vector infected cells set at 100%, as assessed by flow cytometry of GPR103b in empty vector, non-targeting shRNA or specific GPR103b shRNA infected and differentiated 3T3-L1 cells. C, Triglyceride accumulation in empty vector, non-targeting shRNA or specific GPR103b shRNA infected 3T3-L1 cells. ORO staining has been performed on differentiated untreated cells. D, Detection of GPR103b in infected and differentiated 3T3-L1 cells by flow cytometry immunofluorescence. The left shift of shGPR103b cells in the fluorescence histogram shows a decrease in GPR103b expression compared to pRS-Neo and shcontrol cells (n=4). E,  $C_{12}$ -BODIPY-labeled FA uptake in pRS-Neo, shcontrol or shGPR103b in infected and differentiated 3T3-L1 cells following 1 h starvation and 2 h treatment with insulin (INS, 50 nM) or QRFP peptides (0.1 and 10 nM) (n=4). F,

Inhibition of ISO-induced lipolysis by QRFP-43 and -26. pRS-Neo, shcontrol or shGPR103b infected 3T3-L1 cells were differentiated and ISO-elicited lipolysis was inhibited with QRFP peptides at 0.1 and 10 nM (n=3). Data are expressed as lipolysis index. #, P < 0.05 vs ISO; \*, P < 0.05 and \*\*, P < 0.01 vs. their respective control.

**Figure 4. Adipogenic genes expression in 3T3-L1 differentiated cells following QRFP treatment.** Differentiated 3T3-L1 cells (A) or empty vector, non-targeting shRNA and specific GPR103b shRNA differentiated 3T3-L1 cells after retroviral infection (B) were treated or not with QRFP-43, -26 (10 nM) or vehicle for 2 days and total RNAs were assayed by qPCR. Data are presented as fold increase over vehicle (10% FBS)-treated cells (n=3). Gene expression levels were quantified by SYBR Green real-time PCR. Relative gene expression was calculated with  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. \*, P < 0.05 and \*\*, P < 0.01 vs. control (vehicle).

**Figure 5. Expression of GPR103b and pre-QRFP in adipose depot from mice fed diet induced obesity.** A, qPCR of GPR103b and pre-QRFP in epididymal (Epid), perirenal (Peri) and inguinal (Ing) fat depots from mice fed a HFD (D12492, Research Diet Inc.) or normal diet (D12450B) for 24 weeks. B, qPCR analysis of GPR103b and pre-QRFP in isolated primary adipocytes from epididymal fat pads of mice fed a HFD, or normal diet, for 18 weeks. Data (mean  $\pm$  SEM) are presented as fold change relative to control (normal diet) expression (n= 3-4). Relative gene expression was calculated with  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01 and \*\*\*, P < 0.001 vs. normal diet.

**Figure 6. Expression of hGPR103 and lipolysis in human omental adipocytes.** A, GPR103 mRNA expression in human omental adipocytes. PCR amplification products

of human hypothalamus were used for positive control. As expected, the amplified products corresponded to 318 bp for hGPR103 and 230 bp for  $\beta$ -actin. B, Lipolysis was measured in adipocytes preincubated with or without either QRFP-43 (1-100 nM) or insulin (100 nM) for 40 min and then incubated with ISO (1  $\mu$ M) for a further 80 min. Results are expressed as percent of control in basal (left panel) or stimulated (right panel) conditions (control glycerol release is of 33.75  $\mu$ M). The means  $\pm$  SEM of five independent experiments are shown. \*\*, P < 0.01 vs. control; #, P < 0.05, ##, P < 0.01 vs. ISO.

## References

1. **Lee DK, Nguyen T, Lynch KR, Cheng R, Vanti WB, Arkhitko O, Lewis T, Evans JF, George SR, O'Dowd BF** 2001 Discovery and mapping of ten novel G protein-coupled receptor genes. *Gene* 275:83-91
2. **Jiang Y, Luo L, Gustafson EL, Yadav D, Lavery M, Murgolo N, Vassileva G, Zeng M, Laz TM, Behan J, Qiu P, Wang L, Wang S, Bayne M, Greene J, Monsma F, Jr., Zhang FL** 2003 Identification and characterization of a novel RF-amide peptide ligand for orphan G-protein-coupled receptor SP9155. *J Biol Chem* 278:27652-27657
3. **Chartrel N, Dujardin C, Anouar Y, Leprince J, Decker A, Clerens S, Do-Rego JC, Vandesande F, Llorens-Cortes C, Costentin J, Beauvillain JC, Vaudry H** 2003 Identification of 26RFa, a hypothalamic neuropeptide of the RFamide peptide family with orexigenic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15247-15252
4. **Fukusumi S, Yoshida H, Fujii R, Maruyama M, Komatsu H, Habata Y, Shintani Y, Hinuma S, Fujino M** 2003 A new peptidic ligand and its receptor regulating adrenal function in rats. *J Biol Chem* 278:46387-46395

5. **Takayasu S, Sakurai T, Iwasaki S, Teranishi H, Yamanaka A, Williams SC, Iguchi H, Kawasaki YI, Ikeda Y, Sakakibara I, Ohno K, Ioka RX, Murakami S, Dohmae N, Xie J, Suda T, Motoike T, Ohuchi T, Yanagisawa M, Sakai J** 2006 A neuropeptide ligand of the G protein-coupled receptor GPR103 regulates feeding, behavioral arousal, and blood pressure in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:7438-7443
6. **Moriya R, Sano H, Umeda T, Ito M, Takahashi Y, Matsuda M, Ishihara A, Kanatani A, Iwaasa H** 2006 RFamide peptide QRFP43 causes obesity with hyperphagia and reduced thermogenesis in mice. *Endocrinology* 147:2916-2922
7. **Primeaux SD, Blackmon C, Barnes MJ, Braymer HD, Bray GA** 2008 Central administration of the RFamide peptides, QRFP-26 and QRFP-43, increases high fat food intake in rats. *Peptides* 29:1994-2000
8. **Baribault H, Danao J, Gupte J, Yang L, Sun B, Richards W, Tian H** 2006 The G-protein-coupled receptor GPR103 regulates bone formation. *Mol Cell Biol* 26:709-717
9. **Navarro VM, Fernandez-Fernandez R, Nogueiras R, Vigo E, Tovar S, Chartrel N, Le MO, Leprince J, Aguilar E, Pinilla L, Dieguez C, Vaudry H, Tena-Sempere M** 2006 Novel role of 26RFa, a hypothalamic RFamide orexigenic peptide, as putative regulator of the gonadotropic axis. *J Physiol* 573:237-249
10. **Egido EM, Hernandez R, Leprince J, Chartrel N, Vaudry H, Marco J, Silvestre RA** 2007 26RFa, a novel orexigenic neuropeptide, inhibits insulin secretion in the rat pancreas. *Peptides* 28:725-730
11. **Yamamoto T, Wada T, Miyazaki R** 2008 Analgesic effects of intrathecally administered 26RFa, an intrinsic agonist for GPR103, on formalin test and carrageenan test in rats. *Neuroscience* 157:214-222

12. **Lectez B, Jeandel L, El-Yamani FZ, Arthaud S, Alexandre D, Mardargent A, Jegou S, Mounien L, Bizet P, Magoul R, Anouar Y, Chartrel N** 2009 The orexigenic activity of the hypothalamic neuropeptide 26RFa is mediated by the neuropeptide Y and proopiomelanocortin neurons of the arcuate nucleus. *Endocrinology* 150:2342-2350
13. **Zhang Q, Qiu P, Arreaza MG, Simon JS, Golovko A, Laverty M, Vassileva G, Gustafson EL, Rojas-Triana A, Bober LA, Hedrick JA, Monsma FJ, Jr., Greene JR, Bayne ML, Murgolo NJ** 2007 P518/Qrfp sequence polymorphisms in SAMP6 osteopenic mouse. *Genomics* 90:629-635
14. **Fukusumi S, Fujii R, Hinuma S** 2006 Recent advances in mammalian RFamide peptides: the discovery and functional analyses of PrRP, RFRPs and QRFP. *Peptides* 27:1073-1086
15. **Herrera-Herrera ML, Salazar-Olivo LA** 2008 RFamide neuropeptides inhibit murine and human adipose differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 377:29-34
16. **Lefrere I, De CP, Camelin JC, Le LS, Mercier N, Elshourbagy N, Bril A, Berrebi-Bertrand I, Feve B, Krief S** 2002 Neuropeptide AF and FF modulation of adipocyte metabolism. Primary insights from functional genomics and effects on beta-adrenergic responsiveness. *J Biol Chem* 277:39169-39178
17. **Dockray GJ** 2004 The expanding family of -RFamide peptides and their effects on feeding behaviour. *Exp Physiol* 89:229-235
18. **Bechtold DA, Luckman SM** 2007 The role of RFamide peptides in feeding. *J Endocrinol* 192:3-15
19. **Spooner PM, Chernick SS, Garrison MM, Scow RO** 1979 Insulin regulation of lipoprotein lipase activity and release in 3T3-L1 adipocytes. Separation and dependence of hormonal effects on hexose metabolism and synthesis of RNA and protein. *J Biol Chem* 254:10021-10029

20. **Yang K, Guan H, Arany E, Hill DJ, Cao X** 2008 Neuropeptide Y is produced in visceral adipose tissue and promotes proliferation of adipocyte precursor cells via the Y1 receptor. *FASEB J* 22:2452-2464
21. **Kuo LE, Kitlinska JB, Tilan JU, Li L, Baker SB, Johnson MD, Lee EW, Burnett MS, Fricke ST, Kvetnansky R, Herzog H, Zukowska Z** 2007 Neuropeptide Y acts directly in the periphery on fat tissue and mediates stress-induced obesity and metabolic syndrome. *Nat Med* 13:803-811
22. **Choi K, Roh SG, Hong YH, Shrestha YB, Hishikawa D, Chen C, Kojima M, Kangawa K, Sasaki S** 2003 The role of ghrelin and growth hormone secretagogues receptor on rat adipogenesis. *Endocrinology* 144:754-759
23. **Ntambi JM, Young-Cheul K** 2000 Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr* 130:3122S-3126S
24. **Muccioli G, Pons N, Ghe C, Catapano F, Granata R, Ghigo E** 2004 Ghrelin and des-acyl ghrelin both inhibit isoproterenol-induced lipolysis in rat adipocytes via a non-type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Eur J Pharmacol* 498:27-35
25. **Valet P, Berlan M, Beauville M, Crampes F, Montastruc JL, Lafontan M** 1990 Neuropeptide Y and peptide YY inhibit lipolysis in human and dog fat cells through a pertussis toxin-sensitive G protein. *J Clin Invest* 85:291-295
26. **Thompson NM, Gill DA, Davies R, Loveridge N, Houston PA, Robinson IC, Wells T** 2004 Ghrelin and des-octanoyl ghrelin promote adipogenesis directly in vivo by a mechanism independent of the type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology* 145:234-242
27. **Clark JT, Kalra PS, Crowley WR, Kalra SP** 1984 Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. *Endocrinology* 115:427-429

28. **Clark JT, Kalra PS, Kalra SP** 1985 Neuropeptide Y stimulates feeding but inhibits sexual behavior in rats. *Endocrinology* 117:2435-2442
29. **Tschop M, Smiley DL, Heiman ML** 2000 Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407:908-913
30. **Preiss-Landl K, Zimmermann R, Hammerle G, Zechner R** 2002 Lipoprotein lipase: the regulation of tissue specific expression and its role in lipid and energy metabolism. *Curr Opin Lipidol* 13:471-481
31. **Merkel M, Eckel RH, Goldberg IJ** 2002 Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J Lipid Res* 43:1997-2006
32. **Amri EZ, Teboul L, Vannier C, Grimaldi PA, Ailhaud G** 1996 Fatty acids regulate the expression of lipoprotein lipase gene and activity in preadipose and adipose cells. *Biochem J* 314 ( Pt 2):541-546
33. **Semenkovich CF, Wims M, Noe L, Etienne J, Chan L** 1989 Insulin regulation of lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes is mediated at posttranscriptional and posttranslational levels. *J Biol Chem* 264:9030-9038
34. **Knutson VP** 2000 The release of lipoprotein lipase from 3T3-L1 adipocytes is regulated by microvessel endothelial cells in an insulin-dependent manner. *Endocrinology* 141:693-701
35. **Gonzales AM, Orlando RA** 2007 Role of adipocyte-derived lipoprotein lipase in adipocyte hypertrophy. *Nutr Metab (Lond)* 4:22
36. **Abumrad N, Coburn C, Ibrahimi A** 1999 Membrane proteins implicated in long-chain fatty acid uptake by mammalian cells: CD36, FATP and FABPm. *Biochim Biophys Acta* 1441:4-13



37. **Shimomura I, Tokunaga K, Jiao S, Funahashi T, Keno Y, Kobatake T, Kotani K, Suzuki H, Yamamoto T, Tarui S, .** 1992 Marked enhancement of acyl-CoA synthetase activity and mRNA, paralleled to lipoprotein lipase mRNA, in adipose tissues of Zucker obese rats (fa/fa). *Biochim Biophys Acta* 1124:112-118
38. **Richards MR, Harp JD, Ory DS, Schaffer JE** 2006 Fatty acid transport protein 1 and long-chain acyl coenzyme A synthetase 1 interact in adipocytes. *J Lipid Res* 47:665-672
39. **Gargiulo CE, Stuhlsatz-Krouper SM, Schaffer JE** 1999 Localization of adipocyte long-chain fatty acyl-CoA synthetase at the plasma membrane. *J Lipid Res* 40:881-892
40. **Cowherd RM, Lyle RE, McGehee RE, Jr.** 1999 Molecular regulation of adipocyte differentiation. *Semin Cell Dev Biol* 10:3-10
41. **Kudo M, Sugawara A, Uruno A, Takeuchi K, Ito S** 2004 Transcription suppression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 gene expression by tumor necrosis factor alpha via an inhibition of CCAAT/ enhancer-binding protein delta during the early stage of adipocyte differentiation. *Endocrinology* 145:4948-4956
42. **Patel SR, Murphy KG, Thompson EL, Patterson M, Curtis AE, Ghatei MA, Bloom SR** 2008 Pyroglutamylated RFamide peptide 43 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis via gonadotropin-releasing hormone in rats. *Endocrinology* 149:4747-4754
43. **Tschop M, Heiman ML** 2001 Rodent obesity models: an overview. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109:307-319
44. **Lafontan M, Berlan M** 2003 Do regional differences in adipocyte biology provide new pathophysiological insights? *Trends Pharmacol Sci* 24:276-283
45. **Bruun JM, Lihn AS, Verdich C, Pedersen SB, Toubro S, Astrup A, Richelsen B** 2003 Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:E527-E533

46. **Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R** 2002 Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 290:1084-1089
47. **Viswanadha S, Londos C** 2006 Optimized conditions for measuring lipolysis in murine primary adipocytes. *J Lipid Res* 47:1859-1864

Figures

Figure 1

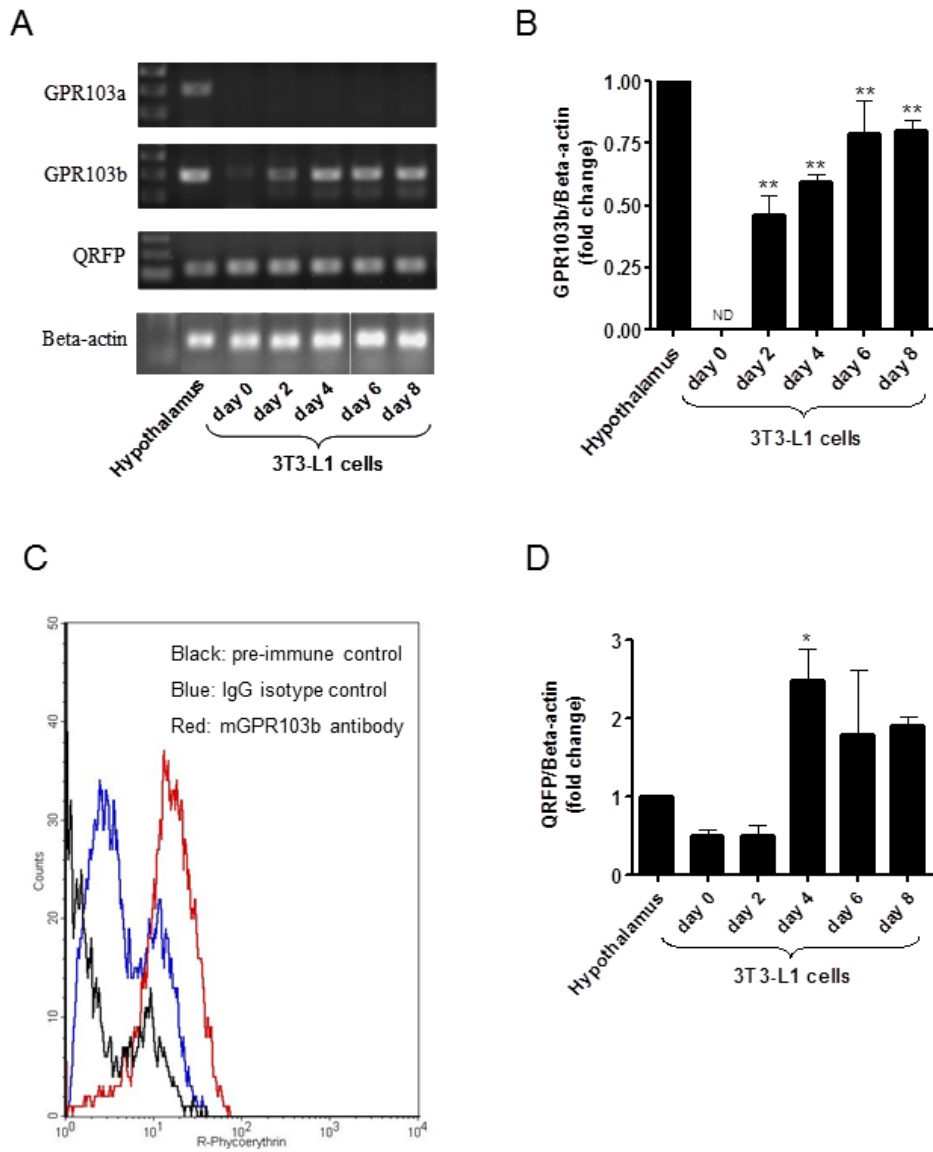


Figure 2

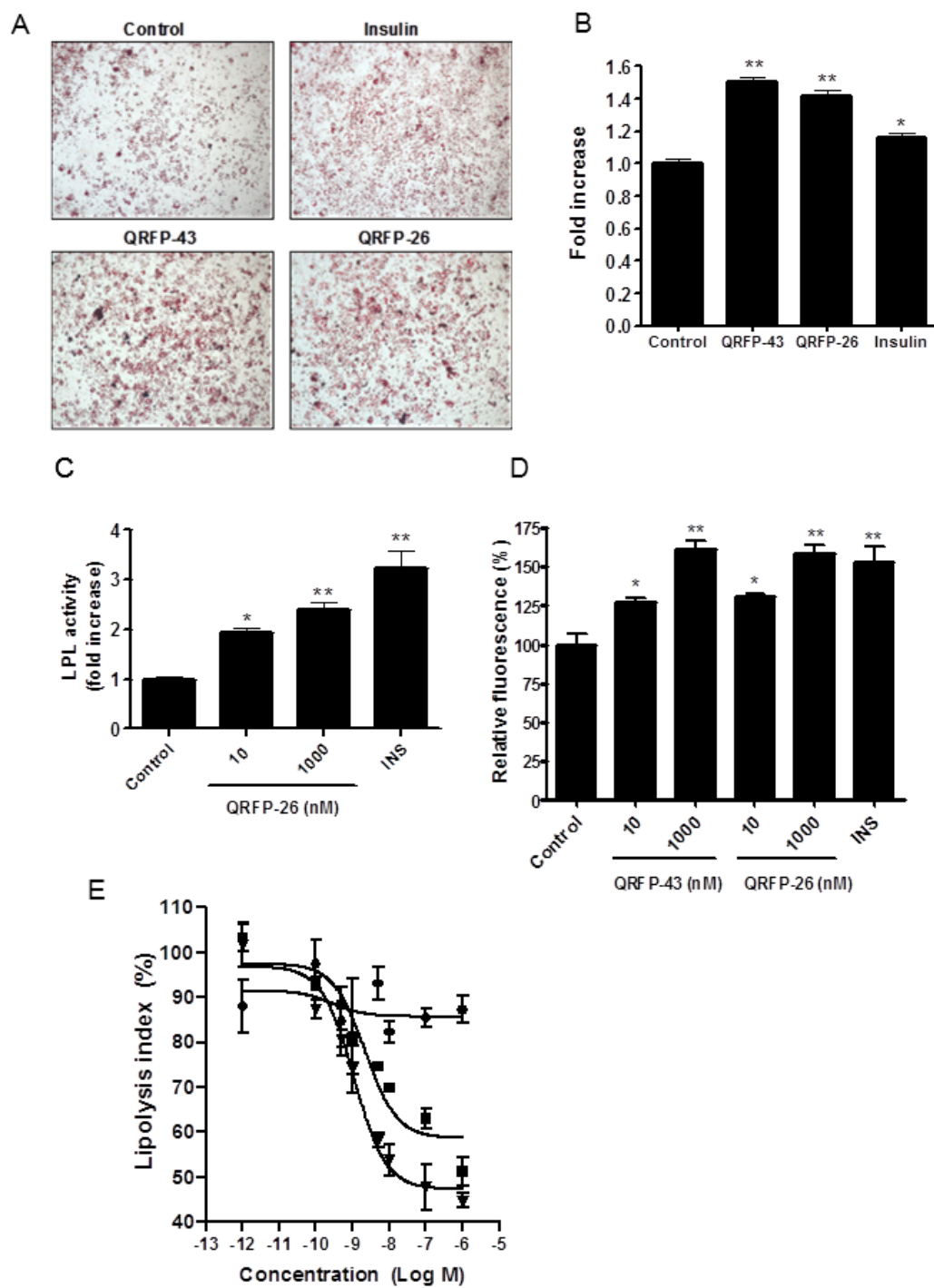


Figure 3

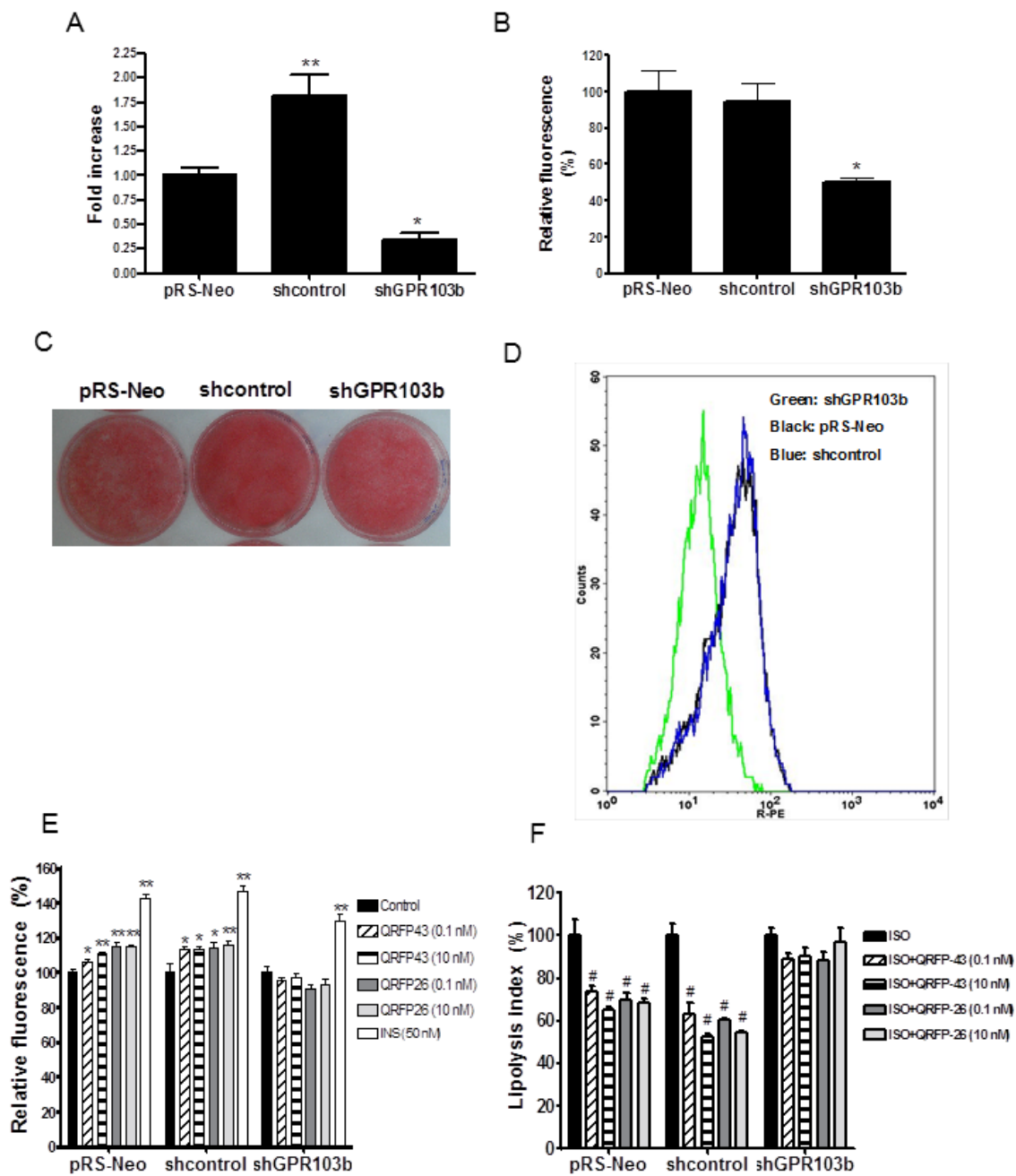
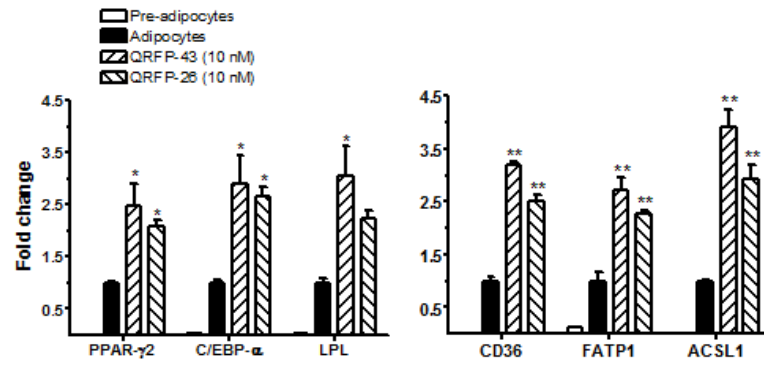


Figure 4

A



B

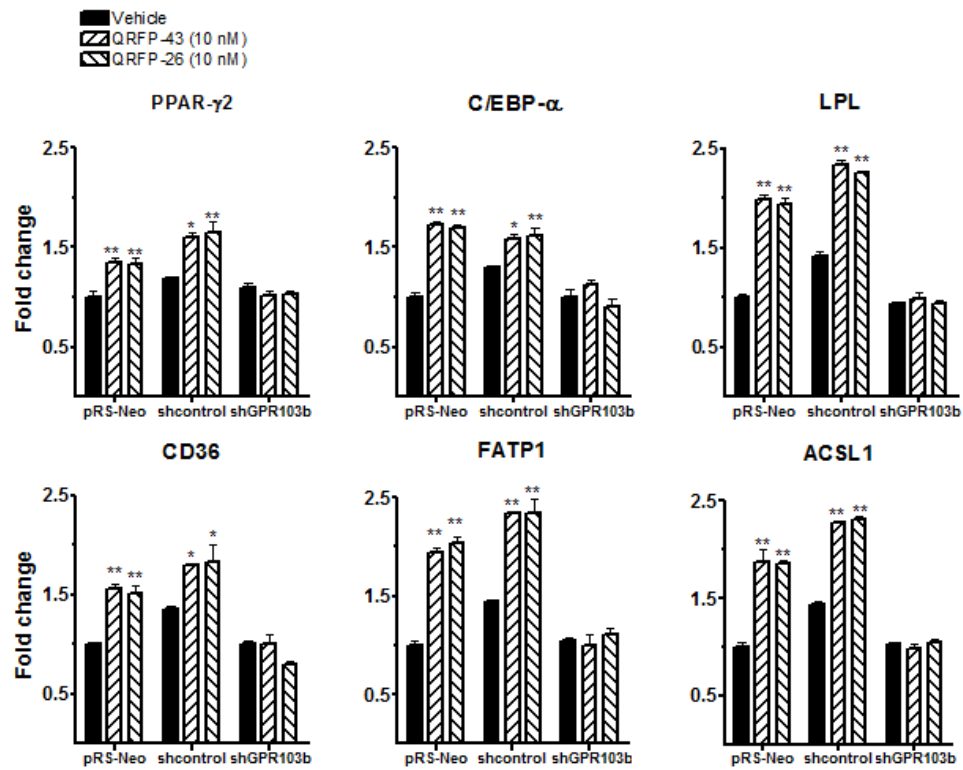


Figure 5

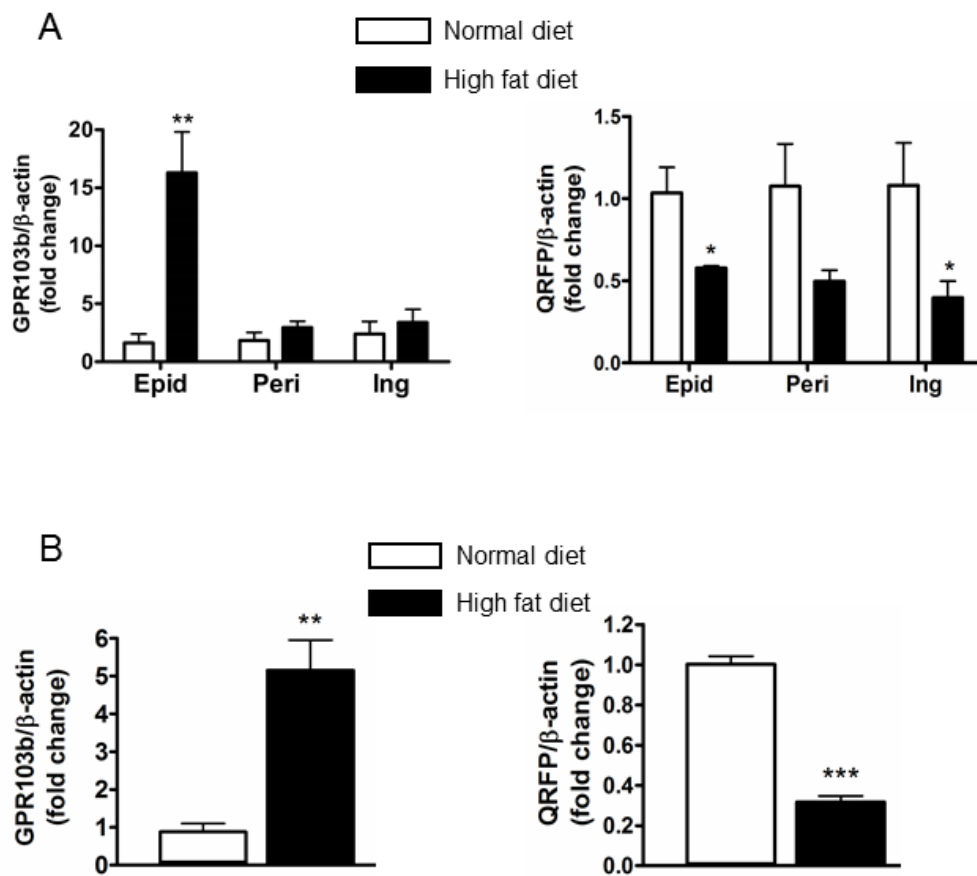
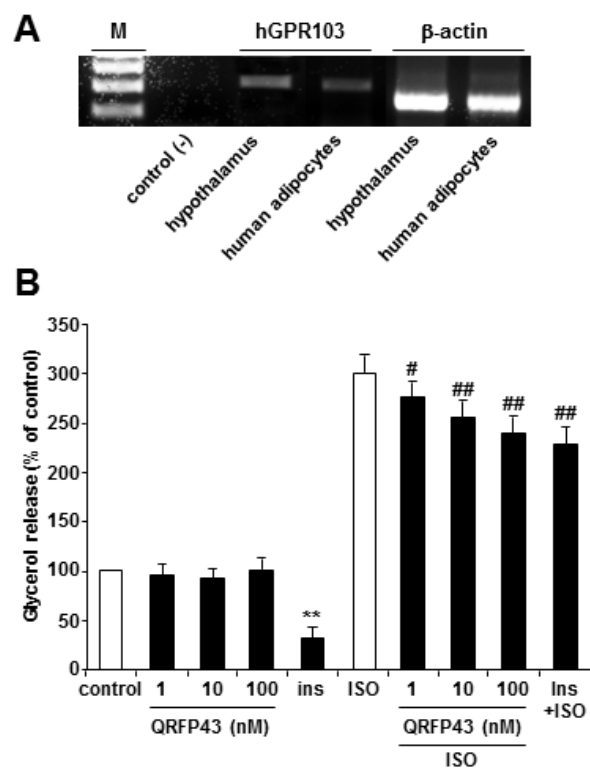
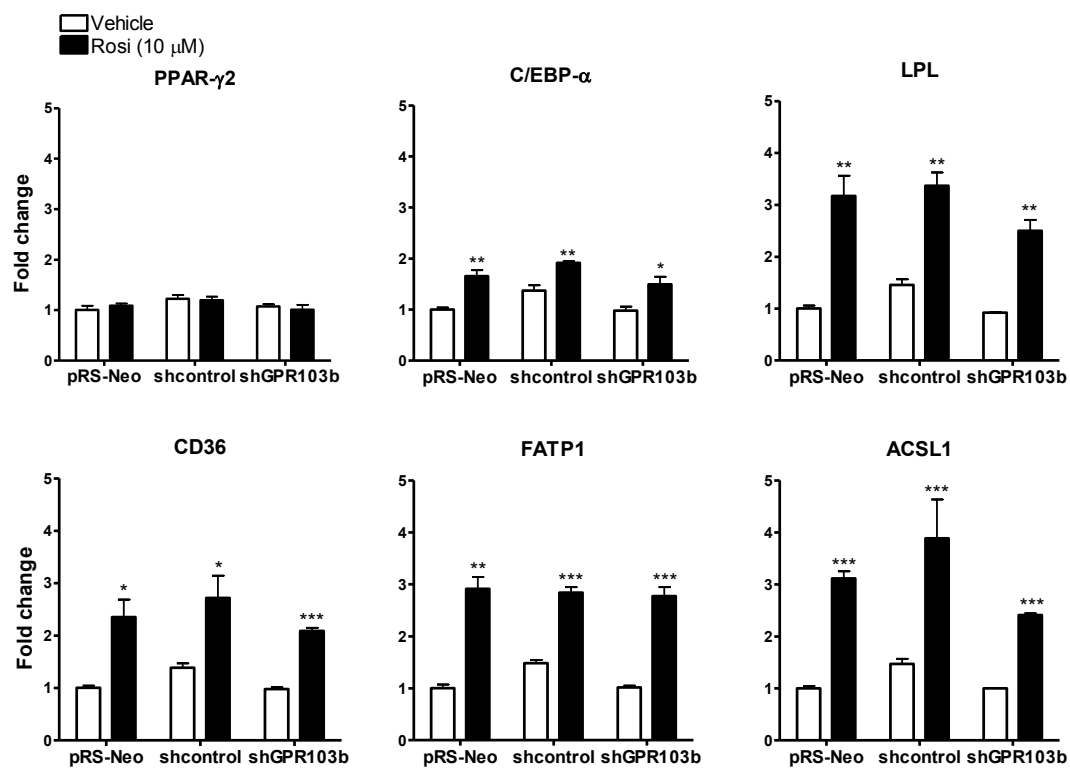


Figure 6





## Résultats supplémentaires

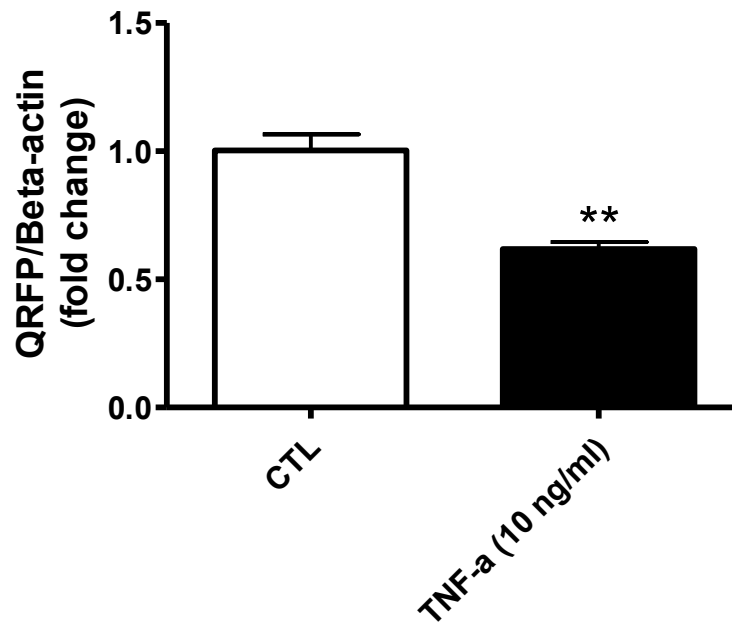


**Supplemental figure 1:** Effects of treatment with rosiglitazone (10  $\mu$ M) on adipogenic gene expression in infected 3T3-L1 cells adipocytes. Infected cells were differentiated as described in materials and methods section. Fully differentiated cells were treated with Rosi (10  $\mu$ M) for 2 days. Total RNAs were assayed by qPCR. Data (mean  $\pm$  SEM) are presented as SEM relative to control (normal diet) expression (n= 3-4). Relative gene expression was calculated with  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$  and \*\*\*,  $P < 0.001$ .

< 0.001 vs vehicle. Fold change represents the gene expression normalized by beta-actin expression.

Table 1: Primers used for real-time PCR

Name	Forward (3'-5')	Reverse (3'-5')	Annealing temperature (C)
PPAR- $\gamma$ 2	CGCTGATGCACTGCCTATGA	AGAGGTCCACAGAGCTGATTCC	60
CEBP- $\alpha$	AGGTGCTGGAGTTGACCAGT	CAGCCTAGAGATCCAGCGAC	60
CD36	GGCCTTACTTGGGATTGG	CCAGTGTATATGTAGGCTCATCCA	60
LPL	ATCGGAGAACTGCTCATGATGA	GTCTTCAAAGAACTCGGATGCT	60
FATP1	TATGGGGTGGCTGTGCCAGGAG	CGCAGGAAGATGGGCCGAGCATAG	60
ACSL1	CGGTCTGAAGCCATTTGAACAG	TGCGACCTGAAATAGTTCCGTAGC	60
$\beta$ -actin	ATTACTGCTCTGGCTCCTA	TCTGCTGGAAGGTGGACA	60



**Supplemental figure 2:** Effects of TNF-alpha treatment on the expression of QRFP. Differentiated 3T3-L1 cells were treated or not with TNF-alpha for 2 days. Total RNA extraction and qPCR were done as described in materials section. Data are presented as fold change of relative expression to control (CTL). Relative gene expression was calculated with  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. \*\*,  $P < 0.01$  vs control.

### **3.3. Mise en contexte du deuxième article**

Dans notre premier article, nous avons montré que les QRFPs exercent des propriétés anti-lipolytiques dans les adipocytes 3T3-L1 après l'induction de la lipolyse par l'ISO. Les voies de signalisation du GPR103B ainsi que les mécanismes impliqués dans l'inhibition de la lipolyse par les QRFPs ne sont pas encore connus. L'objectif de ce deuxième article vise à caractériser les voies de signalisation impliquées dans l'inhibition de la lipolyse induite par le QRFP-43 et médiées par le GPR103B.

Ma contribution a été dans la réalisation de la totalité des expériences présentées ainsi qu'à la rédaction du manuscrit.

**3.4. Article 2: QRFP-43 inhibits lipolysis by preventing ligand-induced complex formation between perilipin A, caveolin-1, the catalytic subunit of protein kinase and hormone sensitive lipase in 3T3-L1 adipocytes**

Mukandila Mulumba, Sylvie Marleau, Huy Ong\*

Faculty of Pharmacy, Université de Montréal C.P. 6128, Succursale Centre-Ville,  
Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

\* Corresponding author: Huy Ong

## Abstract

QRFP (RFamide) peptides are neuropeptides involved in food intake and adiposity regulation in rodents. We have previously shown that QRFP-43 (43RFa) and QRFP-26 (26RFa) inhibited isoproterenol (ISO)-induced lipolysis in adipocytes. However, the antilipolytic signaling pathways activated by QRFP peptides have not been investigated. In the present study, 3T3-L1 adipocytes were used to identify the main pathways involved in QRFP-43-induced lipolysis. Our results show that QRFP-43 reduced ISO-induced phosphorylation of PLIN and Ser660 HSL by 43 and 26% ( $P < 0.001$ ), respectively, but increased Akt phosphorylation by 44% ( $P < 0.001$ ). Specific inhibition of Akt and PI3K abrogated the antilipolytic effect of QRFP-43. In contrast, specific inhibition of PDE3B failed to reverse QRFP-43 anti-lipolytic effects. This was confirmed by using dibutyryl-cAMP (DB-cAMP), a non-PDE3B hydrolysable cAMP analog. Importantly, QRFP-43 treatment prevented ISO-induced PKA-catalytic (PKA-c) subunit and caveolin-1 translocation on lipid droplets by 50 and 46% ( $P < 0.01$ ), respectively. These results suggest that QRFP peptides attenuated ISO-induced lipolysis by preventing formation active complex on lipid droplets and activation of Src kinase and PKC.

**Key words:** RFamide peptides, adrenergic receptors, lipolysis, adipocytes, protein kinases, caveolins

**Abbreviations:** 8Br-cAMP, 8 Bromo-cAMP; CAV-1, caveolin-1; DB-cAMP, dibutyryl-cAMP; ERK, extracellular signal-regulated kinase; FBS, Fetal bovine serum; GPR103, G-protein receptor 103; HSL, hormone-sensitive lipase; ISO, isoproterenol; PDE3B, phosphodiesterase 3B; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PKA, protein kinase A; PKA-c; PKA catalytic subunit; PKC, protein kinase C; PLIN, perilipin A, PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; QRFP, pyroglutamylated arginine-phenylalanineamide peptide; RFa, RF amide peptide

## Introduction

Obesity results from an imbalance in the processes regulating energy homeostasis such as lipolysis. Orexigenic neuropeptides such as neuropeptide Y (NPY), neuropeptide FF (NPFF) and orexin-A have been reported to have direct acute effects on the lipolytic activity of murine adipocytes [7,38,46]. Along this line, neuropeptides exhibiting the Arg–Phe–NH<sub>2</sub> motif, pyroglutamylated arginine–phenylalanineamide peptides (QRFP, also referred to as RFamide), particularly QRFP-43/43RFa and QRFP-26/26RFa (a constitutive part of QRFP-43) were shown to have orexigenic activity when centrally administered [10,29,42]. In rodents, the orexigenic effect appears to be exacerbated when the animals are fed with a high-fat diet, leading to an increase of fat mass and body weight [29,35], and reduced thermogenesis [29]. QRFP-43 and QRFP-26 act as endogenous ligands of the G protein-coupled receptor 103 (GPR103) [18,21]. Both peptides decreased intracellular cAMP and increased calcium concentrations in cells transfected with human GPR103 (hGPR103), suggesting that GPR103 is coupled to G<sub>i/o</sub> and/or G<sub>q</sub> protein [18,21,42]. We have recently reported that isolated and 3T3-L1 adipocytes expressed both QRFP precursor and GPR103b receptor [30], a murine subtype of the GPR103 receptor [22,42]. We have further shown that QRFP peptides enhanced fatty acid uptake and inhibited isoproterenol (ISO)-stimulated lipolysis in 3T3-L1 adipocytes [30]. However, the mechanisms mediating the inhibition of lipolysis by QRFP peptides are still unknown.

Sequence analysis of hGPR103 revealed that it shares a high homology of sequence with NPFF2 (GPR74) and orexin-2 (OX2R) receptors [18,21]. These G-protein coupled receptors are expressed in human and murine adipocytes [15,26,38]. GPR74 receptor mediates NPFF antilipolytic effect through the activation of G<sub>i</sub> protein in human adipocytes [46]. NPFF attenuated  $\beta$ -adrenergic agonists-induced lipolysis in human adipocytes, whilst in 3T3-L1 adipocytes, NPFF treatment increased

phosphoinositide 3-kinase (PI3K) expression [26]. Orexin receptors, OX1R and OX2R expressed in human adipocytes, bind both orexin-A and orexin-B [15]. Antilipolytic effects of orexins are associated with a decrease of hormone-sensitive lipase (HSL) expression in omental [15] and 3T3-L1 adipocytes [38]. In 3T3-L1 adipocytes, orexin-A activated the PI3K/Akt pathway [38]. Whether the murine GPR103b, which shares 79% sequence homology with hGPR103 [42], regulates PI3K/Akt pathway is still unknown.

In adipocytes, lipolysis regulation is well characterized and involves cAMP-dependent protein kinase (PKA) activation [16].  $\beta$ -adrenergic receptors ( $\beta$ -AR) activate PKA through  $G_s$ -stimulation of adenylyl cyclase (AC), whilst  $\alpha$ -AR inhibit AC activity through  $G_i$ , and thus, PKA activation [23,39]. HSL and perilipin A (PLIN) are two major downstream targets of PKA [43]. Murine HSL activity is regulated through phosphorylation of serines 563, 659 and 660 [3,40] by PKA, and serines 600 and 565 by the extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) [20] and the AMP-activated protein kinase (AMPK) [19], respectively. Yet, PLIN phosphorylation by PKA, essential for HSL translocation to lipid droplet [28,41], is facilitated by caveolin-1 (CAV-1), a protein that is found in cholesterol-enriched membrane domains (caveolae) [13,36]. Besides the  $G_i$ -coupled receptor, PKA activity can be downregulated in adipocytes through PI3K/Akt/phosphodiesterase 3B (PDE3B) pathway which decreases intracellular cAMP levels [2,14]. In adipocytes, the PI3K/Akt/PDE3B pathway plays an important role in mediating the antilipolytic effects of insulin [2,12] and has also been recently shown to be involved in ghrelin- [4] and apelin- [48] induced antilipolytic effect. These two orexigenic peptides attenuated ISO- induced lipolysis resulting in decreased HSL phosphorylation in an Akt-, PDE3B- and  $G_q$ -dependent manner in murine adipocytes. In the present study, we investigated whether GPR103b stimulates the PI3K/Akt/PDE3B cascade and decreases ISO induced-phosphorylation of HSL and PLIN after its activation by QRFP-43 in differentiated 3T3-L1 cells.



Our results show that QRFP-43 stimulates Akt and attenuates ISO-induced phosphorylation of HSL and PLIN. Moreover, we show by immunoprecipitation that QRFP-43 inhibits HSL and CAV-1 translocation in isolated lipid droplets.

## **Materials and methods**

### **Materials**

QRFP peptides were obtained (custom synthesis) from W.M. Keck Biotechnology Resource Center (New Haven, CT). Anti beta-actin antibody, insulin, dexamethasone, ISO, fatty acid-free BSA, protein kinase C inhibitor (GF109230x), forskolin, isobutylmethylxanthine, dibutyryl-cAMP, 8-bromo-cAMP, dibutyryl-cAMP, PE3B inhibitor (cilostamide), phosphatase inhibitor cocktail, PP2 (4-Amino-3-(4-chlorophenyl)-1-(t-butyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidine, 4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine) and phorbol 12-myristate 13-acetate were purchased from Sigma-Aldrich Canada Ltd (Oakville, ON). Inhibitors of Akt/PKB (SH-5) and PI3K (LY294002) were from Calbiochem (Gibbstown, NJ). Antibodies anti-perilipin A used in immunoblots was from Chemicon Int. while the anti-perilipin A used for immunoprecipitation was from Santa Cruz Biotechnology, Inc. All other antibodies used in western blots were purchased from Cell Signaling Technology. Cell culture media and fetal bovine serum were from Wisent Inc. (St-Bruno, QC).

### **Cell culture**

Prior to differentiation, 3T3-L1 cells, obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA) were seeded in 150 mm polystyrene plates (Corning Life Sciences, Wilkes-Barre, PA) and grown in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum and 100 units/mL of penicillin/streptomycin in a 10% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C. At 95% confluence, cells were passed and seeded in 12-well Costar plates in DMEM supplemented with 10% calf serum. At confluence, differentiation was induced by

culturing cells with DMEM supplemented with 10% FBS, 167 nM insulin, 1  $\mu$ M dexamethasone and 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine for 3 days. Differentiated cells were then cultured in DMEM with 10 % FBS containing 167 nM insulin for 2 days. Cells were then maintained in DMEM with 10% FBS and the medium was changed every 2 days until experimentation.

### **Lipolysis experiments**

3T3-L1 adipocytes were starved in serum free DMEM at 37°C for 1 hour. 3T3-L1 adipocytes were preincubated with QRFP-43 ( $10^{-6}$  to  $10^{-11}$  M) for 1 hour in DMEM supplemented with 2% fatty acid-free BSA, and lipolysis was stimulated with ISO (300 nM) for another 30 minutes. For experiments using inhibitors, cells were co-incubated with QRFP-43 (10 nM) in presence or in absence of GF109230x (2  $\mu$ M), LY294002 (250 nM), cilostamide (250 nM), SH-5 (5  $\mu$ M) or PP2 (5  $\mu$ M) as described before lipolysis stimulation. All inhibitors were dissolved in DMSO and the final concentration of DMSO was less than 0.1% in the incubation medium. In PMA (4  $\mu$ M)-elicited lipolysis experiments, 3T3-L1 adipocytes were preincubated 30 minutes with QRFP-43 (10 nM) in presence or in absence of GF109230x or PP2 and lipolysis was stimulated with PMA for 4 hours. In experiments using adenylyl cyclase forskolin (2.5  $\mu$ M) or dibutyryl-cAMP (250  $\mu$ M) or 8 bromo-cAMP (250  $\mu$ M) to stimulate lipolysis, 3T3-L1 adipocytes were preincubated with QRFP-43 (10 nM) or insulin (10 nM) for 30 minutes before stimulation. At the end of each experiment, media were collected and assayed for glycerol using free glycerol reagent. Glycerol released was expressed lipolysis index of percentage as previously described [30].

### **Western blots**

3T3-L1 adipocytes were starved for 16 hours in DMEM/0.2% BSA and then treated with vehicle or QRFP-43 for 1 hour. Lipolysis was stimulated with either ISO or cAMP analogues for 10 and 20 minutes, respectively as indicated in figures legends.

Cells were scraped and homogenized in homogenization buffer (50 mM Hepes, pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 5 mM NaF, 0.1% Triton 100X, 10 mM pyrophosphate, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 mM benzamidine, 0.5 mM PMSF, and 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of leupeptin, antipain, pepstatin and phosphatase inhibitor cocktail). Supernatants from 1000 g centrifuged homogenates were collected and assayed for proteins using the BCA protein assay kit from Thermo Scientific (Rockford, IL). 50  $\mu\text{g}$  of protein were separated by SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes for detection of total perilipin A, phospho-perilipin A using phosphor-(Ser/Thr) PKA substrates antibody, total and phospho-HSL (Ser660 and 563), total and phospho-ERK1/2, total and phospho-Y416 Src kinase, CAV-1 and the PKA-catalytic subunit.

### **Lipid droplet isolation**

3T3-L1 adipocytes were starved for 16 hours and treated for 1 hour with QRFP-43 or Src kinase inhibitor, PP2 and then incubated with cholesterol (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) or 300 nM ISO for 10 minutes. Cells were scraped and homogenized (ten gentle strokes) in Hepes/EDTA buffer (50 mM Hepes, pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 5 mM NaF, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 mM benzamidine, 0.5 mM PMSF, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of leupeptin, antipain, pepstatin and phosphatase inhibitor cocktail) using glass potter/Teflon pestle. 1.5 ml of each homogenate was mixed with Hepes/EDTA buffer containing 60% sucrose (final 20% sucrose) in centrifuge tubes. 4.75 ml of Hepes/EDTA buffer containing 5% sucrose were gently layered over samples and filled to the top with Hepes/EDTA buffer. Samples were centrifuged 60 minutes at 15,550 rpm (SW41Ti swinging-bucket rotor, Beckman ultracentrifuge). Fractions (1 ml) containing floating lipid droplets were collected at the top of the gradient and were subjected to immunoblotting.

### **Immunoprecipitation studies**

3T3-L1 adipocytes were starved for 16 hours in DMEM/0.2% BSA and then treated with QRFP-43 (10 nM) for 1 hour. Lipolysis was induced with 300 nM ISO for 10 minutes and then cells were scraped and homogenized in homogenization buffer. The homogenate was centrifuged at 1000 g for 5 minutes at 4°C and the supernatant was collected. Proteins (300 µg) were completed to 1 ml with immunoprecipitation buffer (50 mM Hepes, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Triton 100X, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM benzamidine, 0.5 mM PMSF, 1 µg/ml of leupeptin, antipain, pepstatin and phosphatase inhibitor cocktail). Samples were pre-cleared with 30 µl of 50% slurry protein A/G (Thermo Scientific) for 2 hours at 4°C and supernatants were incubated overnight with 5 µg of anti-perilipin A

### **Statistical analysis**

Data are expressed as mean ± SEM. Statistical significance was tested using a one-way ANOVA with Newman-Keuls post-test, unless stated otherwise, with PRISM software (GraphPad, San Diego, CA).  $P < 0.05$  was considered as statistically significant.

## **Results**

### **QRFP-43 inhibits PKA induced–phosphorylation of HSL and PLIN**

Preincubation of 3T3-L1 adipocytes cells with QRFP-43 for one hour inhibited ISO (300 nM)-induced lipolysis in a dose-dependent manner with an IC<sub>50</sub> of 1 nM (Fig.1A). This response was associated with a reduction in QRFP (10 nM)-induced HSL phosphorylation by 21 and 26 % ( $P < 0.001$ ) on Ser563 (Fig. 1B) and Ser660 (Fig 1C), respectively. In a similar manner, PLIN phosphorylation was reduced by 45% ( $P < 0.001$ ) by QRFP preincubation (Fig. 1D).

### QRFP-43 decreases cAMP analogs-elicited phosphorylation of PLIN

QRFP attenuation of PLIN and HSL phosphorylation in response to  $\beta$ -adrenergic stimulation suggested that QRFP-43 may regulate PKA activity. Since PKA activation resulted from the rising of intracellular cAMP levels, we investigated the effect of QRFP-43 on lipolysis elicited with forskolin and two cAMP analogs, dibutyryl-cAMP (DB-cAMP) and 8-Bromo-cAMP (8-Br-cAMP). Excess of 8-Br-cAMP, a PDE3B hydrolysable cAMP analog and DB-cAMP, a non PDE3B-hydrolysable cAMP analog, mimic elevation of cAMP levels. 3T3-L1 adipocytes were incubated with 10 nM QRFP-43 or 10 nM insulin for 1 hour and then stimulated with 2.5  $\mu$ M of forskolin or 250  $\mu$ M of DB-cAMP or 8Br-cAMP for 30 minutes. QRFP-43 (10 nM) and insulin (10 nM) treatment of differentiated 3T3-L1 cells inhibited forskolin (2.5  $\mu$ M)-elicited glycerol release by 23 ( $P < 0.05$ ) and 43% ( $P < 0.01$ ), respectively (Fig. 2A). Lipolysis stimulated with 8-Br-cAMP (250  $\mu$ M) was inhibited by 24 ( $P < 0.01$ ) and 45% ( $P < 0.01$ ) by QRFP-43 and insulin, respectively (Fig. 2A). The antilipolytic responses of QRFP-43 and insulin to 8Br-cAMP-elicited glycerol release were associated with a decrease of phosphorylation of Ser660 HSL at a similar extent (by 25-31%,  $P < 0.05$ ) (Fig. 2B and 2D). In a similar manner, the phosphorylation of PLIN elicited by 8Br-cAMP stimulation was reduced by 26 ( $P < 0.01$ ) and 37% ( $P < 0.001$ ) when 3T3-L1 adipocytes were treated with 10 nM QRFP-43 or 10 nM insulin, respectively (Fig. 2B and 2C). Lipolysis stimulated with DB-cAMP was inhibited to a lesser extent by QRFP-43 (43%,  $P < 0.01$ ) while insulin failed to inhibit DB-cAMP-induced lipolysis (Fig. 2A). At molecular level, both QRFP-43 and insulin failed to inhibit DB-cAMP-elicited phosphorylation of HSL at Ser660 (Fig. 2B and 2D). However, PLIN phosphorylation was reduced by 28% ( $P < 0.05$ ) in QRFP-43 treated adipocytes while in insulin treatment, no reduction was observed (Fig. 2B and 2C).

### **QRFP-43 activates PI3K/Akt pathway, but not PDE3B**

Activation of PI3K/Akt/PDE3B pathway is an efficient mechanism of regulating intracellular cAMP levels. Given that QRFP-43 inhibited lipolysis induced with DB-cAMP, a non PDE3B-hydrolysable cAMP analog, we next addressed whether GPR103b activation modulates PI3K/Akt/PDE3B pathway. Differentiated 3T3-L1 cells were preincubated with 10 nM QRFP-43 and then stimulated with 300 nM ISO. QRFP-43 increased the phosphorylation of Akt on Ser473 by 44% ( $P < 0.001$ ) compared with ISO alone (Fig. 3A). The specificity of this effect was shown using pharmacological inhibitors of PI3K (10  $\mu$ M LY294002) and Akt (5  $\mu$ M SH-5), which completely reversed the antilipolytic effect of QRFP-43 (Fig. 3B and 3C). These data suggested that QRFP-43 signals, at least in part, through the PI3K/Akt pathway to inhibit lipolysis.

We seek to address whether QRFP-43 activation of the PI3K/Akt pathway leading to the activation of PDE3B. To this aim, differentiated 3T3-L1 cells were preincubated with 10 nM QRFP-43 or 10 nM insulin in presence of 250 nM cilostamide, a pharmacological inhibitor of PDE3B and then stimulated with 300 nM ISO. Both QRFP-43 and insulin inhibited ISO-elicited glycerol release by 23 and 30% ( $P < 0.01$ ), respectively (Fig. 3D). Cilostamide treatment did not modulate ISO-elicited glycerol release or the antilipolytic effect of QRFP-43 (Fig. 3D). However, cilostamide prevented the inhibitory effect of insulin (Fig. 3D). These results suggest that PDE3B was not primarily involved in QRFP-43 antilipolytic effect.

### **QRFP-43 inhibits PKC and Src kinase activation**

Previous studies have shown that PKC and Src kinases are activated following  $\beta$ -adrenergic receptors stimulation in adipocytes [17,37]. Therefore, we have test the effects of QRFP-43 on these kinases. To this aim, 3T3-L1 adipocytes were preincubated

with QRFP-43 (10 nM) in the presence or absence of 2  $\mu$ M GF109230x or 5  $\mu$ M PP2, inhibitor of PKC and Src kinases, respectively. Lipolysis was stimulated with 300 nM ISO. ISO-elicited glycerol release in 3T3-L1 adipocytes was reduced by 30 and 22% ( $P < 0.001$ ) following treatment with GF109230x and QRFP-43, respectively (Fig. 4A), whereas the inhibitory effect of QRFP-43 and GF109530 was additive ( $P < 0.01$ ). Treatment with PP2 elicited a 25% ( $P < 0.001$ ) reduction of ISO induced-lipolysis, to the same extent as that observed with QRFP-43 or GF109230x and the combined treatment with QRF-43 and PP2 did not further reduce (Fig. 4A).

We further investigated the involvement of QRFP-43 in modulating PKC-induced lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. Adipocytes were preincubated with or without QRFP-43 in the presence or in absence of GF109230x. Lipolysis was stimulated with 4  $\mu$ M PMA. As shown in Fig. 4B, QRFP-43 and GF109230x attenuated PMA-induced lipolysis by 28 and 68% ( $P < 0.001$ ), respectively. Again, the effect of QRFP-43 and GF109230X were additive, resulting in complete inhibition of lipolysis. In contrast, PP2 did not abrogate PMA stimulation of lipolysis.

We next seek to address whether QRFP-43 treatment may lead to the inhibition of Src kinases and ERK1/2 which are also activated by  $\beta$ -adrenergic receptor ligands [37]. In agreement, lipolysis stimulation with 300 nM ISO resulted in the activation of ERK1/2 and Src kinases in 3T3-L1 adipocytes and QRFP preincubation reduced by 37 ( $P < 0.01$ ) and 48% ( $P < 0.01$ ) the phosphorylation of ERK1/2 and Src kinases, respectively (Fig. 4C and 4D). Incubation of QRFP-43 on 3T3-L1 adipocytes without ISO stimulation did not activate these kinases as compared to the basal.

**QRFP-43 treatment disrupts the complex formed of PKA-c, CAV-1, phospho-Ser660 HSL and PLIN at the lipid droplet level**

Activation of PKC and Src kinases was reported to modulate the translocation of CAV-1 from the inner surface of plasma membrane to the lipid droplet surface [5,6,25]. We investigated the effect of QRFP-43 in inhibiting CAV-1 translocation which is known to facilitate the phosphorylation of PLIN in adipocytes [25]. Translocation of CAV-1 to lipid droplet was stimulated by 10  $\mu$ g/ml cholesterol for 10 minutes in 3T3-L1 adipocytes preincubated, or not, with 10 nM QRFP-43 or 5  $\mu$ M PP2 for 1 hour. The results show an increase in the ratio of lipid droplet CAV-1/total PLIN elicited by cholesterol whereas treatment with PP2 and QRFP-43 prevented CAV-1 translocation (Fig. 5A).  $\beta$ -adrenergic receptor stimulation also induced CAV-1 translocation to the lipid droplet surface which was inhibited by QRFP-43 by 46% ( $P < 0.01$ ) (Fig. 5A and 5B). ISO also increased the amount of PKA-c, phosphorylated PLIN and HSL (Ser660) at the lipid droplet surface (Fig. 5B). Treatment with QRFP-43 markedly reduced by 2-fold the phosphorylation of both PLIN and HSL as well as that of PKA-c by 50% ( $P < 0.001$ ) (Fig. 5B). Phosphorylated HSL on Ser660, CAV-1 and PKA-c were associated with PLIN phosphorylation upon ISO stimulated-lipolysis, as assessed by co-immunoprecipitation experiments of lipid droplets proteins (Fig. 5C). QRFP-43 treatment markedly decreased the presence of these proteins on lipid droplets (Fig. 5C).

## Discussion

In the present study, we show that the antilipolytic effect of QRFP-43 are associated with the blockade of CAV-1 translocation to the lipid droplet in 3T3-L1 adipocytes, leading to the breakdown of the complex formed of CAV-1, PKA-c and phosphorylated PLIN and HSL (pSer660). The breakdown of the complex prevented the phosphorylation of PLIN upon  $\beta$ -adrenergic receptor stimulation. QRFP-43 also elicited Akt activation through the phosphorylation of Ser473 and the specific inhibition of either Akt or PI3K resulted in the loss of QRFP-43 antilipolytic effect. However, activation of the PI3K/Akt pathway did not result in PDE3B activation. Indeed,



inhibition of PDE3B using either a specific inhibitor (cilostamide) or a non-hydrolysable cAMP failed to inhibit the antilipolytic effect of QRFP-43. In addition, QRFP-43 reduced ISO-induced phosphorylation of HSL at both serine residues 563 and 660. We also showed that QRFP-43 decreased  $\beta$ -adrenergic receptors activation of the Src kinase pathway and PMA-elicited glycerol release.

We have previously reported that QRFP peptides stimulate adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes and enhance fatty acid uptake [30]. We also reported that adipocytes and adipose tissue express only GPR103b, one of the two GPR103 receptor subtypes in mice and rats, and that knockdown of GPR103b completely abolished the adipogenic effects of QRFP peptides [30]. GPR103b signaling was associated with the elevation of intracellular calcium [42], while that of GPR103a showed both intracellular calcium elevation and decreased cAMP concentrations [18,21,42] in transfected cells stimulated with QRFP peptides, suggesting that the GRP103 receptor is coupled with  $G_q$  and/or  $G_{i/o}$  proteins. The latter were recently shown to be involved in apelin antilipolytic effects, a novel adipokine which was also shown to decrease HSL phosphorylation on Ser660 [48].

In adipocytes, catecholamine-induced phosphorylation of HSL on Ser660 was reported to activate and promote HSL translocation from the cytosol to the lipid droplet [8,40]. Yet, catecholamine-induced phosphorylation of PLIN on lipid droplet is essential for the activity of the lipase, as PLIN was reported to function as a lipase barrier [9,41]. In agreement, our results showed that ISO-induced phosphorylation of HSL on Ser563 and Ser660 and of PLIN. QRFP-43 pretreatment of 3T3-L1 adipocytes prevented ISO-induced phosphorylation of PLIN and HSL, suggesting that GPR103b activation targets PKA activity. Indeed, it is well established that PKA is the upstream kinase that phosphorylates PLIN at multiple sites [27] and HSL on Ser563 and Ser660 [40]. PKA is regulated by cAMP, which is dependent on adenylyl cyclase activity, or

the PI3K/Akt/PDE3B pathway. The latter is well-characterized in mediating insulin antilipolytic effect in adipocytes, as a cascade involving the recruitment of insulin receptor substrate and PI3K and the activation of Akt, which in turn phosphorylates and activates PDE3B [14,49]. PDE3B, through hydrolysing cAMP, reduces PKA activity and thus, the phosphorylation of HSL and PLIN [1,32]. Using two cAMP analogs to mimic the elevation of cAMP levels, we showed that QRFP-43 treatment still decreased PLIN phosphorylation but did not alter phospho-Ser660-HSL in DB-cAMP-induced lipolysis, a non PDE3B hydrolysable cAMP analog. In contrast to QRFP-43 treatment, insulin treatment in 3T3-L1 adipocytes failed to reduce HSL and PLIN phosphorylation in DB-cAMP-induced-lipolysis. However, both QRFP-43 and insulin treatments prevented phosphorylation of PLIN and Ser660-HSL in 8Br-cAMP-induced lipolysis in 3T3-L1 adipocytes, a PDE3B hydrolysable cAMP analog. It is likely that the inhibition of HSL phosphorylation by QRFP-43 involves the activation of PDE3B. Further studies using pharmacological inhibitors showed that QRFP-43, although inducing the activation of Akt, did not activate PDE3B. Furthermore, specific inhibition of PI3K and Akt completely abrogated QRFP-43 inhibition of ISO-elicited glycerol release and phosphorylation of PLIN and HSL. Consistent with these observations, the antilipolytic effect of insulin was reported to be reversed in adipocytes by PI3K and Akt inhibitors [47]. However, unlike insulin, the specific inhibition of PDE3B failed to reverse QRFP-43 antilipolytic effect. Overall, these results indicate that the mechanisms of the antilipolytic effects of QRFP-43 involve the inhibition of PLIN and HSL (Ser660) phosphorylation.

Mechanisms of inhibition of ISO-induced PLIN phosphorylation by QRFP-43 were investigated. Our results demonstrate, by co-immunoprecipitation, that ISO promoted an active complex formation of PLIN, CAV-1, PKA-c and phospho-Ser660-HSL at the surface of lipid droplets. Our results are consistent with previous studies which reported that  $\beta$ 3-adrenergic receptors stimulation promotes translocation of

phospho-Ser660 HSL and PKA-c at the lipid droplet level in adipocytes [1]. CAV-1 was shown to be essential for the translocation of both phospho-Ser660 HSL and PKA-c to lipid droplets in adipocytes. Indeed, adipocytes from CAV-1-null mice exhibit markedly attenuated lipolytic activity [1,13]. Mechanistically, although PKA activity was greatly increased in CAV-1-null adipocytes, the phosphorylation of PLIN was dramatically reduced, indicating that CAV-1 may facilitate PKA-c-mediated phosphorylation of PLIN [13]. Moreover,  $\beta_3$ -adrenergic receptor activation in adipocytes from CAV-1-null mice or knockdown of CAV-1 in 3T3-L1 adipocytes resulted in the disruption of PLIN/PKA-c/CAV-1 complex formation compared to cells from wild type mice [1,13]. It was also reported that CAV-1 and -2 can be redirected from plasmalemmal caveolae to intracellular lipid droplets in a variety of cell types [33,34]. Consistent with this, QRFP-43 treatment inhibited the translocation of CAV-1 and prevented the association of CAV-1, PKA-c and phospho-Ser660 HSL with PLIN on the lipid droplet. In adipocytes, CAV-1 translocation was shown to be induced by cholesterol treatment in a Src kinase- and PKC-dependent manner [5,25]. In agreement, we found that cholesterol treatment increased the amount of CAV-1 on lipid droplets and preincubation with PP2 or GF109230x decreased CAV-1 amount on lipid droplets. Moreover, pretreatment with QRFP-43 also resulted in a decrease of CAV-1 on lipid droplets after stimulation by either cholesterol or ISO in 3T3-L1 adipocytes.

Previous studies have demonstrated that  $\beta_3$ -adrenergic receptors mediate Src kinases activation in adipocytes [37]. Activated Src kinases lead to ERK1/2 activation in isolated and 3T3-L1 adipocytes [24,37] and this pathway accounted for about 30% of  $\beta_3$ -adrenergic stimulating lipolysis in adipocytes [37]. Src kinases contain many phosphorylation sites, but autophosphorylation of Tyr416 in the activation loop is critical to the full activation of these proteins [44]. In addition, constitutively active Src kinases expressed in 3T3-L1 adipocytes leads to high levels of CAV-1 association with lipid droplets in absence of stimulation [25]. In this study, we showed that ISO-elicited

Tyr416 Src kinases and ERK1/2 phosphorylation is completely prevented by QRFP-43. These results suggest that GPR103b inhibits Src kinases activation to disrupt the association between CAV-1, PKA-c, phosphorylated Ser660 HSL and PLIN. Moreover, we show that QRFP-43 and PKC inhibitors show additive effect in decreasing ISO- and PMA-elicited glycerol release. There is some evidence that G<sub>s</sub>-coupled receptors, e.g.  $\beta_3$ -adrenergic receptors, as well as PMA-elicited lipolysis, are associated with the activation of both conventional and novel PKC isoforms in adipocytes [11,31]. On the one hand, it has been established that both PKA and PKC pathways actively cooperate in order to stimulate lipolysis in 3T3-L1 adipocytes [17], and that specific inhibition of conventional PKC inhibited thyroid stimulating hormone receptor-Gs protein, mediating lipolysis and PLIN phosphorylation in human adipocytes [45]. On the other hand, conventional and novel PKC activation following longterm treatment with PMA leads to its degradation and to the induction of lipolysis in rat and 3T3-L1 adipocytes [31]. Altogether, it is likely that QRFP-43 treatment might prevent the activation and degradation of conventional and novel PKC. Further studies will be necessary to delineate the role of PKC in mediating the effects of GPR103b.

In conclusion, the inhibitory effect of QRFP-43 on ISO-induced lipolysis mediated by GPR103b result, at least in part, from the inhibition of PLIN phosphorylation and the trafficking of CAV-1 and PKA-c to the lipid droplet. The stimulation of GPR103b signaling by QRFP-43 in ISO-induced lipolysis also activates the PI3K/Akt pathway and inhibits the activity of both PKC and Src kinase.

### **Acknowledgments**

This work was supported by an educational grant from Aeterna-Zentaris, Inc. M.M. is a recipient of a scholarship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and from the Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament (GRUM).

## Legends

**Fig. 1.** QRFP-43 inhibits isoproterenol (ISO)-induced phosphorylation of perilipin (PLIN) and hormone-sensitive lipase (HSL). (A) QRFP-43 inhibits ISO-induced lipolysis in dose-dependent manner. Starved differentiated 3T3-L1 cells were pretreated with different concentration of QRFP-43 for 60 minutes and stimulated with ISO (300 nM) for 30 minutes. Data are expressed as lipolysis index (Sample free glycerol concentration - mean of vehicle treated concentration)/(mean of ISO-elicited free glycerol concentration - mean of vehicle treated concentration). (B) Differentiated 3T3-L1 cells were starved overnight in DMEM-0.2% BSA and pretreated for 60 minutes with QRFP-43 (10 nM) and stimulated 10 minutes with ISO (300 nM). Total proteins were subjected to SDS-PAGE. Immunoblots for  $\beta$ -actin, phospho-Ser563 and -Ser660 HSL, phospho-PLIN using phospho (Ser/Thr)-PKA substrate antibody to detect protein at 64kDa and total HSL and PLIN were performed on cell lysates. Data are expressed as mean  $\pm$  SE. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$  and \*\*\*,  $P < 0.001$  vs ISO.  $N = 3$  separate experiments performed in triplicate.

**Fig. 2.** QRFP-43 inhibits on cAMP analogs elicited phosphorylation of PLIN and HSL. (A) 3T3-L1 differentiated cells were subjected to forskolin-, dibutyryl-cAMP (DB-cAMP)- or 8 bromo-cAMP (8Br-cAMP)-elicited glycerol release in presence of QRFP-43 (10 nM) or insulin (10 nM) for 2 hours. (B) Immunoblots of phospho-PLIN using phospho (Ser/Thr)-PKA substrate antibody to detect protein at 64kDa, phospho-Ser660 HSL, and total HSL and PLIN were performed on cell lysates. Differentiated 3T3-L1 cells were starved overnight in DMEM-BSA (0.2%) and preincubated for 60 minutes with QRFP-43 (10 nM) or insulin (10 nM) and stimulated 20 minutes with dibutyryl-cAMP (DB-cAMP, 250  $\mu$ M) or 8 bromo-cAMP (8Br-cAMP, 250  $\mu$ M).

Phosphorylated/total ratio of PLIN (C) and HSL (D) . Data are expressed as mean  $\pm$  SE. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$  and \*\*\*,  $P < 0.001$  vs vehicle. N = 4 separate experiments.

**Fig. 3.** QRFP-43 activation of PI3K/Akt pathway does not activate PDE3B. (A) Immunoblot of phospho-Ser473 and total Akt in cell lysate. Starved 3T3-L1 differentiated cells were pretreated with vehicle or QRFP-43 (10 nM) for 60 minutes and then stimulated with ISO (300 nM) for 10 minutes. (B) 3T3-L1 differentiated cells were pretreated with QRFP-43 in presence or absence of the Akt inhibitor (SH-5) and of the PI3K inhibitor (LY294002) for 60 minutes and subjected to ISO induced-lipolysis for 30 minutes. (C) Immunoblots of phospho-PLIN using phospho (Ser/Thr)-PKA substrate antibody to detect protein at 64kDa, phospho-Ser660 HSL, and total HSL and PLIN were performed on cell lysates. Differentiated 3T3-L1 cells were starved overnight in DMEM-0.2% BSA and pretreated for 60 minutes with QRFP-43 (10 nM) in presence or in absence of PDE3B inhibitor (cilostamide) and stimulated 10 minutes with ISO (300 nM). (D) Lipolysis index. 3T3-L1 differentiated cells were pretreated with QRFP-43 or insulin in presence or absence of PDE3B inhibitor (cilostamide). Data are expressed as mean  $\pm$  SE. \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  vs ISO and #,  $P < 0.05$ ; ##,  $P < 0.01$  vs DMSO (unpaired student *t* test). N = 3 separate experiments performed in triplicate.

**Fig. 4.** QRFP-43 inhibits PKC and Src kinase activities. 3T3-L1 differentiated cells were preincubated with or without QRFP-43 (10 nM) or the PKC inhibitor, GF109230x (GF, 2  $\mu$ M) or Src kinase inhibitor, PP2 (5  $\mu$ M) for: (A) 60 minutes and stimulated with ISO (300 nM) 30 minutes; or (B) 15 minutes and stimulated with PMA (4  $\mu$ M) for 4 hours.. N = 3 experiments in triplicate. Immunoblots for total and phospho-Y416 Src kinase (C), and total and phospho-ERK1/2 (D). Cells starved for 16 hours were

preincubated with or without QRFP-43 (10 nM) for 60 minutes and stimulated with ISO for 10 minutes.. Data are expressed as mean  $\pm$  SE. \*\*,  $P < 0.01$  and \*\*\*,  $P < 0.001$  vs stimulated cells (ISO or PMA); ##,  $P < 0.01$  and ###,  $P < 0.001$  vs QRFP43-treated cells. N = 4 separate experiments performed in triplicate.

**Fig. 5.** QRFP-43 inhibits ISO-induced translocation of CAV-1 and the formation of the protein complex the lipid droplet. (A) and (B) Western blots of lipid droplet proteins. 3T3-L1 adipocytes were preincubated with QRFP-43 (10 nM) or PP2 (5  $\mu$ M) for 60 minutes and then treated with cholesterol (10  $\mu$ g/ml) or ISO (300 nM) for 10 minutes. Lipid droplets were isolated as described in materials and methods. (C) Coimmunoprecipitation. Cells lysates were immunoprecipitated with anti-perilipin A (PLIN) and immunoblotted with anti-phospho-HSL (Ser660), anti-PKA catalytic subunit (PKA-c), caveolin-1 (CAV-1) and phospho-PLIN using anti-phospho-(Ser/Thr) PKA substrates to detect protein at 64kDa. Immunoblots are representative of four different experiments. Data are expressed as mean  $\pm$  SE. \*\*,  $P < 0.01$  and \*\*\*,  $P < 0.001$  vs ISO treated, unpaired student *t* test. N = 4 separate experiments.

## References

- [1] F Ahmad, R. Lindh, Y. Tang, I. Ruishalme, A. Ost, B. Sahachartsiri, P. Stralfors, E. Degerman, V.C. Manganiello, Differential regulation of adipocyte PDE3B in distinct membrane compartments by insulin and the beta3-adrenergic receptor agonist CL316243: effects of caveolin-1 knockdown on formation/maintenance of macromolecular signalling complexes, *Biochem. J.* 424 (2009) pp. 399-410.
- [2] F Ahmad, R. Lindh, Y. Tang, M. Weston, E. Degerman, V.C. Manganiello, Insulin-induced formation of macromolecular complexes involved in activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B (PDE3B) and its interaction with PKB, *Biochem. J.* 404 (2007) pp. 257-268.
- [3] M W Anthonsen, L. Ronnstrand, C. Wernstedt, E. Degerman, C. Holm, Identification of novel phosphorylation sites in hormone-sensitive lipase that are phosphorylated in response to isoproterenol and govern activation properties in vitro, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) pp. 215-221.
- [4] A Baragli, C. Ghe, E. Arnoletti, R. Granata, E. Ghigo, G. Muccioli, Acylated and unacylated ghrelin attenuate isoproterenol-induced lipolysis in isolated rat visceral adipocytes through activation of phosphoinositide 3-kinase gamma and phosphodiesterase 3B, *Biochim. Biophys. Acta* 1811 (2011) pp. 386-396.
- [5] C M Blouin, L.S. Le, F. Lasnier, I. Dugail, E. Hajduch, Regulated association of caveolins to lipid droplets during differentiation of 3T3-L1 adipocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 376 (2008) pp. 331-335.
- [6] C M Blouin, C. Prado, K.K. Takane, F. Lasnier, A. Garcia-Ocana, P. Ferre, I. Dugail, E. Hajduch, Plasma membrane subdomain compartmentalization contributes to distinct mechanisms of ceramide action on insulin signaling, *Diabetes* 59 (2010) pp. 600-610.
- [7] R L Bradley, J.P. Mansfield, E. Maratos-Flier, Neuropeptides, including neuropeptide Y and melanocortins, mediate lipolysis in murine adipocytes, *Obes. Res.* 13 (2005) pp. 653-661.



- [8] D L Brasaemle, D.M. Levin, D.C. Adler-Wailes, C. Londos, The lipolytic stimulation of 3T3-L1 adipocytes promotes the translocation of hormone-sensitive lipase to the surfaces of lipid storage droplets, *Biochim. Biophys. Acta* 1483 (2000) pp. 251-262.
- [9] D L Brasaemle, B. Rubin, I.A. Harten, J. Gruia-Gray, A.R. Kimmel, C. Londos, Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) pp. 38486-38493.
- [10] N Chartrel, C. Dujardin, Y. Anouar, J. Leprince, A. Decker, S. Clerens, J.C. Do-Rego, F. Vandesande, C. Llorens-Cortes, J. Costentin, J.C. Beauvillain, H. Vaudry, Identification of 26RFa, a hypothalamic neuropeptide of the RFamide peptide family with orexigenic activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100 (2003) pp. 15247-15252.
- [11] E Chernogubova, B. Cannon, T. Bengtsson, Norepinephrine increases glucose transport in brown adipocytes via beta3-adrenoceptors through a cAMP, PKA, and PI3-kinase-dependent pathway stimulating conventional and novel PKCs, *Endocrinology* 145 (2004) pp. 269-280.
- [12] S M Choi, D.F. Tucker, D.N. Gross, R.M. Easton, L.M. DiPilato, A.S. Dean, B.R. Monks, M.J. Birnbaum, Insulin regulates adipocyte lipolysis via an Akt-independent signaling pathway, *Mol. Cell Biol.* 30 (2010) pp. 5009-5020.
- [13] A W Cohen, B. Razani, W. Schubert, T.M. Williams, X.B. Wang, P. Iyengar, D.L. Brasaemle, P.E. Scherer, M.P. Lisanti, Role of caveolin-1 in the modulation of lipolysis and lipid droplet formation, *Diabetes* 53 (2004) pp. 1261-1270.
- [14] E Degerman, T.R. Landstrom, J. Wijkander, L.S. Holst, F. Ahmad, P. Belfrage, V. Manganiello, Phosphorylation and activation of hormone-sensitive adipocyte phosphodiesterase type 3B, *Methods* 14 (1998) pp. 43-53.
- [15] J E Digby, J. Chen, J.Y. Tang, H. Lehnert, R.N. Matthews, H.S. Randeva, Orexin receptor expression in human adipose tissue: effects of orexin-A and orexin-B, *J. Endocrinol.* 191 (2006) pp. 129-136.
- [16] R E Duncan, M. Ahmadian, K. Jaworski, E. Sarkadi-Nagy, H.S. Sul, Regulation of lipolysis in adipocytes, *Annu. Rev. Nutr.* 27 (2007) pp. 79-101.
- [17] K Fricke, A. Heitland, E. Maronde, Cooperative activation of lipolysis by protein kinase A and protein kinase C pathways in 3T3-L1 adipocytes, *Endocrinology* 145 (2004) pp. 4940-4947.

- [18] S Fukusumi, H. Yoshida, R. Fujii, M. Maruyama, H. Komatsu, Y. Habata, Y. Shintani, S. Hinuma, M. Fujino, A new peptidic ligand and its receptor regulating adrenal function in rats, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) pp. 46387-46395.
- [19] A J Garton, D.G. Campbell, D. Carling, D.G. Hardie, R.J. Colbran, S.J. Yeaman, Phosphorylation of bovine hormone-sensitive lipase by the AMP-activated protein kinase. A possible antilipolytic mechanism, *Eur. J. Biochem.* 179 (1989) pp. 249-254.
- [20] A S Greenberg, W.J. Shen, K. Muliro, S. Patel, S.C. Souza, R.A. Roth, F.B. Kraemer, Stimulation of lipolysis and hormone-sensitive lipase via the extracellular signal-regulated kinase pathway, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) pp. 45456-45461.
- [21] Y Jiang, L. Luo, E.L. Gustafson, D. Yadav, M. Laverty, N. Murgolo, G. Vassileva, M. Zeng, T.M. Laz, J. Behan, P. Qiu, L. Wang, S. Wang, M. Bayne, J. Greene, F. Monsma, Jr., F.L. Zhang, Identification and characterization of a novel RF-amide peptide ligand for orphan G-protein-coupled receptor SP9155, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) pp. 27652-27657.
- [22] J Kampe, P. Wiedmer, P.T. Pfluger, T.R. Castaneda, L. Burget, H. Mondala, J. Kerr, C. Liaw, B.J. Oldfield, M.H. Tschop, D. Bagnol, Effect of central administration of QRFP(26) peptide on energy balance and characterization of a second QRFP receptor in rat, *Brain Res.* 1119 (2006) pp. 133-149.
- [23] F Kreier, E. Fliers, P.J. Voshol, C.G. Van Eden, L.M. Havekes, A. Kalsbeek, C.L. Van Heijningen, A.A. Sluiter, T.C. Mettenleiter, J.A. Romijn, H.P. Sauerwein, R.M. Buijs, Selective parasympathetic innervation of subcutaneous and intra-abdominal fat--functional implications, *J. Clin. Invest* 110 (2002) pp. 1243-1250.
- [24] N Kumar, J. Robidoux, K.W. Daniel, G. Guzman, L.M. Floering, S. Collins, Requirement of vimentin filament assembly for beta3-adrenergic receptor activation of ERK MAP kinase and lipolysis, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) pp. 9244-9250.
- [25] L S Le, E. Hajdуч, M.R. Lindsay, L. Le, X, C. Thiele, P. Ferre, R.G. Parton, T. Kurzchalia, K. Simons, I. Dugail, Cholesterol-induced caveolin targeting to lipid droplets in adipocytes: a role for caveolar endocytosis, *Traffic.* 7 (2006) pp. 549-561.
- [26] I Lefrere, C.P. De, J.C. Camelin, L.S. Le, N. Mercier, N. Elshourbagy, A. Bril, I. Berrebi-Bertrand, B. Feve, S. Krief, Neuropeptide AF and FF modulation of

adipocyte metabolism. Primary insights from functional genomics and effects on beta-adrenergic responsiveness, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) pp. 39169-39178.

- [27] S Miura, J.W. Gan, J. Brzostowski, M.J. Parisi, C.J. Schultz, C. Londos, B. Oliver, A.R. Kimmel, Functional conservation for lipid storage droplet association among Perilipin, ADRP, and TIP47 (PAT)-related proteins in mammals, *Drosophila*, and *Dictyostelium*, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) pp. 32253-32257.
- [28] H Miyoshi, S.C. Souza, H.H. Zhang, K.J. Strissel, M.A. Christoffolete, J. Kovsan, A. Rudich, F.B. Kraemer, A.C. Bianco, M.S. Obin, A.S. Greenberg, Perilipin promotes hormone-sensitive lipase-mediated adipocyte lipolysis via phosphorylation-dependent and -independent mechanisms, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) pp. 15837-15844.
- [29] R Moriya, H. Sano, T. Umeda, M. Ito, Y. Takahashi, M. Matsuda, A. Ishihara, A. Kanatani, H. Iwaasa, RFamide peptide QRFP43 causes obesity with hyperphagia and reduced thermogenesis in mice, *Endocrinology* 147 (2006) pp. 2916-2922.
- [30] M Mulumba, C. Jossart, R. Granata, D. Gallo, E. Escher, E. Ghigo, M.J. Servant, S. Marleau, H. Ong, GPR103b functions in the peripheral regulation of adipogenesis, *Mol. Endocrinol.* 24 (2010) pp. 1615-1625.
- [31] J Nakamura, Phorbol 12-myristate 13-acetate inhibits the antilipolytic action of insulin, probably via the activity of protein kinase Cepsilon, *Eur. J. Pharmacol.* 648 (2010) pp. 188-194.
- [32] R Nilsson, F. Ahmad, K. Sward, U. Andersson, M. Weston, V. Manganiello, E. Degerman, Plasma membrane cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B (PDE3B) is associated with caveolae in primary adipocytes, *Cell Signal.* 18 (2006) pp. 1713-1721.
- [33] A G Ostermeyer, J.M. Paci, Y. Zeng, D.M. Lublin, S. Munro, D.A. Brown, Accumulation of caveolin in the endoplasmic reticulum redirects the protein to lipid storage droplets, *J. Cell Biol.* 152 (2001) pp. 1071-1078.
- [34] A Pol, S. Martin, M.A. Fernandez, C. Ferguson, A. Carozzi, R. Luetterforst, C. Enrich, R.G. Parton, Dynamic and regulated association of caveolin with lipid bodies: modulation of lipid body motility and function by a dominant negative mutant, *Mol. Biol. Cell* 15 (2004) pp. 99-110.

- [35] S D Primeaux, C. Blackmon, M.J. Barnes, H.D. Braymer, G.A. Bray, Central administration of the RFamide peptides, QRFP-26 and QRFP-43, increases high fat food intake in rats, *Peptides* 29 (2008) pp. 1994-2000.
- [36] B Razani, C.S. Rubin, M.P. Lisanti, Regulation of cAMP-mediated signal transduction via interaction of caveolins with the catalytic subunit of protein kinase A, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) pp. 26353-26360.
- [37] J Robidoux, N. Kumar, K.W. Daniel, F. Moukdar, M. Cyr, A.V. Medvedev, S. Collins, Maximal beta3-adrenergic regulation of lipolysis involves Src and epidermal growth factor receptor-dependent ERK1/2 activation, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) pp. 37794-37802.
- [38] M Skrzypski, T. Le, P. Kaczmarek, E. Pruszyńska-Oszmerek, P. Pietrzak, D. Szczepankiewicz, P.A. Kolodziejcki, M. Sassek, A. Arafat, B. Wiedenmann, K.W. Nowak, M.Z. Strowski, Orexin A stimulates glucose uptake, lipid accumulation and adiponectin secretion from 3T3-L1 adipocytes and isolated primary rat adipocytes, *Diabetologia* 54 (2011) pp. 1841-1852.
- [39] D Steinberg and J.K. Huttunen, The role of cyclic AMP in activation of hormone-sensitive lipase of adipose tissue, *Adv. Cyclic. Nucleotide. Res.* 1 (1972) pp. 47-62.
- [40] C L Su, C. Sztalryd, J.A. Contreras, C. Holm, A.R. Kimmel, C. Londos, Mutational analysis of the hormone-sensitive lipase translocation reaction in adipocytes, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) pp. 43615-43619.
- [41] C Sztalryd, G. Xu, H. Dorward, J.T. Tansey, J.A. Contreras, A.R. Kimmel, C. Londos, Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation, *J. Cell Biol.* 161 (2003) pp. 1093-1103.
- [42] S Takayasu, T. Sakurai, S. Iwasaki, H. Teranishi, A. Yamanaka, S.C. Williams, H. Iguchi, Y.I. Kawasaki, Y. Ikeda, I. Sakakibara, K. Ohno, R.X. Ioka, S. Murakami, N. Dohmae, J. Xie, T. Suda, T. Motoike, T. Ohuchi, M. Yanagisawa, J. Sakai, A neuropeptide ligand of the G protein-coupled receptor GPR103 regulates feeding, behavioral arousal, and blood pressure in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103 (2006) pp. 7438-7443.
- [43] J T Tansey, C. Sztalryd, E.M. Hlavin, A.R. Kimmel, C. Londos, The central role of perilipin a in lipid metabolism and adipocyte lipolysis, *IUBMB. Life* 56 (2004) pp. 379-385.

- [44] S M Thomas and J.S. Brugge, Cellular functions regulated by Src family kinases, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13 (1997) pp. 513-609.
- [45] A B Thrush, A. Gagnon, A. Sorisky, PKC Activation is Required for TSH-mediated Lipolysis via Perilipin Activation, *Horm. Metab Res.* (2012).
- [46] H van, V, A. Dicker, E. Sjolín, L. Blomqvist, M. Wíren, J. Hoffstedt, M. Ryden, P. Arner, Effects of pain controlling neuropeptides on human fat cell lipolysis, *Int. J. Obes. (Lond)* 34 (2010) pp. 1333-1340.
- [47] J Wijkander, T.R. Landstrom, V. Manganiello, P. Belfrage, E. Degerman, Insulin-induced phosphorylation and activation of phosphodiesterase 3B in rat adipocytes: possible role for protein kinase B but not mitogen-activated protein kinase or p70 S6 kinase, *Endocrinology* 139 (1998) pp. 219-227.
- [48] P Yue, H. Jin, S. Xu, M. Aillaud, A.C. Deng, J. Azuma, R.K. Kundu, G.M. Reaven, T. Quertermous, P.S. Tsao, Apelin decreases lipolysis via G(q), G(i), and AMPK-Dependent Mechanisms, *Endocrinology* 152 (2011) pp. 59-68.
- [49] J Zhang, C.J. Hupfeld, S.S. Taylor, J.M. Olefsky, R.Y. Tsien, Insulin disrupts beta-adrenergic signalling to protein kinase A in adipocytes, *Nature* 437 (2005) pp. 569-573.

## Figures

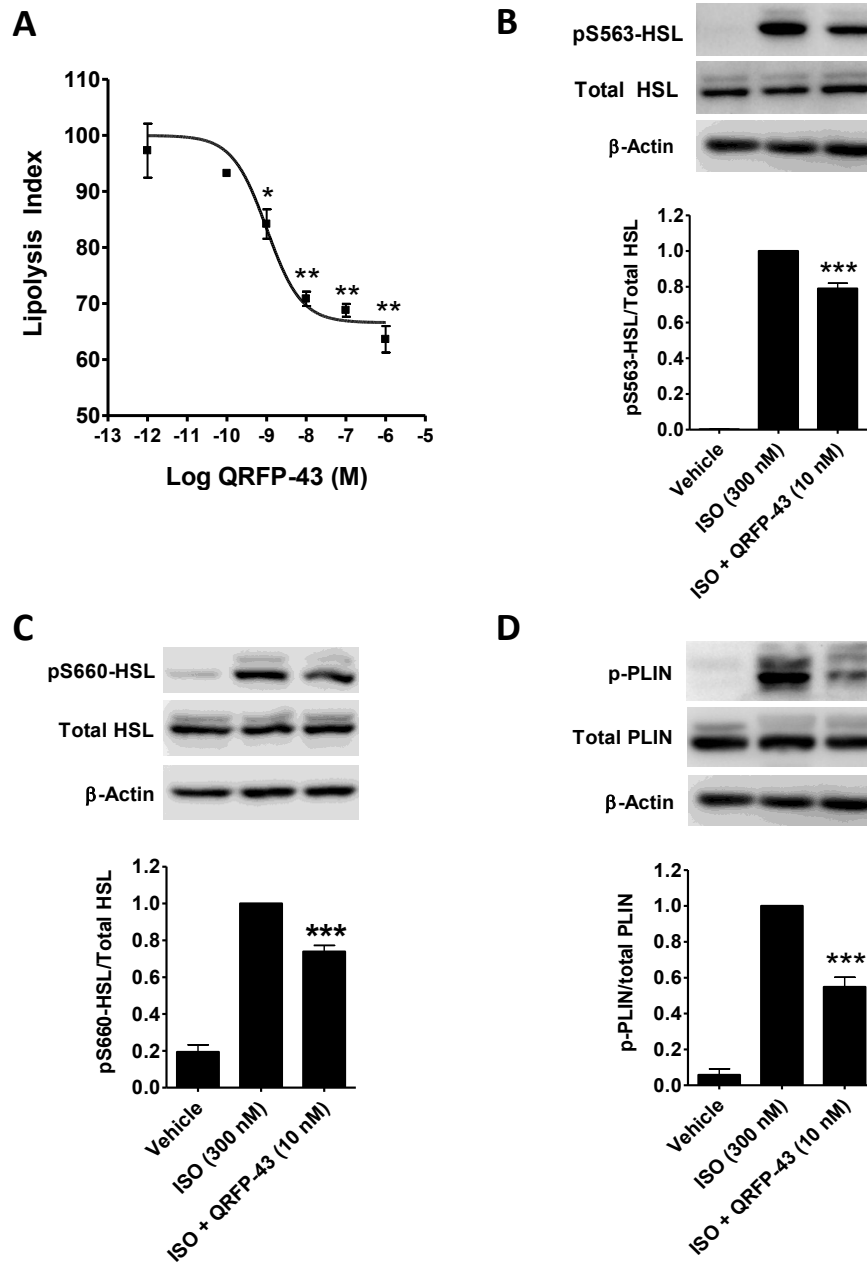


Fig.1

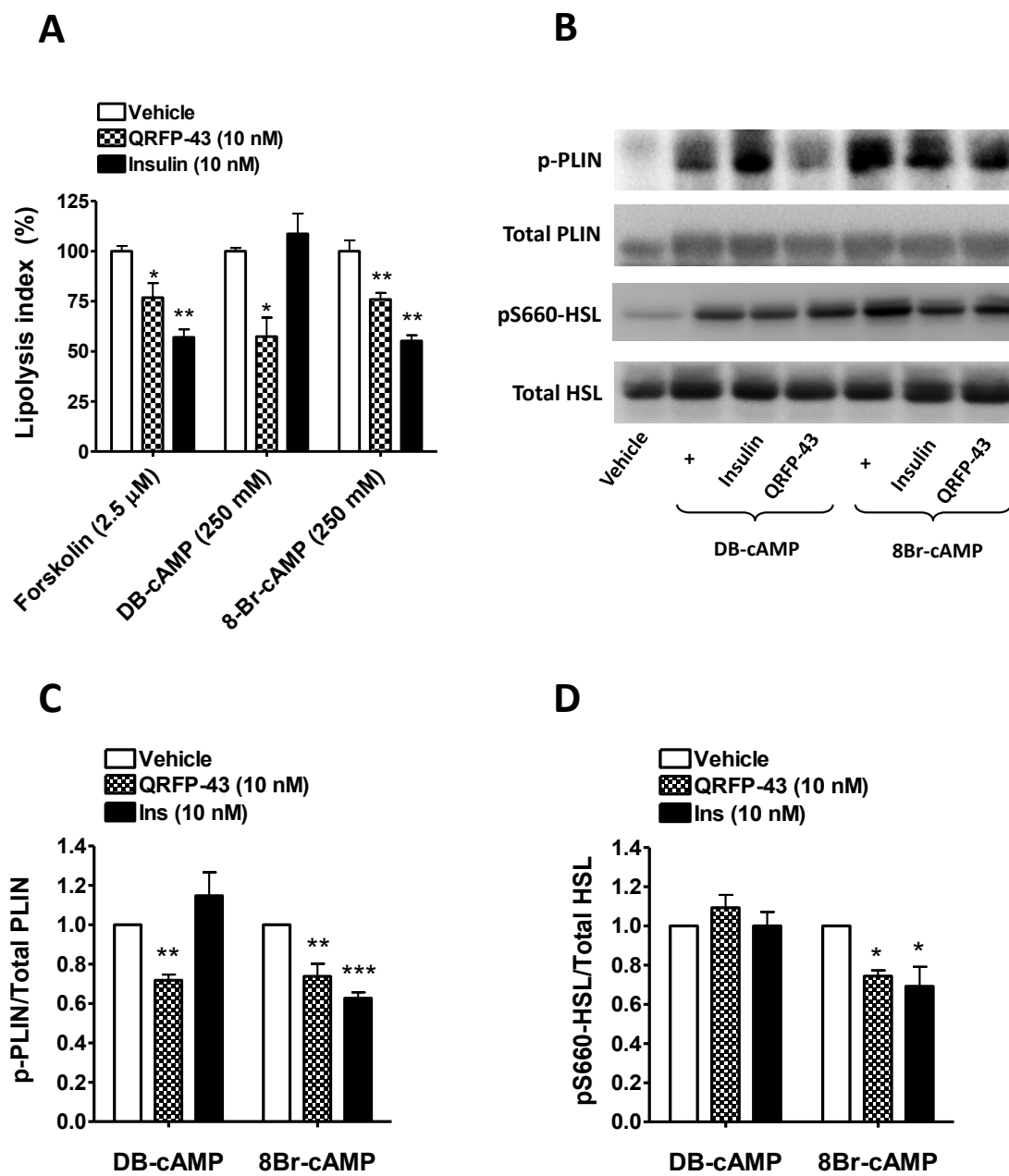


Fig.2

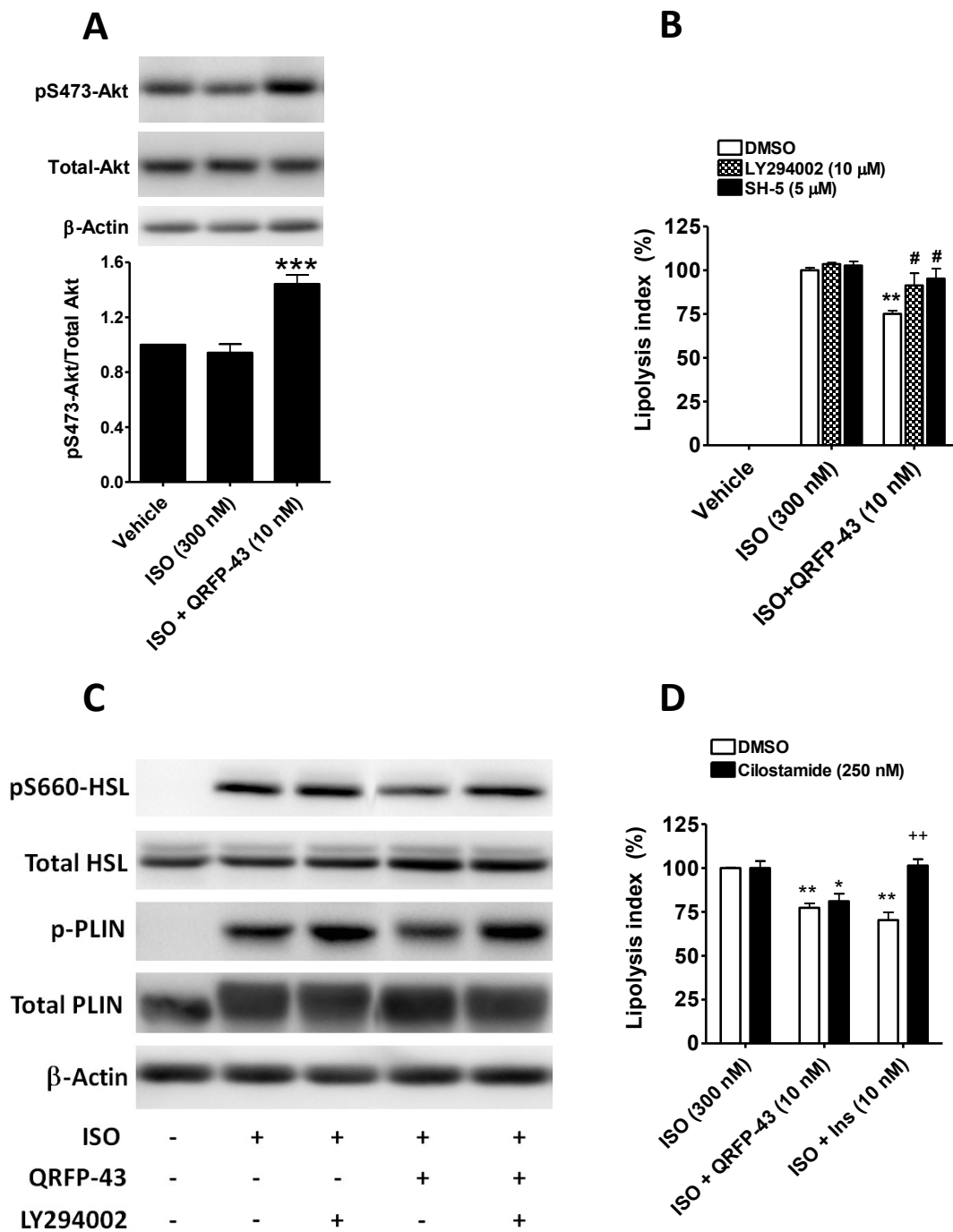


Fig.3



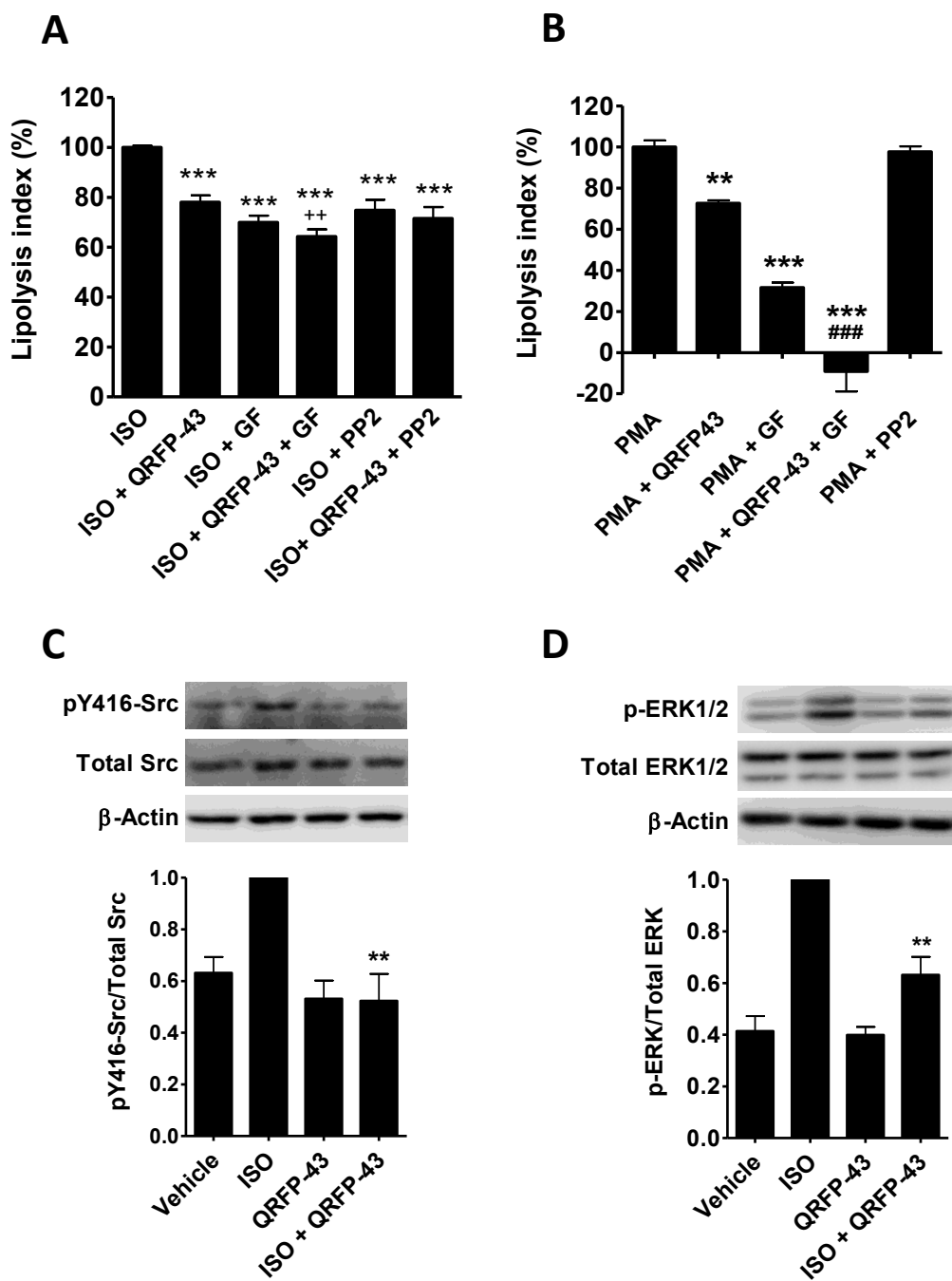


Fig.4

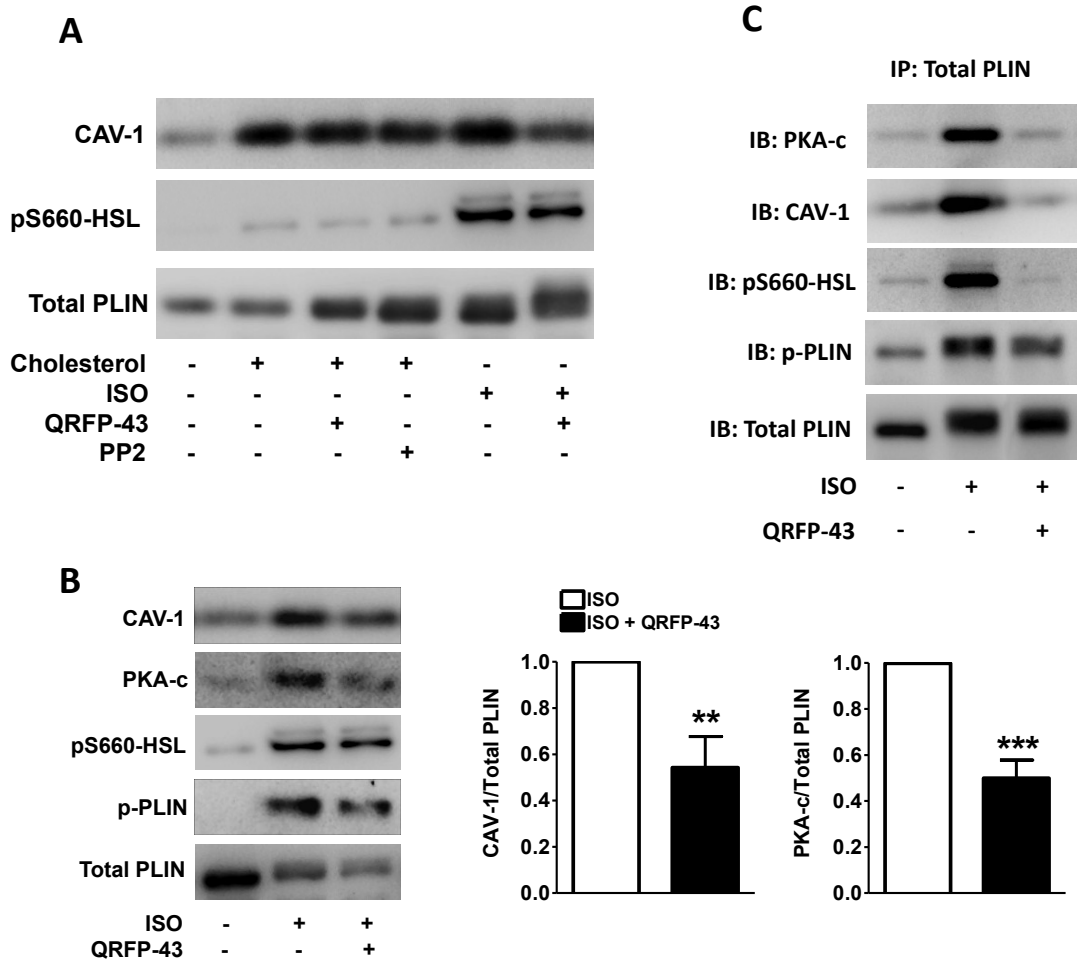


Fig. 5

## **Chapitre IV : DISCUSSION**

Les peptides QRFP isolés au niveau du cerveau exercent des effets orexigènes lorsqu'administrés de manière centrale chez les rongeurs. De plus ces peptides modifient les paramètres métaboliques chez les souris soumises à une diète riche en lipides caractérisés par une augmentation des taux plasmatiques d'insuline, de leptine et de cholestérol. Chez ces souris, une augmentation de la masse adipeuse a été observée; cette augmentation est exacerbée lorsque les souris sont soumises à une diète riche en lipides (Moriya *et al.*, 2006). Le but des travaux de cette thèse était d'investiguer le rôle des peptides QRFP au niveau périphérique en ciblant le tissu adipeux et d'élucider les mécanismes moléculaires impliqués dans l'effet adipogénique de ces peptides.

Notre premier objectif était de montrer que les peptides QRFP ont un effet direct sur le tissu adipeux en stimulant l'accumulation des TG et en inhibant leur mobilisation par le processus de lipolyse. Les travaux présentés dans cette thèse montrent que les peptides QRFP stimulent l'accumulation des lipides sous forme de TG en induisant l'activité de la LPL au niveau de la surface cellulaire adipocytaire ainsi qu'en augmentant l'expression des facteurs de transcription PPAR- $\gamma$  et C/EBP- $\alpha$ . Cette augmentation se traduit par une induction des gènes impliqués dans le transport des AGNEs dont la LPL, le CD36, la FATP1 et l'ACLS1. De plus, nous avons montré que les différents dépôts de tissus adipeux chez la souris expriment exclusivement le récepteur GPR103B ainsi que le prépro-QRFP. Nous avons aussi observé que l'obésité qui se développe suite à une diète riche en lipides s'accompagne d'une réduction de l'expression du prépro-QRFP et d'une augmentation de celle de son récepteur dans les différents dépôts adipeux.

Notre deuxième objectif était d'étudier les voies signalétiques impliquées dans l'inhibition de la lipolyse induite par l'ISO après stimulation du récepteur GPR103B. Nos travaux montrent que le peptide QRFP-43 réduit la phosphorylation des protéines

LHS et PLIN1a induites par l'ISO. L'activation du récepteur GPR103B par le QRFP-43 induit l'activation des kinases PI3-K et Akt/PKB. Contrairement à l'insuline, dont la réponse anti-lipolytique dépend de l'activation de la PDE3B via la voie PI3-K/AKT, la réponse anti-lipolytique du QRFP-43 n'implique pas l'activation de la PDE3B. En effet, l'inhibition pharmacologique de la PDE3B n'a pas permis de renverser la réponse anti-lipolytique du QRFP-43 caractérisée par une diminution de phosphorylation de la PLIN1a. Nous avons démontré que la stimulation du GPR103B par le QRFP-43 en présence de l'ISO diminue l'état de phosphorylation de la PLIN1a sur les gouttelettes lipidiques en empêchant la formation du complexe CAV-1/PLIN1a/PKA-cat/pS660-LHS. L'activation du récepteur conduit aussi à une inhibition de l'activation des kinases Src et PKC.

#### **4.1. Le GPR103B est responsable des effets adipogéniques des peptides QRFP**

Afin d'étudier les effets adipogéniques des QRFPs, nous avons déterminé le profil d'expression des sous-types du GPR103 dans les cellules 3T3-L1 étant donné que chez la souris, les GPR103A et GPR103B ont été identifiés (Takayasu *et al.*, 2006). Nos résultats ont montré une expression exclusive du sous-type B du récepteur GPR103 au niveau des adipocytes et non dans les préadipocytes 3T3-L1, cette expression étant régulée à la hausse lors de la différenciation des adipocytes (Mulumba *et al.*, 2010). Le prépro-QRFP, par contre, est présent autant dans les préadipocytes que les adipocytes 3T3-L1, et son expression augmente aussi pendant la différenciation. Nos résultats sont en accord avec ceux de Zhang (Zhang *et al.*, 2007), qui ont montré que le GPR103B est le seul sous-type présent dans le tissu adipeux épидидymaire chez la souris tandis que chez le rat, le sous-type B du GPR103 est plus exprimé que le sous-type A dans le tissu adipeux.

Le récepteur GPR103B partage près de 50% d'homologie de séquence avec le GPR74 et OX2R, récepteurs du NPY et de l'orexine A, respectivement (Jiang *et al.*, 2003b; Fukusumi *et al.*, 2003). Contrairement aux GPR103B, les messagers de ces deux récepteurs sont exprimés dans les préadipocytes murins (Herrera-Herrera & Salazar-Olivo, 2008; Lefrere *et al.*, 2002; Skrzypski *et al.*, 2012) et humains (van, V *et al.*, 2010; Digby *et al.*, 2006). Ainsi, ces peptides ont montré des propriétés de prolifération notamment chez des préadipocytes 3T3-L1, suggérant la fonctionnalité de leur récepteur respectif (Herrera-Herrera & Salazar-Olivo, 2008; van, V *et al.*, 2010; Skrzypski *et al.*, 2012). Dans nos travaux, nous n'avons pas étudié les effets des peptides QRFP sur la prolifération des préadipocytes 3T3-L1 étant donné que l'ARN messager du GPR103B n'est pas détectable.

Nous avons ensuite déterminé les effets des QRFPs sur la réponse fonctionnelle des adipocytes, à savoir l'accumulation des TG. Nos résultats ont montré que les QRFPs induisent de manière dépendante de la dose une accumulation de lipides sous formes de TG dans les cellules 3T3-L1 différenciées (Mulumba *et al.*, 2010). Nous avons observé, de façon parallèle, une augmentation de l'activité de la LPL à la surface cellulaire des adipocytes 3T3-L1, ainsi qu'une augmentation de l'expression des biomarqueurs du transport et de l'accumulation d'AG, tels que le CD36, FAT1 et ACSL1 (Mulumba *et al.*, 2010). Nos résultats ont montré que les QRFPs favorisent l'adipogenèse en induisant l'expression des facteurs de transcription PPAR- $\gamma$ 2 et C/EBP- $\alpha$ . Ces deux facteurs de transcription jouent un rôle essentiel dans l'acquisition du phénotype adipocytaire en contrôlant l'expression d'une panoplie de gènes dont le CD36, la LPL, la FAT1 et l'ACSL1 (Rosen *et al.*, 1999; Lane *et al.*, 1996). Ces résultats suggèrent que ces peptides favorisent l'anabolisme cellulaire. En effet, l'administration i.c.v. du QRFP-43 a montré des effets anaboliques caractérisés par des taux plasmatiques élevés d'insuline, de faibles taux circulants d'AGNEs et une thermogenèse diminuée (Moriya *et al.*, 2006).

Des propriétés anaboliques semblables aux QRFPs ont été observées avec certains peptides orexigènes. Ainsi, l'orexine-A stimule une accumulation de TG dans les adipocytes 3T3-L1 (Skrzypski *et al.*, 2011) et dans les adipocytes isolés des tissus sous-cutanés et de l'omentum humain (Digby *et al.*, 2006). Cette accumulation résulte d'une activation de la lipogenèse ainsi que d'une activation et d'une régulation à la hausse de PPAR- $\gamma$  dans ces cellules. L'orexine-A induit la lipogenèse en stimulant l'expression de GLUT4 et le transport du glucose dans les adipocytes isolés de souris et dans les adipocytes 3T3-L1 (Skrzypski *et al.*, 2011). Il est de même pour le NPY qui stimule l'accumulation de lipides et une augmentation de l'expression de PPAR- $\gamma$  dans les adipocytes 3T3-L1 médiées par les récepteurs Y2 et Y5 (Rosmaninho-Salgado *et al.*, 2012a). La stimulation de l'accumulation de lipides via ces deux récepteurs implique la PI3-K, car l'inhibition de celle-ci bloque l'accumulation de lipides induite par le NPY (Rosmaninho-Salgado *et al.*, 2012b). La même situation est observée avec la ghréline qui favorise l'accumulation des lipides, autant dans les adipocytes murins que humains, en induisant l'expression du PPAR- $\gamma$  et celle de SREBP-1c (Choi *et al.*, 2003). Ceci résulte en une hausse de l'expression des gènes tels que l'ACC1, la FAS, la LPL, la PLIN1a (Miegeu *et al.*, 2011; Rodriguez *et al.*, 2009; Choi *et al.*, 2003). De la même manière, la désacyl-ghréline stimule l'adipogenèse notamment des adipocytes médullaires (Thompson *et al.*, 2004). Dans ces derniers, les effets de la ghréline et de la désacyl-ghréline ne sont pas médiés par le GHS-R1a. En effet, la perfusion dans le tibia de rat du L-163255, un agoniste du GHS-R1a (Moulas *et al.*, 2002), ne stimule pas la différenciation des préadipocytes médullaires, contrairement à la ghréline et à la désacyl-ghréline (Thompson *et al.*, 2004). Sur des préadipocytes 3T3-L1, la ghréline ne stimule pas la différenciation mais favorise la prolifération des cellules (Zhang *et al.*, 2004b). La réponse positive de la ghréline sur la différenciation adipocytaire n'est observée que lorsque celle-ci est soit incluse dans le cocktail de différenciation, soit ajoutée dans le milieu d'incubation après l'initiation de la différenciation (Choi *et al.*,

2003; Rodriguez *et al.*, 2009). Récemment, il a été montré que l'expression du prépro-ghréline dans les cellules 3T3-L1 pendant la différenciation dépend de la présence de l'insuline dans le cocktail de différenciation (Gurriaran-Rodriguez *et al.*, 2011). En effet, étant présent dans les préadipocytes, l'expression du prépro-ghréline n'est pas régulée à la hausse lorsque l'insuline est omise dans le cocktail de différenciation (Gurriaran-Rodriguez *et al.*, 2011). Dans nos travaux, l'expression du prépro-QRFP augmente lorsque les cellules 3T3-L1 sont traitées par un milieu avec insuline pendant la différenciation (voir matériels et méthodes de l'article 1). Ce traitement intervient au jour 4 après le début de la différenciation (Mulumba *et al.*, 2010). Il est probable que l'insuline influence l'expression du prépro-QRFP dans les adipocytes 3T3-L1, toutefois cette hypothèse reste à démontrer.

Par ailleurs, nous avons montré que les effets adipogéniques des QRFPs dépendent de l'expression du récepteur GPR103B dans les adipocytes 3T3-L1. En effet, l'inactivation du gène *GPR103B* par une approche shARN (*short hairpin* ARN) conduit aussi bien à la perte totale de l'accumulation des TG qu'à celle de l'expression des marqueurs de l'adipogenèse, validant le rôle du GPR103B comme le récepteur responsable des effets des QRFP au niveau du tissu adipeux blanc. Au niveau central, des sites de liaison autres que le GPR103 ont été détectés dans certaines régions du noyau thalamique et de la corne dorsale de la moelle épinière (Bruzzone *et al.*, 2007). Les auteurs de ces travaux ont suggéré que dans ces régions, les QRFPs pourraient lier le récepteur GPR74 (Bruzzone *et al.*, 2007). Ce récepteur est aussi exprimé au niveau des adipocytes humains et murins et son activation induirait l'inhibition de la lipolyse (van, V *et al.*, 2010; Dahlman *et al.*, 2007; Lefrere *et al.*, 2002). Toutefois, le rôle du récepteur GPR74 médiant l'activité des QRFPs au niveau adipocytaire reste à déterminer.



## 4.2. L'obésité module l'expression du GPR103B et du prépro-QRFP

Les données que nous avons obtenues sur l'accumulation des TG dans les adipocytes 3T3-L1 sont en accord avec les résultats des travaux de Moriya et de ses collaborateurs montrant que l'administration i.c.v. du QRFP-43 à des souris conduit à l'obésité (Moriya *et al.*, 2006). Dans une autre étude, il a été montré que l'obésité module l'expression du prépro-QRFP (Takayasu *et al.*, 2006). En effet, dans les modèles génétiques de souris obèses de type *ob/ob* ou *db/db* à jeun ou sous diète normale, l'expression génique du prépro-QRFP est augmentée dans l'hypothalamus (Takayasu *et al.*, 2006), mais rien n'était alors connu quant à son expression périphérique. Nous avons entrepris d'évaluer l'impact de l'obésité sur l'expression génique du GPR103B et du prépro-QRFP au niveau des différents dépôts adipeux chez la souris. Afin d'atteindre cet objectif, nous avons soumis des souris à une diète riche en lipides pendant 18 et 24 semaines. L'obésité induite par une diète riche en lipides chez la souris mime le développement de l'obésité chez l'homme en ce sens qu'on observe une résistance à la leptine suite à une alimentation riche en lipides (White *et al.*, 2009; Morrison, 2008; Tschop & Heiman, 2002). Contrairement à ce qui a été observé au niveau de l'hypothalamus, l'expression génique du prépro-QRFP est fortement diminuée dans les différents dépôts adipeux blancs chez la souris tandis que l'expression du GPR103B est augmentée. Cette augmentation est plus marquée dans le tissu adipeux épидидymaire, suggérant un rôle du GPR103B dans le métabolisme du tissu adipeux abdominal. Nous avons investigué si la diminution de l'expression du prépro-QRFP était due à l'augmentation de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ . En effet, l'obésité est associée à un état d'inflammation chronique résultant d'une infiltration de macrophages dans le tissu adipeux (Weisberg *et al.*, 2003). Cette accumulation de macrophages au sein du tissu adipeux serait en majeure partie

responsable de la forte production de cytokines inflammatoires observée au cours de l'obésité (Clement *et al.*, 2004). De plus, il a été démontré qu'après seize semaines d'un régime riche en lipides chez la souris, il y a une accumulation de macrophages et une forte sécrétion locale de TNF- $\alpha$  dans le tissu adipeux blanc, et qu'à plus de vingt semaines sous régime riche en lipides (Xu *et al.*, 2003), l'inflammation se propage au niveau systémique tel que démontré par des taux élevés de cytokines pro-inflammatoires dont le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 (Tilg & Moschen, 2008; Stelzer *et al.*, 2012). Les taux plasmatiques élevés de TNF- $\alpha$  sont associés à la résistance à l'insuline (Tilg & Moschen, 2008; Xu *et al.*, 2003). Nous avons montré qu'un traitement par le TNF- $\alpha$  pendant 48 heures réduit l'expression du prépro-QRFP dans les adipocytes 3T3-L1 (Mulumba *et al.*, 2010). Il a été montré que le TNF- $\alpha$  induit de façon dépendante de la dose la résistance à l'insuline en empêchant le recrutement de l'IRS-1 au niveau de l'RI et la translocation du GLUT4 au niveau de la membrane dans les adipocytes 3T3-L1 (Stephens *et al.*, 1997). Outre le fait d'induire la résistance à l'insuline chez les adipocytes 3T3-L1, le TNF- $\alpha$  réduit l'expression de plusieurs gènes adipogéniques, dont le PPAR- $\gamma$  (Ruan *et al.*, 2002).

### **4.3. L'activation du GPR103B inhibe la mobilisation des lipides**

En plus de stimuler l'accumulation de lipides, nous avons montré que les QRFPs inhibent la mobilisation des TG dans les adipocytes 3T3-L1 (Mulumba *et al.*, 2010). En effet, lorsque la lipolyse est induite par l'ISO dans les adipocytes 3T3-L1, les QRFPs inhibent de façon dépendante de la dose cette lipolyse (Mulumba *et al.*, 2010). Il en est de même pour les adipocytes omentaux de l'humain, dans lesquels les ARNm du récepteur GPR103 et du prépro-QRFP sont exprimés, et dont la lipolyse induite par l'ISO est inhibée par le QRFP-43 (Mulumba *et al.*, 2010). Comme dans le cas de l'accumulation des TG dans les adipocytes 3T3-L1, l'inactivation du gène *GPR103B* a

complètement aboli l'effet anti-lipolytique des QRFPs (Mulumba *et al.*, 2010). Les voies de signalisation médiées par le GPR103B n'étant pas encore connues, nous avons entrepris de les caractériser dans les effets anti-lipolytiques du QRFP-43. Nous avons donc utilisé les cellules 3T3-L1 différenciées en adipocytes traitées par le QRFP-43 à une concentration de 10 nM. À cette concentration, qui se situe à une décade du  $CI_{50}$ , l'effet anti-lipolytique du QRFP-43 est facilement détectable chez les adipocytes 3T3-L1. Le choix du peptide de 43 acides aminés (QRFP-43) au lieu du QRFP-26 pour ces études est basé sur le fait que le peptide de 43 acides aminés présente une affinité de liaison plus importante envers le GPR103B (Takayasu *et al.*, 2006; Fukusumi *et al.*, 2003). Nos résultats ont montré que l'effet anti-lipolytique du QRFP-43 sur la lipolyse induite par l'ISO s'accompagne d'une réduction de 26 et 45% de la phosphorylation de la LHS et de la PLIN1a, respectivement (Mulumba *et al.* 2013).

#### **4.3.1. L'activation du GPR103B conduit à l'activation de la voie de PI3-K/AKT**

Une voie bien connue de l'inhibition de la lipolyse est celle de PI3-K/Akt/PDE3B caractérisée dans l'inhibition de la lipolyse par l'insuline. L'activation des kinases PI3-K et Akt par l'insuline conduit à l'activation de la PDE3B qui va réduire les taux intracellulaires d'AMPc, ce qui engendre une réduction de l'activité de PKA (voir section 2.5.6.2.1) (Lam *et al.*, 1994; Moule *et al.*, 1997; Wijkander *et al.*, 1997). Nous avons cherché à comprendre comment l'activation du GPR103B modulerait les taux intracellulaires de l'AMPc induits par une stimulation adrénérique par l'ISO. La première approche consistait à utiliser la forskoline qui stimule directement l'adénylate cyclase (Seamon *et al.*, 1981) ou des analogues de l'AMPc (le dibutyryl-AMPc et le 8-bromo-AMPc), composés qui miment une augmentation des taux intracellulaires de l'AMPc suite à une activation  $\beta$ -adrénérique (Figure 20). La deuxième approche est pharmacologique utilisant le LY294002, le SH-5 et le

cilostamide, inhibiteurs sélectifs de la PI3-K, de l'Akt et de la PDE3B, respectivement (Figure 20). Nous avons montré et confirmé que la PDE3B n'est pas impliquée dans l'inhibition de la lipolyse dans la cascade GPR103B/PI3-K/Akt. En effet, ni le cilostamide ni le dibutyryl-AMPc, un analogue non-hydrolysable de l'AMPc (figure 20), n'ont permis d'abolir les effets anti-lipolytiques du QRFP-43. Au niveau moléculaire, la lipolyse induite par le dibutyryl-AMPc en présence de QRFP-43 se traduit par une diminution de la phosphorylation de PLIN1a tandis que celle de la LHS n'est pas affectée. Le fait que le traitement par le QRFP-43 soit capable de bloquer la lipolyse induite par les analogues de l'AMPc suggère que l'activation du GPR103B cible des seconds messagers en aval de l'adénylate cyclase (Figure 17 et 20). Nous avons cependant trouvé que l'activation du GPR103B stimule la voie PI3-K/Akt, mais la stimulation de cette voie par le QRFP-43 ne s'accompagne pas d'une activation de la PDE3B dans les adipocytes 3T3-L1.

Des mécanismes d'inhibition de la lipolyse suite à l'activation de la voie de PI3-K/Akt médiée par des récepteurs couplés à une protéine G ont déjà été rapportés (Baragli *et al.*, 2011; Lefrere *et al.*, 2002; Skrzypski *et al.*, 2011). Ainsi par exemple, la stimulation des récepteurs GPR74 et OX2R dans les adipocytes 3T3-L1 inhibe la lipolyse induite par l'ISO en activant la PI3-K (Lefrere *et al.*, 2002; Skrzypski *et al.*, 2011). Une étude a montré que la ghréline et la désacyl-ghréline inhibent la lipolyse induite par l'ISO en activant la PI3-K dans les adipocytes isolés des viscères de rat (Baragli *et al.*, 2011) (voir section 2.4.7.2.6). Dans cette étude, l'inhibition de la lipolyse par la ghréline et la désacyl-ghréline est bloquée par un traitement avec le cilostamide ou le dibutyryl-AMPc. La réponse anti-lipolytique de ces peptides résulte de l'activation de la PI3-K $\gamma$  (Baragli *et al.*, 2011), une des trois isoformes de la PI3-K (Andrews *et al.*, 2007). L'isoforme  $\gamma$  est principalement activé par les récepteurs couplés à une protéine G tandis que les isoformes  $\alpha$  et  $\beta$  sont activés par les récepteurs tyrosine kinase. Ces

trois isoformes ont la capacité d'activer l'Akt menant à la stimulation de la PDE3B (Andrews *et al.*, 2007).

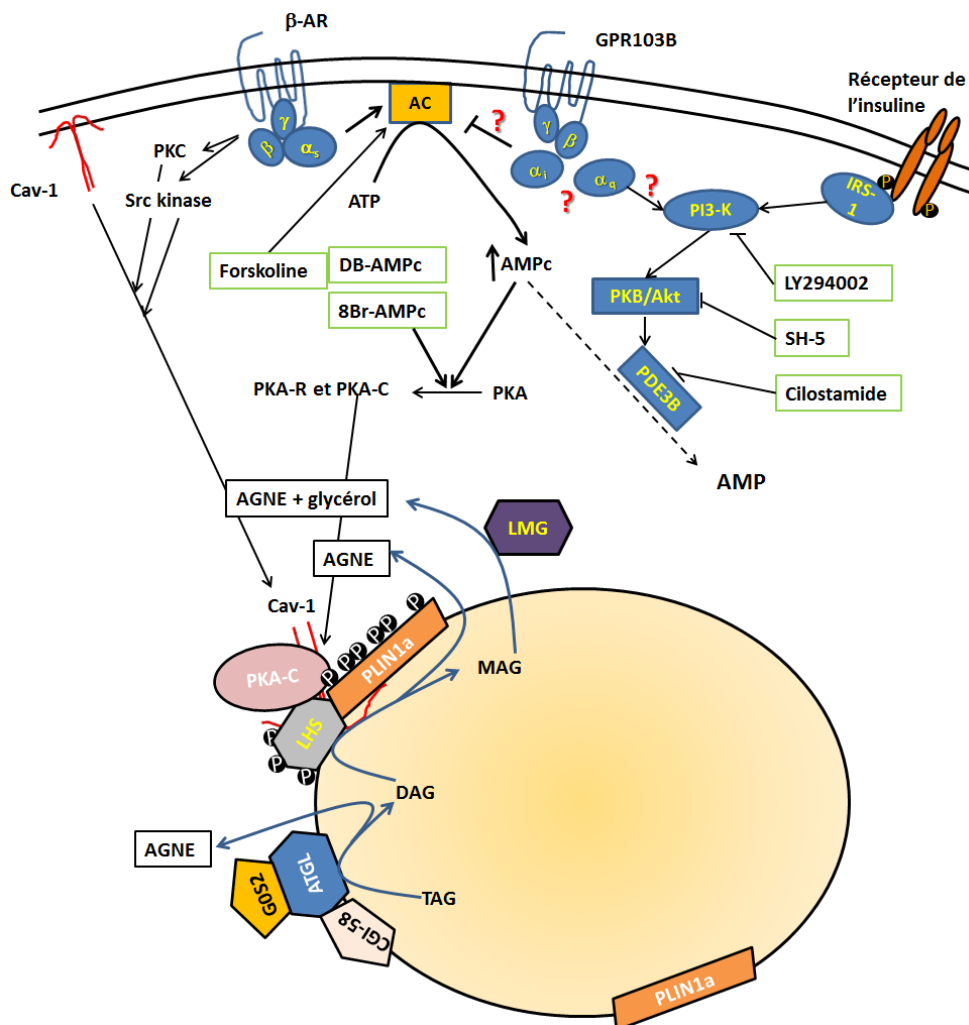


Figure 20: Schéma de l'approche dans les études des voies de signalisation induite par la GPR103B. AC : adénylate cyclase, AGNE : acides gras non estérifiés, AMPc : adénosine monophosphate cyclique,  $\beta$ -AR : récepteur  $\beta$ -adrénergique, ATGL : lipase adipeuse des triglycérides, 8Br-AMPc : 8 bromo-AMPc, Cav-1 : cavéoline 1, DAG : diacylglycérol, DB-AMPc : dibutyryl-AMPc, IRS-1 : substrat du récepteur de l'insuline type 1, MAG : monoacylglycérol, LHS : lipase hormono-sensible, LMG :

lipase des monoacylglycérols, PDE3B : phosphodiesterase 3B, PI3-K : kinase-3 phosphoinositide, PKA : protéine kinase A, PKA-c : sous-unité catalytique de PKA, PKA-R : sous-unité régulatrice de PKA, PKB : protéine kinase B, PLIN1a : périlipine 1a, TAG : triacylglycérol (Mulumba *et al.* 2013).

#### **4.3.2. Le GPR103B inhibe l'activité de la Src kinase et de PKC**

Étant donné que le QRFP-43 inhibe la phosphorylation de la PLIN1a suite une induction de la lipolyse avec le dibutyryl-AMPC ou avec l'ISO en présence du cilostamide, nous avons étudié une voie de signalisation alternative potentielle afin d'expliquer cette observation. Cette voie implique les kinases Src et PKC (Fricke *et al.*, 2004; Robidoux *et al.*, 2006). En effet, une partie de la lipolyse induite par la stimulation des récepteurs  $\beta_3$ -AR est dépendante de l'activation de la PKC qui agirait de façon synergique avec la voie PKA dans la stimulation de la lipolyse (Fricke *et al.*, 2004). Il a aussi été démontré que les récepteurs  $\beta_3$ -AR stimulent l'activité des kinases Src qui sont impliquées dans l'activation des MAPK dont ERK1/2 dans les adipocytes (Robidoux *et al.*, 2006). De plus, les kinases Src facilitent la migration de la CAV-1 de la membrane vers différents compartiments intracellulaires, dont les gouttelettes lipidiques dans les adipocytes (Blouin *et al.*, 2008). La migration de la CAV-1 vers les gouttelettes a été observée dans la lipolyse induite par des agonistes  $\beta_3$ -AR dans les adipocytes isolés et les cellules 3T3-L1 différenciées (Cohen *et al.*, 2004). Cette migration est associée avec une augmentation de la lipolyse et de la phosphorylation de PLIN1a dans les adipocytes (Cohen *et al.*, 2004; Ahmad *et al.*, 2009). Au niveau moléculaire, la phosphorylation de la PLIN1a est possible grâce à son interaction avec la PKA-c, elle-même facilitée par la migration de la CAV-1 au niveau des gouttelettes (Cohen *et al.*, 2004). L'analyse de ces deux voies s'avère être judicieuse dans la compréhension de la phosphorylation de la PLIN1a. Nos travaux ont montré que, d'une part, l'activation du GPR103B par le QRFP-43 inhibe les mécanismes de migration de

la CAV-1 vers les gouttelettes lipidiques dans les adipocytes 3T3-L1. Cette inhibition conduit par le fait même à une réduction de l'association entre la PKA-c et la PLIN1a. L'activation du GPR103B atténue la phosphorylation des kinases Src, ce qui explique l'inhibition de la migration de la CAV-1 et l'atténuation de la phosphorylation de ERK1/2 observées dans les adipocytes stimulés par l'ISO. D'autre part, nous avons montré que l'activation du GPR103B réduit l'association entre la LHS phosphorylée sur la Ser-660 et la PLIN1a au niveau des gouttelettes lipidiques dans les adipocytes 3T3-L1. Des travaux antérieurs avaient montré que les kinases Src facilitaient l'association entre les filaments de vimentine et le récepteur  $\beta_3$ -AR dans les adipocytes (Kumar *et al.*, 2007). En effet, une inhibition spécifique de Src réduit considérablement cette association (Kumar *et al.*, 2007). D'autres travaux ont montré que la vimentine est impliquée dans la migration de la LHS vers les gouttelettes lipidiques dans les adipocytes 3T3-L1 (Shen *et al.*, 2010) et dans celle de la CAV-1 vers les différents compartiments intracellulaires (Santilman *et al.*, 2007). Donc, l'inhibition de la phosphorylation de Src kinase suite à une activation de GPR103B conduit à une réduction de la phosphorylation de la PLIN1a et une diminution de la migration de la LHS vers les gouttelettes lipidiques.

Nos travaux ont aussi montré que l'activation du GPR103B dans les adipocytes 3T3-L1 inhibe l'activité de PKC. Cette kinase est constituée de plusieurs isoformes regroupées en trois catégories: classique (cPKC), nouvelle (nPKC) et atypique (aPKC) (Newton, 2003). Les nPKC et cPKC sont activées par le PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*) qui induit aussi leur dégradation dans différents types cellulaires, dont les adipocytes (Nakamura, 2008; Nakamura, 2010; Gould & Newton, 2008). Cette dégradation est associée à une induction de la lipolyse dans des adipocytes de rat lorsque ceux-ci sont traités avec le PMA pendant plus de 3 heures (Nakamura, 2010). D'un côté, des études antérieures ont montré que l'activation du récepteur  $\beta_3$ -AR est associée à une augmentation de l'activité des isoformes  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\epsilon$ , et  $\theta$  de PKC dans

les adipocytes bruns (Chernogubova *et al.*, 2004). D'un autre côté, la stimulation de la lipolyse et la phosphorylation de PLIN1a par la TSH dans les adipocytes 3T3-L1 est dépendante des PKC classiques  $-\alpha$  et  $-\beta$ I. En effet, l'inhibition spécifique de ces isoformes réduit la phosphorylation de PLIN1a et inhibe la lipolyse (Thrush *et al.*, 2012). Dans nos travaux, nous avons montré que la lipolyse induite par le PMA est atténuée en présence du QRFP-43 ou de l'inhibiteur de PKC GF109203x qui, à des concentrations sub-micromolaires, inhibe les isoformes classiques et nouvelles. Cependant, le GF109203x à des concentrations micromolaires, inhibe de façon non spécifique toutes les isoformes de PKC (Powell *et al.*, 2003). En fait, nos résultats ont montré que la lipolyse induite par le PMA est complètement abolie en présence de QRFP-43 et de GF109203x (2  $\mu$ M), confirmant ainsi que les effets anti-lipolytiques du QRFP-43 sont potentialisés en présence de GF109203x. Ceci suggère que l'activation du GPR103B protégerait les isoformes classiques et nouvelles de PKC d'une dégradation dans les adipocytes 3T3-L1. Les mécanismes moléculaires à l'origine de cette protection restent à être déterminés.



## Chapitre V : CONCLUSION

En conclusion, les travaux présentés dans cette thèse ont permis de mettre en évidence et de comprendre le rôle du GPR103B et de ses ligands, les QRFP-43 et -26 la régulation du métabolisme lipidique des tissus adipeux. En particulier, nous avons montré que ces peptides favorisent l'adipogenèse en stimulant l'accumulation des TG dans les adipocytes et en induisant l'expression des gènes régulés par le PPAR- $\gamma$  et le C/EBP- $\alpha$  tels que la LPL, le CD36, la FATP1, la PLIN1a et l'ACSL1 dans les adipocytes. De plus, ces peptides atténuent la lipolyse induite par des agents  $\beta$ -adrénergiques et le PMA. Nous avons aussi élucidé les mécanismes de signalisation du GPR103B stimulée par les QRFP et conduisant aux effets anti-lipolytiques de ces peptides. Cette voie signalétique passe par la voie de PI3-K/Akt. Le fait que les adipocytes expriment les QRFPs suggère qu'ils ont des fonctions autocrine/paracrine dans le tissu adipeux, ce qui permettrait de cibler le GPR103B pour le développement des médicaments contre l'obésité.

## PERSPECTIVES

Dans nos travaux nous avons décrit les mécanismes d'inhibition de la lipolyse médiés par le récepteur GPR103B. Cependant la nature de la protéine G impliquée reste inconnue. Dans la littérature, il a été suggéré que le GPR103B est couplé aux protéines  $G_{\alpha i}$  et/ou  $G_q$ . Nous avons décrit dans l'introduction les mécanismes d'inhibition de la lipolyse médiés par les récepteurs couplés à la protéine  $G_{\alpha i}$ . Une approche pour étudier l'implication de la protéine  $G_q$  et/ou  $G_{\alpha i}$  dans la signalisation du GPR103B serait d'utiliser l'inhibiteur pharmacologique YM-254890 et la toxine pertussique, visant la  $G_q$  et la  $G_{\alpha i}$ , respectivement. Le YM-254890 atténue la mobilisation du calcium induite par des récepteurs couplés à la protéine  $G_q$  tandis que la toxine pertussique inhibe l'activité de la protéine  $G_{\alpha i}$  (Nishimura *et al.*, 2010). Nous nous attendons à ce que l'inhibition de la protéine  $G_q$  conduise à une perte des effets anti-lipolytiques du QRFP-43. Quant à la protéine  $G_{\alpha i}$ , son inhibition n'affecterait pas la réponse anti-lipolytique du QRFP-43. En effet, dans nos travaux (deuxième article) nous avons montré que la stimulation de la lipolyse avec des analogues de l'AMPC est inhibée par le QRFP-43 (Mulumba *et al.* 2013). Ces analogues agissent en aval de la protéine  $G_{\alpha i}$  pour stimuler la lipolyse (Figure 20).

Il serait aussi important de confirmer l'inhibition des kinases Src et la translocation de la Cav-1 vers les gouttelettes lipidiques suite à l'activation du GPR103B par le QRFP-43 dans les adipocytes. Pour ce faire, nous pourrions utiliser des cellules 3T3-L1 transfectées avec la forme active des kinases Src, Y527FSrc. La transfection transitoire de Y527FSrc dans les adipocytes 3T3-L1 engendre une forte migration de la Cav-1 vers les gouttelettes lipidiques (Le *et al.*, 2006). La lipolyse sera stimulée avec l'ISO en présence du QRFP-43 ou du PP2, inhibiteur des kinases Src, dans les adipocytes 3T3-L1.

### **Métabolisme lipidiques d'une injection périphérique du QRFP-43**

À ce jour, les études démontrant le rôle physiologique du QRFP-43 dans le métabolisme lipidique ont été effectuées chez des rongeurs qui ont reçu le peptide par administration i.c.v. Chez les rongeurs, les études effectuées après une administration i.p. des QRFP-43 et -26 n'ont porté que sur la sécrétion de la LH et de la FSH (Patel *et al.*, 2008; Navarro *et al.*, 2006). Cependant, si l'on considère les résultats publiés par Moriya et ses collaborateurs montrant les effets d'une administration i.c.v. du peptide sur le métabolisme périphérique des lipides (Moriya *et al.*, 2006), et nos résultats d'études *in vitro* sur l'adipogenèse, nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle le QRFP-43, dans la circulation sanguine agit directement sur le tissu adipeux. De plus, il a été montré que le QRFP-26 est présent dans le plasma et que les taux plasmatiques augmentent chez des patientes souffrant de troubles de l'appétit (Galusca *et al.*, 2012), tel qu'observé dans le cas du NPY (Baranowska *et al.*, 2001). Contrairement à ce qui a été rapporté chez les patients anorexiques, les taux plasmatiques du NPY sont fortement diminués chez des patientes obèses (Baltazi *et al.*, 2011; Baranowska *et al.*, 2005). Toutefois, aucune étude n'a documenté à ce jour la modulation des taux plasmatiques des QRFPs dans l'obésité ou encore les effets d'une administration périphérique des QRFPs sur la prise alimentaire et le développement de l'obésité chez des rongeurs.

Nous pourrions étudier l'effet d'une administration i.p. du QRFP-43 chez des souris C57BL/6J mâles. Les études de Moriya et ses collaborateurs ont montré que le QRFP-43, lorsqu'administré à une dose de 30 µg/jour pendant deux semaines, augmentait la prise alimentaire ainsi que les masses corporelle et adipeuse (Moriya *et al.*, 2006). Dans l'étude que nous proposons, un groupe de souris sous diète normale recevrait par voie i.p. 30 µg/jour de QRFP-43 durant durant quatorze jours. Les souris contrôles recevraient du véhicule (NaCl 0.9%). Un deuxième groupe subirait les mêmes

traitements, mais les animaux seraient soumis à une diète riche en lipides. Dans le premier volet de l'étude, les concentrations plasmatiques de la leptine, d'AGNEs, de TG, de l'insuline, du glucose, du cholestérol total et des LDL et HDL cholestérol seraient dosées. La prise alimentaire serait évaluée ainsi que la masse corporelle. Dans le deuxième volet de l'étude, nous proposons de déterminer si l'obésité module les taux plasmatiques de QRFP-43 par radioimmunoessai (Phoenix Pharmaceutical, Inc.). Pour ce faire, les souris dans ce groupe seraient soumises à leur diète respective pendant quatre, seize et vingt semaines, qui correspondent à des stades différents du développement de l'obésité sous un régime riche en lipides (Xu *et al.*, 2003; Collins *et al.*, 2004). Les taux plasmatiques de QRFP-43 seraient ensuite corrélés avec la masse corporelle.

Dans le troisième volet de l'étude, les effets du QRFP-43 sur la thermogénèse seraient évalués *in vivo*. En effet, une administration i.c.v. du QRFP-43 réduit la thermogénèse adaptative chez les souris avec comme conséquence une diminution de l'expression de l'UCP-1 dans le tissu adipeux brun (Moriya *et al.*, 2006). Comme nous l'avons mentionné dans la section 1.2, l'activation du récepteur  $\beta_3$ -AR au niveau du tissu adipeux brun augmente la thermogénèse (Atgie *et al.*, 1997) et active l'UCP-1 en conséquence (Collins *et al.*, 2010; Golozoubova *et al.*, 2006). De plus, la phosphorylation de la PLIN1a lors de la lipolyse est importante dans la stimulation de la thermogénèse induite par les agonistes  $\beta_3$ -AR dans les adipocytes bruns (Souza *et al.*, 2007). Contrairement au tissu adipeux blanc, la lipolyse induite dans le tissu adipeux brun ne libère pas les AGNEs en circulation, mais ceux-ci servent de substrats à la  $\beta$ -oxydation et à l'activation de l'UCP-1 (Robidoux *et al.*, 2004). Étant donné que nos travaux ont montré que le QRFP-43 inhibe les voies de la lipolyse induite suite à une stimulation  $\beta$ -AR et que dans les travaux de Moriya, l'administration i.c.v. de QRFP-43 réduit la thermogénèse (Moriya *et al.*, 2006), il serait intéressant d'étudier les effets potentiels du QRFP-43 sur les mécanismes de la thermogénèse. L'objectif de cette étude

serait de voir si des injections répétées i.p. de QRFP-43 pendant quatorze jours réduisent l'expression de l'UCP-1 au niveau du tissu adipeux brun chez les souris;

Du point de vue moléculaire, il est nécessaire de déterminer lequel des deux sous-types du récepteur GPR103 est exprimé au niveau du tissu adipeux brun ainsi qu'au niveau des adipocytes bruns isolés. Dans les adipocytes bruns, la lipolyse génère d'abord des acides gras nécessaires à la production de la chaleur au niveau des mitochondries et ensuite, elle engendre une activation de l'AMPK favorisant le transport de ces acides gras à travers la membrane mitochondriale (section 3.1.2) (Pulinilkunnil *et al.*, 2011). Les effets du QRFP-43 sur la thermogénèse seraient déterminés dans des expériences sur des adipocytes bruns isolés de souris et sur une lignée cellulaire immortalisée d'adipocytes bruns, les SV40T. Les objectifs seraient de documenter les effets du QRFP-43:

- sur la phosphorylation et l'activité de l'AMPK dans des conditions basales et stimulées avec le composé CL-316,243 en mesurant le degré de phosphorylation de la sous-unité  $\alpha$  de l'AMPK sur la Thr-172 et de l'ACC sur la Ser-80, substrat de l'AMPK activée;
- sur la phosphorylation de la PLIN et de la LHS induite suite à la stimulation avec le composé CL-316,243;
- sur l'expression de CPT-1 et UCP-1, ainsi que sur l'expression de PCG-1 $\alpha$ , coactivateur de PPAR- $\gamma$  contrôlant la transcription de plusieurs gènes dont celui de l'UCP-1 dans les adipocytes bruns.

## BIBLIOGRAPHIE

### Reference List

1. Adams, M, Montague, CT, Prins, JB, Holder, JC, Smith, SA, Sanders, L, Digby, JE, Sewter, CP, Lazar, MA, Chatterjee, VK & O'Rahilly, S. (1997). Activators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma have depot-specific effects on human preadipocyte differentiation. *J Clin Invest*, **100**, 3149-3153.
2. Adams, SH, Lei, C, Jodka, CM, Nikoulina, SE, Hoyt, JA, Gedulin, B, Mack, CM & Kendall, ES. (2006). PYY[3-36] administration decreases the respiratory quotient and reduces adiposity in diet-induced obese mice. *J Nutr*, **136**, 195-201.
3. Ahmad, F, Lindh, R, Tang, Y, Ruishalme, I, Ost, A, Sahachartsiri, B, Stralfors, P, Degerman, E & Manganiello, VC. (2009). Differential regulation of adipocyte PDE3B in distinct membrane compartments by insulin and the beta3-adrenergic receptor agonist CL316243: effects of caveolin-1 knockdown on formation/maintenance of macromolecular signalling complexes. *Biochem J*, **424**, 399-410.
4. Ahmad, F, Lindh, R, Tang, Y, Weston, M, Degerman, E & Manganiello, VC. (2007). Insulin-induced formation of macromolecular complexes involved in activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B (PDE3B) and its interaction with PKB. *Biochem J*, **404**, 257-268.
5. Ahmed, K, Tunaru, S, Tang, C, Muller, M, Gille, A, Sassmann, A, Hanson, J & Offermanns, S. (2010). An autocrine lactate loop mediates insulin-dependent inhibition of lipolysis through GPR81. *Cell Metab*, **11**, 311-319.
6. Altiock, S, Xu, M & Spiegelman, BM. (1997). PPARgamma induces cell cycle withdrawal: inhibition of E2F/DP DNA-binding activity via down-regulation of PP2A. *Genes Dev*, **11**, 1987-1998.
7. Amri, EZ, Dani, C, Doglio, A, Grimaldi, P & Ailhaud, G. (1986). Coupling of growth arrest and expression of early markers during adipose conversion of preadipocyte cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*, **137**, 903-910.

8. Andrews, S, Stephens, LR & Hawkins, PT. (2007). PI3K class IB pathway in neutrophils. *Sci STKE*, **2007**, cm3.
9. Anthonsen, MW, Ronnstrand, L, Wernstedt, C, Degerman, E & Holm, C. (1998). Identification of novel phosphorylation sites in hormone-sensitive lipase that are phosphorylated in response to isoproterenol and govern activation properties in vitro. *J Biol Chem*, **273**, 215-221.
10. Atgie, C, D'Allaire, F & Bukowiecki, LJ. (1997). Role of beta1- and beta3-adrenoceptors in the regulation of lipolysis and thermogenesis in rat brown adipocytes. *Am J Physiol*, **273**, C1136-C1142.
11. Auboeuf, D, Rieusset, J, Fajas, L, Vallier, P, Frering, V, Riou, JP, Staels, B, Auwerx, J, Laville, M & Vidal, H. (1997). Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes*, **46**, 1319-1327.
12. Awad, HA, Wickham, MQ, Leddy, HA, Gimble, JM & Guilak, F. (2004). Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. *Biomaterials*, **25**, 3211-3222.
13. Baltazi, M, Katsiki, N, Savopoulos, C, Iliadis, F, Koliakos, G & Hatzitolios, AI. (2011). Plasma neuropeptide Y (NPY) and alpha-melanocyte stimulating hormone (a-MSH) levels in patients with or without hypertension and/or obesity: a pilot study. *Am J Cardiovasc Dis*, **1**, 48-59.
14. Banerjee, SS, Feinberg, MW, Watanabe, M, Gray, S, Haspel, RL, Denking, DJ, Kawahara, R, Hauner, H & Jain, MK. (2003). The Kruppel-like factor KLF2 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression and adipogenesis. *J Biol Chem*, **278**, 2581-2584.
15. Baragli, A, Ghe, C, Arnoletti, E, Granata, R, Ghigo, E & Muccioli, G. (2011). Acylated and unacylated ghrelin attenuate isoproterenol-induced lipolysis in isolated rat visceral adipocytes through activation of phosphoinositide 3-kinase gamma and phosphodiesterase 3B. *Biochim Biophys Acta*, **1811**, 386-396.
16. Barak, Y, Nelson, MC, Ong, ES, Jones, YZ, Ruiz-Lozano, P, Chien, KR, Koder, A & Evans, RM. (1999). PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell*, **4**, 585-595.

17. Baranowska, B, Wolinska-Witort, E, Martynska, L, Chmielowska, M & Baranowska-Bik, A. (2005). Plasma orexin A, orexin B, leptin, neuropeptide Y (NPY) and insulin in obese women. *Neuro Endocrinol Lett*, **26**, 293-296.
18. Baranowska, B, Wolinska-Witort, E, Wasilewska-Dziubinska, E, Roguski, K & Chmielowska, M. (2001). Plasma leptin, neuropeptide Y (NPY) and galanin concentrations in bulimia nervosa and in anorexia nervosa. *Neuro Endocrinol Lett*, **22**, 356-358.
19. Barrett, P, MacDonald, A, Helliwell, R, Davidson, G & Morgan, P. (1994). Cloning and expression of a new member of the melanocyte-stimulating hormone receptor family. *J Mol Endocrinol*, **12**, 203-213.
20. Bartz, R, Zehmer, JK, Zhu, M, Chen, Y, Serrero, G, Zhao, Y & Liu, P. (2007). Dynamic activity of lipid droplets: protein phosphorylation and GTP-mediated protein translocation. *J Proteome Res*, **6**, 3256-3265.
21. Bastie, C, Holst, D, Gaillard, D, Jehl-Pietri, C & Grimaldi, PA. (1999). Expression of peroxisome proliferator-activated receptor PPARdelta promotes induction of PPARgamma and adipocyte differentiation in 3T3C2 fibroblasts. *J Biol Chem*, **274**, 21920-21925.
22. Batterham, RL, Cowley, MA, Small, CJ, Herzog, H, Cohen, MA, Dakin, CL, Wren, AM, Brynes, AE, Low, MJ, Ghatei, MA, Cone, RD & Bloom, SR. (2002). Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature*, **418**, 650-654.
23. Baugh, JE, Jr., Floyd, ZE & Stephens, JM. (2007). The modulation of STAT5A/GR complexes during fat cell differentiation and in mature adipocytes. *Obesity (Silver Spring)*, **15**, 583-590.
24. Behrens, J, Jerchow, BA, Wurtele, M, Grimm, J, Asbrand, C, Wirtz, R, Kuhl, M, Wedlich, D & Birchmeier, W. (1998). Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science*, **280**, 596-599.
25. Beigneux, AP, Davies, BS, Gin, P, Weinstein, MM, Farber, E, Qiao, X, Peale, F, Bunting, S, Walzem, RL, Wong, JS, Blaner, WS, Ding, ZM, Melford, K, Wongsiriroj, N, Shu, X, de, SF, Ryan, RO, Fong, LG, Bensadoun, A & Young, SG. (2007). Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 plays a critical role in the lipolytic processing of chylomicrons. *Cell Metab*, **5**, 279-291.



26. Belfrage, P, Fredrikson, G, Nilsson, NO & Stralfors, P. (1980). Regulation of adipose tissue lipolysis: phosphorylation of hormones sensitive lipase in intact rat adipocytes. *FEBS Lett*, **111**, 120-124.
27. Bell, M, Wang, H, Chen, H, McLenithan, JC, Gong, DW, Yang, RZ, Yu, D, Fried, SK, Quon, MJ, Londos, C & Sztalryd, C. (2008). Consequences of lipid droplet coat protein downregulation in liver cells: abnormal lipid droplet metabolism and induction of insulin resistance. *Diabetes*, **57**, 2037-2045.
28. Bennett, CN, Ross, SE, Longo, KA, Bajnok, L, Hemati, N, Johnson, KW, Harrison, SD & MacDougald, OA. (2002). Regulation of Wnt signaling during adipogenesis. *J Biol Chem*, **277**, 30998-31004.
29. Berger, K, Lindh, R, Wierup, N, Zmuda-Trzebiatowska, E, Lindqvist, A, Manganiello, VC & Degerman, E. (2009). Phosphodiesterase 3B is localized in caveolae and smooth ER in mouse hepatocytes and is important in the regulation of glucose and lipid metabolism. *PLoS One*, **4**, e4671.
30. Berndt, J, Kralisch, S, Kloting, N, Ruschke, K, Kern, M, Fasshauer, M, Schon, MR, Stumvoll, M & Bluher, M. (2008). Adipose triglyceride lipase gene expression in human visceral obesity. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, **116**, 203-210.
31. Berneis, KK & Krauss, RM. (2002). Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *J Lipid Res*, **43**, 1363-1379.
32. Bernlohr, DA, Bolanowski, MA, Kelly, TJ, Jr. & Lane, MD. (1985). Evidence for an increase in transcription of specific mRNAs during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem*, **260**, 5563-5567.
33. Berry, DC, DeSantis, D, Soltanian, H, Croniger, CM & Noy, N. (2012). Retinoic acid upregulates preadipocyte genes to block adipogenesis and suppress diet-induced obesity. *Diabetes*, **61**, 1112-1121.
34. Bhattacharya, I & Ullrich, A. (2006). Endothelin-1 inhibits adipogenesis: role of phosphorylation of Akt and ERK1/2. *FEBS Lett*, **580**, 5765-5771.
35. Bickel, PE, Tansey, JT & Welte, MA. (2009). PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. *Biochim Biophys Acta*, **1791**, 419-440.

36. Billington, CJ, Briggs, JE, Grace, M & Levine, AS. (1991). Effects of intracerebroventricular injection of neuropeptide Y on energy metabolism. *Am J Physiol*, **260**, R321-R327.
37. Birsoy, K, Chen, Z & Friedman, J. (2008). Transcriptional regulation of adipogenesis by KLF4. *Cell Metab*, **7**, 339-347.
38. Bjorndal, B, Burri, L, Staalesen, V, Skorve, J & Berge, RK. (2011). Different adipose depots: their role in the development of metabolic syndrome and mitochondrial response to hypolipidemic agents. *J Obes*, **2011**, 490650.
39. Bjorntorp, P & Furman, RH. (1962). Lipolytic activity in rat epididymal fat pads. *Am J Physiol*, **203**, 316-322.
40. Blad, CC, Ahmed, K, IJzerman, AP & Offermanns, S. (2011). Biological and pharmacological roles of HCA receptors. *Adv Pharmacol*, **62**, 219-250.
41. Blanco Martinez de, MP, Gonzalez, CR, Saha, AK, Martins, L, Dieguez, C, Vidal-Puig, A, Tena-Sempere, M & Lopez, M. (2011). Hypothalamic AMP-activated protein kinase as a mediator of whole body energy balance. *Rev Endocr Metab Disord*, **12**, 127-140.
42. Blouin, CM, Le, LS, Lasnier, F, Dugail, I & Hajdich, E. (2008). Regulated association of caveolins to lipid droplets during differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, **376**, 331-335.
43. Boney, CM, Fiedorek, FT, Jr., Paul, SR & Gruppuso, PA. (1996). Regulation of preadipocyte factor-1 gene expression during 3T3-L1 cell differentiation. *Endocrinology*, **137**, 2923-2928.
44. Boston, BA. (1999). The role of melanocortins in adipocyte function. *Ann N Y Acad Sci*, **885**, 75-84.
45. Boston, BA & Cone, RD. (1996). Characterization of melanocortin receptor subtype expression in murine adipose tissues and in the 3T3-L1 cell line. *Endocrinology*, **137**, 2043-2050.
46. Bradley, RL, Mansfield, JP & Maratos-Flier, E. (2005). Neuropeptides, including neuropeptide Y and melanocortins, mediate lipolysis in murine adipocytes. *Obes Res*, **13**, 653-661.

47. Braissant, O, Foufelle, F, Scotto, C, Dauca, M & Wahli, W. (1996). Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology*, **137**, 354-366.
48. Brandes, R, Arad, R, Gaathon, A & Bar-Tana, J. (1993). Induction of adipose conversion in 3T3-L1 cells is associated with an early phosphorylation of a protein partly homologous with mouse vimentin. *FEBS Lett*, **333**, 179-182.
49. Brasaemle, DL, Barber, T, Kimmel, AR & Londos, C. (1997a). Post-translational regulation of perilipin expression. Stabilization by stored intracellular neutral lipids. *J Biol Chem*, **272**, 9378-9387.
50. Brasaemle, DL, Barber, T, Wolins, NE, Serrero, G, Blanchette-Mackie, EJ & Londos, C. (1997b). Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. *J Lipid Res*, **38**, 2249-2263.
51. Brasaemle, DL, Dolios, G, Shapiro, L & Wang, R. (2004). Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, **279**, 46835-46842.
52. Brasaemle, DL, Rubin, B, Harten, IA, Gruia-Gray, J, Kimmel, AR & Londos, C. (2000). Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis. *J Biol Chem*, **275**, 38486-38493.
53. Brasaemle, DL, Subramanian, V, Garcia, A, Marcinkiewicz, A & Rothenberg, A. (2009). Perilipin A and the control of triacylglycerol metabolism. *Mol Cell Biochem*, **326**, 15-21.
54. Braun, JE & Severson, DL. (1992). Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase. *Biochem J*, **287** ( Pt 2), 337-347.
55. Bruzzone, F, Lectez, B, Alexandre, D, Jegou, S, Mounien, L, Tollemer, H, Chatenet, D, Leprince, J, Vallarino, M, Vaudry, H & Chartrel, N. (2007). Distribution of 26RFa binding sites and GPR103 mRNA in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol*, **503**, 573-591.
56. Bruzzone, F, Lectez, B, Tollemer, H, Leprince, J, Dujardin, C, Rachidi, W, Chatenet, D, Baroncini, M, Beauvillain, JC, Vallarino, M, Vaudry, H & Chartrel, N. (2006). Anatomical distribution and biochemical characterization of the novel RFamide peptide 26RFa in the human hypothalamus and spinal cord. *J Neurochem*, **99**, 616-627.

57. Buettner, C, Muse, ED, Cheng, A, Chen, L, Scherer, T, Poci, A, Su, K, Cheng, B, Li, X, Harvey-White, J, Schwartz, GJ, Kunos, G, Rossetti, L & Buettner, C. (2008). Leptin controls adipose tissue lipogenesis via central, STAT3-independent mechanisms. *Nat Med*, **14**, 667-675.
58. Butler, AA & Cone, RD. (2002). The melanocortin receptors: lessons from knockout models. *Neuropeptides*, **36**, 77-84.
59. Cadigan, KM & Nusse, R. (1997). Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev*, **11**, 3286-3305.
60. Cannon, B & Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev*, **84**, 277-359.
61. Cao, Z, Umek, RM & McKnight, SL. (1991). Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev*, **5**, 1538-1552.
62. Cariou, B. (2012). **Rôle physiologique du tissu adipeux brun chez l'Homme**. *Médecine Clinique Endocrinologie & Diabète*, **56**, 39-43.
63. Carlsson, P & Mahlapuu, M. (2002). Forkhead transcription factors: key players in development and metabolism. *Dev Biol*, **250**, 1-23.
64. Castan, I, Valet, P, Voisin, T, Quideau, N, Laburthe, M & Lafontan, M. (1992). Identification and functional studies of a specific peptide YY-preferring receptor in dog adipocytes. *Endocrinology*, **131**, 1970-1976.
65. Catalioto, RM, Gaillard, D, Ailhaud, G & Negrel, R. (1992). Terminal differentiation of mouse preadipocyte cells: the mitogenic-adipogenic role of growth hormone is mediated by the protein kinase C signalling pathway. *Growth Factors*, **6**, 255-264.
66. Chabowski, A, Coort, SL, Calles-Escandon, J, Tandon, NN, Glatz, JF, Luiken, JJ & Bonen, A. (2005). The subcellular compartmentation of fatty acid transporters is regulated differently by insulin and by AICAR. *FEBS Lett*, **579**, 2428-2432.
67. Chang, YC, Liu, PH, Tsai, YC, Chiu, YF, Shih, SR, Ho, LT, Lee, WJ, Lu, CH, Quertermous, T, Curb, JD, Lee, WJ, Lee, PC, He, YH, Yeh, JI, Hwang, JJ, Tsai, SH & Chuang, LM. (2012). Genetic variation in the carbonyl reductase 3

gene confers risk of type 2 diabetes and insulin resistance: a potential regulator of adipogenesis. *J Mol Med (Berl)*, **90**, 847-858.

68. Chapman, AB, Knight, DM, Dieckmann, BS & Ringold, GM. (1984). Analysis of gene expression during differentiation of adipogenic cells in culture and hormonal control of the developmental program. *J Biol Chem*, **259**, 15548-15555.
69. Chartrel, N, Alonzeau, J, Alexandre, D, Jeandel, L, Alvear-Perez, R, Leprince, J, Boutin, J, Vaudry, H, Anouar, Y & Llorens-Cortes, C. (2011). The RFamide neuropeptide 26RFa and its role in the control of neuroendocrine functions. *Front Neuroendocrinol*, **32**, 387-397.
70. Chartrel, N, Bruzzone, F, Dujardin, C, Leprince, J, Tollemer, H, Anouar, Y, Vallarino, M, Costentin, J & Vaudry, H. (2005). Identification of 26RFa from frog brain: a novel hypothalamic neuropeptide with orexigenic activity in mammals. *Ann N Y Acad Sci*, **1040**, 80-83.
71. Chartrel, N, Dujardin, C, Anouar, Y, Leprince, J, Decker, A, Clerens, S, Do-Rego, JC, Vandesande, F, Llorens-Cortes, C, Costentin, J, Beauvillain, JC & Vaudry, H. (2003). Identification of 26RFa, a hypothalamic neuropeptide of the RFamide peptide family with orexigenic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 15247-15252.
72. Chartrel, N, Dujardin, C, Leprince, J, Desrues, L, Tonon, MC, Cellier, E, Cosette, P, Jouenne, T, Simonnet, G & Vaudry, H. (2002). Isolation, characterization, and distribution of a novel neuropeptide, Rana RFamide (R-RFa), in the brain of the European green frog *Rana esculenta*. *J Comp Neurol*, **448**, 111-127.
73. Chawla, A & Lazar, MA. (1994). Peroxisome proliferator and retinoid signaling pathways co-regulate preadipocyte phenotype and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 1786-1790.
74. Chawla, A, Schwarz, EJ, Dimaculangan, DD & Lazar, MA. (1994). Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology*, **135**, 798-800.
75. Chen, Z, Torrens, JI, Anand, A, Spiegelman, BM & Friedman, JM. (2005). Krox20 stimulates adipogenesis via C/EBPbeta-dependent and -independent mechanisms. *Cell Metab*, **1**, 93-106.

76. Chernogubova, E, Cannon, B & Bengtsson, T. (2004). Norepinephrine increases glucose transport in brown adipocytes via beta3-adrenoceptors through a cAMP, PKA, and PI3-kinase-dependent pathway stimulating conventional and novel PKCs. *Endocrinology*, **145**, 269-280.
77. Chiu, HC, Kovacs, A, Blanton, RM, Han, X, Courtois, M, Weinheimer, CJ, Yamada, KA, Brunet, S, Xu, H, Nerbonne, JM, Welch, MJ, Fettig, NM, Sharp, TL, Sambandam, N, Olson, KM, Ory, DS & Schaffer, JE. (2005). Transgenic expression of fatty acid transport protein 1 in the heart causes lipotoxic cardiomyopathy. *Circ Res*, **96**, 225-233.
78. Cho, KJ, Shim, JH, Cho, MC, Choe, YK, Hong, JT, Moon, DC, Kim, JW & Yoon, DY. (2005). Signaling pathways implicated in alpha-melanocyte stimulating hormone-induced lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *J Cell Biochem*, **96**, 869-878.
79. Choi, K, Roh, SG, Hong, YH, Shrestha, YB, Hishikawa, D, Chen, C, Kojima, M, Kangawa, K & Sasaki, S. (2003). The role of ghrelin and growth hormone secretagogues receptor on rat adipogenesis. *Endocrinology*, **144**, 754-759.
80. Chong, MF, Hodson, L, Bickerton, AS, Roberts, R, Neville, M, Karpe, F, Frayn, KN & Fielding, BA. (2008). Parallel activation of de novo lipogenesis and stearoyl-CoA desaturase activity after 3 d of high-carbohydrate feeding. *Am J Clin Nutr*, **87**, 817-823.
81. Christy, RJ, Yang, VW, Ntambi, JM, Geiman, DE, Landschulz, WH, Friedman, AD, Nakabeppu, Y, Kelly, TJ & Lane, MD. (1989). Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes: CCAAT/enhancer binding protein interacts with and activates the promoters of two adipocyte-specific genes. *Genes Dev*, **3**, 1323-1335.
82. Cinti, S. (2005). The adipose organ. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **73**, 9-15.
83. Clarke, SL, Robinson, CE & Gimble, JM. (1997). CAAT/enhancer binding proteins directly modulate transcription from the peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 promoter. *Biochem Biophys Res Commun*, **240**, 99-103.
84. Clement, K, Viguerie, N, Poitou, C, Carette, C, Pelloux, V, Curat, CA, Sicard, A, Rome, S, Benis, A, Zucker, JD, Vidal, H, Laville, M, Barsh, GS, Basdevant, A, Stich, V, Canello, R & Langin, D. (2004). Weight loss

- regulates inflammation-related genes in white adipose tissue of obese subjects. *FASEB J*, **18**, 1657-1669.
85. Coburn, CT, Hajri, T, Ibrahimi, A & Abumrad, NA. (2001). Role of CD36 in membrane transport and utilization of long-chain fatty acids by different tissues. *J Mol Neurosci*, **16**, 117-121.
  86. Coburn, CT, Knapp, FF, Jr., Febbraio, M, Beets, AL, Silverstein, RL & Abumrad, NA. (2000). Defective uptake and utilization of long chain fatty acids in muscle and adipose tissues of CD36 knockout mice. *J Biol Chem*, **275**, 32523-32529.
  87. Coe, NR, Simpson, MA & Bernlohr, DA. (1999). Targeted disruption of the adipocyte lipid-binding protein (aP2 protein) gene impairs fat cell lipolysis and increases cellular fatty acid levels. *J Lipid Res*, **40**, 967-972.
  88. Cohen, AW, Razani, B, Schubert, W, Williams, TM, Wang, XB, Iyengar, P, Brasaemle, DL, Scherer, PE & Lisanti, MP. (2004). Role of caveolin-1 in the modulation of lipolysis and lipid droplet formation. *Diabetes*, **53**, 1261-1270.
  89. Collins, S, Martin, TL, Surwit, RS & Robidoux, J. (2004). Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics. *Physiol Behav*, **81**, 243-248.
  90. Collins, S, Yehuda-Shnaidman, E & Wang, H. (2010). Positive and negative control of Ucp1 gene transcription and the role of beta-adrenergic signaling networks. *Int J Obes (Lond)*, **34 Suppl 1**, S28-S33.
  91. Cone, RD, Cowley, MA, Butler, AA, Fan, W, Marks, DL & Low, MJ. (2001). The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *Int J Obes Relat Metab Disord*, **25 Suppl 5**, S63-S67.
  92. Contreras, JA, Karlsson, M, Osterlund, T, Laurell, H, Svensson, A & Holm, C. (1996). Hormone-sensitive lipase is structurally related to acetylcholinesterase, bile salt-stimulated lipase, and several fungal lipases. Building of a three-dimensional model for the catalytic domain of hormone-sensitive lipase. *J Biol Chem*, **271**, 31426-31430.
  93. Cook, KG, Yeaman, SJ, Stralfors, P, Fredrikson, G & Belfrage, P. (1982). Direct evidence that cholesterol ester hydrolase from adrenal cortex is the same enzyme as hormone-sensitive lipase from adipose tissue. *Eur J Biochem*, **125**, 245-249.

94. Cornaciu, I, Boeszoermyeni, A, Lindermuth, H, Nagy, HM, Cerk, IK, Ebner, C, Salzburger, B, Gruber, A, Schweiger, M, Zechner, R, Lass, A, Zimmermann, R & Oberer, M. (2011). The minimal domain of adipose triglyceride lipase (ATGL) ranges until leucine 254 and can be activated and inhibited by CGI-58 and GOS2, respectively. *PLoS One*, **6**, e26349.
95. Cowley, MA, Smart, JL, Rubinstein, M, Cerdan, MG, Diano, S, Horvath, TL, Cone, RD & Low, MJ. (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*, **411**, 480-484.
96. Cram, EJ, Ramos, RA, Wang, EC, Cha, HH, Nishio, Y & Firestone, GL. (1998). Role of the CCAAT/enhancer binding protein-alpha transcription factor in the glucocorticoid stimulation of p21waf1/cip1 gene promoter activity in growth-arrested rat hepatoma cells. *J Biol Chem*, **273**, 2008-2014.
97. Dahlman, I, Dicker, A, Jiao, H, Kere, J, Blomqvist, L, van, H, V, Hoffstedt, J, Borch-Johnsen, K, Jorgensen, T, Hansen, T, Pedersen, O, Laakso, M & Arner, P. (2007). A common haplotype in the G-protein-coupled receptor gene GPR74 is associated with leanness and increased lipolysis. *Am J Hum Genet*, **80**, 1115-1124.
98. Dalen, KT, Dahl, T, Holter, E, Arntsen, B, Londos, C, Sztalryd, C & Nebb, HI. (2007). LSDP5 is a PAT protein specifically expressed in fatty acid oxidizing tissues. *Biochim Biophys Acta*, **1771**, 210-227.
99. Dani, C, Smith, AG, Dessolin, S, Leroy, P, Staccini, L, Villageois, P, Darimont, C & Ailhaud, G. (1997). Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro. *J Cell Sci*, **110 ( Pt 11)**, 1279-1285.
100. Darlington, GJ, Ross, SE & MacDougald, OA. (1998). The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J Biol Chem*, **273**, 30057-30060.
101. Daval, M, Diot-Dupuy, F, Bazin, R, Hainault, I, Viollet, B, Vaulont, S, Hajdouch, E, Ferre, P & Foufelle, F. (2005). Anti-lipolytic action of AMP-activated protein kinase in rodent adipocytes. *J Biol Chem*, **280**, 25250-25257.
102. Davies, BS, Beigneux, AP, Barnes, RH, Tu, Y, Gin, P, Weinstein, MM, Nobumori, C, Nyren, R, Goldberg, I, Olivecrona, G, Bensadoun, A, Young, SG & Fong, LG. (2010). GPIHBP1 is responsible for the entry of lipoprotein lipase into capillaries. *Cell Metab*, **12**, 42-52.



103. Davis, KE, Moldes, M & Farmer, SR. (2004). The forkhead transcription factor FoxC2 inhibits white adipocyte differentiation. *J Biol Chem*, **279**, 42453-42461.
104. de Bold, AJ, Borenstein, HB, Veress, AT & Sonnenberg, H. (1981). A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci*, **28**, 89-94.
105. Degerman, E, Landstrom, TR, Wijkander, J, Holst, LS, Ahmad, F, Belfrage, P & Manganiello, V. (1998). Phosphorylation and activation of hormone-sensitive adipocyte phosphodiesterase type 3B. *Methods*, **14**, 43-53.
106. Degerman, E, Smith, CJ, Tornqvist, H, Vasta, V, Belfrage, P & Manganiello, VC. (1990). Evidence that insulin and isoprenaline activate the cGMP-inhibited low-Km cAMP phosphodiesterase in rat fat cells by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 533-537.
107. Deslex, S, Negrel, R & Ailhaud, G. (1987a). Development of a chemically defined serum-free medium for differentiation of rat adipose precursor cells. *Exp Cell Res*, **168**, 15-30.
108. Deslex, S, Negrel, R, Vannier, C, Etienne, J & Ailhaud, G. (1987b). Differentiation of human adipocyte precursors in a chemically defined serum-free medium. *Int J Obes*, **11**, 19-27.
109. Dhalla, AK, Santikul, M, Smith, M, Wong, MY, Shryock, JC & Belardinelli, L. (2007). Antilipolytic activity of a novel partial A1 adenosine receptor agonist devoid of cardiovascular effects: comparison with nicotinic acid. *J Pharmacol Exp Ther*, **321**, 327-333.
110. Dhalla, AK, Shryock, JC, Shreeniwas, R & Belardinelli, L. (2003). Pharmacology and therapeutic applications of A1 adenosine receptor ligands. *Curr Top Med Chem*, **3**, 369-385.
111. Dhillon, SS, McFadden, SA, Chalmers, JA, Centeno, ML, Kim, GL & Belsham, DD. (2011). Cellular leptin resistance impairs the leptin-mediated suppression of neuropeptide Y secretion in hypothalamic neurons. *Endocrinology*, **152**, 4138-4147.
112. Dicker, A, Ryden, M, Naslund, E, Muehlen, IE, Wiren, M, Lafontan, M & Arner, P. (2004). Effect of testosterone on lipolysis in human pre-adipocytes from different fat depots. *Diabetologia*, **47**, 420-428.

113. Dieguez, C, Vazquez, MJ, Romero, A, Lopez, M & Nogueiras, R. (2011). Hypothalamic control of lipid metabolism: focus on leptin, ghrelin and melanocortins. *Neuroendocrinology*, **94**, 1-11.
114. Digby, JE, Chen, J, Tang, JY, Lehnert, H, Matthews, RN & Randeva, HS. (2006). Orexin receptor expression in human adipose tissue: effects of orexin-A and orexin-B. *J Endocrinol*, **191**, 129-136.
115. Dimaculangan, DD, Chawla, A, Boak, A, Kagan, HM & Lazar, MA. (1994). Retinoic acid prevents downregulation of ras reversion gene/lysyl oxidase early in adipocyte differentiation. *Differentiation*, **58**, 47-52.
116. Diraison, F, Dusserre, E, Vidal, H, Sothier, M & Beylot, M. (2002). Increased hepatic lipogenesis but decreased expression of lipogenic gene in adipose tissue in human obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **282**, E46-E51.
117. Dixon, RA, Kobilka, BK, Strader, DJ, Benovic, JL, Dohlman, HG, Frielle, T, Bolanowski, MA, Bennett, CD, Rands, E, Diehl, RE, Mumford, RA, Slater, EE, Sigal, IS, Caron, MG, Lefkowitz, RJ & Strader, CD. (1986). Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature*, **321**, 75-79.
118. do Rego, JC, Leprince, J, Chartrel, N, Vaudry, H & Costentin, J. (2006). Behavioral effects of 26RFamide and related peptides. *Peptides*, **27**, 2715-2721.
119. Dodson, MV, Hausman, GJ, Guan, L, Du, M, Rasmussen, TP, Poulos, SP, Mir, P, Bergen, WG, Fernyhough, ME, McFarland, DC, Rhoads, RP, Soret, B, Reecy, JM, Velleman, SG & Jiang, Z. (2010). Lipid metabolism, adipocyte depot physiology and utilization of meat animals as experimental models for metabolic research. *Int J Biol Sci*, **6**, 691-699.
120. Doglio, A, Dani, C, Grimaldi, P & Ailhaud, G. (1986). Growth hormone regulation of the expression of differentiation-dependent genes in preadipocyte Ob1771 cells. *Biochem J*, **238**, 123-129.
121. Drover, VA, Nguyen, DV, Bastie, CC, Darlington, YF, Abumrad, NA, Pessin, JE, London, E, Sahoo, D & Phillips, MC. (2008). CD36 mediates both cellular uptake of very long chain fatty acids and their intestinal absorption in mice. *J Biol Chem*, **283**, 13108-13115.

122. Duncan, RE, Ahmadian, M, Jaworski, K, Sarkadi-Nagy, E & Sul, HS. (2007). Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annu Rev Nutr*, **27**, 79-101.
123. Duncan, RE, Sarkadi-Nagy, E, Jaworski, K, Ahmadian, M & Sul, HS. (2008). Identification and functional characterization of adipose-specific phospholipase A2 (AdPLA). *J Biol Chem*, **283**, 25428-25436.
124. Egido, EM, Hernandez, R, Leprince, J, Chartrel, N, Vaudry, H, Marco, J & Silvestre, RA. (2007). 26RFa, a novel orexigenic neuropeptide, inhibits insulin secretion in the rat pancreas. *Peptides*, **28**, 725-730.
125. Eriksson, H, Ridderstrale, M, Degerman, E, Ekholm, D, Smith, CJ, Manganiello, VC, Belfrage, P & Tornqvist, H. (1995). Evidence for the key role of the adipocyte cGMP-inhibited cAMP phosphodiesterase in the antilipolytic action of insulin. *Biochim Biophys Acta*, **1266**, 101-107.
126. Fain, JN, Leffler, CW & Bahouth, SW. (2000a). Eicosanoids as endogenous regulators of leptin release and lipolysis by mouse adipose tissue in primary culture. *J Lipid Res*, **41**, 1689-1694.
127. Fain, JN, Leffler, CW, Bahouth, SW, Rice, AM & Rivkees, SA. (2000b). Regulation of leptin release and lipolysis by PGE2 in rat adipose tissue. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, **62**, 343-350.
128. Fajas, L, Schoonjans, K, Gelman, L, Kim, JB, Najib, J, Martin, G, Fruchart, JC, Briggs, M, Spiegelman, BM & Auwerx, J. (1999). Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism. *Mol Cell Biol*, **19**, 5495-5503.
129. Fan, W, Boston, BA, Kesterson, RA, Hruby, VJ & Cone, RD. (1997). Role of melanocortineric neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature*, **385**, 165-168.
130. Fang, Q, Liu, Q, Li, N, Jiang, TN, Li, YL, Yan, X & Wang, R. (2009). Cardiovascular effects of intravenous administered 26RFa, a novel RFamide peptide ligand for GPR103, in anaesthetised rats. *Eur J Pharmacol*, **621**, 61-66.
131. Farooqi, IS & O'Rahilly, S. (2007). Genetic factors in human obesity. *Obes Rev*, **8 Suppl 1**, 37-40.

132. Fasshauer, M, Klein, J, Lossner, U, Klier, M, Kralisch, S & Paschke, R. (2003). Suppression of aquaporin adipose gene expression by isoproterenol, TNFalpha, and dexamethasone. *Horm Metab Res*, **35**, 222-227.
133. Febbraio, M, Abumrad, NA, Hajjar, DP, Sharma, K, Cheng, W, Pearce, SF & Silverstein, RL. (1999). A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *J Biol Chem*, **274**, 19055-19062.
134. Febbraio, M & Silverstein, RL. (2007). CD36: implications in cardiovascular disease. *Int J Biochem Cell Biol*, **39**, 2012-2030.
135. Fetissov, SO, Kopp, J & Hokfelt, T. (2004). Distribution of NPY receptors in the hypothalamus. *Neuropeptides*, **38**, 175-188.
136. Feve, B. (2005). Adipogenesis: cellular and molecular aspects. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, **19**, 483-499.
137. Fischer, J, Lefevre, C, Morava, E, Mussini, JM, Laforet, P, Negre-Salvayre, A, Lathrop, M & Salvayre, R. (2007). The gene encoding adipose triglyceride lipase (PNPLA2) is mutated in neutral lipid storage disease with myopathy. *Nat Genet*, **39**, 28-30.
138. Floyd, ZE & Stephens, JM. (2003). STAT5A promotes adipogenesis in nonprecursor cells and associates with the glucocorticoid receptor during adipocyte differentiation. *Diabetes*, **52**, 308-314.
139. Ford, ES, Giles, WH & Dietz, WH. (2002). Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA*, **287**, 356-359.
140. Forman, BM, Tontonoz, P, Chen, J, Brun, RP, Spiegelman, BM & Evans, RM. (1995). 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell*, **83**, 803-812.
141. Fredrikson, G, Stralfors, P, Nilsson, NO & Belfrage, P. (1981). Hormone-sensitive lipase of rat adipose tissue. Purification and some properties. *J Biol Chem*, **256**, 6311-6320.
142. Fredrikson, G, Tornqvist, H & Belfrage, P. (1986). Hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte triacylglycerol. *Biochim Biophys Acta*, **876**, 288-293.

143. Freytag, SO, Paielli, DL & Gilbert, JD. (1994). Ectopic expression of the CCAAT/enhancer-binding protein alpha promotes the adipogenic program in a variety of mouse fibroblastic cells. *Genes Dev*, **8**, 1654-1663.
144. Fricke, K, Heitland, A & Maronde, E. (2004). Cooperative activation of lipolysis by protein kinase A and protein kinase C pathways in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology*, **145**, 4940-4947.
145. Fruchart-Najib, J, Bauge, E, Niculescu, LS, Pham, T, Thomas, B, Rommens, C, Majd, Z, Brewer, B, Pennacchio, LA & Fruchart, JC. (2004). Mechanism of triglyceride lowering in mice expressing human apolipoprotein A5. *Biochem Biophys Res Commun*, **319**, 397-404.
146. Fruebis, J, Tsao, TS, Javorschi, S, Ebbets-Reed, D, Erickson, MR, Yen, FT, Bihain, BE & Lodish, HF. (2001). 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*, **98**, 2005-2010.
147. Fruhbeck, G, Becerril, S, Sainz, N, Garrastachu, P & Garcia-Velloso, MJ. (2009). BAT: a new target for human obesity? *Trends Pharmacol Sci*, **30**, 387-396.
148. Fujimoto, Y, Itabe, H, Sakai, J, Makita, M, Noda, J, Mori, M, Higashi, Y, Kojima, S & Takano, T. (2004). Identification of major proteins in the lipid droplet-enriched fraction isolated from the human hepatocyte cell line HuH7. *Biochim Biophys Acta*, **1644**, 47-59.
149. Fukusumi, S, Yoshida, H, Fujii, R, Maruyama, M, Komatsu, H, Habata, Y, Shintani, Y, Hinuma, S & Fujino, M. (2003). A new peptidic ligand and its receptor regulating adrenal function in rats. *J Biol Chem*, **278**, 46387-46395.
150. Funk, CD. (2001). Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*, **294**, 1871-1875.
151. Gagnon, A, Antunes, TT, Ly, T, Pongsuwan, P, Gavin, C, Lochnan, HA & Sorisky, A. (2010). Thyroid-stimulating hormone stimulates lipolysis in adipocytes in culture and raises serum free fatty acid levels in vivo. *Metabolism*, **59**, 547-553.
152. Gallardo, N, Bonzon-Kulichenko, E, Fernandez-Agullo, T, Molto, E, Gomez-Alonso, S, Blanco, P, Carrascosa, JM, Ros, M & Andres, A. (2007). Tissue-

- specific effects of central leptin on the expression of genes involved in lipid metabolism in liver and white adipose tissue. *Endocrinology*, **148**, 5604-5610.
153. Galusca, B, Jeandel, L, Germain, N, Alexandre, D, Leprince, J, Anouar, Y, Estour, B & Chartrel, N. (2012). Orexigenic Neuropeptide 26RFa: New Evidence for an Adaptive Profile of Appetite Regulation in Anorexia Nervosa. *J Clin Endocrinol Metab*, **97**, 2012-2018.
  154. Gao, S, Kinzig, KP, Aja, S, Scott, KA, Keung, W, Kelly, S, Strynadka, K, Chohnan, S, Smith, WW, Tamashiro, KL, Ladenheim, EE, Ronnett, GV, Tu, Y, Birnbaum, MJ, Lopaschuk, GD & Moran, TH. (2007). Leptin activates hypothalamic acetyl-CoA carboxylase to inhibit food intake. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 17358-17363.
  155. Garcia, A, Sekowski, A, Subramanian, V & Brasaemle, DL. (2003). The central domain is required to target and anchor perilipin A to lipid droplets. *J Biol Chem*, **278**, 625-635.
  156. Gargiulo, CE, Stuhlsatz-Krouper, SM & Schaffer, JE. (1999). Localization of adipocyte long-chain fatty acyl-CoA synthetase at the plasma membrane. *J Lipid Res*, **40**, 881-892.
  157. Garton, AJ, Campbell, DG, Carling, D, Hardie, DG, Colbran, RJ & Yeaman, SJ. (1989). Phosphorylation of bovine hormone-sensitive lipase by the AMP-activated protein kinase. A possible antilipolytic mechanism. *Eur J Biochem*, **179**, 249-254.
  158. Gasic, S, Tian, B & Green, A. (1999). Tumor necrosis factor alpha stimulates lipolysis in adipocytes by decreasing Gi protein concentrations. *J Biol Chem*, **274**, 6770-6775.
  159. Gelfand, MJ, O'hara, SM, Curtwright, LA & Maclean, JR. (2005). Pre-medication to block [(18)F]FDG uptake in the brown adipose tissue of pediatric and adolescent patients. *Pediatr Radiol*, **35**, 984-990.
  160. Gericke, MT, Kosacka, J, Koch, D, Nowicki, M, Schroder, T, Ricken, AM, Nieber, K & Spanel-Borowski, K. (2009). Receptors for NPY and PACAP differ in expression and activity during adipogenesis in the murine 3T3-L1 fibroblast cell line. *Br J Pharmacol*, **157**, 620-632.
  161. Gerin, I, Bommer, GT, Lidell, ME, Cederberg, A, Enerback, S & MacDougald, OA. (2009). On the role of FOX transcription factors in

- adipocyte differentiation and insulin-stimulated glucose uptake. *J Biol Chem*, **284**, 10755-10763.
162. Gharbi-Chihi, J, Grimaldi, P, Torresani, J & Ailhaud, G. (1981). Triiodothyronine and adipose conversion of OB17 preadipocytes : binding to high affinity sites and effects on fatty acid synthetizing and esterifying enzymes. *J Recept Res*, **2**, 153-173.
  163. Girard, J, Perdereau, D, Foufelle, F, Prip-Buus, C & Ferre, P. (1994). Regulation of lipogenic enzyme gene expression by nutrients and hormones. *FASEB J*, **8**, 36-42.
  164. Girouard, H & Savard, R. (1998). The lack of bimodality in the effects of endogenous and exogenous prostaglandins on fat cell lipolysis in rats. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, **56**, 43-52.
  165. Golozoubova, V, Cannon, B & Nedergaard, J. (2006). UCP1 is essential for adaptive adrenergic nonshivering thermogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **291**, E350-E357.
  166. Gorin, E, Tal-Or, Z & Shafrir, E. (1969). Glyceroneogenesis in adipose tissue of fasted, diabetic and triamcinolone treated rats. *Eur J Biochem*, **8**, 370-375.
  167. Gould, CM & Newton, AC. (2008). The life and death of protein kinase C. *Curr Drug Targets*, **9**, 614-625.
  168. Granneman, JG, Moore, HP, Granneman, RL, Greenberg, AS, Obin, MS & Zhu, Z. (2007). Analysis of lipolytic protein trafficking and interactions in adipocytes. *J Biol Chem*, **282**, 5726-5735.
  169. Granneman, JG, Moore, HP, Krishnamoorthy, R & Rathod, M. (2009). Perilipin controls lipolysis by regulating the interactions of AB-hydrolase containing 5 (Abhd5) and adipose triglyceride lipase (Atgl). *J Biol Chem*, **284**, 34538-34544.
  170. Granneman, JG, Moore, HP, Mottillo, EP, Zhu, Z & Zhou, L. (2011). Interactions of perilipin-5 (Plin5) with adipose triglyceride lipase. *J Biol Chem*, **286**, 5126-5135.
  171. Green, H & Kehinde, O. (1975). An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell*, **5**, 19-27.

172. Green, H & Kehinde, O. (1976). Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells. *Cell*, **7**, 105-113.
173. Green, H & Meuth, M. (1974). An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell*, **3**, 127-133.
174. Greenberg, AS, Egan, JJ, Wek, SA, Garty, NB, Blanchette-Mackie, EJ & Londos, C. (1991). Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *J Biol Chem*, **266**, 11341-11346.
175. Greenberg, AS, Egan, JJ, Wek, SA, Moos, MC, Jr., Londos, C & Kimmel, AR. (1993). 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*, **90**, 12035-12039.
176. Greenberg, AS, Shen, WJ, Muliro, K, Patel, S, Souza, SC, Roth, RA & Kraemer, FB. (2001). Stimulation of lipolysis and hormone-sensitive lipase via the extracellular signal-regulated kinase pathway. *J Biol Chem*, **276**, 45456-45461.
177. Gregoire, F, Todoroff, G, Hauser, N & Remacle, C. (1990). The stromal-vascular fraction of rat inguinal and epididymal adipose tissue and the adipoconversion of fat cell precursors in primary culture. *Biol Cell*, **69**, 215-222.
178. Gregoire, FM, Smas, CM & Sul, HS. (1998). Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev*, **78**, 783-809.
179. Gruber, A, Cornaciu, I, Lass, A, Schweiger, M, Poeschl, M, Eder, C, Kumari, M, Schoiswohl, G, Wolinski, H, Kohlwein, SD, Zechner, R, Zimmermann, R & Oberer, M. (2010). The N-terminal region of comparative gene identification-58 (CGI-58) is important for lipid droplet binding and activation of adipose triglyceride lipase. *J Biol Chem*, **285**, 12289-12298.
180. Gurnell, M, Wentworth, JM, Agostini, M, Adams, M, Collingwood, TN, Provenzano, C, Browne, PO, Rajanayagam, O, Burris, TP, Schwabe, JW, Lazar, MA & Chatterjee, VK. (2000). A dominant-negative peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) mutant is a constitutive repressor and inhibits PPARgamma-mediated adipogenesis. *J Biol Chem*, **275**, 5754-5759.



181. Gurriaran-Rodriguez, U, Al-Massadi, O, Crujeiras, AB, Mosteiro, CS, Amil-Diz, M, Beiroa, D, Nogueiras, R, Seoane, LM, Gallego, R, Pazos, Y, Casanueva, FF & Camina, JP. (2011). Preproghrelin expression is a key target for insulin action on adipogenesis. *J Endocrinol*, **210**, R1-R7.
182. Hajri, T, Han, XX, Bonen, A & Abumrad, NA. (2002). Defective fatty acid uptake modulates insulin responsiveness and metabolic responses to diet in CD36-null mice. *J Clin Invest*, **109**, 1381-1389.
183. Hall, AM, Smith, AJ & Bernlohr, DA. (2003). Characterization of the Acyl-CoA synthetase activity of purified murine fatty acid transport protein 1. *J Biol Chem*, **278**, 43008-43013.
184. Hamilton, JA. (2003). Fast flip-flop of cholesterol and fatty acids in membranes: implications for membrane transport proteins. *Curr Opin Lipidol*, **14**, 263-271.
185. Hansen, JB, Zhang, H, Rasmussen, TH, Petersen, RK, Flindt, EN & Kristiansen, K. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta)-mediated regulation of preadipocyte proliferation and gene expression is dependent on cAMP signaling. *J Biol Chem*, **276**, 3175-3182.
186. Harmer, SC, Pepper, DJ, Cooke, K, Bennett, HP & Bicknell, AB. (2008). Evidence of a possible role for Lys-gamma3-MSH in the regulation of adipocyte function. *J Endocrinol*, **196**, 149-158.
187. Harp, JB, Franklin, D, Vanderpuije, AA & Gimble, JM. (2001). Differential expression of signal transducers and activators of transcription during human adipogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, **281**, 907-912.
188. Hauner, H, Entenmann, G, Wabitsch, M, Gaillard, D, Ailhaud, G, Negrel, R & Pfeiffer, EF. (1989). Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J Clin Invest*, **84**, 1663-1670.
189. Hausman, DB, DiGirolamo, M, Bartness, TJ, Hausman, GJ & Martin, RJ. (2001). The biology of white adipocyte proliferation. *Obes Rev*, **2**, 239-254.
190. He, W, Barak, Y, Hevener, A, Olson, P, Liao, D, Le, J, Nelson, M, Ong, E, Olefsky, JM & Evans, RM. (2003). Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 15712-15717.

191. Hellerstein, MK. (1999). De novo lipogenesis in humans: metabolic and regulatory aspects. *Eur J Clin Nutr*, **53 Suppl 1**, S53-S65.
192. Henderson, GC, Fattor, JA, Horning, MA, Faghihnia, N, Johnson, ML, Mau, TL, Luke-Zeitoun, M & Brooks, GA. (2007). Lipolysis and fatty acid metabolism in men and women during the postexercise recovery period. *J Physiol*, **584**, 963-981.
193. Herrera-Herrera, ML & Salazar-Olivo, LA. (2008). RFamide neuropeptides inhibit murine and human adipose differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, **377**, 29-34.
194. Heseltine, L, Webster, JM & Taylor, R. (1995). Adenosine effects upon insulin action on lipolysis and glucose transport in human adipocytes. *Mol Cell Biochem*, **144**, 147-151.
195. Hibuse, T, Maeda, N, Funahashi, T, Yamamoto, K, Nagasawa, A, Mizunoya, W, Kishida, K, Inoue, K, Kuriyama, H, Nakamura, T, Fushiki, T, Kihara, S & Shimomura, I. (2005). Aquaporin 7 deficiency is associated with development of obesity through activation of adipose glycerol kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 10993-10998.
196. Hickenbottom, SJ, Kimmel, AR, Londos, C & Hurley, JH. (2004). Structure of a lipid droplet protein; the PAT family member TIP47. *Structure*, **12**, 1199-1207.
197. Hiebert, SW, Chellappan, SP, Horowitz, JM & Nevins, JR. (1992). The interaction of RB with E2F coincides with an inhibition of the transcriptional activity of E2F. *Genes Dev*, **6**, 177-185.
198. Hinuma, S, Habata, Y, Fujii, R, Kawamata, Y, Hosoya, M, Fukusumi, S, Kitada, C, Masuo, Y, Asano, T, Matsumoto, H, Sekiguchi, M, Kurokawa, T, Nishimura, O, Onda, H & Fujino, M. (1998). A prolactin-releasing peptide in the brain. *Nature*, **393**, 272-276.
199. Hinuma, S, Shintani, Y, Fukusumi, S, Iijima, N, Matsumoto, Y, Hosoya, M, Fujii, R, Watanabe, T, Kikuchi, K, Terao, Y, Yano, T, Yamamoto, T, Kawamata, Y, Habata, Y, Asada, M, Kitada, C, Kurokawa, T, Onda, H, Nishimura, O, Tanaka, M, Ibata, Y & Fujino, M. (2000). New neuropeptides containing carboxy-terminal RFamide and their receptor in mammals. *Nat Cell Biol*, **2**, 703-708.

200. Hoch, M, Hirzel, E, Lindinger, P, Eberle, AN, Linscheid, P, Martin, I, Peters, T & Peterli, R. (2008). Weak functional coupling of the melanocortin-1 receptor expressed in human adipocytes. *J Recept Signal Transduct Res*, **28**, 485-504.
201. Hoffmann, MM & Stoffel, W. (1996). Construction and functional characterization of recombinant fusion proteins of human lipoprotein lipase and apolipoprotein CII. *Eur J Biochem*, **237**, 545-552.
202. Holm, C, Davis, RC, Osterlund, T, Schotz, MC & Fredrikson, G. (1994). Identification of the active site serine of hormone-sensitive lipase by site-directed mutagenesis. *FEBS Lett*, **344**, 234-238.
203. Holm, C, Kirchgessner, TG, Svenson, KL, Fredrikson, G, Nilsson, S, Miller, CG, Shively, JE, Heinzmann, C, Sparkes, RS, Mohandas, T & . (1988). Hormone-sensitive lipase: sequence, expression, and chromosomal localization to 19 cent-q13.3. *Science*, **241**, 1503-1506.
204. Holm, C, Osterlund, T, Laurell, H & Contreras, JA. (2000). Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Annu Rev Nutr*, **20**, 365-393.
205. Horvath, TL, Bechmann, I, Naftolin, F, Kalra, SP & Leranth, C. (1997). Heterogeneity in the neuropeptide Y-containing neurons of the rat arcuate nucleus: GABAergic and non-GABAergic subpopulations. *Brain Res*, **756**, 283-286.
206. Hu, FB, van Dam, RM & Liu, S. (2001). Diet and risk of Type II diabetes: the role of types of fat and carbohydrate. *Diabetologia*, **44**, 805-817.
207. Hu, Z, Cha, SH, Chohnan, S & Lane, MD. (2003). Hypothalamic malonyl-CoA as a mediator of feeding behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 12624-12629.
208. Hwang, CS, Mandrup, S, MacDougald, OA, Geiman, DE & Lane, MD. (1996). Transcriptional activation of the mouse obese (ob) gene by CCAAT/enhancer binding protein alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 873-877.
209. Ibrahimi, A, Bonen, A, Blinn, WD, Hajri, T, Li, X, Zhong, K, Cameron, R & Abumrad, NA. (1999). Muscle-specific overexpression of FAT/CD36 enhances fatty acid oxidation by contracting muscle, reduces plasma

- triglycerides and fatty acids, and increases plasma glucose and insulin. *J Biol Chem*, **274**, 26761-26766.
210. Ibrahimi, A, Sfeir, Z, Magharaie, H, Amri, EZ, Grimaldi, P & Abumrad, NA. (1996). Expression of the CD36 homolog (FAT) in fibroblast cells: effects on fatty acid transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 2646-2651.
  211. Jacobsson, B & Smith, U. (1972). Effect of cell size on lipolysis and antilipolytic action of insulin in human fat cells. *J Lipid Res*, **13**, 651-656.
  212. Janke, J, Engeli, S, Gorzelniak, K, Luft, FC & Sharma, AM. (2002). Mature adipocytes inhibit in vitro differentiation of human preadipocytes via angiotensin type 1 receptors. *Diabetes*, **51**, 1699-1707.
  213. Janson, A, Rawet, H, Perbeck, L & Marcus, C. (1998). Presence of thyrotropin receptor in infant adipocytes. *Pediatr Res*, **43**, 555-558.
  214. Jaworski, K, Ahmadian, M, Duncan, RE, Sarkadi-Nagy, E, Varady, KA, Hellerstein, MK, Lee, HY, Samuel, VT, Shulman, GI, Kim, KH, de, VS, Kang, C & Sul, HS. (2009). AdPLA ablation increases lipolysis and prevents obesity induced by high-fat feeding or leptin deficiency. *Nat Med*, **15**, 159-168.
  215. Jeandel, L, Okamura, H, Belles-Isles, M, Chabot, JG, Dihl, F, Morel, G, Kelly, PA & Heisler, S. (1989). Immunocytochemical localization, binding, and effects of atrial natriuretic peptide in rat adipocytes. *Mol Cell Endocrinol*, **62**, 69-78.
  216. Jenkins, CM, Mancuso, DJ, Yan, W, Sims, HF, Gibson, B & Gross, RW. (2004). Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. *J Biol Chem*, **279**, 48968-48975.
  217. Jensen, MD. (1997). Lipolysis: contribution from regional fat. *Annu Rev Nutr*, **17**, 127-139.
  218. Jiang, HP & Serrero, G. (1992). Isolation and characterization of a full-length cDNA coding for an adipose differentiation-related protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 7856-7860.

219. Jiang, Y, Gao, G, Fang, G, Gustafson, EL, Lavery, M, Yin, Y, Zhang, Y, Luo, J, Greene, JR, Bayne, ML, Hedrick, JA & Murgolo, NJ. (2003a). PepPat, a pattern-based oligopeptide homology search method and the identification of a novel tachykinin-like peptide. *Mamm Genome*, **14**, 341-349.
220. Jiang, Y, Luo, L, Gustafson, EL, Yadav, D, Lavery, M, Murgolo, N, Vassileva, G, Zeng, M, Laz, TM, Behan, J, Qiu, P, Wang, L, Wang, S, Bayne, M, Greene, J, Monsma, F, Jr. & Zhang, FL. (2003b). Identification and characterization of a novel RF-amide peptide ligand for orphan G-protein-coupled receptor SP9155. *J Biol Chem*, **278**, 27652-27657.
221. Johansson, SM, Lindgren, E, Yang, JN, Herling, AW & Fredholm, BB. (2008). Adenosine A1 receptors regulate lipolysis and lipogenesis in mouse adipose tissue-interactions with insulin. *Eur J Pharmacol*, **597**, 92-101.
222. Jones, BH, Standridge, MK, Taylor, JW & Moustaid, N. (1997). Angiotensinogen gene expression in adipose tissue: analysis of obese models and hormonal and nutritional control. *Am J Physiol*, **273**, R236-R242.
223. Joyner, JM, Hutley, LJ & Cameron, DP. (2000). Glucocorticoid receptors in human preadipocytes: regional and gender differences. *J Endocrinol*, **166**, 145-152.
224. Judge, MR, Atherton, DJ, Salvayre, R, Hilaire, N, Levade, T, Johnston, DI, Winchester, B & Lake, BD. (1994). Neutral lipid storage disease. Case report and lipid studies. *Br J Dermatol*, **130**, 507-510.
225. Kaestner, KH, Christy, RJ & Lane, MD. (1990). Mouse insulin-responsive glucose transporter gene: characterization of the gene and trans-activation by the CCAAT/enhancer binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 251-255.
226. Kalra, SP, Dube, MG, Pu, S, Xu, B, Horvath, TL & Kalra, PS. (1999). Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev*, **20**, 68-100.
227. Kalra, SP & Kalra, PS. (2004a). NPY and cohorts in regulating appetite, obesity and metabolic syndrome: beneficial effects of gene therapy. *Neuropeptides*, **38**, 201-211.
228. Kalra, SP & Kalra, PS. (2004b). Overlapping and interactive pathways regulating appetite and craving. *J Addict Dis*, **23**, 5-21.

229. Kampe, J, Wiedmer, P, Pfluger, PT, Castaneda, TR, Burget, L, Mondala, H, Kerr, J, Liaw, C, Oldfield, BJ, Tschop, MH & Bagnol, D. (2006). Effect of central administration of QRFP(26) peptide on energy balance and characterization of a second QRFP receptor in rat. *Brain Res*, **1119**, 133-149.
230. Karlsson, M, Contreras, JA, Hellman, U, Tornqvist, H & Holm, C. (1997). cDNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase. Evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases, and haloperoxidases. *J Biol Chem*, **272**, 27218-27223.
231. Kawai, M, Namba, N, Mushiake, S, Etani, Y, Nishimura, R, Makishima, M & Ozono, K. (2007). Growth hormone stimulates adipogenesis of 3T3-L1 cells through activation of the Stat5A/5B-PPARgamma pathway. *J Mol Endocrinol*, **38**, 19-34.
232. Kersten, S. (2001). Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep*, **2**, 282-286.
233. Kim, J, Temple, KA, Jones, SA, Meredith, KN, Basko, JL & Brady, MJ. (2007). Differential modulation of 3T3-L1 adipogenesis mediated by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase-1 levels. *J Biol Chem*, **282**, 11038-11046.
234. Kim, JB, Sarraf, P, Wright, M, Yao, KM, Mueller, E, Solanes, G, Lowell, BB & Spiegelman, BM. (1998a). Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. *J Clin Invest*, **101**, 1-9.
235. Kim, JB & Spiegelman, BM. (1996). ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev*, **10**, 1096-1107.
236. Kim, JB, Wright, HM, Wright, M & Spiegelman, BM. (1998b). ADD1/SREBP1 activates PPARgamma through the production of endogenous ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 4333-4337.
237. Kim, JK, Gimeno, RE, Higashimori, T, Kim, HJ, Choi, H, Punreddy, S, Mozell, RL, Tan, G, Stricker-Krongrad, A, Hirsch, DJ, Fillmore, JJ, Liu, ZX, Dong, J, Cline, G, Stahl, A, Lodish, HF & Shulman, GI. (2004). Inactivation of fatty acid transport protein 1 prevents fat-induced insulin resistance in skeletal muscle. *J Clin Invest*, **113**, 756-763.

238. Kim, JY, Tillison, K, Lee, JH, Rearick, DA & Smas, CM. (2006). The adipose tissue triglyceride lipase ATGL/PNPLA2 is downregulated by insulin and TNF-alpha in 3T3-L1 adipocytes and is a target for transactivation by PPARgamma. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **291**, E115-E127.
239. Kimmel, AR, Brasaemle, DL, McAndrews-Hill, M, Sztalryd, C & Londos, C. (2010). Adoption of PERILIPIN as a unifying nomenclature for the mammalian PAT-family of intracellular lipid storage droplet proteins. *J Lipid Res*, **51**, 468-471.
240. Kliewer, SA, Lenhard, JM, Willson, TM, Patel, I, Morris, DC & Lehmann, JM. (1995). A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell*, **83**, 813-819.
241. Konieczny, SF & Emerson, CP, Jr. (1984). 5-Azacytidine induction of stable mesodermal stem cell lineages from 10T1/2 cells: evidence for regulatory genes controlling determination. *Cell*, **38**, 791-800.
242. Kos, K, Harte, AL, O'Hare, PJ, Kumar, S & McTernan, PG. (2009). Ghrelin and the differential regulation of des-acyl (DSG) and oct-anoyl ghrelin (OTG) in human adipose tissue (AT). *Clin Endocrinol (Oxf)*, **70**, 383-389.
243. Koutsari, C & Jensen, MD. (2006). Thematic review series: patient-oriented research. Free fatty acid metabolism in human obesity. *J Lipid Res*, **47**, 1643-1650.
244. Kreier, F, Fliers, E, Voshol, PJ, Van Eden, CG, Havekes, LM, Kalsbeek, A, Van Heijningen, CL, Sluiter, AA, Mettenleiter, TC, Romijn, JA, Sauerwein, HP & Buijs, RM. (2002). Selective parasympathetic innervation of subcutaneous and intra-abdominal fat--functional implications. *J Clin Invest*, **110**, 1243-1250.
245. Krintel, C, Osmark, P, Larsen, MR, Resjo, S, Logan, DT & Holm, C. (2008). Ser649 and Ser650 are the major determinants of protein kinase A-mediated activation of human hormone-sensitive lipase against lipid substrates. *PLoS One*, **3**, e3756.
246. Kubota, N, Terauchi, Y, Miki, H, Tamemoto, H, Yamauchi, T, Komeda, K, Satoh, S, Nakano, R, Ishii, C, Sugiyama, T, Eto, K, Tsubamoto, Y, Okuno, A, Murakami, K, Sekihara, H, Hasegawa, G, Naito, M, Toyoshima, Y, Tanaka, S, Shiota, K, Kitamura, T, Fujita, T, Ezaki, O, Aizawa, S, Kadowaki, T & .

- (1999). PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell*, **4**, 597-609.
247. Kumar, N, Robidoux, J, Daniel, KW, Guzman, G, Floering, LM & Collins, S. (2007). Requirement of vimentin filament assembly for beta3-adrenergic receptor activation of ERK MAP kinase and lipolysis. *J Biol Chem*, **282**, 9244-9250.
248. Kuo, LE, Kitlinska, JB, Tilan, JU, Li, L, Baker, SB, Johnson, MD, Lee, EW, Burnett, MS, Fricke, ST, Kvetnansky, R, Herzog, H & Zukowska, Z. (2007). Neuropeptide Y acts directly in the periphery on fat tissue and mediates stress-induced obesity and metabolic syndrome. *Nat Med*, **13**, 803-811.
249. Kuri-Harcuch, W & Marsch-Moreno, M. (1983). DNA synthesis and cell division related to adipose differentiation of 3T3 cells. *J Cell Physiol*, **114**, 39-44.
250. Labelle, M, Boulanger, Y, Fournier, A, St, PS & Savard, R. (1997). Tissue-specific regulation of fat cell lipolysis by NPY in 6-OHDA-treated rats. *Peptides*, **18**, 801-808.
251. Lafontan, M. (2008). Advances in adipose tissue metabolism. *Int J Obes (Lond)*, **32 Suppl 7**, S39-S51.
252. Lafontan, M & Langin, D. (2009). Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog Lipid Res*, **48**, 275-297.
253. Lage, R, Dieguez, C, Vidal-Puig, A & Lopez, M. (2008). AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis. *Trends Mol Med*, **14**, 539-549.
254. Laharrague, P, Corberand, JX, Cousin, B, Penicaud, L & Casteilla, L. (1999). Adipocytes médullaires et hématopoïèse. *Med Sci (Paris)*, **5**, 255-263.
255. Lam, K, Carpenter, CL, Ruderman, NB, Friel, JC & Kelly, KL. (1994). The phosphatidylinositol 3-kinase serine kinase phosphorylates IRS-1. Stimulation by insulin and inhibition by Wortmannin. *J Biol Chem*, **269**, 20648-20652.
256. Lane, MD, Lin, FT, MacDougald, OA & Vasseur-Cognet, M. (1996). Control of adipocyte differentiation by CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP alpha). *Int J Obes Relat Metab Disord*, **20 Suppl 3**, S91-S96.



257. Lane, MD, Tang, QQ & Jiang, MS. (1999). Role of the CCAAT enhancer binding proteins (C/EBPs) in adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, **266**, 677-683.
258. Langin, D. (2010). Recruitment of brown fat and conversion of white into brown adipocytes: strategies to fight the metabolic complications of obesity? *Biochim Biophys Acta*, **1801**, 372-376.
259. Langin, D, Laurell, H, Holst, LS, Belfrage, P & Holm, C. (1993). Gene organization and primary structure of human hormone-sensitive lipase: possible significance of a sequence homology with a lipase of *Moraxella* TA144, an antarctic bacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 4897-4901.
260. Large, V, Peroni, O, Letexier, D, Ray, H & Beylot, M. (2004). Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metab*, **30**, 294-309.
261. LaRosa, JC, Levy, RI, Herbert, P, Lux, SE & Fredrickson, DS. (1970). A specific apoprotein activator for lipoprotein lipase. *Biochem Biophys Res Commun*, **41**, 57-62.
262. Lass, A, Zimmermann, R, Haemmerle, G, Riederer, M, Schoiswohl, G, Schweiger, M, Kienesberger, P, Strauss, JG, Gorkiewicz, G & Zechner, R. (2006). Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell Metab*, **3**, 309-319.
263. Laugwitz, KL, Allgeier, A, Offermanns, S, Spicher, K, Van, SJ, Dumont, JE & Schultz, G. (1996). The human thyrotropin receptor: a heptahelical receptor capable of stimulating members of all four G protein families. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 116-120.
264. Laviola, L, Perrini, S, Cignarelli, A, Natalicchio, A, Leonardini, A, De, SF, Cuscito, M, De, FM, Memeo, V, Neri, V, Cignarelli, M, Giorgino, R & Giorgino, F. (2006). Insulin signaling in human visceral and subcutaneous adipose tissue in vivo. *Diabetes*, **55**, 952-961.
265. Le, LS, Hajdуч, E, Lindsay, MR, Le, L, X, Thiele, C, Ferre, P, Parton, RG, Kurzchalia, T, Simons, K & Dugail, I. (2006). Cholesterol-induced caveolin targeting to lipid droplets in adipocytes: a role for caveolar endocytosis. *Traffic*, **7**, 549-561.

266. Lectez, B, Jeandel, L, El-Yamani, FZ, Arthaud, S, Alexandre, D, Mardargent, A, Jegou, S, Mounien, L, Bizet, P, Magoul, R, Anouar, Y & Chartrel, N. (2009). The orexigenic activity of the hypothalamic neuropeptide 26RFa is mediated by the neuropeptide Y and proopiomelanocortin neurons of the arcuate nucleus. *Endocrinology*, **150**, 2342-2350.
267. Lee, DK, Nguyen, T, Lynch, KR, Cheng, R, Vanti, WB, Arkhitko, O, Lewis, T, Evans, JF, George, SR & O'Dowd, BF. (2001). Discovery and mapping of ten novel G protein-coupled receptor genes. *Gene*, **275**, 83-91.
268. Lee, K, Villena, JA, Moon, YS, Kim, KH, Lee, S, Kang, C & Sul, HS. (2003). Inhibition of adipogenesis and development of glucose intolerance by soluble preadipocyte factor-1 (Pref-1). *J Clin Invest*, **111**, 453-461.
269. Lefevre, C, Jobard, F, Caux, F, Bouadjar, B, Karaduman, A, Heilig, R, Lakhdar, H, Wollenberg, A, Verret, JL, Weissenbach, J, Ozguc, M, Lathrop, M, Prud'homme, JF & Fischer, J. (2001). Mutations in CGI-58, the gene encoding a new protein of the esterase/lipase/thioesterase subfamily, in Chanarin-Dorfman syndrome. *Am J Hum Genet*, **69**, 1002-1012.
270. Lefrere, I, De, CP, Camelin, JC, Le, LS, Mercier, N, Elshourbagy, N, Bril, A, Berrebi-Bertrand, I, Fève, B & Krief, S. (2002). Neuropeptide AF and FF modulation of adipocyte metabolism. Primary insights from functional genomics and effects on beta-adrenergic responsiveness. *J Biol Chem*, **277**, 39169-39178.
271. Lefterova, MI & Lazar, MA. (2009). New developments in adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab*, **20**, 107-114.
272. Lewis, M, Tartaglia, LA, Lee, A, Bennett, GL, Rice, GC, Wong, GH, Chen, EY & Goeddel, DV. (1991). Cloning and expression of cDNAs for two distinct murine tumor necrosis factor receptors demonstrate one receptor is species specific. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 2830-2834.
273. Li, C, Kim, K & Nelson, LS. (1999). FMRFamide-related neuropeptide gene family in *Caenorhabditis elegans*. *Brain Res*, **848**, 26-34.
274. Li, R, Guan, H & Yang, K. (2012). Neuropeptide Y potentiates beta-adrenergic stimulation of lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *Regul Pept*, **178**, 16-20.

275. Li, S, Seitz, R & Lisanti, MP. (1996). Phosphorylation of caveolin by src tyrosine kinases. The alpha-isoform of caveolin is selectively phosphorylated by v-Src in vivo. *J Biol Chem*, **271**, 3863-3868.
276. Lieber, JG & Evans, RM. (1996). Disruption of the vimentin intermediate filament system during adipose conversion of 3T3-L1 cells inhibits lipid droplet accumulation. *J Cell Sci*, **109 ( Pt 13)**, 3047-3058.
277. Lien, CC, Au, LC, Tsai, YL, Ho, LT & Juan, CC. (2009). Short-term regulation of tumor necrosis factor-alpha-induced lipolysis in 3T3-L1 adipocytes is mediated through the inducible nitric oxide synthase/nitric oxide-dependent pathway. *Endocrinology*, **150**, 4892-4900.
278. Lin, FT & Lane, MD. (1992). Antisense CCAAT/enhancer-binding protein RNA suppresses coordinate gene expression and triglyceride accumulation during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Genes Dev*, **6**, 533-544.
279. Lin, FT, MacDougald, OA, Diehl, AM & Lane, MD. (1993). A 30-kDa alternative translation product of the CCAAT/enhancer binding protein alpha message: transcriptional activator lacking antimetabolic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 9606-9610.
280. Litthauer, D & Serrero, G. (1992). The primary culture of mouse adipocyte precursor cells in defined medium. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*, **101**, 59-64.
281. Liu, C, Wu, J, Zhu, J, Kuei, C, Yu, J, Shelton, J, Sutton, SW, Li, X, Yun, SJ, Mirzadegan, T, Mazur, C, Kamme, F & Lovenberg, TW. (2009a). Lactate inhibits lipolysis in fat cells through activation of an orphan G-protein-coupled receptor, GPR81. *J Biol Chem*, **284**, 2811-2822.
282. Liu, P, Ying, Y, Zhao, Y, Mundy, DI, Zhu, M & Anderson, RG. (2004). Chinese hamster ovary K2 cell lipid droplets appear to be metabolic organelles involved in membrane traffic. *J Biol Chem*, **279**, 3787-3792.
283. Liu, Y, Sun, Y, Zhu, T, Xie, Y, Yu, J, Sun, WL, Ding, GX & Hu, G. (2007). 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 promotes differentiation of 3T3-L1 preadipocyte. *Acta Pharmacol Sin*, **28**, 1198-1204.
284. Liu, Y, Zhang, Y, Li, S, Huang, W, Liu, X, Lu, D, Meng, Z & Lin, H. (2009b). Molecular cloning and functional characterization of the first non-mammalian

- 26RFa/QRFP orthologue in Goldfish, *Carassius auratus*. *Mol Cell Endocrinol*, **303**, 82-90.
285. Lobo, S, Wiczer, BM & Bernlohr, DA. (2009). Functional analysis of long-chain acyl-CoA synthetase 1 in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, **284**, 18347-18356.
286. Lobo, S, Wiczer, BM, Smith, AJ, Hall, AM & Bernlohr, DA. (2007). Fatty acid metabolism in adipocytes: functional analysis of fatty acid transport proteins 1 and 4. *J Lipid Res*, **48**, 609-620.
287. Loftus, TM, Jaworsky, DE, Frehywot, GL, Townsend, CA, Ronnett, GV, Lane, MD & Kuhajda, FP. (2000). Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science*, **288**, 2379-2381.
288. Logan, CY & Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **20**, 781-810.
289. Londos, C, Brasaemle, DL, Gruia-Gray, J, Servetnick, DA, Schultz, CJ, Levin, DM & Kimmel, AR. (1995). Perilipin: unique proteins associated with intracellular neutral lipid droplets in adipocytes and steroidogenic cells. *Biochem Soc Trans*, **23**, 611-615.
290. Londos, C, Brasaemle, DL, Schultz, CJ, Segrest, JP & Kimmel, AR. (1999). Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells. *Semin Cell Dev Biol*, **10**, 51-58.
291. Londos, C, Gruia-Gray, J, Brasaemle, DL, Rondinone, CM, Takeda, T, Dwyer, NK, Barber, T, Kimmel, AR & Blanchette-Mackie, EJ. (1996). Perilipin: possible roles in structure and metabolism of intracellular neutral lipids in adipocytes and steroidogenic cells. *Int J Obes Relat Metab Disord*, **20 Suppl 3**, S97-101.
292. Lopez, M, Tovar, S, Vazquez, MJ, Williams, LM & Dieguez, C. (2007). Peripheral tissue-brain interactions in the regulation of food intake. *Proc Nutr Soc*, **66**, 131-155.
293. Lu, X, Gruia-Gray, J, Copeland, NG, Gilbert, DJ, Jenkins, NA, Londos, C & Kimmel, AR. (2001). The murine perilipin gene: the lipid droplet-associated perilipins derive from tissue-specific, mRNA splice variants and define a gene family of ancient origin. *Mamm Genome*, **12**, 741-749.

294. Lu, X, Yang, X & Liu, J. (2010). Differential control of ATGL-mediated lipid droplet degradation by CGI-58 and G0S2. *Cell Cycle*, **9**, 2719-2725.
295. Maack, T. (1992). Receptors of atrial natriuretic factor. *Annu Rev Physiol*, **54**, 11-27.
296. MacDougald, OA, Cornelius, P, Lin, FT, Chen, SS & Lane, MD. (1994). Glucocorticoids reciprocally regulate expression of the CCAAT/enhancer-binding protein alpha and delta genes in 3T3-L1 adipocytes and white adipose tissue. *J Biol Chem*, **269**, 19041-19047.
297. Mairal, A, Melaine, N, Laurell, H, Grober, J, Holst, LS, Guillaudeux, T, Holm, C, Jegou, B & Langin, D. (2002). Characterization of a novel testicular form of human hormone-sensitive lipase. *Biochem Biophys Res Commun*, **291**, 286-290.
298. Manganiello, VC, Smith, CJ, Degerman, E, Vasta, V, Tornqvist, H & Belfrage, P. (1991). Molecular mechanisms involved in the antilipolytic action of insulin: phosphorylation and activation of a particulate adipocyte cAMP phosphodiesterase. *Adv Exp Med Biol*, **293**, 239-248.
299. Mantovani, G, Bondioni, S, Alberti, L, Gilardini, L, Invitti, C, Corbetta, S, Zappa, MA, Ferrero, S, Lania, AG, Bosari, S, Beck-Peccoz, P & Spada, A. (2009). Protein kinase A regulatory subunits in human adipose tissue: decreased R2B expression and activity in adipocytes from obese subjects. *Diabetes*, **58**, 620-626.
300. Marchildon, F, St-Louis, C, Akter, R, Roodman, V & Wiper-Bergeron, NL. (2010). Transcription factor Smad3 is required for the inhibition of adipogenesis by retinoic acid. *J Biol Chem*, **285**, 13274-13284.
301. Marcus, C, Ehren, H, Bolme, P & Arner, P. (1988). Regulation of lipolysis during the neonatal period. Importance of thyrotropin. *J Clin Invest*, **82**, 1793-1797.
302. Margareto, J, Aguado, M, Osés-Prieto, JA, Rivero, I, Monge, A, Aldana, I, Marti, A & Martinez, JA. (2000). A new NPY-antagonist strongly stimulates apoptosis and lipolysis on white adipocytes in an obesity model. *Life Sci*, **68**, 99-107.
303. Marx, N, Bourcier, T, Sukhova, GK, Libby, P & Plutzky, J. (1999). PPARgamma activation in human endothelial cells increases plasminogen

- activator inhibitor type-1 expression: PPARgamma as a potential mediator in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **19**, 546-551.
304. Masuzaki, H, Paterson, J, Shinyama, H, Morton, NM, Mullins, JJ, Seckl, JR & Flier, JS. (2001). A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science*, **294**, 2166-2170.
  305. Matarese, V & Bernlohr, DA. (1988). Purification of murine adipocyte lipid-binding protein. Characterization as a fatty acid- and retinoic acid-binding protein. *J Biol Chem*, **263**, 14544-14551.
  306. Mauriege, P, De, PG, Berlan, M & Lafontan, M. (1988). Human fat cell beta-adrenergic receptors: beta-agonist-dependent lipolytic responses and characterization of beta-adrenergic binding sites on human fat cell membranes with highly selective beta 1-antagonists. *J Lipid Res*, **29**, 587-601.
  307. Mauriege, P, Galitzky, J, Berlan, M & Lafontan, M. (1987). Heterogeneous distribution of beta and alpha-2 adrenoceptor binding sites in human fat cells from various fat deposits: functional consequences. *Eur J Clin Invest*, **17**, 156-165.
  308. McKeon, C & Pham, T. (1991). Transactivation of the human insulin receptor gene by the CAAT/enhancer binding protein. *Biochem Biophys Res Commun*, **174**, 721-728.
  309. Meshulam, T, Simard, JR, Wharton, J, Hamilton, JA & Pilch, PF. (2006). Role of caveolin-1 and cholesterol in transmembrane fatty acid movement. *Biochemistry*, **45**, 2882-2893.
  310. Michalik, L & Wahli, W. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptors: three isotypes for a multitude of functions. *Curr Opin Biotechnol*, **10**, 564-570.
  311. Miegueu, P, Cianflone, K, Richard, D & St-Pierre, DH. (2013a). Effect of secretin on preadipocyte, differentiating and mature adipocyte functions. *Int J Obes (Lond)*, **37**, 366-374.
  312. Miegueu, P, St, PD, Broglio, F & Cianflone, K. (2011). Effect of desacyl ghrelin, obestatin and related peptides on triglyceride storage, metabolism and GHSR signaling in 3T3-L1 adipocytes. *J Cell Biochem*, **112**, 704-714.

313. Miegueu, P, St-Pierre, DH, Munkonda, MN, Lapointe, M & Cianflone, K. (2013b). Amylin stimulates fatty acid esterification in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Endocrinol*, **366**, 99-107.
314. Minehira, K, Vega, N, Vidal, H, Acheson, K & Tappy, L. (2004). Effect of carbohydrate overfeeding on whole body macronutrient metabolism and expression of lipogenic enzymes in adipose tissue of lean and overweight humans. *Int J Obes Relat Metab Disord*, **28**, 1291-1298.
315. Minokoshi, Y, Alquier, T, Furukawa, N, Kim, YB, Lee, A, Xue, B, Mu, J, Foufelle, F, Ferre, P, Birnbaum, MJ, Stuck, BJ & Kahn, BB. (2004). AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature*, **428**, 569-574.
316. Miura, S, Gan, JW, Brzostowski, J, Parisi, MJ, Schultz, CJ, Londos, C, Oliver, B & Kimmel, AR. (2002). Functional conservation for lipid storage droplet association among Perilipin, ADRP, and TIP47 (PAT)-related proteins in mammals, Drosophila, and Dictyostelium. *J Biol Chem*, **277**, 32253-32257.
317. Miyoshi, H, Perfield, JW, Souza, SC, Shen, WJ, Zhang, HH, Stancheva, ZS, Kraemer, FB, Obin, MS & Greenberg, AS. (2007). Control of adipose triglyceride lipase action by serine 517 of perilipin A globally regulates protein kinase A-stimulated lipolysis in adipocytes. *J Biol Chem*, **282**, 996-1002.
318. Miyoshi, H, Souza, SC, Zhang, HH, Strissel, KJ, Christoffolete, MA, Kovan, J, Rudich, A, Kraemer, FB, Bianco, AC, Obin, MS & Greenberg, AS. (2006). Perilipin promotes hormone-sensitive lipase-mediated adipocyte lipolysis via phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem*, **281**, 15837-15844.
319. Mizuno, H, Zuk, PA, Zhu, M, Lorenz, HP, Benhaim, P & Hedrick, MH. (2002). Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast Reconstr Surg*, **109**, 199-209.
320. Moldes, M, Zuo, Y, Morrison, RF, Silva, D, Park, BH, Liu, J & Farmer, SR. (2003). Peroxisome-proliferator-activated receptor gamma suppresses Wnt/beta-catenin signalling during adipogenesis. *Biochem J*, **376**, 607-613.
321. Moller, CL, Raun, K, Jacobsen, ML, Pedersen, TA, Holst, B, Conde-Frieboes, KW & Wulff, BS. (2011). Characterization of murine melanocortin receptors

- mediating adipocyte lipolysis and examination of signalling pathways involved. *Mol Cell Endocrinol*, **341**, 9-17.
322. Moon, YS, Smas, CM, Lee, K, Villena, JA, Kim, KH, Yun, EJ & Sul, HS. (2002). Mice lacking paternally expressed Pref-1/Dlk1 display growth retardation and accelerated adiposity. *Mol Cell Biol*, **22**, 5585-5592.
323. Mori, T, Sakaue, H, Iguchi, H, Gomi, H, Okada, Y, Takashima, Y, Nakamura, K, Nakamura, T, Yamauchi, T, Kubota, N, Kadowaki, T, Matsuki, Y, Ogawa, W, Hiramatsu, R & Kasuga, M. (2005). Role of Kruppel-like factor 15 (KLF15) in transcriptional regulation of adipogenesis. *J Biol Chem*, **280**, 12867-12875.
324. Moriya, R, Sano, H, Umeda, T, Ito, M, Takahashi, Y, Matsuda, M, Ishihara, A, Kanatani, A & Iwaasa, H. (2006). RFamide peptide QRFP43 causes obesity with hyperphagia and reduced thermogenesis in mice. *Endocrinology*, **147**, 2916-2922.
325. Moro, C, Galitzky, J, Sengenès, C, Crampes, F, Lafontan, M & Berlan, M. (2004). Functional and pharmacological characterization of the natriuretic peptide-dependent lipolytic pathway in human fat cells. *J Pharmacol Exp Ther*, **308**, 984-992.
326. Moro, C, Pillard, F, De, G, I, Klimcakova, E, Crampes, F, Thalamas, C, Harant, I, Marques, MA, Lafontan, M & Berlan, M. (2008). Exercise-induced lipid mobilization in subcutaneous adipose tissue is mainly related to natriuretic peptides in overweight men. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **295**, E505-E513.
327. Moro, C, Polak, J, Hejnova, J, Klimcakova, E, Crampes, F, Stich, V, Lafontan, M & Berlan, M. (2006). Atrial natriuretic peptide stimulates lipid mobilization during repeated bouts of endurance exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **290**, E864-E869.
328. Morrison, CD. (2008). Leptin resistance and the response to positive energy balance. *Physiol Behav*, **94**, 660-663.
329. Morrison, RF & Farmer, SR. (2000). Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. *J Nutr*, **130**, 3116S-3121S.



330. Morton, GJ, Cummings, DE, Baskin, DG, Barsh, GS & Schwartz, MW. (2006). Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*, **443**, 289-295.
331. Morton, NM, Paterson, JM, Masuzaki, H, Holmes, MC, Staels, B, Fievet, C, Walker, BR, Flier, JS, Mullins, JJ & Seckl, JR. (2004). Novel adipose tissue-mediated resistance to diet-induced visceral obesity in 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1-deficient mice. *Diabetes*, **53**, 931-938.
332. Moulas, AN, Krieg, RJ, Jr., Veldhuis, JD & Chan, JC. (2002). Effect of the GH secretagogue L-163,255 and restricted feeding time on GH pulsatility in the rat. *Eur J Endocrinol*, **147**, 143-148.
333. Moule, SK, Welsh, GI, Edgell, NJ, Foulstone, EJ, Proud, CG & Denton, RM. (1997). Regulation of protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 by insulin and beta-adrenergic agonists in rat epididymal fat cells. Activation of protein kinase B by wortmannin-sensitive and -insensitive mechanisms. *J Biol Chem*, **272**, 7713-7719.
334. Moustaid, N, Lasnier, F, Hainque, B, Quignard-Boulangue, A & Pairault, J. (1990). Analysis of gene expression during adipogenesis in 3T3-F442A preadipocytes: insulin and dexamethasone control. *J Cell Biochem*, **42**, 243-254.
335. Muccioli, G, Pons, N, Ghe, C, Catapano, F, Granata, R & Ghigo, E. (2004). Ghrelin and des-acyl ghrelin both inhibit isoproterenol-induced lipolysis in rat adipocytes via a non-type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Eur J Pharmacol*, **498**, 27-35.
336. Mulder, H, Holst, LS, Svensson, H, Degerman, E, Sundler, F, Ahren, B, Rorsman, P & Holm, C. (1999). Hormone-sensitive lipase, the rate-limiting enzyme in triglyceride hydrolysis, is expressed and active in beta-cells. *Diabetes*, **48**, 228-232.
337. Mulumba, M, Jossart, C, Granata, R, Gallo, D, Escher, E, Ghigo, E, Servant, MJ, Marleau, S & Ong, H. (2010). GPR103b functions in the peripheral regulation of adipogenesis. *Mol Endocrinol*, **24**, 1615-1625.
338. Nagare, T, Sakaue, H, Matsumoto, M, Cao, Y, Inagaki, K, Sakai, M, Takashima, Y, Nakamura, K, Mori, T, Okada, Y, Matsuki, Y, Watanabe, E, Ikeda, K, Taguchi, R, Kamimura, N, Ohta, S, Hiramatsu, R & Kasuga, M. (2011). Overexpression of KLF15 in adipocytes of mice results in down-

regulation of SCD1 expression in adipocytes and consequent enhancement of glucose-induced insulin secretion. *J Biol Chem*.

339. Nagy, L, Tontonoz, P, Alvarez, JG, Chen, H & Evans, RM. (1998). Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell*, **93**, 229-240.
340. Nakae, J, Kitamura, T, Kitamura, Y, Biggs, WH, III, Arden, KC & Accili, D. (2003). The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation. *Dev Cell*, **4**, 119-129.
341. Nakamura, J. (2008). Protein kinase Cbeta1 interacts with the beta1-adrenergic signaling pathway to attenuate lipolysis in rat adipocytes. *Biochim Biophys Acta*, **1781**, 277-281.
342. Nakamura, J. (2010). Phorbol 12-myristate 13-acetate inhibits the antilipolytic action of insulin, probably via the activity of protein kinase Cepsilon. *Eur J Pharmacol*, **648**, 188-194.
343. Nanbu-Wakao, R, Fujitani, Y, Masuho, Y, Muramatsu, M & Wakao, H. (2000). Prolactin enhances CCAAT enhancer-binding protein-beta (C/EBP beta) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) messenger RNA expression and stimulates adipogenic conversion of NIH-3T3 cells. *Mol Endocrinol*, **14**, 307-316.
344. Napolitano, A, Voice, MW, Edwards, CR, Seckl, JR & Chapman, KE. (1998). 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 in adipocytes: expression is differentiation-dependent and hormonally regulated. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **64**, 251-260.
345. Navarro, VM, Fernandez-Fernandez, R, Nogueiras, R, Vigo, E, Tovar, S, Chartrel, N, Le, MO, Leprince, J, Aguilar, E, Pinilla, L, Dieguez, C, Vaudry, H & Tena-Sempere, M. (2006). Novel role of 26RFa, a hypothalamic RFamide orexigenic peptide, as putative regulator of the gonadotropic axis. *J Physiol*, **573**, 237-249.
346. Nedergaard, J, Bengtsson, T & Cannon, B. (2007). Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **293**, E444-E452.
347. Newton, AC. (2003). Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem J*, **370**, 361-371.

348. Nielsen, S, Guo, Z, Johnson, CM, Hensrud, DD & Jensen, MD. (2004). Splanchnic lipolysis in human obesity. *J Clin Invest*, **113**, 1582-1588.
349. Nilsson, R, Ahmad, F, Sward, K, Andersson, U, Weston, M, Manganiello, V & Degerman, E. (2006). Plasma membrane cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B (PDE3B) is associated with caveolae in primary adipocytes. *Cell Signal*, **18**, 1713-1721.
350. Nishimura, A, Kitano, K, Takasaki, J, Taniguchi, M, Mizuno, N, Tago, K, Hakoshima, T & Itoh, H. (2010). Structural basis for the specific inhibition of heterotrimeric Gq protein by a small molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 13666-13671.
351. Nixon, T & Green, H. (1984). Contribution of growth hormone to the adipogenic activity of serum. *Endocrinology*, **114**, 527-532.
352. Nye, C, Kim, J, Kalhan, SC & Hanson, RW. (2008a). Reassessing triglyceride synthesis in adipose tissue. *Trends Endocrinol Metab*, **19**, 356-361.
353. Nye, CK, Hanson, RW & Kalhan, SC. (2008b). Glyceroneogenesis is the dominant pathway for triglyceride glycerol synthesis in vivo in the rat. *J Biol Chem*, **283**, 27565-27574.
354. O'Brien, PJ, Alborn, WE, Sloan, JH, Ulmer, M, Boodhoo, A, Knierman, MD, Schultze, AE & Konrad, RJ. (2005). The novel apolipoprotein A5 is present in human serum, is associated with VLDL, HDL, and chylomicrons, and circulates at very low concentrations compared with other apolipoproteins. *Clin Chem*, **51**, 351-359.
355. Obici, S, Feng, Z, Arduini, A, Conti, R & Rossetti, L. (2003). Inhibition of hypothalamic carnitine palmitoyltransferase-1 decreases food intake and glucose production. *Nat Med*, **9**, 756-761.
356. Oh, YT, Oh, KS, Choi, YM, Jokiaho, A, Donovan, C, Choi, S, Kang, I & Youn, JH. (2011). Continuous 24-h nicotinic acid infusion in rats causes FFA rebound and insulin resistance by altering gene expression and basal lipolysis in adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **300**, E1012-E1021.
357. Ohsumi, J, Miyadai, K, Kawashima, I, Ishikawa-Ohsumi, H, Sakakibara, S, Mita-Honjo, K & Takiguchi, Y. (1991). Adipogenesis inhibitory factor. A novel inhibitory regulator of adipose conversion in bone marrow. *FEBS Lett*, **288**, 13-16.

358. Ohtaki, T, Shintani, Y, Honda, S, Matsumoto, H, Hori, A, Kanehashi, K, Terao, Y, Kumano, S, Takatsu, Y, Masuda, Y, Ishibashi, Y, Watanabe, T, Asada, M, Yamada, T, Suenaga, M, Kitada, C, Usuki, S, Kurokawa, T, Onda, H, Nishimura, O & Fujino, M. (2001). Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature*, **411**, 613-617.
359. Oishi, Y, Manabe, I, Tobe, K, Ohsugi, M, Kubota, T, Fujiu, K, Maemura, K, Kubota, N, Kadowaki, T & Nagai, R. (2008). SUMOylation of Kruppel-like transcription factor 5 acts as a molecular switch in transcriptional programs of lipid metabolism involving PPAR-delta. *Nat Med*, **14**, 656-666.
360. Oishi, Y, Manabe, I, Tobe, K, Tsushima, K, Shindo, T, Fujiu, K, Nishimura, G, Maemura, K, Yamauchi, T, Kubota, N, Suzuki, R, Kitamura, T, Akira, S, Kadowaki, T & Nagai, R. (2005). Kruppel-like transcription factor KLF5 is a key regulator of adipocyte differentiation. *Cell Metab*, **1**, 27-39.
361. Oka, N, Yamamoto, M, Schwencke, C, Kawabe, J, Ebina, T, Ohno, S, Couet, J, Lisanti, MP & Ishikawa, Y. (1997). Caveolin interaction with protein kinase C. Isoenzyme-dependent regulation of kinase activity by the caveolin scaffolding domain peptide. *J Biol Chem*, **272**, 33416-33421.
362. Okamura, H, Kelly, PA, Chabot, JG, Morel, G, Belles-Isles, M & Heisler, S. (1988). Atrial natriuretic peptide receptors are present in brown adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun*, **156**, 1000-1006.
363. Olivecrona, G & Beisiegel, U. (1997). Lipid binding of apolipoprotein CII is required for stimulation of lipoprotein lipase activity against apolipoprotein CII-deficient chylomicrons. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **17**, 1545-1549.
364. Ollmann, MM, Wilson, BD, Yang, YK, Kerns, JA, Chen, Y, Gantz, I & Barsh, GS. (1997). Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science*, **278**, 135-138.
365. Olsson, H & Belfrage, P. (1987). The regulatory and basal phosphorylation sites of hormone-sensitive lipase are dephosphorylated by protein phosphatase-1, 2A and 2C but not by protein phosphatase-2B. *Eur J Biochem*, **168**, 399-405.
366. Olsson, H, Stralfors, P & Belfrage, P. (1986). Phosphorylation of the basal site of hormone-sensitive lipase by glycogen synthase kinase-4. *FEBS Lett*, **209**, 175-180.

367. Ost, A, Ortegren, U, Gustavsson, J, Nystrom, FH & Stralfors, P. (2005). Triacylglycerol is synthesized in a specific subclass of caveolae in primary adipocytes. *J Biol Chem*, **280**, 5-8.
368. Osterlund, T, Beussman, DJ, Julenius, K, Poon, PH, Linse, S, Shabanowitz, J, Hunt, DF, Schotz, MC, Derewenda, ZS & Holm, C. (1999). Domain identification of hormone-sensitive lipase by circular dichroism and fluorescence spectroscopy, limited proteolysis, and mass spectrometry. *J Biol Chem*, **274**, 15382-15388.
369. Osterlund, T, Contreras, JA & Holm, C. (1997). Identification of essential aspartic acid and histidine residues of hormone-sensitive lipase: apparent residues of the catalytic triad. *FEBS Lett*, **403**, 259-262.
370. Pairault, J & Green, H. (1979). A study of the adipose conversion of suspended 3T3 cells by using glycerophosphate dehydrogenase as differentiation marker. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 5138-5142.
371. Patel, SR, Murphy, KG, Thompson, EL, Patterson, M, Curtis, AE, Ghatei, MA & Bloom, SR. (2008). Pyroglutamylated RFamide peptide 43 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis via gonadotropin-releasing hormone in rats. *Endocrinology*, **149**, 4747-4754.
372. Pedersen, SB, Kristensen, K, Hermann, PA, Katzenellenbogen, JA & Richelsen, B. (2004). Estrogen controls lipolysis by up-regulating alpha2A-adrenergic receptors directly in human adipose tissue through the estrogen receptor alpha. Implications for the female fat distribution. *J Clin Endocrinol Metab*, **89**, 1869-1878.
373. Pennacchio, LA, Olivier, M, Hubacek, JA, Cohen, JC, Cox, DR, Fruchart, JC, Krauss, RM & Rubin, EM. (2001). An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. *Science*, **294**, 169-173.
374. Pilch, PF, Souto, RP, Liu, L, Jedrychowski, MP, Berg, EA, Costello, CE & Gygi, SP. (2007). Cellular spelunking: exploring adipocyte caveolae. *J Lipid Res*, **48**, 2103-2111.
375. Pineiro, R, Iglesias, MJ, Gallego, R, Raghay, K, Eiras, S, Rubio, J, Dieguez, C, Gualillo, O, Gonzalez-Juanatey, JR & Lago, F. (2005). Adiponectin is synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes. *FEBS Lett*, **579**, 5163-5169.

376. Pisani, DF, Djedaini, M, Beranger, GE, Elabd, C, Scheideler, M, Ailhaud, G & Amri, EZ. (2011). Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells into "Brite" (Brown-in-White) Adipocytes. *Front Endocrinol (Lausanne)*, **2**, 87.
377. Pohl, J, Ring, A, Eehalt, R, Schulze-Bergkamen, H, Schad, A, Verkade, P & Stremmel, W. (2004). Long-chain fatty acid uptake into adipocytes depends on lipid raft function. *Biochemistry*, **43**, 4179-4187.
378. Pohl, J, Ring, A, Korkmaz, U, Eehalt, R & Stremmel, W. (2005). FAT/CD36-mediated long-chain fatty acid uptake in adipocytes requires plasma membrane rafts. *Mol Biol Cell*, **16**, 24-31.
379. Powell, DJ, Hajduch, E, Kular, G & Hundal, HS. (2003). Ceramide disables 3-phosphoinositide binding to the pleckstrin homology domain of protein kinase B (PKB)/Akt by a PKCzeta-dependent mechanism. *Mol Cell Biol*, **23**, 7794-7808.
380. Primeaux, SD. (2011). QRFP in female rats: Effects on high fat food intake and hypothalamic gene expression across the estrous cycle. *Peptides*, **32**, 1270-1275.
381. Primeaux, SD, Blackmon, C, Barnes, MJ, Braymer, HD & Bray, GA. (2008). Central administration of the RFamide peptides, QRFP-26 and QRFP-43, increases high fat food intake in rats. *Peptides*, **29**, 1994-2000.
382. Prunet-Marcassus, B, Cousin, B, Caton, D, Andre, M, Penicaud, L & Casteilla, L. (2006). From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: site-specific differences. *Exp Cell Res*, **312**, 727-736.
383. Prusty, D, Park, BH, Davis, KE & Farmer, SR. (2002). Activation of MEK/ERK signaling promotes adipogenesis by enhancing peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and C/EBPalpha gene expression during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem*, **277**, 46226-46232.
384. Pulinilkunnil, T, He, H, Kong, D, Asakura, K, Peroni, OD, Lee, A & Kahn, BB. (2011). Adrenergic regulation of AMP-activated protein kinase in brown adipose tissue in vivo. *J Biol Chem*, **286**, 8798-8809.
385. Qaiser, F, Wahab, F, Wiqar, MA, Hashim, R, Leprince, J, Vaudry, H, Tena-Sempere, M & Shahab, M. (2012). Study of the role of novel RF-amide

neuropeptides in affecting growth hormone secretion in a representative non-human primate (*Macaca mulatta*). *Endocrine*.

386. Qiao, L, Kinney, B, Schaack, J & Shao, J. (2011). Adiponectin inhibits lipolysis in mouse adipocytes. *Diabetes*, **60**, 1519-1527.
387. Rahn, LT, Mei, J, Karlsson, M, Manganiello, V & Degerman, E. (2000). Down-regulation of cyclic-nucleotide phosphodiesterase 3B in 3T3-L1 adipocytes induced by tumour necrosis factor alpha and cAMP. *Biochem J*, **346 Pt 2**, 337-343.
388. Rahn, T, Ridderstrale, M, Tornqvist, H, Manganiello, V, Fredrikson, G, Belfrage, P & Degerman, E. (1994). Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced activation and phosphorylation of the cGMP-inhibited cAMP phosphodiesterase in rat adipocytes. Studies using the selective inhibitor wortmannin. *FEBS Lett*, **350**, 314-318.
389. Ramis, JM, Salinas, R, Garcia-Sanz, JM, Moreira, J, Proenza, AM & Llado, I. (2006). Depot- and gender-related differences in the lipolytic pathway of adipose tissue from severely obese patients. *Cell Physiol Biochem*, **17**, 173-180.
390. Razani, B, Combs, TP, Wang, XB, Frank, PG, Park, DS, Russell, RG, Li, M, Tang, B, Jelicks, LA, Scherer, PE & Lisanti, MP. (2002). Caveolin-1-deficient mice are lean, resistant to diet-induced obesity, and show hypertriglyceridemia with adipocyte abnormalities. *J Biol Chem*, **277**, 8635-8647.
391. Razani, B & Lisanti, MP. (2001). Two distinct caveolin-1 domains mediate the functional interaction of caveolin-1 with protein kinase A. *Am J Physiol Cell Physiol*, **281**, C1241-C1250.
392. Razani, B, Rubin, CS & Lisanti, MP. (1999). Regulation of cAMP-mediated signal transduction via interaction of caveolins with the catalytic subunit of protein kinase A. *J Biol Chem*, **274**, 26353-26360.
393. Reshef, L, Olswang, Y, Cassuto, H, Blum, B, Croniger, CM, Kalhan, SC, Tilghman, SM & Hanson, RW. (2003). Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. *J Biol Chem*, **278**, 30413-30416.
394. Reue, K, Cohen, RD & Schotz, MC. (1997). Evidence for hormone-sensitive lipase mRNA expression in human monocyte/macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **17**, 3428-3432.

395. Reusch, JE, Colton, LA & Klemm, DJ. (2000). CREB activation induces adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Mol Cell Biol*, **20**, 1008-1020.
396. Reynisdottir, S, Dauzats, M, Thorne, A & Langin, D. (1997). Comparison of hormone-sensitive lipase activity in visceral and subcutaneous human adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab*, **82**, 4162-4166.
397. Rice, SP, Zhang, L, Grennan-Jones, F, Agarwal, N, Lewis, MD, Rees, DA & Ludgate, M. (2010). Dehydroepiandrosterone (DHEA) treatment in vitro inhibits adipogenesis in human omental but not subcutaneous adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol*, **320**, 51-57.
398. Richards, MR, Harp, JD, Ory, DS & Schaffer, JE. (2006). Fatty acid transport protein 1 and long-chain acyl coenzyme A synthetase 1 interact in adipocytes. *J Lipid Res*, **47**, 665-672.
399. Richards, MR, Listenberger, LL, Kelly, AA, Lewis, SE, Ory, DS & Schaffer, JE. (2003). Oligomerization of the murine fatty acid transport protein 1. *J Biol Chem*, **278**, 10477-10483.
400. Richelsen, B. (1988). Prostaglandin E2 action and binding in human adipocytes: effects of sex, age, and obesity. *Metabolism*, **37**, 268-275.
401. Richelsen, B, Eriksen, EF, Beck-Nielsen, H & Pedersen, O. (1984). Prostaglandin E2 receptor binding and action in human fat cells. *J Clin Endocrinol Metab*, **59**, 7-12.
402. Richelsen, B & Pedersen, SB. (1987). Antilipolytic effect of prostaglandin E2 in perfused rat adipocytes. *Endocrinology*, **121**, 1221-1226.
403. Richon, VM, Lyle, RE & McGehee, RE, Jr. (1997). Regulation and expression of retinoblastoma proteins p107 and p130 during 3T3-L1 adipocyte differentiation. *J Biol Chem*, **272**, 10117-10124.
404. Ring, A, Le, LS, Pohl, J, Verkade, P & Stremmel, W. (2006). Caveolin-1 is required for fatty acid translocase (FAT/CD36) localization and function at the plasma membrane of mouse embryonic fibroblasts. *Biochim Biophys Acta*, **1761**, 416-423.
405. Roberts, R, Hodson, L, Dennis, AL, Neville, MJ, Humphreys, SM, Harnden, KE, Micklem, KJ & Frayn, KN. (2009). Markers of de novo lipogenesis in



- adipose tissue: associations with small adipocytes and insulin sensitivity in humans. *Diabetologia*, **52**, 882-890.
406. Robidoux, J, Kumar, N, Daniel, KW, Moukdar, F, Cyr, M, Medvedev, AV & Collins, S. (2006). Maximal beta3-adrenergic regulation of lipolysis involves Src and epidermal growth factor receptor-dependent ERK1/2 activation. *J Biol Chem*, **281**, 37794-37802.
  407. Robidoux, J, Martin, TL & Collins, S. (2004). Beta-adrenergic receptors and regulation of energy expenditure: a family affair. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **44**, 297-323.
  408. Rodriguez, A, Gomez-Ambrosi, J, Catalan, V, Gil, MJ, Becerril, S, Sainz, N, Silva, C, Salvador, J, Colina, I & Fruhbeck, G. (2009). Acylated and desacyl ghrelin stimulate lipid accumulation in human visceral adipocytes. *Int J Obes (Lond)*, **33**, 541-552.
  409. Rosen, ED, Sarraf, P, Troy, AE, Bradwin, G, Moore, K, Milstone, DS, Spiegelman, BM & Mortensen, RM. (1999). PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell*, **4**, 611-617.
  410. Rosmaninho-Salgado, J, Cortez, V, Estrada, M, Santana, MM, Goncalves, A, Marques, AP & Cavadas, C. (2012a). Intracellular mechanisms coupled to NPY Y(2) and Y(5) receptor activation and lipid accumulation in murine adipocytes. *Neuropeptides*, **46**, 359-366.
  411. Rosmaninho-Salgado, J, Marques, AP, Estrada, M, Santana, M, Cortez, V, Grouzmann, E & Cavadas, C. (2012b). Dipeptidyl-peptidase-IV by cleaving neuropeptide Y induces lipid accumulation and PPAR-gamma expression. *Peptides*, **37**, 49-54.
  412. Ross, SE, Hemati, N, Longo, KA, Bennett, CN, Lucas, PC, Erickson, RL & MacDougald, OA. (2000). Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science*, **289**, 950-953.
  413. Rossi, M, Kim, MS, Morgan, DG, Small, CJ, Edwards, CM, Sunter, D, Abusnana, S, Goldstone, AP, Russell, SH, Stanley, SA, Smith, DM, Yagaloff, K, Ghatei, MA & Bloom, SR. (1998). A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo. *Endocrinology*, **139**, 4428-4431.

414. Ruan, H, Hacoheh, N, Golub, TR, Van, PL & Lodish, HF. (2002). Tumor necrosis factor-alpha suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor-kappaB activation by TNF-alpha is obligatory. *Diabetes*, **51**, 1319-1336.
415. Rubin, CS, Hirsch, A, Fung, C & Rosen, OM. (1978). Development of hormone receptors and hormonal responsiveness in vitro. Insulin receptors and insulin sensitivity in the preadipocyte and adipocyte forms of 3T3-L1 cells. *J Biol Chem*, **253**, 7570-7578.
416. Russell, L & Forsdyke, DR. (1991). A human putative lymphocyte G0/G1 switch gene containing a CpG-rich island encodes a small basic protein with the potential to be phosphorylated. *DNA Cell Biol*, **10**, 581-591.
417. Ryden, M, Arvidsson, E, Blomqvist, L, Perbeck, L, Dicker, A & Arner, P. (2004). Targets for TNF-alpha-induced lipolysis in human adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, **318**, 168-175.
418. Sacks, HS, Fain, JN, Holman, B, Cheema, P, Chary, A, Parks, F, Karas, J, Optican, R, Bahouth, SW, Garrett, E, Wolf, RY, Carter, RA, Robbins, T, Wolford, D & Samaha, J. (2009). Uncoupling protein-1 and related messenger ribonucleic acids in human epicardial and other adipose tissues: epicardial fat functioning as brown fat. *J Clin Endocrinol Metab*, **94**, 3611-3615.
419. Salans, LB, Cushman, SW & Weismann, RE. (1973). Studies of human adipose tissue. Adipose cell size and number in nonobese and obese patients. *J Clin Invest*, **52**, 929-941.
420. Sanders, MJ, Grondin, PO, Hegarty, BD, Snowden, MA & Carling, D. (2007). Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *Biochem J*, **403**, 139-148.
421. Santilman, V, Baran, J, Anand-Apte, B, Evans, RM & Parat, MO. (2007). Caveolin-1 polarization in transmigrating endothelial cells requires binding to intermediate filaments. *Angiogenesis*, **10**, 297-305.
422. Schaffer, JE & Lodish, HF. (1994). Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell*, **79**, 427-436.
423. Schaffhauser, AO, Stricker-Krongrad, A, Brunner, L, Cumin, F, Gerald, C, Whitebread, S, Criscione, L & Hofbauer, KG. (1997). Inhibition of food intake

- by neuropeptide Y Y5 receptor antisense oligodeoxynucleotides. *Diabetes*, **46**, 1792-1798.
424. Scheja, L, Makowski, L, Uysal, KT, Wiesbrock, SM, Shimshek, DR, Meyers, DS, Morgan, M, Parker, RA & Hotamisligil, GS. (1999). Altered insulin secretion associated with reduced lipolytic efficiency in *aP2*<sup>-/-</sup> mice. *Diabetes*, **48**, 1987-1994.
425. Scherer, PE, Bickel, PE, Kotler, M & Lodish, HF. (1998). Cloning of cell-specific secreted and surface proteins by subtractive antibody screening. *Nat Biotechnol*, **16**, 581-586.
426. Schoelch, C, Kuhlmann, J, Gossel, M, Mueller, G, Neumann-Haefelin, C, Belz, U, Kalisch, J, Biemer-Daub, G, Kramer, W, Juretschke, HP & Herling, AW. (2004). Characterization of adenosine-A1 receptor-mediated antilipolysis in rats by tissue microdialysis, 1H-spectroscopy, and glucose clamp studies. *Diabetes*, **53**, 1920-1926.
427. Schwabe, U & Ebert, R. (1974). Stimulation of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate accumulation and lipolysis in fat cells by adenosine deaminase. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **282**, 33-44.
428. Schwartz, MW, Baskin, DG, Bukowski, TR, Kuijper, JL, Foster, D, Lasser, G, Prunkard, DE, Porte, D, Jr., Woods, SC, Seeley, RJ & Weigle, DS. (1996). Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in *ob/ob* mice. *Diabetes*, **45**, 531-535.
429. Schwartz, MW, Woods, SC, Porte, D, Jr., Seeley, RJ & Baskin, DG. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature*, **404**, 661-671.
430. Schwarz, EJ, Reginato, MJ, Shao, D, Krakow, SL & Lazar, MA. (1997). Retinoic acid blocks adipogenesis by inhibiting C/EBPbeta-mediated transcription. *Mol Cell Biol*, **17**, 1552-1561.
431. Schweiger, M, Schoiswohl, G, Lass, A, Radner, FP, Haemmerle, G, Malli, R, Graier, W, Cornaciu, I, Oberer, M, Salvayre, R, Fischer, J, Zechner, R & Zimmermann, R. (2008). The C-terminal region of human adipose triglyceride lipase affects enzyme activity and lipid droplet binding. *J Biol Chem*, **283**, 17211-17220.
432. Schweiger, M, Schreiber, R, Haemmerle, G, Lass, A, Fledelius, C, Jacobsen, P, Tornqvist, H, Zechner, R & Zimmermann, R. (2006). Adipose triglyceride

- lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism. *J Biol Chem*, **281**, 40236-40241.
433. Scott, RE, Florine, DL, Wille, JJ, Jr. & Yun, K. (1982). Coupling of growth arrest and differentiation at a distinct state in the G1 phase of the cell cycle: GD. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**, 845-849.
434. Seale, P, Bjork, B, Yang, W, Kajimura, S, Chin, S, Kuang, S, Scime, A, Devarakonda, S, Conroe, HM, Erdjument-Bromage, H, Tempst, P, Rudnicki, MA, Beier, DR & Spiegelman, BM. (2008). PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature*, **454**, 961-967.
435. Seamon, KB, Padgett, W & Daly, JW. (1981). Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 3363-3367.
436. Seidah, NG, Day, R, Marcinkiewicz, M & Chretien, M. (1998). Precursor convertases: an evolutionary ancient, cell-specific, combinatorial mechanism yielding diverse bioactive peptides and proteins. *Ann N Y Acad Sci*, **839**, 9-24.
437. Sengenès, C, Berlan, M, De, G, I, Lafontan, M & Galitzky, J. (2000). Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes. *FASEB J*, **14**, 1345-1351.
438. Sengenès, C, Bouloumie, A, Hauner, H, Berlan, M, Busse, R, Lafontan, M & Galitzky, J. (2003). Involvement of a cGMP-dependent pathway in the natriuretic peptide-mediated hormone-sensitive lipase phosphorylation in human adipocytes. *J Biol Chem*, **278**, 48617-48626.
439. Sengenès, C, Zakaroff-Girard, A, Moulin, A, Berlan, M, Bouloumie, A, Lafontan, M & Galitzky, J. (2002). Natriuretic peptide-dependent lipolysis in fat cells is a primate specificity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **283**, R257-R265.
440. Serradeil-Le, GC, Lafontan, M, Raufaste, D, Marchand, J, Pouzet, B, Casellas, P, Pascal, M, Maffrand, JP & Le, FG. (2000). Characterization of NPY receptors controlling lipolysis and leptin secretion in human adipocytes. *FEBS Lett*, **475**, 150-156.
441. Servetnick, DA, Brasaemle, DL, Gruia-Gray, J, Kimmel, AR, Wolff, J & Londos, C. (1995). Perilipins are associated with cholesteryl ester droplets in

- steroidogenic adrenal cortical and Leydig cells. *J Biol Chem*, **270**, 16970-16973.
442. Sethi, JK, Xu, H, Uysal, KT, Wiesbrock, SM, Scheja, L & Hotamisligil, GS. (2000). Characterisation of receptor-specific TNFalpha functions in adipocyte cell lines lacking type 1 and 2 TNF receptors. *FEBS Lett*, **469**, 77-82.
443. Sfeir, Z, Ibrahimi, A, Amri, E, Grimaldi, P & Abumrad, N. (1999). CD36 antisense expression in 3T3-F442A preadipocytes. *Mol Cell Biochem*, **192**, 3-8.
444. Shang, CA & Waters, MJ. (2003). Constitutively active signal transducer and activator of transcription 5 can replace the requirement for growth hormone in adipogenesis of 3T3-F442A preadipocytes. *Mol Endocrinol*, **17**, 2494-2508.
445. Shao, D & Lazar, MA. (1997). Peroxisome proliferator activated receptor gamma, CCAAT/enhancer-binding protein alpha, and cell cycle status regulate the commitment to adipocyte differentiation. *J Biol Chem*, **272**, 21473-21478.
446. Shen, WJ, Liang, Y, Hong, R, Patel, S, Natu, V, Sridhar, K, Jenkins, A, Bernlohr, DA & Kraemer, FB. (2001). Characterization of the functional interaction of adipocyte lipid-binding protein with hormone-sensitive lipase. *J Biol Chem*, **276**, 49443-49448.
447. Shen, WJ, Patel, S, Eriksson, JE & Kraemer, FB. (2010). Vimentin is a functional partner of hormone sensitive lipase and facilitates lipolysis. *J Proteome Res*, **9**, 1786-1794.
448. Shimomura, I, Shimano, H, Korn, BS, Bashmakov, Y & Horton, JD. (1998). Nuclear sterol regulatory element-binding proteins activate genes responsible for the entire program of unsaturated fatty acid biosynthesis in transgenic mouse liver. *J Biol Chem*, **273**, 35299-35306.
449. Shimomura, I, Tokunaga, K, Jiao, S, Funahashi, T, Keno, Y, Kobatake, T, Kotani, K, Suzuki, H, Yamamoto, T, Tarui, S & . (1992). Marked enhancement of acyl-CoA synthetase activity and mRNA, paralleled to lipoprotein lipase mRNA, in adipose tissues of Zucker obese rats (fa/fa). *Biochim Biophys Acta*, **1124**, 112-118.
450. Simard, JR, Kamp, F & Hamilton, JA. (2008). Measuring the adsorption of Fatty acids to phospholipid vesicles by multiple fluorescence probes. *Biophys J*, **94**, 4493-4503.

451. Simard, JR, Meshulam, T, Pillai, BK, Kirber, MT, Brunaldi, K, Xu, S, Pilch, PF & Hamilton, JA. (2009). Caveolins sequester fatty acids on the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane, augment triglyceride formation and protect cells from lipotoxicity. *J Lipid Res*.
452. Skrzypski, M, Kaczmarek, P, Le, TT, Wojciechowicz, T, Pruszynska-Oszmalek, E, Szczepankiewicz, D, Sassek, M, Arafat, A, Wiedenmann, B, Nowak, KW & Strowski, MZ. (2012). Effects of orexin A on proliferation, survival, apoptosis and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes into mature adipocytes. *FEBS Lett*, **586**, 4157-4164.
453. Skrzypski, M, Le, T, Kaczmarek, P, Pruszynska-Oszmalek, E, Pietrzak, P, Szczepankiewicz, D, Kolodziejcki, PA, Sassek, M, Arafat, A, Wiedenmann, B, Nowak, KW & Strowski, MZ. (2011). Orexin A stimulates glucose uptake, lipid accumulation and adiponectin secretion from 3T3-L1 adipocytes and isolated primary rat adipocytes. *Diabetologia*, **54**, 1841-1852.
454. Smas, CM, Chen, L, Zhao, L, Latasa, MJ & Sul, HS. (1999). Transcriptional repression of pref-1 by glucocorticoids promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation. *J Biol Chem*, **274**, 12632-12641.
455. Smas, CM & Sul, HS. (1993). Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation. *Cell*, **73**, 725-734.
456. Smas, CM & Sul, HS. (1996). Characterization of Pref-1 and its inhibitory role in adipocyte differentiation. *Int J Obes Relat Metab Disord*, **20 Suppl 3**, S65-S72.
457. Smith, AJ, Sanders, MA, Thompson, BR, Londos, C, Kraemer, FB & Bernlohr, DA. (2004). Physical association between the adipocyte fatty acid-binding protein and hormone-sensitive lipase: a fluorescence resonance energy transfer analysis. *J Biol Chem*, **279**, 52399-52405.
458. Smith, AJ, Thompson, BR, Sanders, MA & Bernlohr, DA. (2007). Interaction of the adipocyte fatty acid-binding protein with the hormone-sensitive lipase: regulation by fatty acids and phosphorylation. *J Biol Chem*, **282**, 32424-32432.
459. Smith, CJ, Vasta, V, Degerman, E, Belfrage, P & Manganiello, VC. (1991). Hormone-sensitive cyclic GMP-inhibited cyclic AMP phosphodiesterase in rat adipocytes. Regulation of insulin- and cAMP-dependent activation by phosphorylation. *J Biol Chem*, **266**, 13385-13390.

460. Smith, GM, Garton, AJ, Aitken, A & Yeaman, SJ. (1993). Domain structure of hormone-sensitive lipase. *Biochem Soc Trans*, **21 ( Pt 3)**, 233S.
461. Smith, GM, Garton, AJ, Aitken, A & Yeaman, SJ. (1996). Evidence for a multi-domain structure for hormone-sensitive lipase. *FEBS Lett*, **396**, 90-94.
462. Smith, PJ, Wise, LS, Berkowitz, R, Wan, C & Rubin, CS. (1988). Insulin-like growth factor-I is an essential regulator of the differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, **263**, 9402-9408.
463. Soga, T, Kamohara, M, Takasaki, J, Matsumoto, S, Saito, T, Ohishi, T, Hiyama, H, Matsuo, A, Matsushime, H & Furuichi, K. (2003). Molecular identification of nicotinic acid receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, **303**, 364-369.
464. Souza, SC, Christoffolete, MA, Ribeiro, MO, Miyoshi, H, Strissel, KJ, Stancheva, ZS, Rogers, NH, D'Eon, TM, Perfield, JW, Imachi, H, Obin, MS, Bianco, AC & Greenberg, AS. (2007). Perilipin regulates the thermogenic actions of norepinephrine in brown adipose tissue. *J Lipid Res*, **48**, 1273-1279.
465. Souza, SC, Palmer, HJ, Kang, YH, Yamamoto, MT, Muliro, KV, Paulson, KE & Greenberg, AS. (2003). TNF-alpha induction of lipolysis is mediated through activation of the extracellular signal related kinase pathway in 3T3-L1 adipocytes. *J Cell Biochem*, **89**, 1077-1086.
466. Spiegelman, BM, Frank, M & Green, H. (1983). Molecular cloning of mRNA from 3T3 adipocytes. Regulation of mRNA content for glycerophosphate dehydrogenase and other differentiation-dependent proteins during adipocyte development. *J Biol Chem*, **258**, 10083-10089.
467. Steinberg, D & Huttunen, JK. (1972). The role of cyclic AMP in activation of hormone-sensitive lipase of adipose tissue. *Adv Cyclic Nucleotide Res*, **1**, 47-62.
468. Stelzer, I, Zelzer, S, Raggam, RB, Pruller, F, Truschnig-Wilders, M, Meinitzer, A, Schnedl, WJ, Horejsi, R, Moller, R, Weghuber, D, Reeves, G, Postolache, TT & Mangge, H. (2012). Link between leptin and interleukin-6 levels in the initial phase of obesity related inflammation. *Transl Res*, **159**, 118-124.
469. Stephens, JM, Lee, J & Pilch, PF. (1997). Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of

- insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction. *J Biol Chem*, **272**, 971-976.
470. Stephens, JM, Morrison, RF & Pilch, PF. (1996). The expression and regulation of STATs during 3T3-L1 adipocyte differentiation. *J Biol Chem*, **271**, 10441-10444.
471. Stewart, PM & Tomlinson, JW. (2002). Cortisol, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and central obesity. *Trends Endocrinol Metab*, **13**, 94-96.
472. Stewart, WC, Morrison, RF, Young, SL & Stephens, JM. (1999). Regulation of signal transducers and activators of transcription (STATs) by effectors of adipogenesis: coordinate regulation of STATs 1, 5A, and 5B with peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and C/AAAT enhancer binding protein-alpha. *Biochim Biophys Acta*, **1452**, 188-196.
473. Stich, V, De, G, I, Crampes, F, Hejnova, J, Cottet-Emard, JM, Galitzky, J, Lafontan, M, Riviere, D & Berlan, M. (2000). Activation of alpha(2)-adrenergic receptors impairs exercise-induced lipolysis in SCAT of obese subjects. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **279**, R499-R504.
474. Stralfors, P & Belfrage, P. (1983). Phosphorylation of hormone-sensitive lipase by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, **258**, 15146-15152.
475. Strawford, A, Antelo, F, Christiansen, M & Hellerstein, MK. (2004). Adipose tissue triglyceride turnover, de novo lipogenesis, and cell proliferation in humans measured with 2H2O. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **286**, E577-E588.
476. Stuhlsatz-Krouper, SM, Bennett, NE & Schaffer, JE. (1998). Substitution of alanine for serine 250 in the murine fatty acid transport protein inhibits long chain fatty acid transport. *J Biol Chem*, **273**, 28642-28650.
477. Su, CL, Sztalryd, C, Contreras, JA, Holm, C, Kimmel, AR & Londos, C. (2003). Mutational analysis of the hormone-sensitive lipase translocation reaction in adipocytes. *J Biol Chem*, **278**, 43615-43619.
478. Subramanian, V, Garcia, A, Sekowski, A & Brasaemle, DL. (2004a). Hydrophobic sequences target and anchor perilipin A to lipid droplets. *J Lipid Res*, **45**, 1983-1991.



479. Subramanian, V, Rothenberg, A, Gomez, C, Cohen, AW, Garcia, A, Bhattacharyya, S, Shapiro, L, Dolios, G, Wang, R, Lisanti, MP & Brasaemle, DL. (2004b). Perilipin A mediates the reversible binding of CGI-58 to lipid droplets in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, **279**, 42062-42071.
480. Sue, N, Jack, BH, Eaton, SA, Pearson, RC, Funnell, AP, Turner, J, Czolij, R, Denyer, G, Bao, S, Molero-Navajas, JC, Perkins, A, Fujiwara, Y, Orkin, SH, Bell-Anderson, K & Crossley, M. (2008). Targeted disruption of the basic Kruppel-like factor gene (Klf3) reveals a role in adipogenesis. *Mol Cell Biol*, **28**, 3967-3978.
481. Sullivan, JE, Brocklehurst, KJ, Marley, AE, Carey, F, Carling, D & Beri, RK. (1994). Inhibition of lipolysis and lipogenesis in isolated rat adipocytes with AICAR, a cell-permeable activator of AMP-activated protein kinase. *FEBS Lett*, **353**, 33-36.
482. Suryawan, A & Hu, CY. (1997). Effect of retinoic acid on differentiation of cultured pig preadipocytes. *J Anim Sci*, **75**, 112-117.
483. Szkudelski, T, Szkudelska, K & Nogowski, L. (2009). Effects of adenosine A1 receptor antagonism on lipogenesis and lipolysis in isolated rat adipocytes. *Physiol Res*, **58**, 863-871.
484. Sztalryd, C, Xu, G, Dorward, H, Tansey, JT, Contreras, JA, Kimmel, AR & Londos, C. (2003). Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation. *J Cell Biol*, **161**, 1093-1103.
485. Taggart, AK, Kero, J, Gan, X, Cai, TQ, Cheng, K, Ippolito, M, Ren, N, Kaplan, R, Wu, K, Wu, TJ, Jin, L, Liaw, C, Chen, R, Richman, J, Connolly, D, Offermanns, S, Wright, SD & Waters, MG. (2005). (D)-beta-Hydroxybutyrate inhibits adipocyte lipolysis via the nicotinic acid receptor PUMA-G. *J Biol Chem*, **280**, 26649-26652.
486. Tajima, D, Masaki, T, Hidaka, S, Kakuma, T, Sakata, T & Yoshimatsu, H. (2005). Acute central infusion of leptin modulates fatty acid mobilization by affecting lipolysis and mRNA expression for uncoupling proteins. *Exp Biol Med (Maywood)*, **230**, 200-206.
487. Takayasu, S, Sakurai, T, Iwasaki, S, Teranishi, H, Yamanaka, A, Williams, SC, Iguchi, H, Kawasawa, YI, Ikeda, Y, Sakakibara, I, Ohno, K, Ioka, RX, Murakami, S, Dohmae, N, Xie, J, Suda, T, Motoike, T, Ohuchi, T, Yanagisawa, M & Sakai, J. (2006). A neuropeptide ligand of the G protein-

- coupled receptor GPR103 regulates feeding, behavioral arousal, and blood pressure in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 7438-7443.
488. Tanaka, T, Yoshida, N, Kishimoto, T & Akira, S. (1997). Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene. *EMBO J*, **16**, 7432-7443.
489. Tang, QQ, Gronborg, M, Huang, H, Kim, JW, Otto, TC, Pandey, A & Lane, MD. (2005). Sequential phosphorylation of CCAAT enhancer-binding protein beta by MAPK and glycogen synthase kinase 3beta is required for adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 9766-9771.
490. Tang, QQ, Otto, TC & Lane, MD. (2003). CCAAT/enhancer-binding protein beta is required for mitotic clonal expansion during adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 850-855.
491. Tansey, JT, Sztalryd, C, Gruia-Gray, J, Roush, DL, Zee, JV, Gavrilova, O, Reitman, ML, Deng, CX, Li, C, Kimmel, AR & Londos, C. (2001). Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 6494-6499.
492. Taschler, U, Radner, FP, Heier, C, Schreiber, R, Schweiger, M, Schoiswohl, G, Preiss-Landl, K, Jaeger, D, Reiter, B, Koefeler, HC, Wojciechowski, J, Theussl, C, Penninger, JM, Lass, A, Haemmerle, G, Zechner, R & Zimmermann, R. (2011). Monoglyceride lipase deficiency in mice impairs lipolysis and attenuates diet-induced insulin resistance. *J Biol Chem*, **286**, 17467-17477.
493. Tauchi-Sato, K, Ozeki, S, Houjou, T, Taguchi, R & Fujimoto, T. (2002). The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition. *J Biol Chem*, **277**, 44507-44512.
494. Tchernof, A, Belanger, C, Morisset, AS, Richard, C, Mailloux, J, Laberge, P & Dupont, P. (2006). Regional differences in adipose tissue metabolism in women: minor effect of obesity and body fat distribution. *Diabetes*, **55**, 1353-1360.
495. Thompson, BR, Lobo, S & Bernlohr, DA. (2010). Fatty acid flux in adipocytes: the in's and out's of fat cell lipid trafficking. *Mol Cell Endocrinol*, **318**, 24-33.

496. Thompson, NM, Gill, DA, Davies, R, Loveridge, N, Houston, PA, Robinson, IC & Wells, T. (2004). Ghrelin and des-octanoyl ghrelin promote adipogenesis directly in vivo by a mechanism independent of the type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology*, **145**, 234-242.
497. Thorne, A, Lonnqvist, F, Aelman, J, Hellers, G & Arner, P. (2002). A pilot study of long-term effects of a novel obesity treatment: omentectomy in connection with adjustable gastric banding. *Int J Obes Relat Metab Disord*, **26**, 193-199.
498. Thrush, AB, Gagnon, A & Sorisky, A. (2012). PKC Activation is Required for TSH-mediated Lipolysis via Perilipin Activation. *Horm Metab Res*.
499. Thuau, R, Guilhaudis, L, Segalas-Milazzo, I, Chartrel, N, Oulyadi, H, Boivin, S, Fournier, A, Leprince, J, Davoust, D & Vaudry, H. (2005). Structural studies on 26RFa, a novel human RFamide-related peptide with orexigenic activity. *Peptides*, **26**, 779-789.
500. Tilg, H & Moschen, AR. (2008). Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. *Mol Med*, **14**, 222-231.
501. Timchenko, NA, Wilde, M, Nakanishi, M, Smith, JR & Darlington, GJ. (1996). CCAAT/enhancer-binding protein alpha (C/EBP alpha) inhibits cell proliferation through the p21 (WAF-1/CIP-1/SDI-1) protein. *Genes Dev*, **10**, 804-815.
502. Timmons, JA, Wennmalm, K, Larsson, O, Walden, TB, Lassmann, T, Petrovic, N, Hamilton, DL, Gimeno, RE, Wahlestedt, C, Baar, K, Nedergaard, J & Cannon, B. (2007). Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 4401-4406.
503. Tobari, Y, Iijima, N, Tsunekawa, K, Osugi, T, Haraguchi, S, Ubuka, T, Ukena, K, Okanoya, K, Tsutsui, K & Ozawa, H. (2011). Identification, localisation and functional implication of 26RFa orthologue peptide in the brain of zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *J Neuroendocrinol*, **23**, 791-803.
504. Tong, Q, Dalgin, G, Xu, H, Ting, CN, Leiden, JM & Hotamisligil, GS. (2000). Function of GATA transcription factors in preadipocyte-adipocyte transition. *Science*, **290**, 134-138.

505. Tong, Q, Tsai, J, Tan, G, Dalgin, G & Hotamisligil, GS. (2005). Interaction between GATA and the C/EBP family of transcription factors is critical in GATA-mediated suppression of adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol*, **25**, 706-715.
506. Tontonoz, P, Hu, E & Spiegelman, BM. (1994). Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*, **79**, 1147-1156.
507. Tschop, M & Heiman, ML. (2002). Overview of rodent models for obesity research. *Curr Protoc Neurosci*, **Chapter 9**, Unit.
508. Tseng, YH, Kokkotou, E, Schulz, TJ, Huang, TL, Winnay, JN, Taniguchi, CM, Tran, TT, Suzuki, R, Espinoza, DO, Yamamoto, Y, Ahrens, MJ, Dudley, AT, Norris, AW, Kulkarni, RN & Kahn, CR. (2008). New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature*, **454**, 1000-1004.
509. Tsujita, T, Ninomiya, H & Okuda, H. (1989). p-nitrophenyl butyrate hydrolyzing activity of hormone-sensitive lipase from bovine adipose tissue. *J Lipid Res*, **30**, 997-1004.
510. Tsutsui, K, Saigoh, E, Ukena, K, Teranishi, H, Fujisawa, Y, Kikuchi, M, Ishii, S & Sharp, PJ. (2000). A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochem Biophys Res Commun*, **275**, 661-667.
511. Tunaru, S, Kero, J, Schaub, A, Wufka, C, Blaukat, A, Pfeffer, K & Offermanns, S. (2003). PUMA-G and HM74 are receptors for nicotinic acid and mediate its anti-lipolytic effect. *Nat Med*, **9**, 352-355.
512. Ukena, K, Tachibana, T, Iwakoshi-Ukena, E, Saito, Y, Minakata, H, Kawaguchi, R, Osugi, T, Tobar, Y, Leprince, J, Vaudry, H & Tsutsui, K. (2010). Identification, localization, and function of a novel avian hypothalamic neuropeptide, 26RFa, and its cognate receptor, G protein-coupled receptor-103. *Endocrinology*, **151**, 2255-2264.
513. Ukena, K, Vaudry, H, Leprince, J & Tsutsui, K. (2011). Molecular evolution and functional characterization of the orexigenic peptide 26RFa and its receptor in vertebrates. *Cell Tissue Res*, **343**, 475-481.

514. Umek, RM, Friedman, AD & McKnight, SL. (1991). CCAAT-enhancer binding protein: a component of a differentiation switch. *Science*, **251**, 288-292.
515. Umlauf, E, Cszasz, E, Moertelmaier, M, Schuetz, GJ, Parton, RG & Prohaska, R. (2004). Association of stomatin with lipid bodies. *J Biol Chem*, **279**, 23699-23709.
516. Vaisse, C, Halaas, JL, Horvath, CM, Darnell, JE, Jr., Stoffel, M & Friedman, JM. (1996). Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. *Nat Genet*, **14**, 95-97.
517. Valet, P, Berlan, M, Beauville, M, Crampes, F, Montastruc, JL & Lafontan, M. (1990). Neuropeptide Y and peptide YY inhibit lipolysis in human and dog fat cells through a pertussis toxin-sensitive G protein. *J Clin Invest*, **85**, 291-295.
518. van der Vliet, HN, Schaap, FG, Levels, JH, Ottenhoff, R, Looije, N, Wesseling, JG, Groen, AK & Chamuleau, RA. (2002). Adenoviral overexpression of apolipoprotein A-V reduces serum levels of triglycerides and cholesterol in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, **295**, 1156-1159.
519. van, H, V, Dicker, A, Sjolín, E, Blomqvist, L, Wiren, M, Hoffstedt, J, Ryden, M & Arner, P. (2010). Effects of pain controlling neuropeptides on human fat cell lipolysis. *Int J Obes (Lond)*, **34**, 1333-1340.
520. Vasta, V, Smith, CJ, Calvo, J, Belfrage, P & Manganiello, VC. (1992). Insulin and isoproterenol induce phosphorylation of the particulate cyclic GMP-inhibited, low Km cyclic AMP phosphodiesterase (cGI PDE) in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, **183**, 1070-1075.
521. Vaughan, M, Berger, JE & Steinberg, D. (1964). Hormone-sensitive lipase and monoglyceride lipase activities in adipose tissue. *J Biol Chem*, **239**, 401-409.
522. Vestergaard, ET, Gormsen, LC, Jessen, N, Lund, S, Hansen, TK, Moller, N & Jorgensen, JO. (2008). Ghrelin infusion in humans induces acute insulin resistance and lipolysis independent of growth hormone signaling. *Diabetes*, **57**, 3205-3210.
523. Villena, JA, Roy, S, Sarkadi-Nagy, E, Kim, KH & Sul, HS. (2004). Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is

- induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem*, **279**, 47066-47075.
524. Virtanen, KA & Nuutila, P. (2011). Brown adipose tissue in humans. *Curr Opin Lipidol*, **22**, 49-54.
525. Vizek, K, Razova, M & Melichar, V. (1979). Lipolytic effect of TSH, glucagon and hydrocortisone on the adipose tissue of newborns and adults in vitro. *Physiol Bohemoslov*, **28**, 325-331.
526. Voshol, PJ, Rensen, PC, van Dijk, KW, Romijn, JA & Havekes, LM. (2009). Effect of plasma triglyceride metabolism on lipid storage in adipose tissue: studies using genetically engineered mouse models. *Biochim Biophys Acta*, **1791**, 479-485.
527. Wabitsch, M, Heinze, E, Hauner, H, Shymko, RM, Teller, WM, De, MP & Ilondo, MM. (1996). Biological effects of human growth hormone in rat adipocyte precursor cells and newly differentiated adipocytes in primary culture. *Metabolism*, **45**, 34-42.
528. Wahab, F, Salahuddin, H, Anees, M, Leprince, J, Vaudry, H, Tena-Sempere, M & Shahab, M. (2012). Study of the effect of 26RF- and 43RF-amides on Testosterone and Prolactin secretion in the adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Peptides*, **36**, 23-28.
529. Walker, CG, Holness, MJ, Gibbons, GF & Sugden, MC. (2007). Fasting-induced increases in aquaporin 7 and adipose triglyceride lipase mRNA expression in adipose tissue are attenuated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha deficiency. *Int J Obes (Lond)*, **31**, 1165-1171.
530. Wang, H, Bell, M, Sreenevasan, U, Hu, H, Liu, J, Dalen, K, Londos, C, Yamaguchi, T, Rizzo, MA, Coleman, R, Gong, D, Brasaemle, D & Sztalryd, C. (2011). Unique regulation of adipose triglyceride lipase (ATGL) by perilipin 5, a lipid droplet-associated protein. *J Biol Chem*, **286**, 15707-15715.
531. Wang, ND, Finegold, MJ, Bradley, A, Ou, CN, Abdelsayed, SV, Wilde, MD, Taylor, LR, Wilson, DR & Darlington, GJ. (1995). Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. *Science*, **269**, 1108-1112.
532. Wang, S, Soni, KG, Semache, M, Casavant, S, Fortier, M, Pan, L & Mitchell, GA. (2008). Lipolysis and the integrated physiology of lipid energy metabolism. *Mol Genet Metab*, **95**, 117-126.

533. Warden, CH, Davis, RC, Yoon, MY, Hui, DY, Svenson, K, Xia, YR, Diep, A, He, KY & Lusic, AJ. (1993). Chromosomal localization of lipolytic enzymes in the mouse: pancreatic lipase, colipase, hormone-sensitive lipase, hepatic lipase, and carboxyl ester lipase. *J Lipid Res*, **34**, 1451-1455.
534. Watt, MJ, Holmes, AG, Pinnamaneni, SK, Garnham, AP, Steinberg, GR, Kemp, BE & Febbraio, MA. (2006). Regulation of HSL serine phosphorylation in skeletal muscle and adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **290**, E500-E508.
535. Wedellova, Z, Dietrich, J, Siklova-Vitkova, M, Kolostova, K, Kovacicova, M, Duskova, M, Broz, J, Vedral, T, Stich, V & Polak, J. (2011). Adiponectin inhibits spontaneous and catecholamine-induced lipolysis in human adipocytes of non-obese subjects through AMPK-dependent mechanisms. *Physiol Res*, **60**, 139-148.
536. Wei, S, Lai, K, Patel, S, Piantedosi, R, Shen, H, Colantuoni, V, Kraemer, FB & Blaner, WS. (1997). Retinyl ester hydrolysis and retinol efflux from BFC-1beta adipocytes. *J Biol Chem*, **272**, 14159-14165.
537. Weisberg, SP, McCann, D, Desai, M, Rosenbaum, M, Leibel, RL & Ferrante, AW, Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*, **112**, 1796-1808.
538. Weyer, C, Foley, JE, Bogardus, C, Tataranni, PA & Pratley, RE. (2000). Enlarged subcutaneous abdominal adipocyte size, but not obesity itself, predicts type II diabetes independent of insulin resistance. *Diabetologia*, **43**, 1498-1506.
539. White, CL, Whittington, A, Barnes, MJ, Wang, Z, Bray, GA & Morrison, CD. (2009). HF diets increase hypothalamic PTP1B and induce leptin resistance through both leptin-dependent and -independent mechanisms. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **296**, E291-E299.
540. Wijkander, J, Holst, LS, Rahn, T, Resjo, S, Castan, I, Manganiello, V, Belfrage, P & Degerman, E. (1997). Regulation of protein kinase B in rat adipocytes by insulin, vanadate, and peroxovanadate. Membrane translocation in response to peroxovanadate. *J Biol Chem*, **272**, 21520-21526.
541. Wijkander, J, Landstrom, TR, Manganiello, V, Belfrage, P & Degerman, E. (1998). Insulin-induced phosphorylation and activation of phosphodiesterase

- 3B in rat adipocytes: possible role for protein kinase B but not mitogen-activated protein kinase or p70 S6 kinase. *Endocrinology*, **139**, 219-227.
542. Williams, PM, Chang, DJ, Danesch, U, Ringold, GM & Heller, RA. (1992). CCAAT/enhancer binding protein expression is rapidly extinguished in TA1 adipocyte cells treated with tumor necrosis factor. *Mol Endocrinol*, **6**, 1135-1141.
543. Wise, A, Foord, SM, Fraser, NJ, Barnes, AA, Elshourbagy, N, Eilert, M, Ignar, DM, Murdock, PR, Steplewski, K, Green, A, Brown, AJ, Dowell, SJ, Szekeres, PG, Hassall, DG, Marshall, FH, Wilson, S & Pike, NB. (2003). Molecular identification of high and low affinity receptors for nicotinic acid. *J Biol Chem*, **278**, 9869-9874.
544. Wolfgang, MJ, Kurama, T, Dai, Y, Suwa, A, Asaumi, M, Matsumoto, S, Cha, SH, Shimokawa, T & Lane, MD. (2006). The brain-specific carnitine palmitoyltransferase-1c regulates energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 7282-7287.
545. Wolins, NE, Quaynor, BK, Skinner, JR, Tzekov, A, Croce, MA, Gropler, MC, Varma, V, Yao-Borengasser, A, Rasouli, N, Kern, PA, Finck, BN & Bickel, PE. (2006). OXPAT/PAT-1 is a PPAR-induced lipid droplet protein that promotes fatty acid utilization. *Diabetes*, **55**, 3418-3428.
546. Wolins, NE, Rubin, B & Brasaemle, DL. (2001). TIP47 associates with lipid droplets. *J Biol Chem*, **276**, 5101-5108.
547. Wolins, NE, Skinner, JR, Schoenfish, MJ, Tzekov, A, Bensch, KG & Bickel, PE. (2003). Adipocyte protein S3-12 coats nascent lipid droplets. *J Biol Chem*, **278**, 37713-37721.
548. Wood, SL, Emmison, N, Borthwick, AC & Yeaman, SJ. (1993). The protein phosphatases responsible for dephosphorylation of hormone-sensitive lipase in isolated rat adipocytes. *Biochem J*, **295 ( Pt 2)**, 531-535.
549. Woods, A, Dickerson, K, Heath, R, Hong, SP, Momcilovic, M, Johnstone, SR, Carlson, M & Carling, D. (2005). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab*, **2**, 21-33.
550. Wu, J, Bostrom, P, Sparks, LM, Ye, L, Choi, JH, Giang, AH, Khandekar, M, Virtanen, KA, Nuutila, P, Schaart, G, Huang, K, Tu, H, van Marken



- Lichtenbelt, WD, Hoeks, J, Enerback, S, Schrauwen, P & Spiegelman, BM. (2012a). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*, **150**, 366-376.
551. Wu, MR, Hou, MH, Lin, YL & Kuo, CF. (2012b). 2,4,5-TMBA, a natural inhibitor of cyclooxygenase-2, suppresses adipogenesis and promotes lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *J Agric Food Chem*, **60**, 7262-7269.
552. Wu, Z, Bucher, NL & Farmer, SR. (1996). 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*, **16**, 4128-4136.
553. Wu, Z, Rosen, ED, Brun, R, Hauser, S, Adelmant, G, Troy, AE, McKeon, C, Darlington, GJ & Spiegelman, BM. (1999). Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell*, **3**, 151-158.
554. Wu, Z, Xie, Y, Bucher, NL & Farmer, SR. (1995). Conditional ectopic expression of C/EBP beta in NIH-3T3 cells induces PPAR gamma and stimulates adipogenesis. *Genes Dev*, **9**, 2350-2363.
555. Xing, H, Northrop, JP, Grove, JR, Kilpatrick, KE, Su, JL & Ringold, GM. (1997). TNF alpha-mediated inhibition and reversal of adipocyte differentiation is accompanied by suppressed expression of PPARgamma without effects on Pref-1 expression. *Endocrinology*, **138**, 2776-2783.
556. Xu, C, He, J, Jiang, H, Zu, L, Zhai, W, Pu, S & Xu, G. (2009). Direct effect of glucocorticoids on lipolysis in adipocytes. *Mol Endocrinol*, **23**, 1161-1170.
557. Xu, H, Barnes, GT, Yang, Q, Tan, G, Yang, D, Chou, CJ, Sole, J, Nichols, A, Ross, JS, Tartaglia, LA & Chen, H. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*, **112**, 1821-1830.
558. Xu, H, Hirosumi, J, Uysal, KT, Guler, AD & Hotamisligil, GS. (2002). Exclusive action of transmembrane TNF alpha in adipose tissue leads to reduced adipose mass and local but not systemic insulin resistance. *Endocrinology*, **143**, 1502-1511.

559. Xue, JC, Schwarz, EJ, Chawla, A & Lazar, MA. (1996). Distinct stages in adipogenesis revealed by retinoid inhibition of differentiation after induction of PPARgamma. *Mol Cell Biol*, **16**, 1567-1575.
560. Yamaguchi, T, Matsushita, S, Motojima, K, Hirose, F & Osumi, T. (2006a). MLDP, a novel PAT family protein localized to lipid droplets and enriched in the heart, is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J Biol Chem*, **281**, 14232-14240.
561. Yamaguchi, T, Omatsu, N, Matsushita, S & Osumi, T. (2004). CGI-58 interacts with perilipin and is localized to lipid droplets. Possible involvement of CGI-58 mislocalization in Chanarin-Dorfman syndrome. *J Biol Chem*, **279**, 30490-30497.
562. Yamaguchi, T, Omatsu, N, Morimoto, E, Nakashima, H, Ueno, K, Tanaka, T, Satouchi, K, Hirose, F & Osumi, T. (2007). CGI-58 facilitates lipolysis on lipid droplets but is not involved in the vesiculation of lipid droplets caused by hormonal stimulation. *J Lipid Res*, **48**, 1078-1089.
563. Yamaguchi, T, Omatsu, N, Omukae, A & Osumi, T. (2006b). Analysis of interaction partners for perilipin and ADRP on lipid droplets. *Mol Cell Biochem*, **284**, 167-173.
564. Yamamoto, T, Miyazaki, R & Yamada, T. (2009). Intracerebroventricular administration of 26RFa produces an analgesic effect in the rat formalin test. *Peptides*, **30**, 1683-1688.
565. Yamamoto, T, Miyazaki, R, Yamada, T & Shinozaki, T. (2011). Anti-allodynic effects of intrathecally and intracerebroventricularly administered 26RFa, an intrinsic agonist for GRP103, in the rat partial sciatic nerve ligation model. *Peptides*, **32**, 1262-1269.
566. Yamamoto, T, Wada, T & Miyazaki, R. (2008). Analgesic effects of intrathecally administered 26RFa, an intrinsic agonist for GPR103, on formalin test and carrageenan test in rats. *Neuroscience*, **157**, 214-222.
567. Yamauchi, T, Kamon, J, Minokoshi, Y, Ito, Y, Waki, H, Uchida, S, Yamashita, S, Noda, M, Kita, S, Ueki, K, Eto, K, Akanuma, Y, Froguel, P, Foufelle, F, Ferre, P, Carling, D, Kimura, S, Nagai, R, Kahn, BB & Kadowaki, T. (2002). Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med*, **8**, 1288-1295.

568. Yang, J, Croniger, CM, Lekstrom-Himes, J, Zhang, P, Fenyus, M, Tenen, DG, Darlington, GJ & Hanson, RW. (2005). Metabolic response of mice to a postnatal ablation of CCAAT/enhancer-binding protein alpha. *J Biol Chem*, **280**, 38689-38699.
569. Yang, K, Guan, H, Arany, E, Hill, DJ & Cao, X. (2008). Neuropeptide Y is produced in visceral adipose tissue and promotes proliferation of adipocyte precursor cells via the Y1 receptor. *FASEB J*, **22**, 2452-2464.
570. Yang, X, Lu, X, Lombes, M, Rha, GB, Chi, YI, Guerin, TM, Smart, EJ & Liu, J. (2010). The G(0)/G(1) switch gene 2 regulates adipose lipolysis through association with adipose triglyceride lipase. *Cell Metab*, **11**, 194-205.
571. Yang, X, Zhang, X, Heckmann, BL, Lu, X & Liu, J. (2011). Relative contribution of adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase to tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-induced lipolysis in adipocytes. *J Biol Chem*, **286**, 40477-40485.
572. Yarwood, SJ, Sale, EM, Sale, GJ, Houslay, MD, Kilgour, E & Anderson, NG. (1999). Growth hormone-dependent differentiation of 3T3-F442A preadipocytes requires Janus kinase/signal transducer and activator of transcription but not mitogen-activated protein kinase or p70 S6 kinase signaling. *J Biol Chem*, **274**, 8662-8668.
573. Yeh, WC, Cao, Z, Classon, M & McKnight, SL. (1995). Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes Dev*, **9**, 168-181.
574. Ying, H, Araki, O, Furuya, F, Kato, Y & Cheng, SY. (2007). Impaired adipogenesis caused by a mutated thyroid hormone alpha1 receptor. *Mol Cell Biol*, **27**, 2359-2371.
575. Zarjevski, N, Cusin, I, Vettor, R, Rohner-Jeanrenaud, F & Jeanrenaud, B. (1993). Chronic intracerebroventricular neuropeptide-Y administration to normal rats mimics hormonal and metabolic changes of obesity. *Endocrinology*, **133**, 1753-1758.
576. Zhang, B, Berger, J, Zhou, G, Elbrecht, A, Biswas, S, White-Carrington, S, Szalkowski, D & Moller, DE. (1996). Insulin- and mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation and activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem*, **271**, 31771-31774.

577. Zhang, HH, Souza, SC, Muliro, KV, Kraemer, FB, Obin, MS & Greenberg, AS. (2003). Lipase-selective functional domains of perilipin A differentially regulate constitutive and protein kinase A-stimulated lipolysis. *J Biol Chem*, **278**, 51535-51542.
578. Zhang, J, Hupfeld, CJ, Taylor, SS, Olefsky, JM & Tsien, RY. (2005a). Insulin disrupts beta-adrenergic signalling to protein kinase A in adipocytes. *Nature*, **437**, 569-573.
579. Zhang, JW, Klemm, DJ, Vinson, C & Lane, MD. (2004a). Role of CREB in transcriptional regulation of CCAAT/enhancer-binding protein beta gene during adipogenesis. *J Biol Chem*, **279**, 4471-4478.
580. Zhang, Q, Qiu, P, Arreaza, MG, Simon, JS, Golovko, A, Lavery, M, Vassileva, G, Gustafson, EL, Rojas-Triana, A, Bober, LA, Hedrick, JA, Monsma, FJ, Jr., Greene, JR, Bayne, ML & Murgolo, NJ. (2007). P518/Qrpf sequence polymorphisms in SAMP6 osteopenic mouse. *Genomics*, **90**, 629-635.
581. Zhang, W, Zhao, L, Lin, TR, Chai, B, Fan, Y, Gantz, I & Mulholland, MW. (2004b). Inhibition of adipogenesis by ghrelin. *Mol Biol Cell*, **15**, 2484-2491.
582. Zhang, Y, Schmidt, RJ, Foxworthy, P, Emkey, R, Oler, JK, Large, TH, Wang, H, Su, EW, Mosior, MK, Eacho, PI & Cao, G. (2005b). Niacin mediates lipolysis in adipose tissue through its G-protein coupled receptor HM74A. *Biochem Biophys Res Commun*, **334**, 729-732.
583. Zhou, SL, Stump, D, Sorrentino, D, Potter, BJ & Berk, PD. (1992). Adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells involves augmented expression of a 43-kDa plasma membrane fatty acid-binding protein. *J Biol Chem*, **267**, 14456-14461.
584. Zhu, Y, Qi, C, Korenberg, JR, Chen, XN, Noya, D, Rao, MS & Reddy, JK. (1995). Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 7921-7925.
585. Zimmermann, R, Strauss, JG, Haemmerle, G, Schoiswohl, G, Birner-Gruenberger, R, Riederer, M, Lass, A, Neuberger, G, Eisenhaber, F, Hermetter, A & Zechner, R. (2004). Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science*, **306**, 1383-1386.

586. Zuk, PA, Zhu, M, Ashjian, P, De Ugarte, DA, Huang, JI, Mizuno, H, Alfonso, ZC, Fraser, JK, Benhaim, P & Hedrick, MH. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, **13**, 4279-4295.
587. Zuk, PA, Zhu, M, Mizuno, H, Huang, J, Futrell, JW, Katz, AJ, Benhaim, P, Lorenz, HP & Hedrick, MH. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, **7**, 211-228.