

Université de Montréal

**Mécanismes impliqués dans les effets du récepteur à la (pro)rénine
sur le développement de l'obésité et de ses complications
cardiométaboliques associées**

par
Paul Tan

Département de Biochimie et médecine moléculaire
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine en vue de
l'obtention du grade de Ph.D en Biochimie et Médecine Moléculaire

Octobre 2015

© Paul Tan, 2015

Université de Montréal
Faculté de Médecine

Cette thèse intitulée :

**Mécanismes impliqués dans les effets du récepteur à la (pro)rénine
sur le développement de l'obésité et de ses complications reliées**

présentée par
Paul Tan

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Nikolaus Heveker, président-rapporteur
Julie Lavoie, directrice de recherche
Jolanta Gutkowska, co-directrice de recherche
Raynald Bergeron, membre du jury
Antony Karelis, examinateur externe
Marc Prentki, représentant du doyen

Résumé

L'obésité est une maladie associée à de nombreuses complications comme le diabète de type 2, l'hypertension et le cancer. De nos jours, les modifications au mode de vie, tels l'alimentation et le niveau d'activité physique, ne sont pas suffisants pour combattre les effets délétères de l'obésité. La pharmacothérapie est un traitement alternatif bien que les effets bénéfiques soient temporaires et ne peuvent être maintenus à long terme. Le besoin pour un traitement bénéfique à long terme sans effet secondaire n'est pas comblé. Mieux connu pour son rôle dans la régulation de la pression artérielle, le système rénine-angiotensine favorise l'entreposage du gras. Le récepteur à la prorénine et à la rénine est une composante du système rénine-angiotensine. Ainsi, le récepteur qui amplifie l'activation de celui-ci pourrait avoir un rôle clé dans le gain de masse grasse. Le but de ce projet de thèse est d'évaluer le rôle du récepteur à la prorénine et à la rénine dans le développement de l'obésité et de ses complications chez la souris et ce, en utilisant une combinaison de diète riche en gras et en hydrates de carbone et du *handle region peptide*, un bloqueur du récepteur à la prorénine à la rénine.

Après une période de 10 semaines, nous avons constaté que l'expression et la protéine du récepteur à la prorénine et à la rénine augmentent spécifiquement dans le tissu adipeux sous-cutané et viscéral des souris obèses. Lorsqu'administré en concomitance avec une diète riche en gras et en hydrates de carbone, le *handle region peptide* favorise chez la souris des diminutions des gains des masses corporelles et adipeuses viscérales. Une diminution de l'expression de l'enzyme catalysant la dernière étape de la lipogenèse pourrait être responsable de la réduction de gras viscéral. Chez les mêmes animaux, l'expression de plusieurs adipokines est également diminuée dans le tissu adipeux suggérant une réduction de la résistance à l'insuline, de l'inflammation et de l'infiltration des macrophages localement dans le gras sous-cutané et viscéral. L'augmentation de l'expression d'un marqueur de l'adipogenèse dans le tissu adipeux sous-cutané pourrait suggérer un plus grand nombre d'adipocytes. Cela pourrait tamponner l'excès d'acides gras libres circulants puisque nous avons constaté une diminution de ce paramètre chez les souris ayant une diète riche en gras et en hydrates de carbone et traitées avec le peptide. Nous avons émis l'hypothèse qu'un cycle futile pourrait être activé

dans le gras sous-cutané car nous avons observé une augmentation de l'expression de plusieurs enzymes impliquées dans la lipogenèse et dans la lipolyse. Le "brunissement" du tissu adipeux est la présence de cellules similaires aux adipocytes bruns dans le tissu adipeux qui sont caractérisés par une grande densité mitochondriale et la thermogénèse. L'augmentation de l'expression des marqueurs de "brunissement" et de biogenèse de mitochondrie dans le gras sous-cutané suggère que le "brunissement" pourrait également être activé dans ce dépôt de gras. La sensibilité à l'insuline chez ces animaux pourrait être améliorée telle que suggérée en circulation par la diminution de l'insuline, par le glucose qui change peu, par l'augmentation du ratio glucose sur insuline ainsi que par un changement potentiel dans la corrélation entre le poids corporel de la souris et les niveaux d'adiponectine circulante.

Nos travaux suggèrent que le *handle region peptide* pourrait augmenter la capacité du tissu adipeux sous-cutané à métaboliser les lipides circulants avec l'activation potentielle d'un cycle futile et le "brunissement". Cela préviendrait le dépôt ectopique de lipides vers les compartiments viscéraux comme le suggère la réduction de masse adipeuse viscérale chez les souris ayant une diète riche en gras et en hydrates de carbone et traitées avec le peptide. Utilisant un modèle de souris, cette étude démontre le potentiel pharmacologique du *handle region peptide* comme un nouveau traitement pour prévenir l'obésité.

Mots-clés : obésité, système rénine-angiotensine, récepteur à la prorénine et à la rénine, *handle region peptide*, tissu adipeux, adipokine, résistance à l'insuline, cycle futile, "brunissement"

Abstract

Obesity is a disease associated with multiple complications such as type 2 diabetes, hypertension and cancer. Nowadays, lifestyle modifications, such as eating habits and physical activity, are simply not enough to counter the deleterious effects of obesity. Pharmacotherapy is used as an alternative treatment although beneficial effects are temporary and cannot be maintained in the long run. The current medical need for a treatment with long term beneficial outcomes devoid of side effects is unmet. Best known for its role in blood pressure regulation, the renin-angiotensin system has recently been attributed a role in favouring fat storage. The prorenin and renin receptor is a component of renin-angiotensin system that amplifies its activation. Thus, the prorenin and renin receptor might play a key role in gaining fat mass. The aim of this thesis is to investigate the role of the prorenin and renin receptor in the development of obesity and its complications in mice using a combination of high-fat and high carbohydrate diet and the handle region peptide, a blocker of the prorenin and renin receptor.

After a period of 10 weeks, we have found that the prorenin and renin receptor is increased specifically in subcutaneous and visceral adipose tissue of obese mice. When administered simultaneously with a high-fat and high-carbohydrate diet, the handle region peptide reduced body weight gain in mice with similar decrease in visceral fat mass. Decreased expression of the enzyme catalyzing the last step of lipogenesis could be responsible for the reduction in visceral fat mass. In the same animals, the expressions of several adipokines were also decreased in adipose tissue suggesting reduced insulin resistance, inflammation and macrophage infiltration locally in subcutaneous and visceral fat. Increased expression of a marker of adipogenesis in subcutaneous adipose tissue could suggest higher adipocyte number. This would buffer excess circulating free fatty acid since we have noticed a reduction in the latter in mice on a high-fat and high-carbohydrate diet and treated with the peptide. We hypothesized that a futile cycle could be activated in subcutaneous fat because we have observed increased expression of several enzymes implicated in lipogenesis and lipolysis. « Beiging » is defined as the presence of brown-like adipocytes in adipose tissue which is characterized by high mitochondrial density and thermogenesis. Increased expression of markers for « beiging » and mitochondrial biogenesis in subcutaneous fat suggests that «

being » could also be activated in this fat pad. Insulin sensitivity in these animals could be improved as suggested in the circulation by decreased insulin, similar glucose, increased glucose on insulin ratio as well as a possible change in the correlation between mouse body weight and circulating adiponectin levels.

Our work suggests that the handle region peptide could increase the capacity of subcutaneous adipose tissue to metabolize circulating lipids with a potential activation of a futile cycle and « being ». This would prevent ectopic deposition of fat in visceral compartments as suggested by the reduction in visceral fat mass in mice on high-fat and high-carbohydrate diet and treated with the peptide. Using a mice model, this study demonstrates the pharmacological potential of the handle region peptide as a novel treatment to prevent obesity.

Keywords : obesity, renin-angiotensin system, prorenin and renin receptor, handle region peptide, adipose tissue, adipokine, insulin resistance, futile cycle, « being ».

Tables des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures.....	xii
Liste des abréviations.....	xiv
Remerciements.....	xviii
Introduction.....	1
Chapitre 1 - L'obésité.....	1
1.1 Généralité.....	1
1.2 Mesures anthropométriques.....	2
1.3 Complications de l'obésité.....	4
1.4 Traitements actuels pour l'obésité.....	5
Chapitre 2 - Le tissu adipeux.....	7
2.1 Généralité.....	7
2.2 Tissu adipeux blanc.....	7
2.3 Tissu adipeux brun.....	10
2.4 Tissu adipeux beige.....	12
2.5 Lipogenèse et lipolyse.....	14
2.6 Fonction endocrinienne.....	16
Chapitre 3 - Le système rénine-angiotensine.....	19
3.1 Historique.....	19
3.2 Composantes du RAS.....	19
3.2.1 RAS classique.....	19
3.2.2 RAS moderne.....	21

3.3 RAS local dans le tissu adipeux.....	23
3.4 Lien entre le RAS et l'obésité.....	24
3.5 Modulation des composantes du RAS avec l'obésité.....	25
3.6 Implication du RAS dans l'obésité.....	27
Chapitre 4 - Le récepteur à la prorénine et à la rénine.....	35
4.1 Caractéristiques.....	35
4.2 Activation de la prorénine.....	36
4.3 Mécanisme d'action du (P)RR.....	40
4.3.1 Dépendante de l'Ang II.....	40
4.3.2 Indépendante de l'Ang II.....	40
4.3.3 Indépendante de la rénine.....	43
4.4 Implication pathologique du (P)RR.....	46
4.4.1 Dommages aux organes.....	46
4.4.2 Hypertension.....	49
4.4.3 Retard mental et épilepsie lié au chromosome X.....	51
4.4.4 Parkinsonisme avec spasticité lié au chromosome X.....	51
4.4.5 Problème développemental.....	52
4.5 <i>Handle region peptide</i>	52
4.6 Effet thérapeutique du HRP.....	53
4.6.1 Modèles de complications diabétiques.....	55
4.6.1.1 Néphropathie diabétique.....	55
4.6.1.2 Rétinopathie diabétique.....	58
4.6.2 Modèles d'hypertension.....	61
4.6.2.1 Cardiomyopathie hypertensive.....	61
4.6.2.2 Insuffisance cardiaque.....	63
4.6.2.3 Néphropathie hypertensive.....	63
4.6.3 Lignées cellulaires.....	64
4.6.4 Divergences sur les effets du HRP.....	65
4.6.4.1 Modèles <i>in vivo</i>	65

4.6.4.2 Modèles <i>in vitro</i>	68
4.7 Lien entre le (P)RR et l'obésité.....	69
Chapitre 5 - Mise en contexte.....	73
5.1 Problématique.....	73
5.2 Rationnel.....	73
5.3 Questions.....	74
5.4 Hypothèses.....	75
5.5 Objectifs.....	75
Résultats.....	76
Chapitre 6 - Article 1 - <i>Impact of the prorenin/renin receptor on the development of obesity and associated cardiometabolic risk factors</i>.....	76
Résumé.....	80
Introduction.....	81
Matériels et méthodes.....	82
Résultats.....	84
Discussion.....	89
Références.....	94
Tableaux et figures.....	102
Suppléments.....	110
Matériels et méthodes.....	111
Tableaux et figures.....	116
Références.....	129
Chapitre 7 - Article 2 - <i>Prorenin/renin blockade implication in triglyceride/free fatty acid cycling and beiging in subcutaneous adipose tissue of obese mice</i>.....	132
Résumé.....	135

Introduction.....	136
Matériels et méthodes.....	140
Résultats.....	143
Discussion.....	148
Références.....	157
Tableaux et figures.....	170
Chapitre 8 - Discussion.....	184
8.1 Résumé des travaux.....	184
8.2 Similarités avec la littérature.....	185
8.2.1 Dose et durée du traitement au HRP.....	185
8.2.2 Expression et présence de la rénine dans le tissu adipeux.....	186
8.3 Raffinement des observations par les RASi.....	187
8.3.1 PPAR γ et ses deux isoformes.....	187
8.3.2 Adiponectine et ses différentes formes circulantes.....	187
8.4 Voies responsables des effets du HRP.....	188
8.5 Nouvelles observations avec le HRP par rapport aux RASi.....	188
8.5.1 Cycle futile des triglycérides/acide gras libres.....	188
8.5.2 "Brunissement" du SCF.....	191
8.6 Différences avec la littérature.....	192
8.6.1 Leptine et son effet sur la prise alimentaire.....	192
8.6.2 Utilisation du glucose par le muscle et le tissu adipeux.....	192
8.7 Effet du HRP sur la fonction cardiaque.....	193
8.8 Limitations.....	194
8.8.1 HRP modifie-t-il le type de macrophages présent dans le tissu adipeux?.....	194
8.8.2 Laquelle des deux voies du (P)RR contribue le plus?.....	195
8.8.3 HRP active-t-il un cycle futile des triglycérides/acide gras libres et le "brunissement"?.....	196
8.8.4 (P)RR est-t-il modulé avec l'obésité et après une perte de poids corporel chez l'homme?.....	197

8.9 Impact clinique du (P)RR et du HRP sur le développement de l'obésité.....	197
8.10 Perspectives et conclusions.....	201
Bibliographie.....	202

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau I. Classification des individus par leur indice de masse corporelle selon l'Organisation mondiale de la Santé.....	3
Tableau II. Limites du tour de taille et risque de complications selon l'Organisation mondiale de la Santé.....	4

Chapitre 3

Tableau III. Effets de l'inactivation ubiquitaire des composantes du RAS sur les paramètres associés à l'obésité chez la souris.....	29
Tableau IV. Effets de l'administration d'un RASi sur les paramètres associés à l'obésité.....	32

Chapitre 4

Tableau V. Divergences sur les effets <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> du HRP.....	66
---	----

Chapitre 6

Table 1. Renin-angiotensin system components mRNA expression in human subcutaneous adipose tissue.....	102
Table 2. Effect of the HRP on mouse hepatic and circulating metabolites.....	103
Table S1. Primer sequences for mice (m) and human (h) mRNA expression.....	121
Table S2. Real Time PCR conditions for mice (m) and human (h) mRNA expression.....	122
Table S3. Renin level in adipose tissue compared to the kidney.....	123
Table S4. Effect of HF/HC diet on female mice renin mRNA in adipose tissues.....	124
Table S5. Female mice body and adipose tissue weight.....	125
Table S6. Characteristics in human subjects for the CAO cohort study.....	126
Table S7. Weekly food consumption.....	127
Table S8. Effect of the HRP on left ventricular volume.....	128

Chapitre 7

Table 1. Primer sequences used for Real-time PCR..... 170

Table 2. Details of the primary and secondary antibodies used in Western Blotting..... 171

Liste des figures

Chapitre 2

Figure 1. Structure simplifiée du tissu adipeux blanc et d'un adipocyte blanc.....	8
Figure 2. Structure simplifiée d'un adipocyte brun et sa production de chaleur.....	11
Figure 3. Structure simplifiée d'un tissu adipeux beige et d'un adipocyte beige.....	13
Figure 4. Étapes de la lipogenèse et lipolyse.....	15

Chapitre 3

Figure 5. Système rénine-angiotensine classique systémique.....	20
Figure 6. Système rénine-angiotensine moderne.....	22

Chapitre 4

Figure 7. Signalisation du (P)RR dépendante et indépendante de l'Ang II.....	39
Figure 8. Signalisation du (P)RR indépendante de la rénine.....	45
Figure 9. Mécanisme de fonctionnement du HRP.....	54

Chapitre 6

Figure 1. Effect of the HRP on mouse (P)RR and renin mRNA and protein in adipose tissues.....	104
Figure 2. Effect of the HRP on mouse body weight, weight gain and adipose tissue weight.....	105
Figure 3. Effect of the HRP on mouse adipokine mRNA in adipose tissues and circulating levels.....	106
Figure 4. Effect of the HRP on mouse inflammation markers mRNA in adipose tissues.....	107
Figure 5. Effect of the HRP on mouse Mest/Peg1 mRNA in adipose tissues.....	108
Figure 6. Effect of the HRP on mouse heart function.....	109
Figure S1. (P)RR protein in the heart, liver and kidney is not modified by diet and treatment.....	116
Figure S2. Effect of the HRP on mouse plasma renin activity.....	117

Figure S3. Renin protein in the kidney.....	118
Figure S4. Effect of HF/HC diet on female mice (P)RR protein in adipose tissue.....	119
Figure S5. Effect of the HRP on mouse GLUT1 and GLUT4 mRNA expression in adipose tissues.....	120

Chapitre 7

Figure 1. Effect of (P)RR on local RAS and intracellular pathway in adipocytes.....	172
Figure 2. Lean and diet-induced obese C58BL/6 mouse model.....	173
Figure 3. HRP treatment increases enzymes implicated in lipogenesis in SCF of obese mice.....	174
Figure 4. HRP treatment increases enzymes implicated in lipolysis in SCF of obese mice...	175
Figure 5. HRP treatment decreases plasma FFA levels in obese mice.....	176
Figure 6. HRP treatment increases a marker for adipogenesis in SCF of obese mice.....	177
Figure 7. HRP treatment increases a marker angiogenesis in SCF of obese mice.....	178
Figure 8. HRP treatment increases markers for beiging in SCF of obese mice.....	179
Figure 9. HRP treatment may increase adiponectin and insulin signalling in obese mice.....	180
Figure 10. PLZF is increased in PGF and HRP treatment decreases p38 MAPK signalling in SCF of obese mice.....	182
Figure 11. Proposed model for the effects of HRP treatment on the phenotype of SCF adipocytes.....	183

Chapitre 8

Figure 10. Modèle du cycle triglycérides/acides gras dans le SCF des souris HF/HC+HRP.....	190
Figure 11. Effet des RASi sur le système rénine-angiotensine.....	200

Liste des abréviations

2K1C : 2 reins, 1 clip
ACC : acétyl-CoA carboxylase
ACE : enzyme de conversion de l'angiotensine
ACEi : inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine
AdipoH : adiponectine haut poids moléculaire
AGT : angiotensinogène
Ang : angiotensine
ARB : bloqueur du récepteur type 1 de l'angiotensine II
AT1R : récepteur type 1 de l'angiotensine II
AT2R : récepteur type 2 de l'angiotensine II
ATGL : lipase de triglycéride du tissu adipeux
ATP : adénosine triphosphate
AVP : vasopressine
BAT : tissu adipeux brun
BW : poids corporel
COX-2 : cyclooxygénase-2
CTGF : facteur de croissance du tissu conjonctif
DAG : diacylglycérol
DGAT : diglycéride acyltransférase
ERK1/2 : kinases 1/2 régulées par signal extracellulaire
FA CoA : acide gras CoA
FAS : synthase des acides gras
FFA : acide gras libre
FFM : masse sans gras
G3P : glycérol-3-phosphate
GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GDR : taux de disponibilité du glucose
GFP : protéine fluorescente verte

GLUT : transporteur de glucose
GPAT : glycérol-3-phosphate acyltransférase
GPDH : glycérol-3-phosphate déshydrogénase
GyK : glycérol kinase
Gly : glycérol
HDL-c : cholestérol-lipoprotéine de haute densité
HEK293 : embryoniques humaines de rein 293
HF/HC : riche en gras et en hydrates de carbone
HMW : haut poids moléculaire
HSL : lipase hormono-sensible
HSP27 : protéine de choc thermique 27
HRP : *handle region peptide*
ICAM-1 : molécule d'adhésion intercellulaire 1
IL-1 β : interleukine 1 bêta
IL-6 : interleukine 6
IMC : indice de masse corporel
IRAP : aminopeptidase régulé par l'insuline
IRO : obèse résistante à l'insuline
ISO : obèse sensible à l'insuline
JNK : kinase c-jun N-terminal
K_D : constante de dissociation
LRP5/6 : protéine 5/6 reliée au récepteur de lipoprotéine à faible densité
LVV : volume ventriculaire gauche
M6PR : récepteur mannose-6-phosphate
MAG : monoacylglycérol
MAPK : protéine kinase activée par mitogène
MasR : récepteur Mas
MCP-1 : protéine 1 chimioattractante de monocyte
Mest/Peg1 : transcript mésoderme-spécifique/gène 1 exprimé paternellement
MGAT : monoacylglycérol acyltransférase

MGL : lipase de monoacylglycérol
MMW : moyen poids moléculaire
OGTT : teste de tolérance au glucose
PAI-1 : inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1
PGC1 α : coactivateur 1-alpha du PPAR γ
PGF : gras péri-gonadal
PI3K-p85 α : sous-unité p85 α de phosphoinositide 3-kinase
PLZF : doigt de zinc de la leucémie promyelocytaire
PPAR γ : récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxyosomes
PRA : activité de la rénine plasmatique
PRDM16 : domaine PR contenant 16
PRF : gras péri-rénal
(Pro)rénine : prorénin et rénine
(P)RR : récepteur à la prorénine et à la rénine
RAS : système rénine-angiotensine
RASi : inhibiteur du système rénine-angiotensine
SCF : tissu adipeux sous-cutané
SHR : rat spontanément hypertendu
SHRsp : SHR susceptible de développer un accident vasculaire cérébral
siRNA : petit ARN interférant
s(P)RR : récepteur à la prorénine et à la rénine soluble
STZ : streptozotocine
TAG : triacylglycérol
TG : triglycéride
TGF- β 1 : facteur de croissance de transformation-bêta 1
TNF α : facteur de nécrose tumorale alpha
UCP1 : protéine de découplage 1
VAT : tissu adipeux viscéral
V-ATPase : adénosine triphosphatase vacuolaire
VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

VSMC : cellule de muscle lisse vasculaire

WAT : tissu adipeux blanc

Remerciements

J'aimerais avant tout remercier mes parents non seulement pour m'avoir donné la chance de venir dans ce monde merveilleux mais aussi pour m'avoir élevé. Vous avez été patients avec moi durant toutes les étapes de ma vie malgré le fait que j'étais un enfant rebelle et plutôt difficile à éduquer. Toutefois, vous ne m'avez jamais abandonnés et vous avez toujours fait de votre mieux pour me protéger. Il est impossible de nommer toutes les bonnes choses que vous aviez faites pour moi. Sans votre aide, je ne pourrais même pas imaginer ce que je serais devenu aujourd'hui. Cette thèse a été écrite pour vous.

Je veux aussi remercier mes amis du secondaire d'avoir été compréhensifs à l'égard de mon absence pendant mes années au doctorat. Vous m'avez toujours encouragé et vous m'avez souvent rappelé qu'il ne me fallait pas abandonner mes objectifs à la moindre difficulté.

Je veux aussi remercier toutes les personnes avec qui j'ai passé plusieurs années à Angus. Bien qu'Angus ne fût pas aussi grand que le CRCHUM, cela est venu faciliter les échanges entre les personnes. J'ai beaucoup apprécié nos discussions sur tous les sujets. Cela me donnait la sensation qu'il n'y avait pas de barrière séparant les gens entre les différents laboratoires. C'était pour moi une grande famille. Il me faut aussi mentionner toutes les personnes que j'ai connues uniquement au CRCHUM. Vous êtes tous et toutes très sympathique et nos discussions sont toujours intéressantes. J'ai beaucoup apprécié votre compagnie durant les longues nuits de travail. Merci d'avoir été là pendant mes périodes difficiles et d'avoir créé le *Beer Session*.

Je tiens également à remercier Suzanne Cossette, Ahmed Menouar et Zhenhong Li pour les conseils pratiques, l'assistance technique et leur expertise pour l'avancement de mon projet.

De plus, j'ai eu la chance de rencontrer plusieurs personnes dans mon laboratoire incluant Dominique Suzanne Genest, Catherine Michel, Basma Ahmed, Zulaykho Shamansurova, Sonia Kajla, Aida Kasaei, Alexandre Garneau, Olga Asaftei, et Zhenhong Li

ainsi que les stagiaires d'été. Ce n'était pas des plus facile de voir certains d'entre vous quitter le laboratoire mais vous avez tous contribuer à rendre mes années au doctorat plus intéressantes et moins ardues. Que cela soit au niveau personnel ou professionnel, j'ai beaucoup appris avec vous tous et toutes et je vous en suis des plus reconnaissants. Même si la plupart d'entre vous ont quittés, je n'oublierais jamais les bons moments que nous avons passés ensemble.

J'aimerais aussi remercier la compagnie Red Bull pour la création et la commercialisation de leur boisson énergétique. Cette boisson m'a fourni l'énergie additionnelle afin de compléter ma thèse de doctorat. Il est également important pour moi de donner une reconnaissance aux souris impliquées dans mon projet de recherche puisque sans ces animaux, cette thèse n'aurait pu être réalisée.

Merci à ma co-directrice Dre. Gutkowska. Vous m'avez toujours fournis votre assistance et des commentaires constructifs durant mes études. C'était toujours des plus enrichissant de parler de science et autres sujets avec vous.

Finalement, je désire profiter pour remercier chaleureusement ma directrice de recherche Dre. Julie Lavoie de m'avoir accepté en tant qu'étudiant. Autrement, je n'aurais jamais connu toutes ces personnes avec qui j'ai partagé des moments inoubliables et qui ont eu un impact majeur sur mon développement personnel et professionnel. Merci Julie, je te suis infiniment reconnaissant et il n'existe pas de mot pour le décrire. Tu m'as accueilli en tant qu'étudiant malgré le fait de ne pas avoir le meilleur dossier académique/professionnel et peu d'expérience pratique. Tu m'as personnellement montrée les techniques de base du laboratoire et tu m'as offert de multiples opportunités pour améliorer mes faiblesses. Tu m'as montrée comment "bien faire" la science et comment communiquer plus efficacement tant à l'écrit qu'à l'oral. Tu as toujours été disponible pour tes étudiants même en dehors des heures de travail normal. De plus, tu me considères comme un ami et un membre de ta famille. Julie, tu m'as offert plus que ce que je croyais mériter. Cette thèse est également écrite pour toi. Elle est résultat de ce tout j'ai accompli pendant toutes ces années où tu m'as accompagnée. Merci

pour ta formation de qualité, ton aide si précieuse, de ne pas m'abandonné durant mes études. Merci pour ta patience, ta confiance envers moi et m'avoir donné le sentiment d'appartenance à une formidable équipe. Un énorme merci pour tout.

Introduction

Chapitre 1 : L'obésité

1.1 - Généralité

L'Organisation mondiale de la Santé définit l'obésité comme "*une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui représente un risque pour la santé*". La prévalence mondiale d'adultes en surpoids est estimée aux alentours de 1,6 milliard avec plus de 400 millions d'individus obèses et elle l'augmente d'environ 0,3-0,8% annuellement depuis les 30 dernières années (1;2). Selon cette tendance, les statistiques risquent fortement d'augmenter à 2,3 milliards et 700 millions respectivement cette année (2).

Quoi que la technologie puisse alléger nos tâches au travail, à domicile et dans nos déplacements, elle encourage toutefois l'inactivité physique (3-5). Du côté de l'alimentation, de nombreuses raisons vont aujourd'hui inciter les gens à consommer plus de produits à densité énergétique élevée (6-8). Par exemple, certaines personnes opteront pour du *fast food* ou des repas congelés. Il s'avère ainsi, qu'il y ait une diminution de la consommation de fruits et légumes (9). La commercialisation, les campagnes publicitaires et l'accessibilité à la nourriture malsaine expliquent en partie cette transition vers la mauvaise alimentation. La croyance voulant que les personnes à haut revenu ont plus de risques d'être obèses comparativement aux personnes à bas revenu est devenue un mythe, puisque des études récentes suggèrent le contraire (10). La valeur marchande pour les produits à dense énergie est plus faible que celui des fruits et légumes. Avec un budget limité, les aliments calorifiques sont plus économiques.

1.2 - Mesures anthropométriques

L'obésité est évaluée par des index calculés à partir de paramètres anthropométriques. L'indice de masse corporel (IMC) est la mesure la plus utilisée et permet de classer les individus en divisant leur poids corporel en kilogrammes par leur taille en mètres au carré (kg/m^2) (**Tableau I, Page 3**). Un individu est classé normal avec un IMC entre 18,50 à 24,99 kg/m^2 . Au fur et à mesure que la personne gagne en poids, elle se retrouve éventuellement dans la catégorie de surpoids avec un IMC entre 25 à 30 kg/m^2 . Les individus obèses ont pour leur part un IMC plus grand que 30,00 kg/m^2 sans aucune limite supérieure. De manière similaire, un individu est classé comme étant maigre lorsque son IMC est en dessous de la norme, c'est-à-dire plus faible que 18,50 kg/m^2 sans aucune limite inférieure. L'IMC est une mesure qui corrèle avec les risques cardiovasculaires. Par exemple, l'augmentation de l'IMC est associée à une hausse de pression artérielle, de glycémie et de cholestérol, facteurs de risque pour la maladie coronarienne chez l'homme (11). Bien que l'IMC soit couramment utilisé pour l'identification des individus obèses, cet indice possède une limitation. Il est d'ailleurs impossible de différencier l'abondance de la masse grasse et de la masse maigre en se basant uniquement sur l'IMC d'un individu. Une personne qui s'entraîne a plus de masse musculaire, son poids corporel augmente et son IMC surévalue sa masse grasse. Par conséquent, cet individu est classé dans la catégorie de surpoids. De la même façon, un individu perdant sa masse musculaire aura un IMC qui sous-évalue sa masse grasse. Toutefois, il faut demeurer prudent avec la classification de l'IMC fournie par l'Organisation mondiale de la Santé puisqu'elle ne peut pas être appliquée à toutes les populations ethniques. Par exemple, pour un même IMC, une personne asiatique a plus de masse grasse et a un plus grand risque de développer une comorbidité liée à l'obésité qu'un individu caucasien (12;13). Ainsi, si l'on se réfère uniquement sur les limites fixées par l'Organisation mondiale de la Santé, certains individus à risque ne seront pas détectés ou mal catégorisés. C'est pourquoi, l'Organisation mondiale de la Santé a ainsi établi une échelle d'IMC mieux adaptée pour différentes populations asiatiques (14).

Tableau I. Classification des individus par leur indice de masse corporelle selon l'Organisation mondiale de la Santé

Classification	IMC (kg/m²)
Maigre	<18,50
Minceur sévère	<16,00
Minceur modérée	16,00 – 16,99
Minceur légère	17,00 - 18,49
Normal	18,50 - 24,99
Surpoids	≥25,00
Pré-obèse	25,00 - 29,99
Obèse	≥30,00
Obèse de classe I	30,00 - 34,99
Obèse de classe II	35,00 - 39,99
Obèse de classe III	≥40,00

Données provenant du site internet de l'organisation mondiale de la Santé (http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html). Consultation et traduction française en date du 2 juin 2015. IMC, indice de masse corporel.

En raison de ces limitations, l'IMC est souvent utilisé conjointement avec la mesure du tour de taille d'un individu en centimètres (**Tableau II, Page 4**). Un tour de taille plus élevé que 94 cm chez l'homme et 80 cm chez la femme représente un risque modéré de développer une comorbidité. Lorsque les valeurs sont supérieures à 102 cm chez l'homme et 88 cm chez la femme, les risques de complications sont nettement plus élevés. Une corrélation positive existe entre le tour de taille et l'occurrence d'évènement cardiovasculaire où une augmentation de 1 cm accroît les risques de 2% (15). Une autre mesure anthropométrique est le ratio du tour

de taille sur le tour de hanche. La supériorité de cette mesure par rapport au tour de taille afin de prédire par exemple les risques cardiovasculaires est toutefois discordante (16). Ceci est potentiellement dû au fait que les mesures anthropométriques peuvent varier selon le manipulateur et l'endroit exacte où la mesure est prise.

Tableau II. Limites du tour de taille et risque de complications selon l'Organisation mondiale de la Santé

	Homme	Femme	Risque de complication
Tour de taille (cm)	>94	>80	Modeste
Tour de taille (cm)	>102	>88	Élevé

Données provenant du site internet de l'organisation mondiale de la Santé (http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44583/1/9789241501491_eng.pdf?ua=1).

Consultation et traduction française en date du 8 juin 2015.

1.3 - Complications de l'obésité

L'obésité est associée à des complications telles que les maladies cardiovasculaires, le diabète et le cancer. Selon l'Organisation mondiale de la santé, le nombre de décès attribué à l'obésité était de 2,8 millions par année en 2002 (17). L'obésité contribue jusqu'à 70% des cas d'hypertension et le risque de développer cette complication est 5 fois plus élevé chez les individus obèses (18;19). Le risque de maladie coronarienne et de diabète augmentent de 3% et 9% respectivement pour chaque kilogramme de gain de poids (20;21). Le risque de développer un diabète de type 2 augmente avec l'IMC et la durée qu'un individu demeure en surpoids ou obèse (22). Le surpoids et l'obésité contribuent à environ 44% des cas de diabète (23). En 2001, le coût associé aux soins de santé pour le traitement de l'obésité était près de 10% des dépenses médicales totales, soit 123 milliards de dollars et ce, uniquement aux États-Unis (24).

1.4 - Traitements actuels pour l'obésité

Afin de traiter l'obésité, un changement de mode de vie est souvent recommandé et représente la première forme de traitement proposé, c'est-à-dire faire de l'activité physique et modifier la diète en priorisant une alimentaire faible en gras et en glucide et riche en fibre. Cette combinaison permet de réduire le risque de développer le diabète et les maladies cardiovasculaires (25). Pour un individu obèse, une faible perte de poids peut diminuer la pression artérielle, le glucose et les lipides circulants ainsi que le risque de cancer (26). Lorsque le changement de mode de vie échoue, la pharmacothérapie est le second traitement utilisé. Les recommandations de l'Institut national de la Santé suggèrent que la pharmacothérapie ne soit proposée qu'à des individus obèses avec un IMC de plus de 30,00 kg/m² ou aux individus en surpoids avec un IMC de 27,00 kg/m² accompagnés d'au moins une complication liée à l'obésité (18). Quoiqu'il existe peu de médicaments disponibles sur le marché pour réduire le gain de poids corporel, l'orlistat est un inhibiteur des lipases intestinales qui inhibe l'absorption de gras. Toutefois, l'administration de l'orlistat produit des effets secondaires gastro-intestinaux (27).

Lorsque les deux méthodes de traitement mentionnées ci-haut ne produisent que peu d'effet sur la prise de poids corporel ou que les effets secondaires sont considérables, la chirurgie bariatrique est à ce moment ultimement utilisée. Elle consiste à restreindre l'absorption de nutriment en modifiant anatomiquement le système digestif en réduisant l'espace allouée aux aliments dans l'estomac. La chirurgie bariatrique n'est pas accessible à tous les patients obèses. Selon les lignes directrices de l'Institut national de la Santé et pour être éligible à la chirurgie bariatrique, un individu doit avoir une obésité de classe II représentée par un IMC égale ou supérieur à 35,00 kg/m² (28). Selon une étude réalisée pendant 10 ans, plusieurs types de chirurgie bariatrique (i.e. pontage gastrique) donnent de meilleurs résultats sur la perte de poids chez des sujets obèses que le traitement conventionnel, c'est-à-dire le changement de mode de vie et la pharmacothérapie (29). De plus, la chirurgie bariatrique améliore le diabète de type 2, l'hypertension et l'apnée de sommeil tout comme les deux autres types de traitement (30). Malgré les effets bénéfiques rapportés, des décès

opératoires (0,31%), complications post-opératoires (17%) et des ré-opérations (7%) ont été rapportés (31).

À l'exception de la chirurgie bariatrique, les traitements disponibles à l'heure actuelle pour les patients obèses ont des effets bénéfiques à court terme et échouent souvent à long terme. Toutefois, les traitements comme la pharmacothérapie et la chirurgie bariatrique ont des effets secondaires pouvant dans certains cas être plus nuisibles que les effets bénéfiques. Il est essentiel de rappeler ici que le risque de développer un diabète de type 2 augmente avec l'IMC même si l'individu est seulement en surpoids (22). Dans les années à venir, il sera donc important d'avoir les outils pour identifier ces individus à risque et leur procurer un traitement adéquat afin de réduire le gain de poids corporel. Dans le futur, le défi pour le traitement de l'obésité sera de mettre sur le marché des médicaments ayant moins d'effets secondaires, produisant des effets bénéfiques maintenus sur une plus longue durée en rendant les traitements financièrement plus accessibles aux utilisateurs. À l'égard du patient, le défi sera de créer des programmes de suivi à long terme non seulement pour les individus obèses mais également pour les personnes à risque.

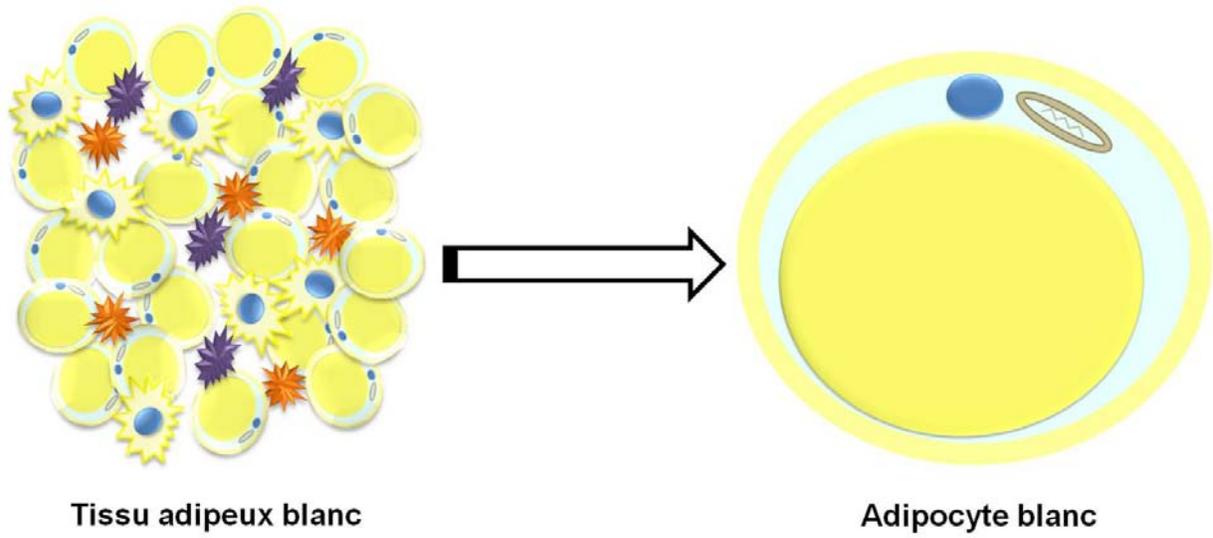
Chapitre 2 : Le tissu adipeux

2.1 - Généralité

Après un repas, les nutriments sont absorbés par le système digestif et entreposés pour une utilisation ultérieure. Chez un individu sain, la balance entre l'absorption d'aliments et la dépense énergétique est maintenue. Cette homéostasie est perturbée lorsque l'apport alimentaire est plus élevé que la dépense énergétique. L'excès de calorie est entreposé dans les dépôts de gras appelé tissu adipeux. Ce dernier représente la réserve énergétique principale du corps conservant les acides gras sous forme de triglycérides (TG). L'obésité se développe quand le poids corporel d'un individu est augmenté en raison d'une hausse considérable de la masse grasse. Chez l'homme, le nombre d'adipocytes (cellules du tissu adipeux) augmente durant l'enfance et l'adolescence mais son changement est minime après l'âge adulte tant chez les individus minces que ceux obèses suggérant ainsi que ce nombre est déterminé durant la jeunesse (32). Le tissu adipeux a toujours été perçu comme un tissu servant uniquement à entreposer l'excès d'énergie. Récemment, il est devenu clair que le tissu adipeux exerce aussi une fonction endocrinienne avec la capacité de produire et de sécréter des adipokines (hormones sécrétées par le tissu adipeux). Il y a trois catégories de tissus adipeux principaux dont le tissu adipeux blanc (WAT), le tissu adipeux brun (BAT) et le tissu adipeux beige. Le WAT entrepose l'énergie, le BAT active la dépense énergétique par thermogenèse et le tissu adipeux beige fait les deux.

2.2 - Tissu adipeux blanc

Le WAT est formé majoritairement d'adipocytes contenant des gouttelettes lipidiques mais il y a également d'autres types de cellules (**Figure 1, Page 8**). Il est composé de tissu conjonctif, cellules souches, préadipocytes, fibroblastes, cellules endothéliales, macrophages et cellules immunitaires (33). Les lipides sont d'abord entreposés dans le tissu adipeux sous-cutané (SCF) tant que la capacité maximale de stockage de ce gras n'est pas atteinte. Lorsque le SCF est saturé, l'excès est redirigé vers différents tissus périphériques qui n'entreposent pas normalement les acides gras d'où la formation de tissu adipeux viscéral (VAT).



- | | |
|---|---|
|  : noyau |  : macrophage |
|  : mitochondrie |  : préadipocyte |
|  : gouttelette lipidique |  : fibroblaste |

© Paul Tan, 2015

Figure 1. Structure simplifiée du tissu adipeux blanc et d'un adipocyte blanc

Le WAT se subdivise en deux types dont le SCF et le VAT. La différence entre ces dépôts de gras n'est pas uniquement dans leur localisation anatomique. Le SCF occupe environ 80% de la masse totale du gras corporel chez l'homme alors que le VAT occupe grossièrement le reste (34). Avec l'obésité, la distribution du SCF diffère selon le sexe soit par une accumulation abdominale chez l'homme (androïde) et une accumulation glutéofémorale chez la femme (gynoïde). La circulation du SCF se déverse dans le système veineux local alors que celle du VAT est directement reliée au foie en se déversant dans la veine porte hépatique qui est généralement plus vascularisée (33;35). La conséquence d'un tel réseau expose le foie aux acides gras et adipokines libérés par le VAT et peut par exemple produire une inflammation hépatique. Chez l'homme, la lipolyse induite par les catécholamines est plus élevée dans le VAT que dans le SCF. Ceci est probablement dû à une différence régionale dans la densité des récepteurs β -adrénergiques (36;37). Chez les sujets obèses, la différenciation des préadipocytes isolées du SCF en adipocyte est plus élevée que celle dans le VAT, de plus, le SCF a une plus grande population de petites cellules (38). En général, les petits adipocytes sont plus sensibles à l'insuline et ont une plus grande capacité à entreposer les acides gras. De plus, le profil d'expression de gènes du SCF et du VAT semble être différent. Chez la femme, un surplus de poids entraîne une augmentation de l'expression des gènes responsables de l'inflammation et du stress oxydatif dans le VAT alors qu'une augmentation des gènes impliqués dans l'homéostasie de l'insuline est observée dans le SCF (39). La différence entre ces deux types de gras a été mise en évidence par une transplantation de SCF de souris normale vers un site viscéral. Après 12 semaines, une diminution de masse grasse et une meilleure sensibilité à l'insuline ont été rapportés alors que ces observations sont moindres ou nulles après une transplantation de VAT vers un site sous-cutané (40). Cette étude démontre que le SCF possède des propriétés intrinsèques différentes du VAT lui permettant d'améliorer le statut métabolique de la souris. De plus, une transplantation de VAT de souris vers une région sous-cutanée du même animal convertit le profil d'expression du VAT en SCF après 3 semaines (41).

2.3 - Tissue adipeux brun

Contrairement au WAT qui entrepose l'énergie, le BAT dissipe l'énergie sous forme de chaleur lorsqu'un individu est exposé au froid ou lors d'une thermogenèse postprandiale (42). Le rôle essentiel du BAT dans la protection contre le froid est clairement démontré chez la souris avec la protéine de découplage 1 (UCP1) désactivée, une protéine impliquée dans la thermogenèse (43). Ces animaux sont sensibles au froid suggérant que la thermogenèse est défectueuse et ce phénotype est présent indépendamment du sexe et de l'âge des souris. Chez l'homme, le BAT a été initialement détecté à l'aide de tomographie par ordinateur et tomographie par émission de positron en utilisant du ^{18}F -fluorodeoxyglucose (44). La détection du traceur indique la capture de glucose par un tissu et le couplage avec la tomographie identifie du tissu adipeux présent dans les régions du cou et des épaules. Le fait que la capture du traceur augmente à basse température suggère que cette région contient du tissu adipeux brun.

Les adipocytes dans le BAT contiennent des petites gouttelettes lipidiques et beaucoup de mitochondries (**Figure 2, Page 11**). Ils expriment une composante mitochondriale unique nommée UCP1 (45). L'adénosine triphosphate (ATP) est produite par les mitochondries à partir de l'adénosine diphosphate et représente la source d'énergie cellulaire (**Figure 2**). Durant la phosphorylation oxydative, les protons sont transportés de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire par la chaîne de transport des électrons. Le gradient créé permet aux protons de retourner vers la matrice mitochondriale à travers l'ATP synthase en synthétisant l'ATP (46). L'UCP1 découple la chaîne de transport des électrons et les protons contournent l'ATP synthase. Par conséquent, la production d'ATP est arrêtée et le passage des protons à travers l'UCP1 génère de la chaleur. Toutefois, il est à noter que la synthèse d'ATP et le découplage ne sont pas efficaces à 100%.

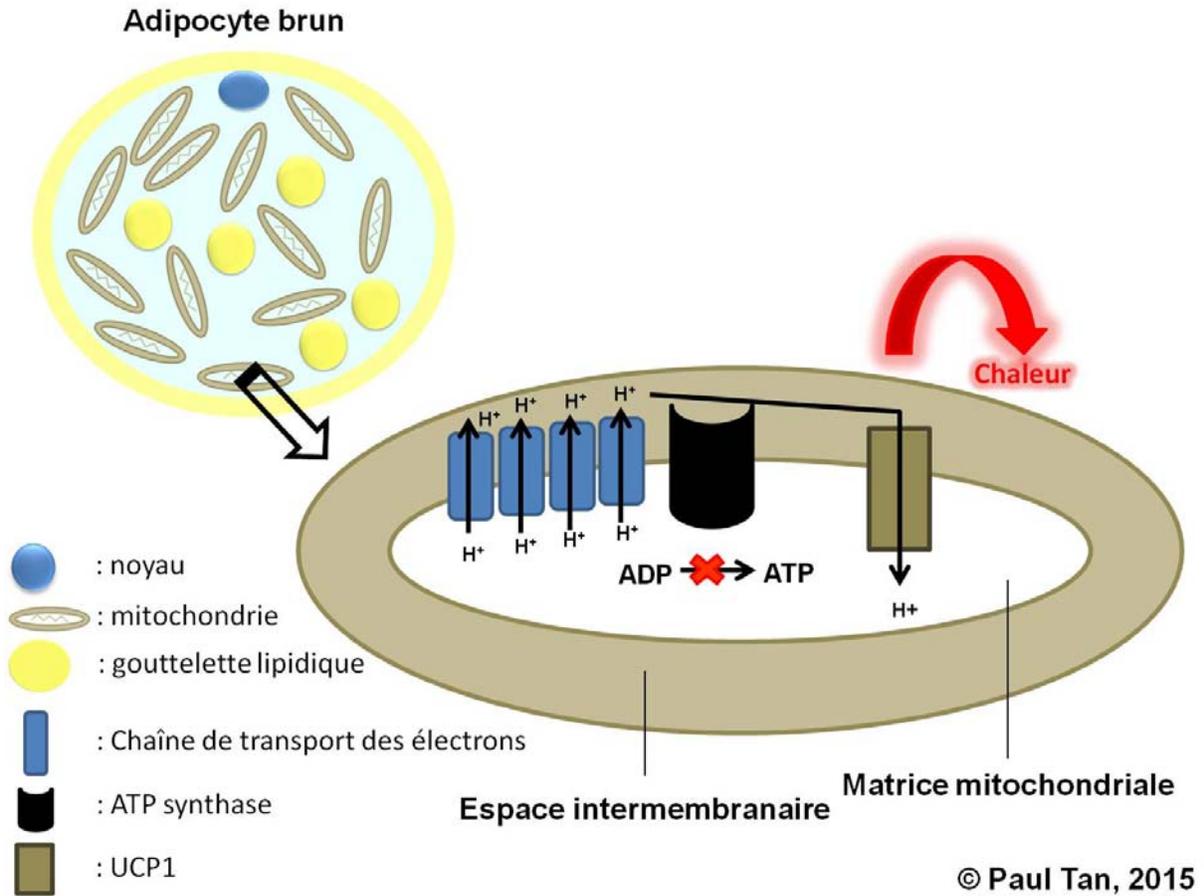
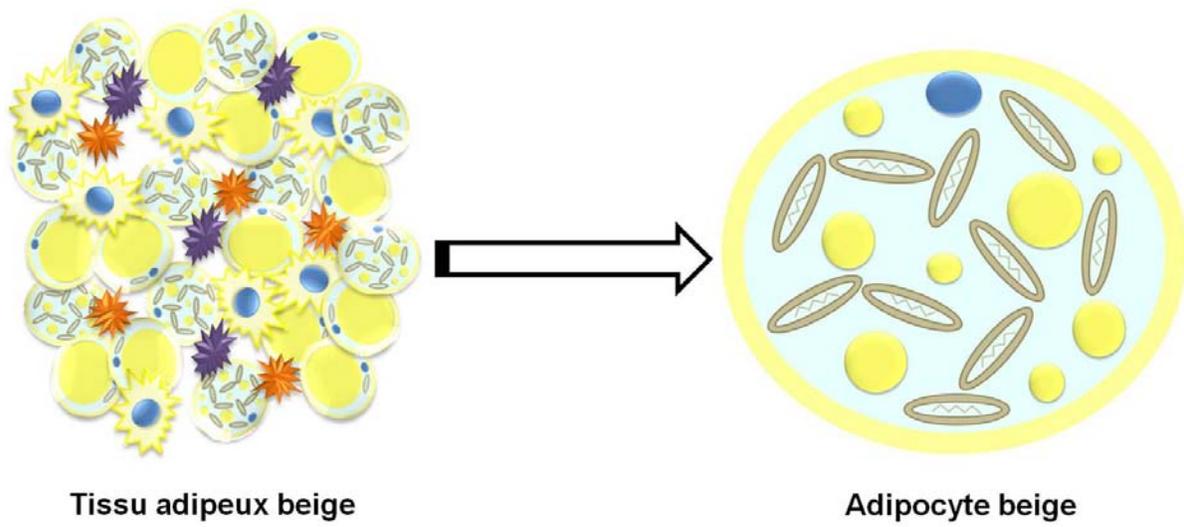


Figure 2. Structure simplifiée d'un adipocyte brun et sa production de chaleur

Lors du découplage de la synthèse d'ATP, les protons passent de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire par la chaîne de transport des électrons. Le gradient créé retourne une partie de ces protons vers la matrice mitochondriale à travers l'UCP1 sans synthétiser de l'ATP et générer de chaleur. **ADP**, adénosine diphosphate; **ATP**, adénosine triphosphate; **H⁺**, proton; **UCP1**, protéine de découplage 1.

2.4- Tissu adipeux beige

Récemment, un troisième type de tissu adipeux a été découvert et se nomme le tissu adipeux beige. Le gras beige est un WAT composé d'adipocytes blancs et beiges (**Figure 3, Page 13**). Contrairement aux adipocytes blancs mais similaire aux bruns, les adipocytes beiges sont caractérisés par une forte proportion de mitochondries et ses gouttelettes lipidiques sont petites et nombreuses (**Figure 3**). Toutefois, il est important de mentionner que les cellules à l'origine des adipocytes blancs et beiges proviennent de souches différentes de celles des adipocytes bruns. En effet, celles qui produisent les adipocytes blancs (du moins pour le SCF) et beiges expriment le récepteur alpha du facteur de croissance dérivé des plaquettes alors que celles des adipocytes bruns expriment le facteur myogénique 5 (47;48). Le "brunissement" du WAT lui confère par exemple une capacité de thermogénèse similaire au BAT. La composante déclenchant ceci dans le WAT est le domaine PR contenant 16 (PRDM16) et elle induit l'expression de plusieurs gènes incluant le coactivateur 1-alpha du récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxysomes (PGC1 α) impliqué dans la biogenèse de mitochondries (49;50). Il n'est pas encore clair si les adipocytes beiges proviennent de la conversion d'adipocytes blancs existants ou d'une différenciation *de novo* de préadipocytes (48). Les adipocytes blancs et beiges n'ont pas de propriété thermogénique en condition basale et une fois stimulée par le froid ou un agoniste des récepteurs β -adrénergiques, le programme de thermogénèse est uniquement inductible dans les adipocytes beiges (51). Au cours de cette thèse, nous avons évalué s'il y a un "brunissement" potentiel du tissu adipeux chez la souris suite à l'observation qu'un cycle futile pourrait être activé dans le gras (**Chapitre 7, Page 133**).



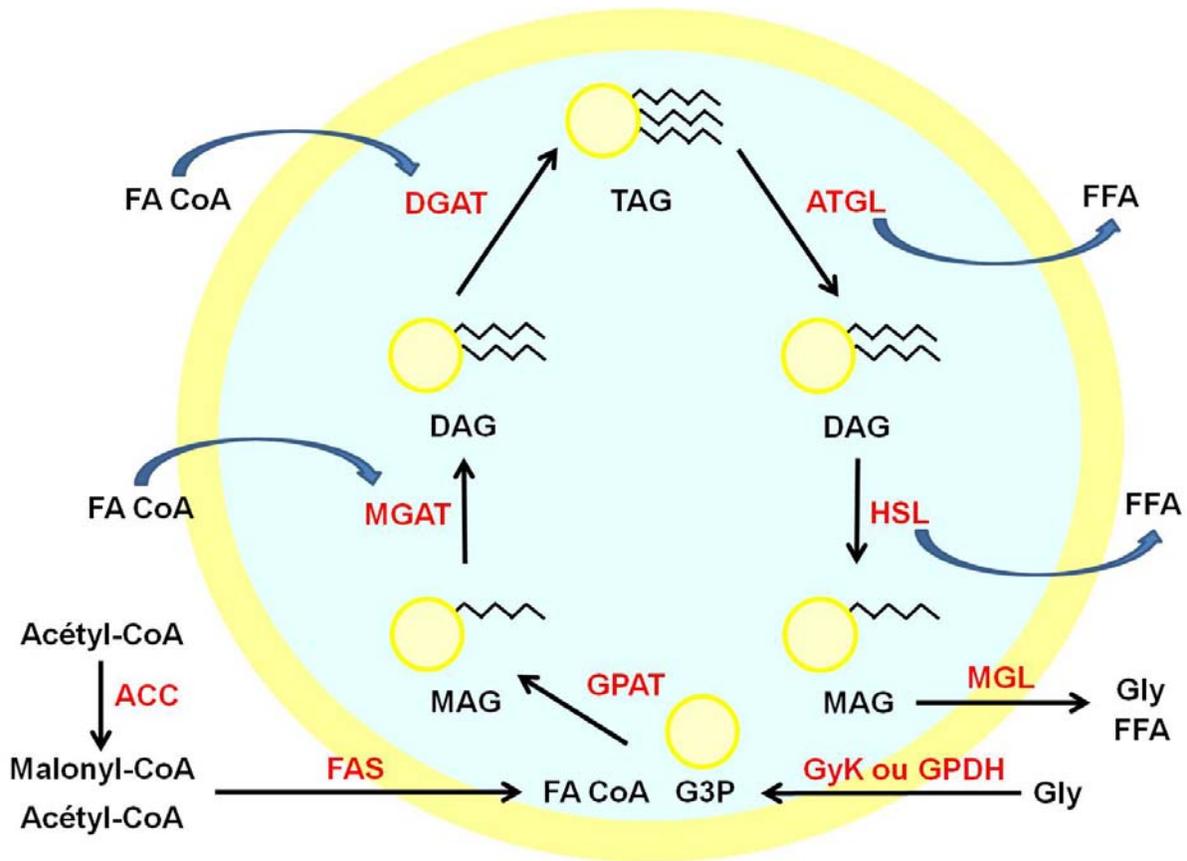
-  : noyau
-  : macrophage
-  : préadipocyte
-  : mitochondrie
-  : fibroblaste
-  : gouttelette lipidique

© Paul Tan, 2015

Figure 3. Structure simplifiée du tissu adipeux beige et d'un adipocyte beige

2.5 - Lipogenèse et lipolyse

Pour la lipogenèse, deux substrats de départ sont nécessaires dont un acide gras CoA (FA CoA) et un glycérol-3-phosphate (G3P). Les FA CoA sont synthétisés à partir de malonyl-CoA et d'acétyl-CoA par la synthase des acides gras (FAS) (**Figure 4, Page 15**). Le malonyl-CoA est obtenu avec la conversion de l'acétyl-CoA par l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) et représente l'étape limitante dans la synthèse des acides gras (52). Le G3P est obtenu par phosphorylation d'un glycérol, par le glycérol kinase (GyK) ou par la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (GPDH). Une fois transportés dans les adipocytes, les FA CoA sont entreposés sous forme de TG par une succession d'étapes impliquant des enzymes lipogéniques (**Figure 4**) (53). La première étape consiste à coupler un FA CoA à un G3P par la glycérol-3-phosphate acyltransférase (GPAT) pour former le monoacylglycérol (MAG). Ce dernier est converti en diacylglycérol (DAG) en rajoutant un deuxième FA CoA, une étape catalysée par le monoacylglycérol acyltransférase (MGAT). Finalement, le triacylglycérol (TAG) est formé par l'ajout d'un troisième FA CoA au DAG par la diglycéride acyltransférase (DGAT). Lorsque le corps manque d'énergie, la lipolyse est activée libérant les réserves de TG du tissu adipeux pour les distribuer aux tissus périphériques qui en ont besoin (**Figure 4**). Le TAG est transformé en DAG en enlevant un acide gras par la lipase de triglycéride du tissu adipeux (ATGL). Le DAG est par la suite converti en MAG en relâchant un autre acide gras par la lipase hormono-sensible (HSL). Finalement, le MAG est converti en glycérol et acide gras par la monoacylglycérol lipase (MGL).



© Paul Tan, 2015

Figure 4. Étapes de la lipogenèse et lipolyse

Deux substrats sont nécessaire pour effectuer la lipogenèse : un FA CoA et un G3P. Les FA CoA sont produits à partir de malonyl-CoA et d'acétyl-CoA par la FAS. Le malonyl-CoA est obtenu avec la conversion de l'acétyl-CoA par l'ACC. Le G3P est produit par la phosphorylation d'un Gly par la GyK ou par la GPDH. Durant la lipogenèse, un FA CoA et un G3P sont convertis en TAG en 3 étapes par la GPAT, MGAT et DGAT en ajoutant un FA CoA à chaque étape. Durant la lipolyse, le TAG est converti en FFA et Gly en 3 étapes par l'ATGL, HSL et MGL en relâchant un FFA à chaque étape. **ACC**, acétyl-CoA carboxylase; **ATGL**, lipase de triglycéride du tissu adipeux adipeux; **DAG**, diacylglycérol; **DGAT**, diglycéride acyltransférase; **FAS**, synthase des acides gras; **FFA**, acide gras libre; **G3P**, glycérol-3-phosphate; **Gly**, glycérol; **GPAT**, glycérol-3-phosphate acyltransférase; **GPDH**, glycérol-3-phosphate déshydrogénase; **GyK**, glycérol kinase; **HSL**, lipase hormono-sensible; **MAG**, monoacylglycérol; **MGAT**, monoacylglycérol acyltransférase; **MGL**, lipase de monoacylglycérol; **TAG**, triacylglycérol.

Le statut nutritionnel est un signal qui change la balance entre la lipogenèse et la lipolyse. Par exemple, la lipolyse est plus active que la lipogenèse dans le tissu adipeux lors d'un jeûne prolongé. La transition entre les deux dépend des changements hormonaux. L'insuline entraîne une augmentation de l'expression génique et de l'activité de l'ACC et de FAS dans le tissu adipeux du rat (54). Ceci suggère que l'augmentation de l'insuline suivant un repas favorise la lipogenèse. Il semble que l'effet lipogénique de l'insuline est contrecarré par la leptine, une hormone de satiété et un marqueur du tissu adipeux. Lorsque des préadipocytes surexprimant la leptine sont exposés à l'insuline, l'activité et l'expression de l'ACC et le taux de synthèse d'acide gras sont réduits en comparaison aux cellules témoins (55).

2.6 - Fonction endocrinienne

Le tissu adipeux est un organe endocrinien sécrétant de multiples adipokines comme par exemple la leptine et l'adiponectine (56). L'expression et la sécrétion de plusieurs adipokines dépend de la taille des adipocytes, du moins pour la leptine, du facteur de nécrose tumorale alpha ($TNF\alpha$), de la protéine 1 chimioattractante de monocyte (MCP-1) et de l'adiponectine (57). Plus les adipocytes sont larges en diamètre, plus il y a sécrétion d'adipokines de nature pro-inflammatoire, telles le $TNF\alpha$ et moins de sécrétions d'adipokines de nature anti-inflammatoire comme l'adiponectine.

La leptine est principalement sécrétée par le tissu adipeux et les niveaux de cet adipokine sont directement proportionnels à la quantité de masse grasse corporelle (58). En condition post prandiale, elle agit au niveau de l'hypothalamus pour diminuer la consommation alimentaire et augmenter la dépense énergétique et vice versa lorsqu'on est à jeun (59). Avec l'obésité, le corps ne répond plus à la leptine en raison d'une résistance, l'inhibition sur la prise alimentaire est défectueuse et une hyperphagie (manger abondamment) s'ensuit. Cette résistance résulte d'une diminution de la signalisation de la leptine dans l'hypothalamus (60).

La résistine est un autre adipokine jouant un rôle dans la résistance à l'insuline. La résistine circulante est augmentée chez les souris avec une obésité induite par une diète riche en gras et les souris génétiquement obèses telles les *ob/ob* et *db/db* (déficience en leptine et en récepteur à la leptine respectivement) (61). Une injection de résistine chez la souris cause une intolérance au glucose qui est associée à une diminution de l'absorption du glucose induite par l'insuline dans les cellules musculaires et les adipocytes causée par une réduction de l'activité des transporteurs de glucose (61;62).

L'adiponectine est exclusivement produite et sécrétée par le tissu adipeux. Cette protéine est une hormone sensibilisant le corps à l'insuline. Les souris ayant une délétion de l'adiponectine sont plus résistantes à l'insuline occasionnant une inflammation du tissu adipeux comme le reflète l'augmentation des acides gras circulants et le défaut dans la signalisation de l'insuline au niveau du muscle (63). Contrairement à la plupart des autres adipokines, les niveaux d'adiponectine diminuent avec l'obésité (64). Elle circule sous 3 formes classées par le poids moléculaire dont la forme à haut poids, moyen poids et petit poids moléculaire (65). Chez l'homme, la forme à haut poids moléculaire est la plus active et corrèle le plus avec la sensibilité à l'insuline et non la somme totale de toutes les formes (66).

Le TNF α est un adipokine pro-inflammatoire qui augmente en expression avec l'obésité dans le tissu adipeux (67). TNF α provoque la résistance à l'insuline principalement en détériorant la signalisation de l'insuline dans le muscle et le tissu adipeux (68). Dans les adipocytes humains, le TNF α semble aussi activer la lipolyse dans le tissu adipeux en augmentant les niveaux intracellulaires d'adénosine monophosphate cyclique représentant une étape importante pour l'activation de HSL (enzyme lipolytique, **Figure 4, Page 15**) par la protéine kinase A (69). De plus, TNF α vient moduler l'expression d'autres adipokines soit par l'expression génique de l'adiponectine est réduite par TNF α dans les adipocytes (70).

La MCP-1 est produite par les macrophages servant à recruter les monocytes vers les tissus inflammés, tel le tissu adipeux, et elle est requise pour l'infiltration des macrophages dans le tissu adipeux durant l'obésité (71). Chez les souris *ob/ob* génétiquement obèses,

l'expression génique de MCP-1 est plus élevée dans le tissu adipeux que dans les autres tissus et représente la source majeure de MCP-1 chez ces animaux (72). Les niveaux de MCP-1 augmentent davantage à une dose élevée d'insuline administrée aux souris *ob/ob* comparativement aux souris sauvages.

Chapitre 3 : Le système rénine-angiotensine

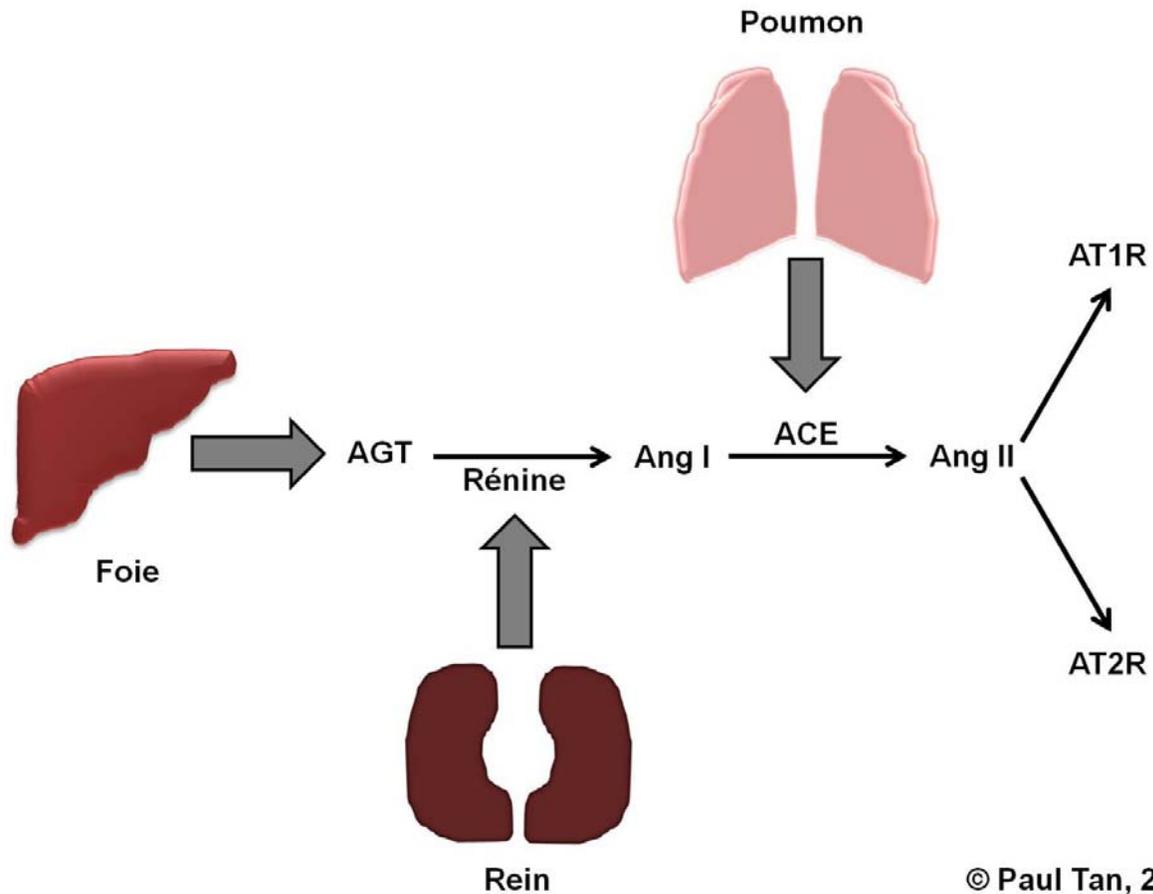
3.1 - Historique

Il serait inapproprié de décrire le système rénine-angiotensine (RAS) sans souligner les travaux accomplis par Tigerstedt et Bergman permettant la découverte de la rénine dans des extraits rénaux de lapin en 1898 (73). Ils avaient observé que l'injection de ces extraits augmentait la pression artérielle chez ces animaux. Contrairement à l'injection intraveineuse, l'injection de la rénine pure dans d'autres endroits amène peu de vasoconstriction chez le chien suggérant qu'une composante supplémentaire dans le sang est nécessaire pour obtenir les effets presseurs de la rénine (74). Ces observations ont ultérieurement menées à l'identification de l'angiotensinogène (AGT) et de l'angiotensine (Ang). L'injection intraveineuse de l'Ang II chez le chat produit une augmentation aigüe de la pression artérielle (75).

3.2 - Composantes du RAS

3.2.1 RAS classique

Comparé au RAS moderne, le RAS classique systémique était très simple (**Figure 5, Page 20**). L'AGT est le seul substrat de la rénine synthétisé par le foie. Une fois sécrétée en circulation, il est converti en Ang I par la rénine circulante, une enzyme produite et sécrétée par les cellules juxtaglomérulaires du rein. La rénine est responsable de l'étape limitante du RAS. Cette réaction est «espèce-spécifique» puisque la rénine de souris ne clive pas l'AGT humain (76;77). Initialement produite sous forme de précurseur inactif appelé prorénine, la rénine est activée par une proconvertase où la proenzyme subit un clivage de 43 acides aminés du côté N-terminal (78). La conversion subséquente de l'Ang I par l'enzyme de conversion de l'Ang (ACE) provenant des poumons génère l'Ang II, le peptide actif du RAS. Cette hormone se lie à deux récepteurs dont le récepteur type 1 de l'angiotensine II (AT1R) et le récepteur type 2 de l'angiotensine II (AT2R). Les effets physiologiques de l'Ang II via l'AT1R sont multiples et incluent la vasoconstriction, la réabsorption d'eau et de sodium, la glycogénolyse, la croissance cellulaire, la formation de superoxyde et l'inflammation. Ces effets sont opposés lorsqu'il se lie à l'AT2R (79;80).



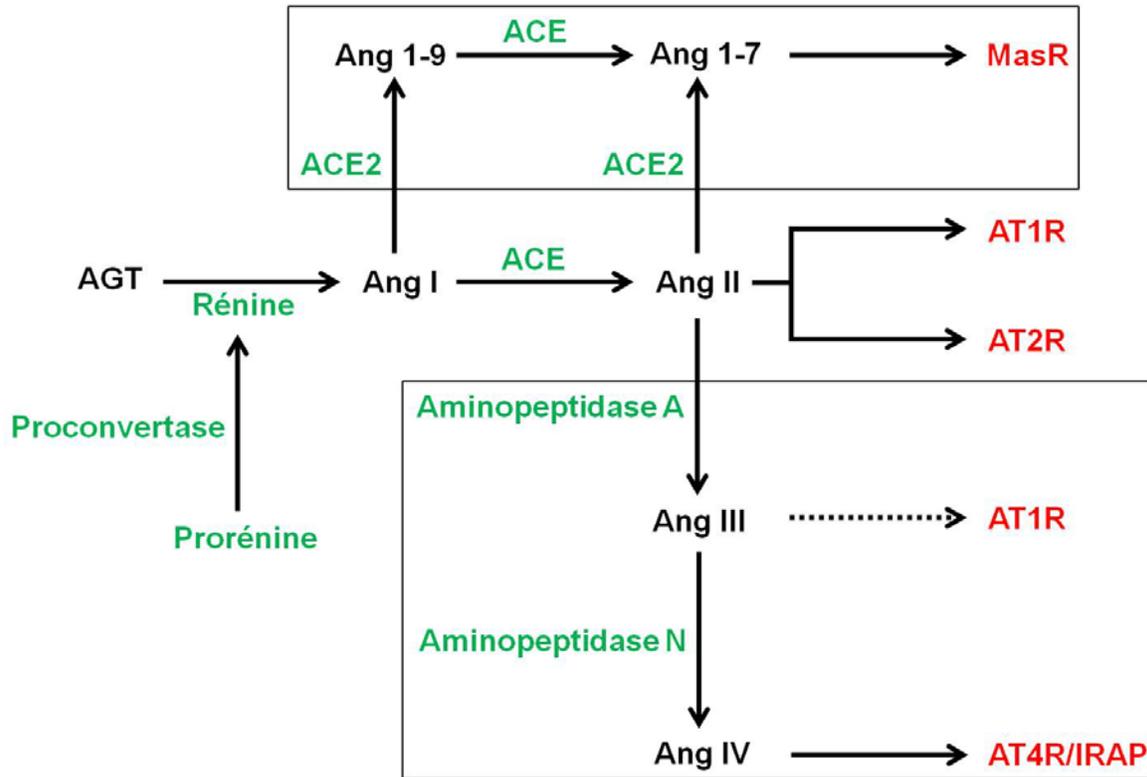
© Paul Tan, 2015

Figure 5. Système rénine-angiotensine classique systémique

L'AGT, substrat synthétisé par le foie, est converti en Ang I par la rénine sécrétée par les reins. L'Ang I est clivé par l'ACE provenant des poumons pour générer de l'Ang II qui se lie à l'AT1R et l'AT2R. **ACE**, enzyme de conversion de l'angiotensine; **AGT**, angiotensinogène; **Ang**, angiotensine; **AT1R**, récepteur type 1 de l'Ang II.

3.2.2 RAS moderne

Le RAS dit "moderne" comprend toutes les nouvelles composantes découvertes depuis les 5 dernières décennies (**Figure 6, Page 22**). Par exemple, l'Ang II n'est plus le seul effecteur du RAS car le peptide peut être clivé davantage par l'aminopeptidases A pour générer l'Ang III et l'Ang III par l'aminopeptidase N pour générer l'Ang IV (81;82). Tout comme l'Ang II, l'Ang III se lie à l'AT1R mais avec une moindre affinité alors que l'Ang IV se lie à l'AT4R aussi connu sous le nom d'aminopeptidase régulée par l'insuline (IRAP). Les rôles physiologique de l'Ang IV via l'AT4R/IRAP incluent notamment la vasodilatation, une diminution de la réabsorption du sodium et une amélioration de la mémoire (80). Le dernier mais non le moindre, l'Ang II peut être converti par l'ACE2 (une isoforme d'ACE produite par le coeur et les reins) pour générer de l'Ang 1-7 (83). Ce dernier se lie au récepteur Mas (MasR) pour produire des effets physiologiques opposés à ceux de l'AT1R notamment la vasodilatation et un effet anti-prolifération (84). De plus, l'Ang I peut aussi être converti en Ang 1-7 plutôt qu'en Ang II. Ceci se fait avec un premier clivage par l'ACE2 pour générer de l'Ang 1-9 suivi d'un second clivage par l'ACE produisant l'Ang 1-7 (85).



© Paul Tan, 2015

Figure 6. Système rénine-angiotensine moderne

L'AGT est converti en Ang I par la rénine et un second clivage par l'ACE produit l'Ang II qui se lie à l'AT1R et l'AT2R. L'Ang II peut être converti en Ang III par l'aminopeptidase A et l'Ang III en Ang IV par l'aminopeptidase N et ces peptides se lient à l'AT1R et l'AT4R/IRAP respectivement. L'Ang II peut être converti en Ang 1-7 par l'ACE2 et le peptide se lie au MasR. L'Ang I peut aussi être converti en Ang 1-7 en deux étapes par l'ACE2 et l'ACE respectivement. Les nouvelles branches sont encadrées. Les mots en vert représentent les enzymes et ceux en rouge représentent les récepteurs. La flèche en pointillé représente une moins grande affinité. **ACE**, enzyme de conversion de l'angiotensine; **AGT**, angiotensinogène; **Ang**, angiotensine; **AT1R**, récepteur type 1 de l'Ang II; **IRAP**, aminopeptidase régulé par l'insuline; **MasR**, récepteur Mas.

3.3 - RAS local dans le tissu adipeux

Depuis longtemps, on attribuait au RAS systémique l'entière responsabilité des effets physiologiques produits par l'Ang II telle la régulation de la pression artérielle. Toutefois, les composantes du RAS comme l'AGT, la rénine et l'ACE sont également détectées dans les tissus (86). Par exemple, les différentes composantes du RAS sont présentes localement dans les tissus périphériques tels le coeur, le cerveau, le pancréas et le tissu adipeux (87). Par conséquent, le RAS local pourrait contribuer aux effets physiologiques attribués au RAS systémique.

Concernant le tissu adipeux, les composantes du RAS sont exprimées en gène dans le VAT (épididymal) chez le rat (88). Chez l'homme, les gènes codant pour l'AGT, l'ACE et l'AT1R sont présents dans le SCF, le VAT (omental) et les adipocytes (mammaire) (89;90). L'AT2R est aussi exprimé et présent dans les adipocytes 3T3-L1 (lignée murine stable) et humains (91). La rénine est exprimée dans le SCF abdominal humain et dans les adipocytes du même tissu (90). Toutefois, l'expression génique de la rénine dans le tissu adipeux n'est pas observée dans plusieurs études impliquant des sujets humains ou des rongeurs (89;92-94). Par exemple, l'activité de la rénine est détectée dans le BAT dans une étude chez le rat mais le gène n'est pas exprimé (95). Ces données suggèrent que la rénine n'est pas produite de manière locale mais qu'elle provient probablement de la circulation. Cette discordance fut partiellement résolue par une étude faisant appel à la culture cellulaire d'adipocytes. Les auteurs ont démontré que les gènes pour l'AGT, la rénine, l'ACE et l'AT1R sont détectés dans les préadipocytes et les adipocytes provenant de SCF humain (96). L'activité de la rénine est également observée dans ces cellules de même que dans le milieu de culture suggérant que la protéine est produite et sécrétée par les adipocytes. La sécrétion d'Ang II par les cellules est également observée. Cette étude *in vitro* suggère fortement que les adipocytes expriment et produisent la rénine. La technique employée et la sensibilité des méthodes peuvent expliquer en partie les discordances comme le démontre une étude chez le rat cherchant à identifier l'expression de la rénine dans le VAT (épididymal) (97). Les auteurs ont constaté que la rénine est indétectable dans le VAT par la méthode de RT-PCR alors que le qPCR permet de valider la présence de l'enzyme dans le même tissu. *In vivo*, les composantes du RAS dans le tissu

adipeux résultent probablement de la combinaison d'une synthèse locale et d'une prise de la circulation.

3.4 - Lien entre le RAS et l'obésité

Comme les composantes de base du RAS sont exprimées localement dans le tissu adipeux, il s'agit maintenant de savoir s'il est fonctionnel. Le lien entre le RAS et la lipogenèse est d'abord suggéré lorsque des adipocytes 3T3-L1 et humains sont stimulés avec l'Ang II. Cette stimulation engendre une augmentation dose et temps dépendant du contenu de TG dans les cellules 3T3-L1 différenciées en adipocytes (91). Ceci est la conséquence d'une augmentation de l'activité de deux enzymes impliquées dans la lipogenèse, la FAS et le GPDH, dans les deux types d'adipocytes (**Figure 4, Page 15**). De plus, l'expression génique de la FAS et de la leptine augmentent également. Il a été démontré que ces effets de l'Ang II se faisaient via l'AT2R, du moins pour les adipocytes 3T3-L1.

L'Ang II ne mène pas uniquement à la lipogenèse mais aussi à une inhibition de la lipolyse. Dans une étude comparant des sujets normaux et obèses, une perfusion d'Ang II dans le SCF abdominal diminue la lipolyse et le flux sanguin dans ce dépôt de gras alors qu'aucune différence basale n'est observée entre les sujets, suggérant que l'effet de l'Ang II sur la lipolyse est indépendant de l'obésité (98). *In vitro*, le même groupe de recherche confirme leurs observations sur la lipolyse dans les adipocytes du SCF abdominal provenant de sujets normaux et obèses (99). Contrairement aux effets de l'Ang II sur la lipogenèse, l'AT1R est responsable des effets inhibiteurs sur la lipolyse.

Utilisant des adipocytes isolés de SCF humain, l'Ang II inhibe aussi la différenciation des préadipocytes en adipocytes via l'AT1R, en évaluant l'expression du récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR γ), un régulateur de l'adipogenèse (100;101). Lorsque des adipocytes sont cultivés simultanément avec des préadipocytes, la différenciation de ces derniers s'arrête alors que la formation *de novo* d'adipocytes est rétablie à

l'aide d'un bloqueur d'AT1R suggérant que les adipocytes matures inhibent l'adipogenèse en produisant de l'Ang II.

Globalement, il semble que l'Ang II favorise le gain de tissu adipeux via l'AT1R et l'AT2R. Il inhibe la lipolyse tout en freinant l'adipogenèse via l'AT1R tout en stimulant la lipogenèse via l'AT2R. Le résultat net est une synthèse et un stockage de TG dans les adipocytes. Ceci mène à une expansion du tissu adipeux en raison d'une hypertrophie (augmentation du volume) et une hypoplasie (diminution du nombre) des adipocytes. À long terme, une dysfonction du tissu adipeux se développe et mène à l'obésité.

3.5 - Modulation des composantes du RAS avec l'obésité

Comme l'Ang II a un effet lipogénique et anti-lipolytique, un changement dans les niveaux des composantes du RAS dans le tissu adipeux jouera sur l'accumulation de masse grasse. Du côté de l'homme, une corrélation entre l'AGT circulant et l'IMC est observée auprès de différentes populations d'individus obèses (102;103). L'expression génique de l'AGT est augmentée dans le SCF abdominal chez les individus obèses et corrèle positivement avec le poids corporel (104). Chez les sujets obèses, l'expression génique de l'AGT et de l'AT1R est plus élevée dans le VAT que dans le SCF suggérant que ces composantes du RAS dans les gras viscéraux sont plus impliquées dans le développement de l'obésité intra-abdominale (92;105;106). Un polymorphisme sur l'intron 16 du gène codant pour l'ACE est associé à un IMC plus élevé chez les sujets humains (107). La prévalence d'un gain de masse grasse abdominale est également plus élevée chez ces individus renforçant la prémisse de l'implication fonctionnelle du RAS dans l'obésité.

De manière général, les niveaux de plusieurs composantes du RAS augmentent chez le rongeur obèse tant en circulation que dans le tissu adipeux. Par exemple, l'expression génique de l'AGT augmente dans différents dépôts de VAT chez des souris avec une diète riche en gras indépendamment du sexe de l'animal (108). Des résultats similaires ont été rapportés lorsque l'AGT humain est surexprimé chez la souris (108). Chez des rats obèses, une hausse de l'AGT

dans le VAT entraîne une augmentation de l'AGT et de l'Ang II circulant (109). Cette étude soulève la possibilité d'un déversement de ces composantes du tissu adipeux vers la circulation. Chez des rats *Zucker falfa* (déficience en récepteur à la leptine) génétiquement obèses, la sécrétion et le contenu en AGT augmentent dans les adipocytes alors que les niveaux hépatiques sont inchangés (110). Des résultats similaires pour l'AGT dans le tissu adipeux et le foie sont également observés chez la souris obèse (108;111). Le foie est la source principale d'AGT selon le RAS classique systémique (**Figure 5, Page 20**). Puisque l'AGT hépatique n'est pas modulé par l'obésité alors que l'AGT et l'Ang II circulante augmentent, cela suggère à nouveau que le tissu adipeux contribue à ces niveaux circulants (109). Effectivement, la réexpression de l'AGT spécifiquement dans le tissu adipeux de la souris suite à une inactivation ubiquitaire amène près de 30% des niveaux d'AGT circulants observés chez les animaux sauvages (112). Une inactivation de l'AGT spécifiquement dans le tissu adipeux de la souris diminue d'environ 30% les niveaux circulants de ce substrat démontrant que le gras est une source non négligeable d'AGT circulant (113).

Chez le rat, le jeûne réduit l'expression génique et protéique de l'AGT dans les adipocytes de VAT (épididymal) (114). Lorsque ces rats sont nourris après un jeûne, l'expression génique de l'AGT augmente à un niveau plus élevé que chez les rats témoins. Ces effets sont spécifiques au tissu adipeux car les niveaux de l'AGT hépatique et circulante ne sont pas affectés par le statut nutritionnel de l'animal. Cette étude suggère que l'AGT dans le tissu adipeux spécifiquement est modulé de manière aiguë par le statut nutritionnel. Chez la souris sur une diète riche en gras, la sécrétion de l'AGT par le tissu adipeux augmente et entraîne une augmentation des niveaux circulants (111). Dans la même étude, la sécrétion, la concentration circulante de l'AGT et la masse de plusieurs tissus adipeux sont réduites chez des animaux avec une diète riche en gras remis sur une diète normale pour 4 semaines. En parallèle chez l'homme, une suralimentation pendant 2 mois entraîne une augmentation de l'expression génique de l'AGT et de l'ACE dans le SCF abdominal (115). Après une perte de poids de 5% par une réduction de l'apport énergétique chez la femme obèse, les niveaux circulants de plusieurs composantes du RAS diminuent tels l'AGT, la rénine et l'ACE ainsi que l'expression génique de l'AGT dans le SAT abdominal (116). La diminution de l'AGT dans le

SCF est fortement corrélée avec la réduction de l'AGT circulant qui est elle-même fortement corrélée avec la diminution du tour de taille. Globalement, un apport hypercalorique aigu ou chronique augmente les composantes du RAS dans le tissu adipeux. Cette modulation à la hausse procure une augmentation de la production d'Ang II local et contribue aux niveaux circulants du RAS.

3.6 - Implication du RAS dans l'obésité

Nous savons que l'Ang II favorise le gain de tissu adipeux et que les composantes du RAS augmentent avec l'obésité (**Section 3.4 et 3.5, Page 24 et 25**). La question soulevée est de savoir si le RAS mène à l'obésité ou vice-versa. Selon ce qui est rapporté, nous pensons que le RAS et l'obésité sont impliqués dans un cercle vicieux dans lequel l'Ang II mène à l'obésité entraînant par la suite une augmentation des composantes du RAS. La manière la plus simple pour démontrer l'importance du RAS dans le développement de l'obésité consiste à surexprimer, invalider génétiquement ou inhiber/bloquer les composantes chez un modèle animal. Chez des souris ayant une diète normale, la surexpression de l'AGT dans le tissu adipeux entraîne une prise de poids corporel majoritairement occasionnée par l'accumulation de masse grasse par rapport aux souris sauvages (112). Une hypertrophie et une hypoplasie des adipocytes (épididymal) sont également observées et associées à une augmentation de l'activité de la FAS (enzyme lipogénique, **Figure 4, Page 15**).

En général, l'inactivation des composantes du RAS chez la souris produit un phénotype similaire caractérisé par une diminution de la prise de poids corporel, de masse grasse (VAT), de la taille des adipocytes, de la leptine, des niveaux de glucose et d'insuline et par l'augmentation de la dépense énergétique et des niveaux adiponectines (**Tableau III, Page 29**) (112;117-124). Plusieurs groupes de recherche observent également une réduction de l'activité de FAS, de cholestérol et une amélioration de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline (112;118;120-124). Puisque l'Ang II stimule l'activité de FAS dans les adipocytes (91), il est possible que le phénotype soit le résultat d'une diminution de la production d'Ang II dans le tissu adipeux. Lorsque mises sur une diète riche en gras, les souris

résistent à l'obésité induite par la diète suggérant que le RAS joue un rôle dans le développement de masse grasse (117;122;123). Dans le cas où la rénine est inactivée génétiquement de manière systémique chez la souris, quelques observations ont été inversées par l'administration de l'Ang II démontrant l'importance de ce dernier dans le développement de l'obésité (123). Une discordance existe entre les souris où l'AT1R ou l'AT2R est inactivée génétiquement de manière systémique (**Tableau III**). Lorsque l'AT1R est inactivé, l'expression génique de PPAR γ est augmentée (normalisée) alors qu'elle est diminuée chez les souris avec l'AT2R inactivé (121;122). Puisque l'AT1R est connu pour inhiber la lipolyse et l'adipogenèse alors que l'AT2R induit la lipogenèse (91;98-100), cette observation n'est pas étonnante considérant que l'AT2R est présent chez les souris avec l'AT1R inactivé et vice versa. Chez les souris avec l'AT2R inactivé, l'Ang II réduirait l'adipogenèse via l'AT1R. Il est intéressant de mentionner que l'élimination de lipides dans les fèces est augmentée chez les souris avec la rénine inactivée génétiquement de manière systémique comparativement aux animaux sauvages (123). Cette observation est unique à ce modèle et n'est pas présente chez les rongeurs avec d'autres composantes du RAS inactivées suggérant des mécanismes indépendants de l'Ang II (118;124).

Tableau III. Effets de l'inactivation ubiquitaire des composantes du RAS sur les paramètres associés à l'obésité chez la souris

Auteur	Modèle	WG	VAT	TA	EE	LEP	Acrp30	BG	BI	GT	Autres observations
Kim S <i>et al</i> 2002 (117)	AGT KO	↓	↓	ND	ND	↓	ND	~	ND	ND	Résistance à l'obésité
Massiera F <i>et al</i> 2001 (112)	AGT KO	ND	↓	↓	↑	ND	ND	ND	ND	ND	↓ BW, masse grasse et FAS, ~ BAT
Massiera F <i>et al</i> 2001 (118)	AGT KO	↓	↓	↓	↑	~	NA	~	~	NA	~ FI, BAT, nombre d'adipocyte, gras fécal et UCP1, ↓ cholestérol, TG et FAS
Kim S <i>et al</i> 2006 (119)	AGT KO	ND	↓	ND	ND	↓	↑	ND	↓	ND	↓BW and résistive
Kouyama R <i>et al</i> 2005 (120)	AT1aR KO	↓	↓	↓	↑	↓	~	↓	↓	↑	↓ SCF, BAT, MCP-1, IL-6 et PAI-1, ~ TG et FFA, ↑ IS et UCP1
Tomono Y <i>et al</i> 2008 (121)	AT1R KO	ND	ND	↓	ND	ND	↑	ND	ND	ND	~ BW, PPAR γ (normalisé), ↓ masse grasse, MCP-1, cholestérol et FFA
Yvan-Charvet L <i>et al</i> 2005 (122)	AT2R KO	↓	↓	↓	↑	↓	↑	ND	ND	↑	↓ FI, IL-6, FAS et PPAR γ , ↑ nombre d'adipocyte et IS, résistance à l'obésité
Takahashi N <i>et al</i> 2007 (123)	Renin KO	↓	↓	↓	↑	ND	↑	↓	↓	↑	↓ SCF, BAT, gras hépatique et DGAT1, ↑ IS et gras fécal, résistance à l'obésité
Jayasooriya AP <i>et al</i> 2008 (124)	ACE KO	ND	ND	ND	↑	ND	ND	ND	ND	↑	↓ BW et masse grasse, ~ FI et gras fécal, ↑ consommation d'eau

~, aucune différence; **Acrp30**, adiponectine; **AGT**, angiotensinogène; **BAT**, tissu adipeux brun; **BG**, glucose circulant; **BI**, insuline circulante; **BW**, poids corporel; **ACE**, enzyme de conversion de l'angiotensine; **AT1R**, récepteur type 1 de l'angiotensine II; **DGAT1**, diglycérade acyltransférase 1; **EE**, dépense énergétique; **FAS**, synthase des acides gras; **FFA**, acide gras libre; **FI**, consommation alimentaire; **GT**, tolérance au glucose; **IL-6**, interleukine 6; **IS**, sensibilité à l'insuline; **LEP**, leptine; **MCP-1**,

protéine 1 chimioattractante de monocyte; **ND**, non disponible; **PAI-1**, inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1; **PPAR γ** , récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxyosomes; **SCF**, tissu adipeux sous-cutané; **TA**, taille des adipocytes; **TG**, triglycéride; **UCP1**, protéine de découplage 1; **VAT**, tissu adipeux viscéral; **WG**, gain de poids corporel.

Un inhibiteur de la rénine est un groupe d'inhibiteur du RAS (RASi) qui fonctionne en inhibant l'activité catalytique de cette enzyme. Par conséquent, la production d'Ang I requise pour la formation d'Ang II est inhibée. Les inhibiteurs de l'ACE (ACEi) est un autre groupe de RASi qui prévient l'étape de la conversion d'Ang I en Ang II. Finalement, les bloqueurs d'AT1R (ARB) servent à empêcher l'activation des effets de l'Ang II via la stimulation des AT1R. Les effets de l'administration de différents RASi sont également similaires à ceux suivant l'inactivation ubiquitaire des composantes du RAS (**Tableau IV, Page 32**). Le phénotype inclut une diminution de la prise de poids corporel, de masse grasse (VAT), de la taille des adipocyte, des niveaux d'insuline, d'acides gras libres et de TG (97;121;125-135). Généralement, la consommation alimentaire est variable et les niveaux de glucose sont similaires chez les animaux. Toutefois, l'administration de candesartan (un ARB) aux rats a produit des résultats inattendus (**Tableau IV**). Ces animaux ont une augmentation de lipides circulants incluant le cholestérol, les acides gras libres et les TG comparativement aux rats témoins (97). Bien qu'un ARB empêche la liaison de l'Ang II à l'AT1R, il peut se fixer sur l'AT2R. Il est donc possible que l'augmentation des lipides circulants soit occasionnée par la stimulation de l'AT2R puisque ce dernier était augmenté chez les rats traités au candesartan. Cela pourrait limiter l'efficacité d'un ARB comme traitement pour l'obésité. Certains ARB, à doses élevées, sont des agonistes partiels de PPAR γ . À titre d'exemple, des ARB comme irbesartan et telmisartan augmentent l'activité de PPAR γ dans les adipocytes 3T3-L1 indépendamment de l'AT1R (136).

Tableau IV. Effets de l'administration d'un RASi sur les paramètres associés à l'obésité (suite et légende à la page suivante)

Auteur	Source	RASi	WG	FI	VAT	FCS	BG	BI	FFA	TG	Autres observations
Stucchi P <i>et al</i> 2009 (125)	Souris	RI (Aliskiren)	↓	~	↓	ND	~	ND	~	~	↑ WI, ↓ LEP
Marchionne EM <i>et al</i> 2012 (126)	Rat	RI (Aliskiren)	↓	ND	ND	ND	↓	~	↓	ND	↑ GT
Furuhashi M <i>et al</i> 2004 (127)	Rat	ACEi (Temocapril)	ND	ND	~	↓	~	↓	↓	↓	~ BW
Weisinger HS <i>et al</i> 2008 (128)	Rat	ACEi (Perindopril)	↓	↑	↓	↓	ND	ND	ND	ND	Aucune
Mathai ML <i>et al</i> 2008 (129)	Rat	ACEi (Perindopril)	↓	~	↓	ND	ND	ND	ND	ND	↑ WI, ↓ LEP
Weisinger RS <i>et al</i> 2009 (130)	Souris	ACEi (Captopril)	ND	↓	↓	↓	~	~	↓	ND	↓ BW et LEP, ↑ WI, Acrp30 et GT
de Kloet AD <i>et al</i> 2009 (131)	Rat	ACEi (Captopril)	↓	↓	↓	ND	ND	ND	ND	ND	↓ SCF, ↑ WI et GT
Furuhashi M <i>et al</i> 2004 (127)	Rat	ARB (Olmesartan)	ND	ND	~	↓	~	↓	↓	↓	~ BW
Kurata A <i>et al</i> 2006 (132)	Souris	ARB (Olmesartan)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	~ BW, ↑ Acrp30 et IS, ↓ TNF α et MCP-1
Zorad S <i>et al</i> 2006 (97)	Rat	ARB (Candesartan)	↓	~	↓	↓	~	~	↑	↑	~ nombre d'adipocyte, ↑ WI, Acrp30, cholestérol, FAS et PPAR γ , ↓ LEP et TNF α
Mori Y <i>et al</i> 2007 (133)	Rat	ARB (Telmisartan)	~	~	~	↓	~	↓	ND	ND	~ SCF
Tomono Y <i>et al</i> 2008 (121)	Souris	ARB (Valsartan)	ND	ND	ND	↓	ND	ND	ND	ND	~ BW, ↓ masse grasse, MCP-1 et TNF α , ↑ Acrp30 et PPAR γ

Tableau IV. Effets de l'administration d'un RASi sur les paramètres associés à l'obésité

Auteur	Source	RASi	WG	FI	VAT	FCS	BG	BI	FFA	TG	Autres observations
Lee MH <i>et al</i> 2008 (134)	Rat	ARB (L158809)	ND	ND	↓	↓	↓	~	ND	↓	~ BW, ↑ tolérance au glucose, Acrp30 et PPAR γ , ↓ cholestérol et MCP-1
Muñoz MC <i>et al</i> 2009 (135)	Rat	ARB (Irbesartan)	ND	ND	ND	↓	~	↓	ND	↓	~ BW, ↓ cholestérol, MCP-1 et TNF α , ↑ Acrp30 et signalisation de l'insuline

~, aucune différence; **Acrp30**, adiponectine; **ACEi**, inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine; **ARB**, bloqueur du récepteur type 1 de l'angiotensine II; **BG**, glucose circulant; **BI**, insuline circulante; **BW**, poids corporel; **RI**, inhibiteur de la rénine; **FAS**, synthase des acides gras; **FFA**, acide gras libre; **FI**, consommation alimentaire; **GT**, tolérance au glucose; **IS**, sensibilité à l'insuline; **LEP**, leptine; **MCP-1**, protéine 1 chimioattractante de monocyte; **ND**, non disponible; **PPAR γ** , récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxysomes; **SCF**, tissu adipeux sous-cutané; **TA**, taille des adipocytes; **TG**, triglycéride; **TNF α** , facteur de nécrose tumorale alpha; **RASi**, inhibiteur du système rénine-angiotensine; **VAT**, tissu adipeux viscéral; **WI**, consommation d'eau; **WG**, gain de poids corporel.

Comme l'Ang II est impliqué dans le développement de l'obésité, l'utilisation des RASi devrait prévenir la pathologie puisque la formation d'Ang II ou la transmission de ses effets via l'AT1R sont empêchées. Pourtant, ils ne normalisent pas les métabolites circulants tels l'insuline, le cholestérol et les triglycérides chez les animaux obèses (135). Ces observations indiquent que le RAS contribue au développement de l'obésité mais suggèrent qu'il n'en est pas entièrement responsable. Malgré les effets bénéfiques de ces drogues, elles produisent une augmentation de l'expression génique de la rénine dans les reins, de la sécrétion rénale de la rénine et de la concentration et de l'activité circulante de cette enzyme tant chez l'homme que chez le rongeur (137-142). Ceci est causé par une compensation pour la diminution de rétro-inhibition sur la sécrétion rénale de la rénine par l'Ang II via l'AT1R (143). Les raisons pour les effets limités des RASi et les conséquences d'une augmentation de la rénine sont devenues claires qu'après la découverte d'une nouvelle composante du RAS, le récepteur à la prorénine et à la rénine [(P)RR].

Chapitre 4 : Le récepteur à la prorénine et à la rénine

4.1 - Caractéristiques

La découverte du (P)RR résulte de la prémisse que certaines protéases possèdent un récepteur membranaire permettant de les concentrer à proximité de la cellule afin d'augmenter leur activité catalytique. En 1996, Nguyen *et al* se sont demandé si la rénine humaine possède la même particularité dans les cellules mésangiales humaines (cellules du rein). Suite aux études de liaison de type ligand-récepteur, ils ont démontré que la rénine se lie à un récepteur membranaire (n'était pas encore connu sous le nom de (P)RR) avec une grande affinité (144). Cette liaison de la rénine au récepteur produit un effet fonctionnel puisqu'une augmentation des niveaux de l'inhibiteur de l'activateur de plasminogène (PAI-1) est observée. PAI-1 est impliqué dans la fibrose qui est la formation de tissu conjonctif et semble jouer également un rôle dans l'obésité en favorisant la croissance du tissu adipeux par la différenciation des préadipocytes, la vascularisation du tissu et le transport de lipides vers les adipocytes (145;146).

En 2002, le (P)RR est cloné par Nguyen *et al* après le criblage d'une banque de donnée commerciale de reins humains avec la rénine humaine (147). Un des clones codait pour un récepteur inconnu de 350 acides aminés qui possède un seul passage transmembranaire n'ayant aucune homologie avec un autre récepteur connu. Le gène codant pour le (P)RR est exprimé sur le chromosome X à la position 1, bande 1, sous-bande 4 (Xp11.4). La structure du (P)RR contient un domaine N-terminal sur le côté extracellulaire, un domaine transmembranaire ainsi qu'un domaine C-terminal du côté intracellulaire (148). La séquence en acide aminé du (P)RR en N-terminal est conservée à travers les espèces vertébrées de même que celle en C-terminal mais ce dernier l'est aussi pour les invertébrés (149). Ceci suggère que le (P)RR a préservé une fonction en C-terminal et les vertébrés ont obtenu par la suite une fonction pour le domaine N-terminal dont celle de la liaison avec la prorénine et la rénine (147).

Le (P)RR existe sous trois formes : le récepteur de 35 kDa, la forme soluble (s(P)RR) de 28 kDa contenant la majeure partie du côté N-terminal et le (P)RR tronqué de 8,9 kDa comprenant le restant du côté N-terminal, la région transmembranaire et le côté C-terminal

(150). Le s(P)RR résulte d'un clivage du (P)RR par la furine sur le site de reconnaissance RKTR (arginine-lysine-thréonine-arginine) en N-terminal laissant ainsi le fragment tronqué d'environ 10 kDa (151). La localisation du (P)RR est principalement intracellulaire au niveau de l'appareil de Golgi plus précisément dans le réseau *trans*-golgien où la furine est très abondante (152). Cependant, une localisation en périphérie des membranes cellulaires est également observée suggérant que le (P)RR est membranaire (153;154).

Chez l'homme et le rongeur, le (P)RR est exprimé dans plusieurs tissus et types cellulaires (147;155). Par exemple, le (P)RR est exprimé dans de multiples lignées cellulaires humaines telles les cellules neuronales, gliales, épithéliales et endothéliales (156). Le (P)RR est aussi exprimé dans le rein plus particulièrement dans les cellules du tube collecteur et dans le néphron distal chez le rat et chez l'humain (157). Le (P)RR est également exprimé dans le coeur et dans différents types cellulaires de l'oeil humain (158;159). Chez le rongeur, l'expression du (P)RR est présente dans de nombreuses régions du cerveau et est plus abondante dans les régions contrôlant la pression artérielle et la fluidité corporelle (154;160).

4.2 - Activation de la prorénine

Deux ligands se lient au (P)RR dont la prorénine et la rénine ((pro)rénine est le terme collectif utilisé pour indiquer les deux enzymes). La prorénine contient un prosegment de 43 acides aminés dans sa séquence N-terminale créant un encombrement stérique empêchant l'AGT d'avoir accès au site actif de l'enzyme (161). Étant un précurseur inactif, il peut être activée de deux manières : une activation non-protéolytique réversible après liaison au (P)RR ne nécessitant pas de clivage du prosegment ou une activation protéolytique irréversible du prosegment (**Figure 7, Page 39**). *In vitro*, l'activation non-protéolytique de la prorénine humaine se produit à basse température ou en milieu acide (162-164). Toutefois, ces mécanismes d'activation ne sont pas observés *in vivo* (165). De plus, seulement une très petite fraction de la prorénine est présente sous une forme active dans des conditions physiologiques à 37°C et à pH 7,5 (166). Il n'est donc pas étonnant de s'interroger sur le rôle physiologique de la prorénine sans la preuve d'une activation non-protéolytique et que l'activation protéolytique

de cette enzyme se fasse dans les reins (161). Toutefois, chez des patients diabétiques de type 1 (dépendant de l'insuline), l'augmentation des niveaux circulants de la prorénine sans modification de ceux de la rénine représente la plus grande particularité observée qui est associée à la prévalence de complications telle la rétinopathie ou l'albuminurie (présence d'albumines dans l'urine) (167;168).

Dans le prosegment de la prorénine humaine, deux régions sont importantes pour l'activation non protéolytique (164). Il y a la région "*gate*" entre les résidus ⁷TFKR¹⁰ (thréonine-phénylalanine-lysine-arginine) et la région "*handle*" entre les résidus ¹¹IFLKR¹⁵ (isoleucine-phénylalanine-leucine-lysine-arginine). Dans le cas d'une activation de la prorénine par le (P)RR, le "*handle*" agit comme un poignet qui, entrant en contact avec le récepteur, provoque le mouvement du "*gate*". Ce déplacement des deux régions expose le site actif de la prorénine à l'AGT pour sa conversion en Ang I. Dans les cellules COS-7 (provenant des reins de singe), il y a des évidences d'activation non-protéolytique de la prorénine de rat liée au (P)RR par la détection de la région "*handle*" de la proenzyme (169). Comme le prosegment est normalement inaccessible parce qu'elle encombre le site actif de la prorénine, la détection de la région "*handle*" suggère une activation non protéolytique par un changement de la conformation de la proenzyme liée au (P)RR (148).

In vitro, la constante de dissociation (K_D) de la prorénine de rat pour le (P)RR de rat est 8 nM alors que celle de la rénine de rat est 20 nM (170). Également, le K_D de la prorénine et de la rénine humaine sont de 1,2 et 4,4 nM respectivement (171). Ceci sous-entend que la prorénine a une meilleure affinité que la rénine pour le (P)RR et qu'il y a également une différence entre le rongeur et l'homme. Ceci soulève la possibilité que la prorénine et la rénine possède un nombre différent de sites de liaison au (P)RR. Pour vérifier cette hypothèse, un groupe de recherche a conçu un peptide de la région *hinge* commun à la (pro)rénine humaine comprenant les résidus ¹⁴⁹SQGVLKEDVF¹⁵⁸ (sérine-glutamine-glycine-valine-leucine-lysine-acide glutamine-acide aspartique-valine-phénylalanine). Lorsque le peptide *hinge* est mis en présence de la (pro)rénine humaine, la liaison de ces ligands au (P)RR humain est réduite (171). Globalement, ces résultats suggèrent que la rénine possède le site *hinge* pour sa liaison

au (P)RR alors que la prorénine possède le même site mais aussi le site *handle* au niveau du prosegment. Ainsi, les deux sites de la prorénine expliquent sa meilleure affinité pour le (P)RR.

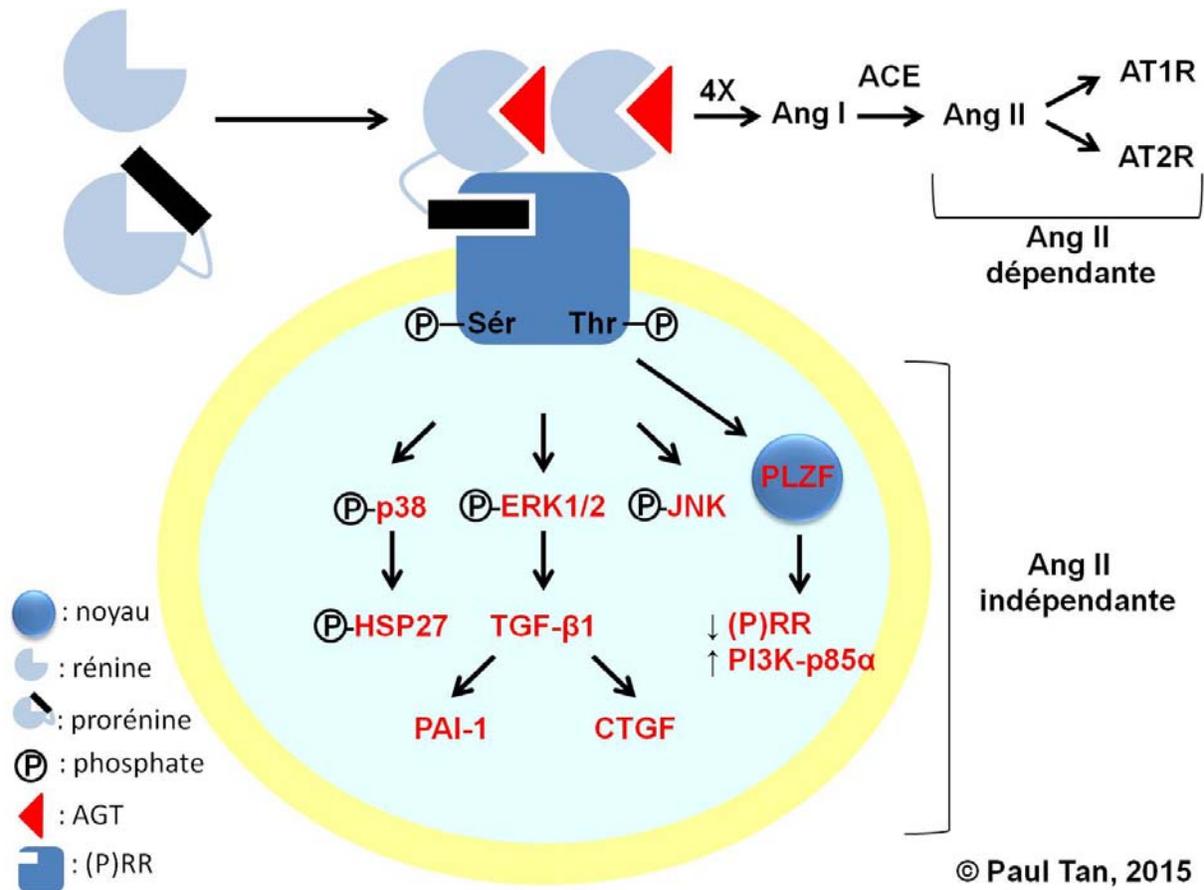


Figure 7. Signalisation du (P)RR dépendante et indépendante de l'Ang II

La liaison de la (pro)rénine au (P)RR augmente de 4 fois l'activité catalytique de la rénine et active la prorénine de manière non-protéolytique amplifiant les voies dépendantes de l'Ang II. La liaison induit également une phosphorylation du (P)RR sur les résidus sérines et thréonines menant à l'activation des voies de signalisation indépendantes de l'Ang II (texte en rouge). La liaison de la (pro)rénine au (P)RR mène au déplacement de PLZF vers le noyau pour réprimer l'expression du (P)RR et augmenter celle de PI3K-p85α. ACE, enzyme de conversion de l'angiotensine; Ang, angiotensine; AT1R, récepteur type 1 de l'Ang II; CTGF, facteur de croissance du tissu conjonctif; ERK1/2, kinases 1/2 régulées par signal extracellulaire; HSP27, protéine de choc thermique 27; JNK, kinase c-jun N-terminal; PAI-1, inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1; PI3K-p85α, sous-unité p85α de phosphoinositide 3-kinase; PLZF, protéine doigt de zinc de la leucémie promyelocytaire; Sér, sérine; TGF-β1, facteur de croissance de transformation-bêta 1; Thr, thréonine.

4.3 - Mécanisme d'action du (P)RR

À ce jour, le (P)RR est impliqué dans 3 voies; la voie dépendante de l'Ang II, la voie indépendante de l'Ang II et la voie indépendante de la rénine.

4.3.1 Dépendante de l'Ang II

La liaison de la (pro)rénine au (P)RR augmente de 4 fois l'activité catalytique de la rénine pour la conversion de l'AGT en Ang I en comparaison à la rénine libre et cette liaison active également la prorénine de manière non-protéolytique (147;169). Cette activation entraîne une augmentation de la production d'Ang I produisant une activation du RAS local (**Figure 7**). Chez l'homme et le rat, le s(P)RR est présent en circulation et lie la rénine suggérant que ce dernier soit sécrété par les cellules et pourrait activer le RAS systémique (151). Bien que la rénine lie le s(P)RR, il demeure incertain que cette liaison entraîne une augmentation de l'activité enzymatique. *In vitro*, le s(P)RR sécrété par des cellules ovariennes d'hamster chinois peut activer la prorénine humaine exogène (172). La présence de s(P)RR est également observée dans l'urine du rat et la liaison de la rénine sur ce dernier est confirmée (173). Encore une fois, le s(P)RR présent dans l'urine est fonctionnel car la prorénine humaine ajoutée de manière exogène est activée.

4.3.2 Indépendante de l'Ang II

La liaison de la (pro)rénine au (P)RR entraîne également une activation des voies de signalisation propres à ce récepteur produisant des effets cellulaires multiples (**Figure 7**). La première évidence d'une voie de signalisation indépendante de l'Ang II est montrée par Nguyen *et al* dans les cellules mésangiales humaines. Ils rapportent que la rénine humaine augmente les niveaux de PAI-1 via le (P)RR et suggère que l'Ang II ne soit pas impliqué principalement car ces cellules ne contiennent pas d'AGT (144;174). Curieusement, la prorénine stimule l'expression de PAI-1 d'une manière dépendante et indépendante de l'Ang II démontrée en utilisant un petit ARN interférant (siRNA) contre le (P)RR et un ARB dans les cellules de muscle lisse vasculaire (VSMC) où toutes les composantes du RAS sont exprimées (175).

Dans l'ensemble, ces études suggèrent que les effets du (P)RR sur la fibrose via le PAI-1 peuvent être indépendantes et dépendantes de l'Ang II selon le type de cellule étudié.

Des auteurs ont rapporté dans les cellules mésangiales humaines que la liaison de la rénine humaine au (P)RR peut activer les kinases 1/2 régulées par signal extracellulaire (ERK1/2), un membre de la famille des protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK). Ceci se ferait indépendamment de l'Ang II après la phosphorylation des résidus sérines et tyrosines du (P)RR (147) (**Figure 7**). Depuis, de nombreux travaux *in vitro* ont évalué cette voie de signalisation du (P)RR dans plusieurs types cellulaires tels les VSMC, les cellules mésangiales humaines, les cellules canines de reins, les cellules primaires de la rétine humaine, les cellules neuronales et les adipocytes 3T3-L1 en bloquant les AT1R et les AT2R (147;153;154;157;158;160;176). L'activation d'ERK1/2 entraîne sa translocation vers le noyau où elle régule l'expression de gènes impliqués dans la différenciation et la prolifération cellulaire (177). L'activation d'ERK1/2 est en amont de la stimulation du facteur de croissance de transformation-bêta 1 (TGF- β 1) (178) L'expression génique de TGF- β 1 est stimulée par la rénine humaine ou de rat dans les cellules mésangiales correspondantes par des voies Ang II-indépendantes démontrées en bloquant les voies dépendantes de l'Ang II avec un ACEi ou un ARB (140) (**Figure 7**). La stimulation de TGF- β 1 entraîne la prolifération des fibroblastes qui synthétisent le collagène menant à la fibrose. Effectivement, les auteurs démontrent que l'augmentation de TGF- β 1 stimule l'expression de PAI-1, de la fibronectine et du collagène de type I. L'activation de TGF- β 1 est en amont du facteur de croissance du tissu conjonctif (CTGF) (179). Dans les cardiomyocytes (cellules du coeur) de rat, la prorénine active également la p38, un autre membre des MAPK, et la protéine de choc thermique 27 (HSP27) par phosphorylation et celles-ci sont également indépendantes de l'Ang II tel que montré en bloquant l'AT1R et l'AT2R (155) (**Figure 7**). La HSP27 est la cible en aval de p38 qui est impliquée dans la régulation de la dynamique des filaments d'actine (180). *In vivo*, il y a également des évidences suggérant l'existence de ces voies de signalisation du (P)RR. Dans les reins du rat transgénique surexprimant le (P)RR humain, la phosphorylation de plusieurs membres des MAPK dont ERK1/2, p38 et la kinase c-jun N-terminal (JNK) augmentent malgré que les animaux ont été traités avec un ACEi (181) (**Figure 7**). JNK, un autre membre

des MAPK, est impliqué dans l'inflammation, l'apoptose, la différenciation et la prolifération cellulaire (182). Les voies de signalisation des MAPK sont communes au (P)RR et à l'AT1R (183).

Le (P)RR a également une voie d'autorégulation impliquant une rétro-inhibition qui est également indépendante de l'Ang II (**Figure 7**). Dans les cellules de la rétine humaine, l'expression génique du (P)RR est réduite par la prorénine de manière dose-dépendante qui ne résulte pas d'un effet sur la viabilité cellulaire (158). Un autre groupe de recherche rapporte que non seulement la liaison de la rénine au (P)RR humain amène à une réduction de l'expression de ce récepteur mais aussi à une augmentation de la sous-unité p85 α de phosphoinositide 3-kinase (PI3K-p85 α) via la protéine doigt de zinc de la leucémie promyelocytaire (PLZF) (156). En agissant comme un partenaire d'interaction avec la région C-terminale du (P)RR, la liaison de la rénine sur le récepteur déclenche la translocation de PLZF du cytosol vers le noyau où la protéine est recrutée sur les promoteurs régulant l'expression génique du (P)RR et de PI3K-p85 α . De plus, un effet prolifératif et anti-apoptotique sont observés sur les cardiomyoblastes du rat après stimulation avec la rénine soit ceux étant dépendants de la présence de PLZF et indépendants de l'Ang II. Dans les cellules embryonniques humaines de reins 293 (HEK293), les auteurs obtiennent des résultats similaires lors de stimulation avec la prorénine ainsi qu'en prétraitant les cellules HEK293 avec un inhibiteur de la rénine suivi par l'ajout de (pro)rénine (184). Ceci suggère que l'inhibiteur inhibe l'activité enzymatique de la rénine mais ne prévient pas sa liaison au (P)RR. Ce mécanisme est le seul connu pour contrôler les niveaux du (P)RR puisqu'il n'y a pas d'internalisation du récepteur après la liaison de la (pro)rénine (185).

L'injection de streptozotocine (STZ) induit le diabète de type 1 chez le rongeur en raison d'une destruction des cellules bêta pancréatiques (cellules produisant et sécrétant l'insuline). Le phénotype typique de ces animaux inclut une hyperglycémie, hyperphagie, polydipsie, polyurie et une perte de poids (186). Lorsque les rats développent le diabète de type 1 par injection de STZ, les niveaux du (P)RR dans les reins augmentent après 6 semaines (187). Potentiellement, cette observation résulte de l'activation de la nicotinamide adénine

dinucléotide phosphate oxydase par l'AT1R puisqu'un inhibiteur contre chacune de ces composantes diminue l'expression du (P)RR alors que l'inhibition de l'AT2R n'a aucun effet sur les niveaux du (P)RR. Ceci suggère que le stress oxydatif induit par l'Ang II ainsi que PLZF travaillent de manière opposée pour moduler les niveaux du (P)RR ce qui soulève une question à savoir si les deux sont connectés. Une étude *in vitro* rapporte que la sumoylation de PLZF est importante pour son rôle en tant que facteur de transcription (188). Le même groupe de recherche montre que le stress oxydatif diminue la sumoylation de PLZF dans des cellules et augmente l'ubiquitination de la protéine (189). Ceci suggère que la translocation de PLZF vers le noyau dépend de la liaison de la (pro)rénine au (P)RR alors que les niveaux de PLZF pourrait dépendre partiellement de l'Ang II, via l'activation de stress oxydatif et l'ubiquitination de la protéine.

4.3.3 Indépendante de la rénine

L'adénosine triphosphatase vacuolaire (V-ATPase) est une pompe à proton formée d'un domaine sur le côté extracellulaire (V_1 composé de 8 sous-unités) et d'un domaine ancré à la membrane cellulaire (V_0 composé de 6 sous-unités) (190). Le domaine V_1 hydrolyse l'ATP alors que le domaine V_0 facilite le transport des protons à travers la membrane cellulaire. La V-ATPase joue un rôle important dans la régulation du pH intracellulaire permettant entre autre l'acidification des vésicules. Dans le but de déterminer la composition des sous-unités de la V-ATPase, Ludwig *et al* ont purifié une protéine de 8,9 kDa associée au domaine V_0 de la V-ATPase dans les cellules du surrénal de bovin (191). Cette protéine est identique au domaine C-terminal généré suite au clivage du (P)RR par la furine (151;192). Par conséquent, le gène du (P)RR est officiellement connue sous le nom d'ATP6ap2 pour protéine 2 accessoire lysosomale de la V-ATPase (149). Dans les reins du rat, la colocalisation du (P)RR et de la V-ATPase sont observées (157). Le domaine extracellulaire et transmembranaire du (P)RR est essentiel pour interagir avec le domaine V_0 de la V-ATPase (193). Le domaine intracellulaire du (P)RR possède un signal de rétention dans le réticulum endoplasmique et un signal de ciblage vers les lysosomes pouvant le cibler avec la V-ATPase vers différentes organelles de la cellule (149). La présence mutuelle du (P)RR et de la V-ATPase est nécessaire pour exercer

leur fonction intracellulaire. D'une part, l'activation d'ERK1/2 par la (pro)rénine liée au (P)RR est réduite par un inhibiteur de la V-ATPase dans une lignée de cellule rénales provenant de canin (157). D'autre part, l'absence du (P)RR dans les fibroblastes embryonniques de souris réduit considérablement les niveaux de plusieurs sous-unités du domaine V_0 de la V-ATPase sans modifier le domaine V_1 (194). Ceci mène à un défaut dans l'autophagie et l'acidification des vésicules intracellulaires. Il semble que la liaison de la (pro)rénine au (P)RR et le clivage du (P)RR par la furine ne sont pas impliqués dans l'assemblage d'une V-ATPase fonctionnelle et l'acidification des vésicules (194).

Le (P)RR sert également comme un adaptateur entre la V-ATPase et le complexe *Frizzled*/protéine 5/6 reliée au récepteur de lipoprotéine à faible densité (LRP5/6) dans la signalisation de Wnt/ β -caténine (**Figure 8, Page 45**) (195). Pour ce faire, le domaine extracellulaire et transmembranaire interagissent avec LRP5/6, alors que le côté intracellulaire du (P)RR n'est pas requis (193). En réponse au ligand Wnt, le complexe membranaire V-ATPase/(P)RR/*Frizzled*/LRP5/6 invagine vers l'intérieur de la cellule par endocytose formant une vésicule. La liaison de Wnt sur *Frizzled*/LRP5/6 induit la phosphorylation de LRP5/6, une phosphorylation nécessitant au préalable l'acidification du vésicule par V-ATPase/(P)RR. Le tout permet l'activation et la stabilisation de la β -caténine cytoplasmique qui se déplace vers le noyau et mène à la transcription de gènes impliqués dans des fonctions telles la prolifération, l'apoptose, la différenciation et le métabolisme (196). Cependant, la voie de Wnt/ β -caténine est indépendante de la (pro)rénine car elle a été caractérisée chez le *Xenopus* qui n'exprime pas la prorénine au cours du développement de l'embryon (193). Par conséquent, les RASi ne devraient pas modifier cette voie. Toutefois, il est possible d'en déduire que la signalisation devrait diminuer dans une situation où le (P)RR est absent comme le démontre les études suggérant que l'acidification par la V-ATPase/(P)RR est cruciale pour le développement chez le *Xenopus* et la drosophile (193;197).

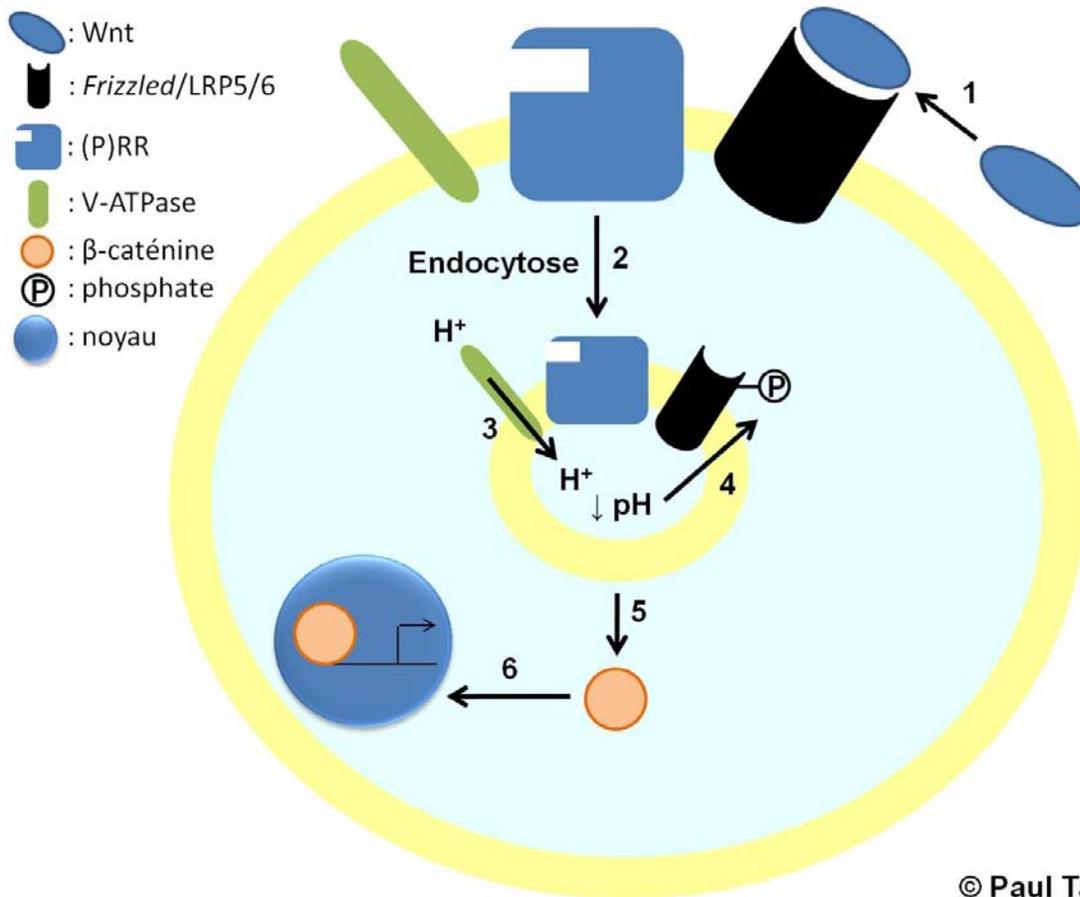


Figure 8. Signalisation du (P)RR indépendante de la rénine

Lorsque le ligand Wnt se lie au complexe *Frizzled*/LRP5/6 (1), le complexe membranaire V-ATPase-(P)RR-*Frizzled*/LRP5/6 pénètre vers l'intérieur de la cellule par endocytose formant une vésicule (2). Le gradient de proton créé par la V-ATPase/(P)RR diminue le pH du vésicule (3) entraîne la phosphorylation de LRP5/6 (4) et l'activation/stabilisation de la β -caténine cytoplasmique (5). La β -caténine se déplace au noyau pour activer la transcription de gènes (6). H^+ , proton; LRP5/6, protéine 5/6 reliée au récepteur de lipoprotéine à faible densité; (P)RR, récepteur à la prorénine et à la rénine; V-ATPase, adénosine triphosphatase vacuolaire.

4.4 - Implication pathologique du (P)RR

4.4.1 Dommage aux organes

Certaines pathologies sont associées à une modulation des niveaux du (P)RR. Par exemple, l'expression du (P)RR dans les cellules de la rétine augmente chez les patients hypertendus qui ont aussi une dégénérescence maculaire de la rétine liée à l'âge (158). La métalloprotéinase-2, impliquée dans le renouvellement de la matrice extracellulaire, est diminuée dans la rétine de ces individus alors que les niveaux de collagène de type I sont augmentés. Ceci suggère que cette pathologie de la rétine résulte d'une suractivation de PAI-1 par le (P)RR causant une réduction du renouvellement de la matrice extracellulaire soit une accumulation de collagène de type I (158).

Chez des patients avec insuffisance rénale, l'expression génique du (P)RR dans des artères rénaux corrèle fortement avec l'expression génique de l'AGT dans le même tissu (198). Ceci suggère que l'augmentation des voies de signalisation du (P)RR dépendantes de l'Ang II sont potentiellement des raisons causant l'insuffisance rénale chez ces patients.

Dans une autre étude où le (P)RR humain est surexprimé de manière ubiquitaire chez le rat, les animaux développent graduellement de la glomérulosclérose (scarification ou durcissement des vaisseaux sanguins rénaux) et de la protéinurie (présence de protéines dans l'urine) à l'âge de 28 semaines avec des niveaux d'Ang II rénaux similaires aux rats témoins (181). L'activation d'ERK1/2, de p38 et de JNK dans le rein, tous membres de la famille des MAPK, sont également observées chez les animaux. Ces observations n'ont pas changé suite à l'administration d'un ACEi aux rats transgéniques, suggérant que ces effets résultent de l'activation des MAPK dans les reins via la voie du (P)RR indépendante de l'Ang II. De plus, ils ont démontré *in vitro* que le (P)RR humain est incapable d'augmenter l'activité catalytique de la pro-rénine de rat mesurée indirectement par la production d'Ang I mais qu'il mène à l'activation d'ERK1/2 indépendamment de l'Ang II dans les VSMC humaines. Ce dernier point a été reproduit avec la (pro)rénine humaine dans les VSMC de souris (199). Globalement, ceci suggère que l'activation non protéolytique de la pro-rénine par le (P)RR est une étape «espèce-

spécifique» alors que l'activation des voies de signalisations du (P)RR n'impliquent pas cette spécificité.

Lorsque le (P)RR humain est surexprimé de manière ubiquitaire chez le rat, l'expression génique et protéique de la cyclooxygénase-2 (COX-2) dans le rein augmentent à l'âge de 4 semaines (200). COX-2 semble être impliqué dans l'hyperfiltration glomérulaire car il cause une dilatation des artères rénales qui est souvent observé dans des cas de néphropathies diabétiques. De plus, COX-2 influence le débit sanguin rénal car les animaux transgéniques recevant un inhibiteur de COX-2 ont une réduction de ce débit sanguin (200). Les rats transgéniques ont aussi une augmentation de l'activation d'ERK1/2 dans les reins. Globalement, cette étude suggère que l'activation d'ERK1/2 par la surexpression du (P)RR peut augmenter les niveaux de COX-2.

Lorsque le (P)RR est spécifiquement inactivé de façon constitutive dans les cardiomyocytes, les souris décèdent à l'intérieur de 3 semaines suivant leur naissance (201). Durant cette période, la fonction cardiaque des animaux diminue d'environ 50% par rapport aux animaux sauvages ceci étant associé à une hypertrophie cardiaque, une augmentation des marqueurs de stress cardiaque tel le peptide natriurétique atrial et une présence de nombreuses vacuoles non-digérées indiquant un défaut d'acidification des vésicules par la V-ATPase/(P)RR. De plus, l'abondance des sous-unités du domaine V_0 de la V-ATPase diminue ce qui engendre un défaut dans l'acidification des vésicules. La même étude reproduit le phénotype sur l'acidification des vésicules *in vitro* en traitant les cardiomyocytes des souris avec un inhibiteur de la V-ATPase. Un phénotype très similaire est observé lorsque le (P)RR est inactivé spécifiquement dans les podocytes (cellules du rein) des souris de façon constitutive. Ces animaux décèdent entre l'âge de 2 à 4 semaines et développent de la protéinurie (202). Les podocytes de ces souris présentent des vésicules avec un pH élevé, un cytosquelette anormal et une mort cellulaire. De plus, le groupe de recherche observe une accumulation d'autophagosomes, de lysosomes et de protéines ubiquitinées. Dans la même étude, les niveaux d'une sous-unité du domaine V_0 de la V-ATPase sont diminués lorsque des podocytes humains sont traités avec un siRNA contre le (P)RR. Toutes leurs observations dans

les podocytes de souris sont reproduites en traitant des podocytes humains avec un inhibiteur de la V-ATPase. Ajouté aux données rapportés chez les souris avec le (P)RR inactivé dans le coeur, ces données suggèrent que le (P)RR joue un rôle important dans l'acidification des vésicules pour prévenir l'accumulation de protéines dommageables pour la cellule. Mises ensemble avec les observations rapportées dans les cardiomyocytes de souris de même que celles chez le *Xenopus* (193) le (P)RR semble avoir un rôle important dans l'acidification des vésicules afin de prévenir l'accumulation de protéines endommagées dans la cellule et dans la survie cellulaire via ses effets indépendants de la rénine.

Suite à une inactivation spécifique du (P)RR dans le bourgeon urétéral de la souris de façon constitutive, les embryons ont une diminution du nombre de ces bourgeons urétéraux au jour 13,5 ce qui est aussi associée à une réduction de l'activation d'ERK1/2 (203;204). Au jour 18,5, la délétion du (P)RR mène ultimement à l'apoptose des cellules, une diminution du poids des reins et une réduction de l'expression de la V-ATPase. Ces souris au jour 30 ont également une urine avec un pH plus élevé que les animaux sauvages en réponse à une administration de NH_4Cl (composé acide) dans l'eau suggérant que ces animaux sont incapables d'acidifier leur urine dans les reins en raison d'une diminution de la V-ATPase.

Chez des rats hypertendus suite à l'infusion d'Ang II pendant 2 semaines, l'expression génique du (P)RR augmente dans la médulla rénale (région la plus interne des reins) alors que l'expression protéique du (P)RR diminue dans la même région (173). Ceci est la résultante d'une augmentation de la production du s(P)RR dans l'urine, une conversion favorisée par une plus grande abondance de la furine chez ces animaux, suggérant que le s(P)RR est sécrété hors du rein. Le s(P)RR présent dans l'urine des animaux est fonctionnel puisqu'il augmente la production d'Ang I en présence de rénine. Le modèle animal 2 reins, 1 clip (2K1C) est utilisé pour certaines études sur l'hypertension. Il consiste à serrer l'artère d'un rein avec une attache et de laisser l'autre intact. Par conséquent, la perfusion vers le rein avec l'artère comprimée est diminuée ce qui provoque une augmentation de la sécrétion de la rénine et ainsi une augmentation de la pression artérielle (205). Il s'avère aussi intéressant d'observer une augmentation de l'expression génique du (P)RR dans le rein attaché. De plus, l'expression

génique de la rénine augmente davantage dans le rein attaché lorsque les rats 2K1C sont traités avec un ACEi pendant 6 semaines. Ceci est aussi associé à un épaississement et des dommages aux vaisseaux rénaux non observés chez les animaux non traités. Cela suggère que l'augmentation de la rénine amenée par l'administration d'un ACEi endommage le tissu par sa liaison au (P)RR et l'activation des voies de signalisations indépendantes de l'Ang II.

Globalement, le (P)RR mène à des dommages aux organes par des voies dépendante de l'Ang II, indépendante de l'Ang II et indépendante de la rénine. Dépendamment du tissu, la présence du (P)RR est requise puisque son inactivation produit un phénotype léthal probablement occasionné par un défaut dans l'acidification des vésicules intracellulaires par la V-ATPase.

4.4.2 Hypertension

Une étude à l'échelle du génome rapporte que le chromosome X à la position 1, bande 1 (Xp11) prédispose une population finlandaise à l'hypertension (206). Puisque le gène du (P)RR est aussi situé dans cette région du chromosome X (Xp11.4), le récepteur pourrait jouer un rôle dans le développement de l'hypertension. De plus, dans une population japonaise, les hommes ayant l'allèle avec le polymorphisme (IVS)5+169C>T du gène du (P)RR ont une pression systolique, diastolique et une pression artérielle ambulatoire (mesure sur 24 heures) plus élevées que ceux avec l'allèle normal alors qu'aucune relation n'était observé chez la femme (207). Les mécanismes par lesquels le polymorphisme est associé à l'hypertension, son effet sur la structure et la fonction du (P)RR ainsi que la raison expliquant les différences entre l'homme et la femme ne sont pas connus. Ce polymorphisme pourrait avoir augmenté l'activité du RAS expliquant la pression artérielle élevée chez les hommes. Des différences dans les hormones entre les deux sexes peuvent avoir protégées les femmes contre la hausse de pression artérielle. Peu après, un autre groupe de recherche a également regardé l'effet du même polymorphisme auprès d'une population d'hommes caucasiens. Comme pour l'étude au sein de la population japonaise, il rapporte que la pression systolique est augmentée chez les individus avec le polymorphisme (IVS)5+169C>T (208). Dans un sous-groupe de cette

population, ils démontrent une augmentation de la concentration circulante de l'aldostérone (hormone stimulée par l'Ang II contrôlant l'homéostasie des électrolytes et des fluides (209)) sans modification des niveaux circulants de l'Ang II et de l'activité circulante de la rénine suggérant que le polymorphisme module le RAS local et augmente la sécrétion d'aldostérone. Dans une cohorte composée uniquement de femmes japonaises, le polymorphisme +1513A4G du gène du (P)RR est associé à une plus forte prévalence aux risques d'infarctus lacunaire et d'hypertrophie du ventricule gauche (210).

Chez les rats surexprimant le (P)RR humain dans les tissus de muscle lisse, la pression artérielle systolique et la fréquence cardiaque augmentent graduellement à partir de l'âge de 6 mois (211). De plus, la concentration plasmatique d'aldostérones augmente alors que la concentration et l'activité circulante de la rénine sont similaires. Lorsque le (P)RR humain est surexprimé spécifiquement dans le noyau supraoptique de l'hypothalamus chez le rat par injection d'adénovirus, la vasopressine (AVP) en circulation et dans l'urine augmentent (160). Conséquemment, comme l'AVP est connu pour ses effets sur la rétention d'eau dans les reins et l'augmentation de la pression artérielle (212), les auteurs ont observé une diminution dans la consommation et l'excrétion d'eau 12 semaines après l'injection. Curieusement, aucun effet sur la pression artérielle n'a été rapporté alors que l'inactivation du (P)RR spécifiquement dans le noyau supraoptique ou d'autres régions du cerveau diminue la pression artérielle, la fréquence cardiaque et l'AVP circulant chez le rat SHR ou la souris double transgénique pour l'AGT et la rénine humaine (160;213). Cette discordance entre la surexpression et l'inactivation du (P)RR concernant la pression artérielle pourrait être due à une différence dans les niveaux d'AVP circulants. Ces données suggèrent que le (P)RR joue un rôle dans le contrôle de paramètres hémodynamiques dans l'hypothalamus en modulant la production et la sécrétion de l'AVP via les voies dépendantes de l'Ang II mais l'implication potentielle des voies indépendantes de l'Ang II ou de la rénine sur ces paramètres ne sont pas connus.

4.4.3 Retard mental et épilepsie lié au chromosome X

Chez l'homme, la mutation d'une cytosine en thymidine dans l'exon 4 à la position 321 du gène codant pour le (P)RR cause un phénotype caractérisé par un retard mental et de l'épilepsie lié au chromosome X (214). Comme le gène du (P)RR est sur le chromosome X (147), la mutation de ce récepteur chez le mâle est suffisante pour causer la pathologie alors que chez la femme la maladie pourrait ou non se manifester à une même amplitude que chez l'homme dépendamment de la copie du chromosome X inactivée (effet mosaïque). Chez les individus présentant cette mutation, la présence du (P)RR muté (forme tronquée de la protéine) est 50% plus élevée que chez les individus témoins. La mutation n'entraîne pas de défaut dans la liaison de la rénine au (P)RR muté puisqu'il peut augmenter l'activité catalytique de l'enzyme suggérant que l'implication du (P)RR dans cette maladie se fait via des effets indépendants de la rénine. Cependant, les hommes avec cette mutation présentent un défaut dans l'activation d'ERK1/2. *In vitro*, le même groupe de recherche a caractérisé fonctionnellement cette mutation du (P)RR dans les cellules neuroendocrines du rat par transfection d'un plasmide codant pour la même mutation que l'exon 4 chez l'homme. Il observe que le (P)RR dimérise avec le (P)RR muté et que les cellules ont une réduction dans l'activation d'ERK1/2 indépendamment de l'Ang II (154). Les auteurs suggèrent que le (P)RR muté agit probablement comme un dominant négatif. Globalement, cela sous-entend que la maladie peut être le résultat d'un changement dans la structure du (P)RR causée soit par la mutation elle-même ou par la dimérisation entre le (P)RR "normal" et le récepteur muté. Ce changement de structure pourrait par exemple rompre l'interaction entre le (P)RR et la V-ATPase nécessaire à l'activation d'ERK1/2 comme il l'a été démontré dans une lignée de cellule rénales provenant de canin (157). La voie de Wnt/ β -caténine pourrait également être diminué (**Figure 8, Page 45**).

4.4.4 Parkinsonisme avec spasticité lié au chromosome X

Il a également été rapporté qu'une mutation de la cytosine en thymidine à la position 345 dans l'exon 4 du gène du (P)RR cause le parkinsonisme avec spasticité lié au chromosome X (215). Les niveaux de la forme tronquée du (P)RR sont augmentés et la diminution du

(P)RR "normal" touche principalement le cortex frontal et le striatum du cerveau, des régions impliquées dans la régulation du mouvement. Un marqueur de défaut de l'autophagie est observé dans le striatum du patient, une région du cerveau souvent affectée par la maladie de Parkinson (215). Les auteurs rapportent aussi que le taux de survie des cellules HEK293 est réduit lorsque l'expression du (P)RR est diminuée par microinjection d'un siRNA et subséquemment traitées avec un inhibiteur de la V-ATPase. Puisque l'inhibition de la V-ATPase cause l'apoptose et un défaut dans la dégradation des protéines (216;217), les auteurs attribuent cette maladie à un défaut dans la fonction de la V-ATPase causé par un (P)RR muté.

4.4.5 Problème développemental

Chez le poisson zèbre, un criblage après une mutagenèse insertionnelle identifie le (P)RR comme un des gènes essentielles au développement de l'embryon (218). Phénotypiquement parlant, les embryons avec le mutant du (P)RR présente une tête et des yeux plus petits sans aucun pigment corporel à l'âge embryonnaire de 2 jours. Au jour 5 du développement, on observe de la nécrose au niveau du système nerveux central, un sous-développement du foie et de l'intestin, de l'oedème péri-cardiaque en ajout aux anomalies du jour 2. Un phénotype similaire à celui rapporté chez le poisson zèbre est observé dans des embryons de *Xenopus* où le (P)RR est invalidé par un petit ARN interférant (193) là où ces observations résultent d'un défaut dans l'activation de la voie de Wnt/ β -caténine (**Figure 8, Page 45**). Par conséquent, plusieurs gènes nécessaires au développement de l'embryon sont diminués. Lorsque l'expression du (P)RR est réintroduite chez le *Xenopus*, le développement de l'embryon est normalisé.

4.5 - *Handle region peptide*

Une autre approche pour l'étude du rôle du (P)RR dans le développement de pathologie consiste à employer le *handle region peptide* (HRP), un bloqueur de ce récepteur. Deux ans après le clonage du (P)RR, le HRP de rat contenant les résidus R¹¹ILLKK¹⁵MPSV a été conçu par Ichihara *et al* (169) en se basant sur la séquence humaine de la région *handle*

(¹¹IFLKR¹⁵) de la prorénine rapporté par Suzuki *et al* (164). Afin de vérifier l'affinité du HRP synthétisé, ils ont observé la liaison de la prorénine de rat sur un anticorps contre la région *handle* de rat (anti-HRP, homologue à la séquence de liaison sur le (P)RR). À une dose de 1 µM, le HRP de rat empêche totalement la liaison de la prorénine sur l'anti-HRP (169). Dans la même étude, ceci est également observé dans les cellules COS-7. Comme aucune autre région du prosegment de la prorénine (i.e. région *gate*) empêche la liaison de la prorénine à l'anti-HRP, ces résultats suggèrent que le HRP a potentiellement une grande affinité pour le (P)RR. Le HRP de rat et de l'humain empêche la liaison de la prorénine à leur (P)RR correspondante dans les cellules COS-7 alors que d'autres régions du prosegment n'ont pas cet effet (219). L'affinité du HRP pour le (P)RR est similaire à celle de la (pro)rénine et se situe dans l'ordre du nanomolaire suggérant que le HRP est un bloqueur compétitif du (P)RR (220). Puisque la rénine n'a pas le prosegment du précurseur, l'enzyme pourrait théoriquement se fixer à son récepteur après le blocage du (P)RR. Bien que le HRP prévient la liaison de la prorénine au (P)RR, le peptide empêche également la rénine de s'y lier (171;220). Il est donc suggéré que la liaison du HRP sur le (P)RR change la conformation du récepteur empêchant ainsi la rénine d'y avoir accès (148).

4.6 - Effet thérapeutique du HRP

Il est très important de ne pas confondre l'effet d'un inhibiteur de la rénine à celui du HRP. L'inhibiteur de la rénine se fixe au site actif de cette enzyme et inhibe uniquement la production d'Ang I mais ne prévient pas la liaison de la (pro)rénine au (P)RR. Par conséquent, il ne modifie pas les voies de signalisation du (P)RR qui sont indépendantes de l'Ang II. Quant au HRP, sa liaison au (P)RR produit deux effets (**Figure 9, Page 54**). D'une part, cette liaison empêche la (pro)rénine de se fixer au (P)RR et ainsi la prorénine demeure inactive et l'activité de la rénine n'est pas augmentée. Toutefois, la rénine libre exerce tout de même une activité enzymatique de base. Par conséquent, l'étape limitante du RAS (conversion de l'AGT en Ang I) est réduite et la production d'Ang I et II diminuent mais n'est pas inhibé contrairement à l'inhibiteur de la rénine. D'autre part, le HRP bloque l'activation des voies de signalisation du (P)RR indépendante de l'Ang II (i.e. MAPK) et il le fait en désactivant le récepteur et en

réduisant la phosphorylation sur les résidus sérines (179). Les impacts physiologiques et cellulaires du HRP ont été vérifiés dans des modèles animaux et des lignées cellulaires.

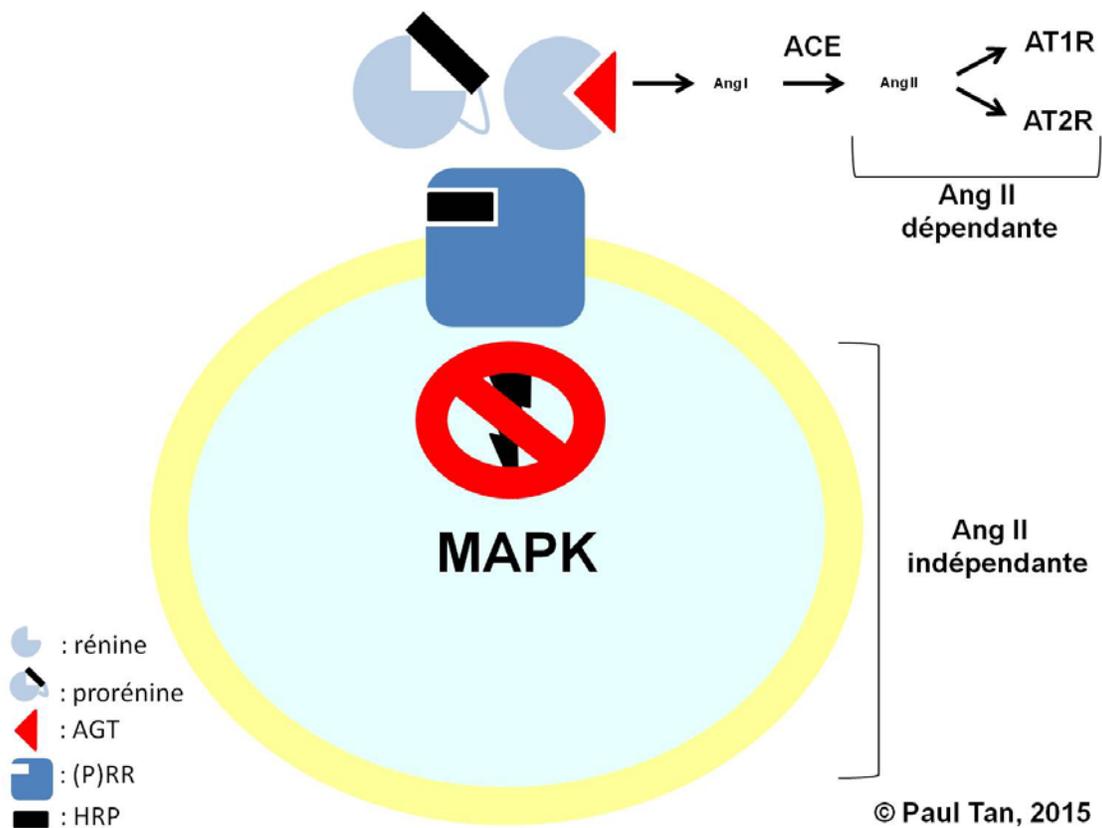


Figure 9. Mécanisme de fonctionnement du HRP

Le HRP prévient la liaison de la (pro)rénine au (P)RR causant une réduction des voies dépendantes de l'Ang II puisque la prorénine reste inactive et la rénine exerce une activité enzymatique de base. Le HRP bloque également l'activation des voies indépendantes de l'Ang II. Dans le schéma, la taille de police réduite pour l'Ang I et II représente une diminution de la production en comparaison avec la Figure 7. **ACE**, enzyme de conversion de l'angiotensine; **AGT**, angiotensinogène; **Ang**, angiotensine; **AT1R**, récepteur type 1 de l'Ang II; **HRP**, *handle region peptide*; **MAPK**, protéine kinase activée par mitogène; **(P)RR**, récepteur à la prorénine et à la rénine.

4.6.1 Modèles de complications diabétiques

4.6.1.1 Néphropathie diabétique

La néphropathie diabétique est caractérisée par un défaut de la fonction rénale au niveau de la barrière de filtration glomérulaire. Des dommages aux glomérules modifient la capacité de filtration des reins et provoquent la protéinurie. L'inflammation et la fibrose résultant des dommages rénaux causent la glomérulosclérose (221). Typiquement, le diabète est associée à une augmentation des niveaux circulants de la pro-rénine et les niveaux du (P)RR augmentent dans le rein alors que la rénine circulante est inchangée (169;187;222).

La première utilisation *in vivo* du HRP est rapportée par Ichihara *et al* dans un modèle de rat diabétique de type 1 induit par la STZ (169). La pro-rénine est la seule composante du RAS qui augmente en circulation chez ces animaux diabétiques et l'administration du HRP de rat (0,1 mg/kg/jour sous-cutanée pour 24 semaines) ne change pas les niveaux de la proenzyme circulante. Toutefois, les niveaux locaux d'Ang I et II dans le rein augmentent chez les rats diabétiques et le HRP diminue largement leur production. Les rats diabétiques développent la glomérulosclérose mais celle-ci est complètement prévenue par l'administration du HRP. Chez le rat diabétique, la protéinurie est nettement plus élevée et le gain de poids corporel est également réduit, ce dernier représentant plus de la moitié de celui des animaux témoins non diabétiques. Le HRP réduit significativement la protéinurie chez ces rats au même niveau que les rats témoins et les animaux reprennent du poids à partir de la 16^e semaine de traitement au HRP. Globalement, le développement de la glomérulosclérose entraîne la protéinurie occasionnant la perte de poids corporel des rats diabétiques et l'administration du HRP permet de prévenir la pathologie. Pourtant, le HRP n'a pas d'effet sur la pression artérielle et la glycémie de ces animaux suggérant qu'une diminution du RAS local dans les reins n'est pas suffisante pour induire des changements hémodynamiques et une amélioration de la fonction pancréatique. De plus, l'effet du HRP sur les rats témoins est absent dans cette étude démontrant l'importance d'une augmentation de la pro-rénine dans le développement de la néphropathie diabétique.

Il est intéressant de mentionner ici que l'administration d'un ACEi dans le même modèle animal pendant 8 mois entraîne uniquement une diminution de la glomérulosclérose et de la protéinurie (223) alors que l'étude d'Ichihara *et al* rapporte une normalisation. Cela suggère que le HRP produit un effet bénéfique supplémentaire comparé aux RASi en bloquant les voies du (P)RR indépendantes de l'Ang II. Pour déterminer si ces voies indépendantes de l'Ang II jouent un rôle dans le développement de la néphropathie diabétique, le groupe de recherche d'Ichihara a refait une étude similaire chez des souris traitées au STZ où l'AT1R était inactivé de manière ubiquitaire. Un ACEi a également été administré dans l'eau pour exclure les effets de l'Ang II via l'AT2R. Chez ces souris diabétiques, l'inactivation d'AT1R diminuait initialement le développement de la glomérulosclérose et de la protéinurie mais le phénotype était revenu à nouveau la 24^e semaine à un niveau similaire que chez les souris diabétiques sauvages (224). L'administration de l'ACEi aux souris diabétiques sauvages diminue la glomérulosclérose et la protéinurie alors que le HRP de souris (0,1 mg/kg/jour sous-cutané pour 24 semaines) abolit complètement le phénotype. L'activation non-protéolytique de la pro-rénine rénale est diminuée par le HRP. L'activation des membres de la famille des MAPK tels ERK1/2, p38 et JNK est normalisée dans les reins des souris diabétiques après le traitement au HRP alors que l'administration d'un ACEi diminue leurs niveaux. Toutefois, après un double traitement du HRP et de l'ACEi, aucun effet synergique n'est observé. L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'activation des voies dépendantes de l'Ang II ne peut entièrement expliquer le développement de la néphropathie diabétique et que les voies du (P)RR indépendantes de l'Ang II sont plus importantes. Ces résultats sont d'autant plus appuyés par le fait que les rats transgéniques surexprimant le (P)RR humain développent de la glomérulosclérose et de la protéinurie pouvant être prévenue par l'administration du HRP (0,1 mg/kg/jour sous-cutané pour 20 semaines) alors qu'un traitement avec un ACEi est sans effet malgré la réduction d'Ang II rénal (181). Le HRP normalise également les niveaux de phosphorylation d'ERK1/2, de p38 et de JNK dans le rein indépendamment de l'Ang II. Ceci suggère que l'augmentation de l'activation non-protéolytique de la pro-rénine ou la hausse du (P)RR favorise le développement de la maladie.

Pour vérifier si le développement de la néphropathie diabétique par le (P)RR se fait aussi par une activation des voies inflammatoires, des rats deviennent diabétiques par la STZ et ils sont administrés le HRP de rat (0,2 mg/kg/jour sous-cutané directement au niveau du rein pour 2 semaines). Chez les animaux diabétiques, l'expression génique de TNF α et de l'interleukine 1 bêta (IL-1 β) dans le rein augmentent chez les rats diabétiques et sont réduites par le HRP (222). Dans le liquide interstitiel rénal, la présence protéique de ces deux facteurs inflammatoires est également diminuée par le HRP suggérant que l'augmentation du (P)RR favorise la production des facteurs inflammatoires localement et contribue ainsi au développement de l'inflammation dans le rein. Il existe également une corrélation positive entre le niveau des marqueurs de l'inflammation et la protéinurie suggérant que ceci pourrait être un mécanisme par lequel le HRP réduit la protéinurie dans cette étude ainsi que dans des études précédentes (169;181;224). Le groupe de recherche montre aussi que le HRP réduit l'augmentation de l'expression génique et protéique de TGF- β 1 et de CTGF au niveau rénal et dans les cellules mésangiales du rat stimulées par une haute concentration de glucose (179). Globalement, les résultats suggèrent que le (P)RR est impliqué dans le développement de la néphropathie diabétique par une activation de la fibrose et de l'inflammation rénale et que le HRP peut prévenir le développement de cette pathologie en réduisant ces mécanismes.

L'ensemble de toutes ces études suggèrent que l'activation non-protéolytique de la prorénine est impliquée dans le développement de la néphropathie chez le rongeur diabétique de type 1. En outre, ceci semble être aussi le cas chez le rongeur développant un diabète de type 2 (indépendant de l'insuline). Le modèle murin *db/db* possède une mutation sur le gène du récepteur de la leptine qui détériore la signalisation de cette adipokine. Par conséquent, ces animaux sont hyperphagique et développent l'obésité et le diabète de type 2 (225). Lorsque ces souris sont administrées avec le HRP de souris (1 mg/kg/jour sous-cutané pour 12 semaines), les effets bénéfiques observés chez le modèle murin diabétique de type 1 sont également présents dans ce modèle, c'est-à-dire qu'il y a réduction de la glomérulosclérose, la protéinurie, les niveaux d'Ang I et II rénale et la signalisation rénale d'ERK1/2 à l'exception de la masse corporelle qui demeure inchangée (226).

L'administration du HRP dans les études précédentes a été réalisée dans une optique de "prévention" du développement de la néphropathie diabétique où l'induction du diabète et l'administration du HRP ont eu lieu simultanément. Afin de voir si le HRP produit les mêmes effets bénéfiques suite à l'apparition de la pathologie, une étude de "traitement" a été initiée chez le rat. Les animaux deviennent diabétique de type 1 par l'injection de la STZ pour une période de 12 semaines et on leur administre un ACEi ou le HRP de rat (0,1 mg/kg/jour sous-cutané pour 12 semaines). Une fois de plus, cette étude rapporte que la progression de la glomérulosclérose et de la protéinurie sont prévenues par le HRP alors que l'ACEi réduit leurs niveaux (227). L'ensemble de ces études proposent que le HRP est non seulement capable de prévenir le développement de la néphropathie diabétique mais qu'il peut aussi le traiter une fois que la pathologie est présente.

4.6.1.2 Rétinopathie diabétique

La rétinopathie diabétique est une autre complication du diabète résultant de l'apoptose des cellules de la rétine en raison des dommages causés par un haut niveau de glucose et de l'inflammation oculaire (221). En effet, la formation anormale de vaisseaux sanguins fragiles augmente les risques d'éclatement de ces vaisseaux et le déversement de leur contenu peut compromettre la vision. Il est intéressant d'observer chez les rats diabétiques, suite à une injection de STZ, une augmentation de l'expression génique de la prorénine dans la rétine. Ces animaux ont plus de leucocytes rétinaux adhérents qui sont réduits de façon plus marquée par l'administration du HRP (70% d'inhibition) (0,1 ou 1,0 mg/kg/jour intrapéritonéale pour 7 semaines) en comparaison à un ARB (30% d'inhibition) suggérant que les effets du (P)RR indépendantes de l'Ang II sont importants (228). Toutefois, aucun effet synergique après un double traitement du HRP et de l'ARB n'est observé. Chez les souris diabétiques suite à un traitement au STZ, un traitement similaire au HRP diminue aussi les niveaux protéiques de la molécule d'adhésion intercellulaire 1 (ICAM-1) et du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) dans la rétine qui sont impliqués dans l'inflammation rétinale induite par le diabète. Pour évaluer la contribution de l'Ang II dans ces phénotypes, ils ont utilisé des souris avec l'AT1R inactivé de manière ubiquitaire. Dans la rétine de ces animaux, les niveaux

d'ERK1/2 phosphorylé et de VEGF diminuent suite à l'administration du HRP alors que les niveaux d'ICAM-1 demeurent similaires. Ceci suggère que la modulation de l'ICAM-1 est effectuée par le (P)RR via ses effets sur la production d'Ang II. D'après ces résultats, la rétinopathie diabétique est potentiellement une résultante de la hausse de l'activation non-protéolytique de la prorénine activant chroniquement la signalisation du (P)RR dépendante et indépendante de l'Ang II dans la rétine. Ceci aboutira à la néovascularisation et à l'adhésion des leucocytes causant une inflammation rétinale.

L'uvéite est une inflammation de l'uvée et l'AT1R est impliqué dans le développement de cette pathologie oculaire (229). Afin de voir si le (P)RR joue un rôle dans le développement de l'inflammation oculaire aigüe, l'uvéite a été induit chez le rat par une injection de lipopolysaccharide. Une journée avant et après l'induction, les animaux ont reçu le HRP de rat (0,1 ou 0,01 mg/kg/jour intrapéritonéal). La prorénine, sa forme activée et le (P)RR sont tous présents dans les vaisseaux de la rétine. Chez les rats avec uvéite traités avec le HRP, l'adhésion des leucocytes dans la rétine, le nombre de leucocytes ainsi que leur infiltration dans l'humeur vitrée diminuent par rapport aux animaux avec uvéite traités avec le placebo (230). La concentration de protéines dans l'humeur aqueuse chez les rats recevant le HRP, indépendamment de la dose, diminue 12 heures après l'injection de lipopolysaccharide suggérant que la fuite de protéines de l'humeur vitrée vers ce compartiment (une des conséquences de l'uvéite) est réduite. Suite à 24 heures de traitement au HRP, la concentration de protéines dans l'humeur aqueuse après une dose de 0,01 mg/kg demeure similaire à celle des rats témoins alors que la dose de 0,1 mg/kg maintient la diminution de protéine. Ceci suppose que selon la dose administrée, il est possible que certains effets bénéfiques soient maintenus, perdus ou amplifiés. De plus, ils rapportent aussi que l'expression génique et protéique d'ICAM-1, MCP-1 et de l'interleukine 6 (IL-6) augmentent dans la rétine des rats atteints d'uvéite et que le HRP réduit les niveaux de toutes ces composantes inflammatoires de façon similaire à ce qui a été rapporté dans la rétine des animaux atteints de rétinopathie diabétique (228). Globalement, cette étude démontre que le (P)RR joue un rôle dans le développement de l'inflammation oculaire et que le HRP diminue l'impact de l'activation du RAS.

La néovascularisation dans la rétine est une caractéristique des pathologies oculaires. L'AT1R est également impliqué dans la néovascularisation rétinale causé par l'ischémie (231). Le même groupe de recherche a ainsi étudié l'effet du HRP de souris sur cette pathologie en induisant la rétinopathie ischémique. Des souris âgées d'une semaine sont mises dans des cages avec un contenu en oxygène de 80% dans l'air ambiant pour 5 jours. Les animaux sont par la suite remis dans des conditions normales (21% d'oxygène) et reçoivent une injection intrapéritonéale de HRP (1 mg/kg) pendant 5 jours. Chez les souris avec rétinopathie ischémique traitées avec le placebo, des vaisseaux physiologiques (intrarétinal) et pathologiques (extrarétinal) sont observés alors que les animaux recevant le HRP présentent une diminution des vaisseaux pathologiques sans changer l'abondance des vaisseaux physiologiques (232). Ainsi tel qu'observé chez les rats avec rétinopathie diabétique (228), le HRP réduit l'expression génique et protéique de l'ICAM-1 et de VEGF. Plus particulièrement, la réduction produite par le HRP touche l'isoforme VEGF165 qui est nécessaire à la néovascularisation rétinale pathologique (233). Ceci suggère que le (P)RR mène à la néovascularisation pathologique.

Bien que ces études montrent que l'activation du (P)RR est impliquée dans l'inflammation et la néovascularisation oculaire, les observations ne sont pas en mesure de démontrer par quels voies spécifiques du (P)RR les effets du HRP sont occasionnés. Pour adresser cette question, le HRP (1 mg/kg intrapéritonéal pour 1 semaine) a été administré à des souris avec néovascularisation de la choroïde ayant l'AT1R inactivé afin d'exclure les voies dépendantes de l'Ang II. Chez ces souris, l'administration du HRP réduit les niveaux d'ERK1/2, VEGF et MCP-1 suggérant que les voies indépendantes de l'Ang II soient responsables de cette pathologie oculaire (234).

4.6.2 Modèles d'hypertension

4.6.2.1 Cardiomyopathie hypertensive

Le rat SHR est le modèle le plus utilisé pour étudier les complications de l'hypertension. Chez les rats SHR susceptibles de développer un accident vasculaire cérébral (SHRsp), les animaux sont hypertendus et ont une augmentation du RAS circulant et cardiaque lorsqu'une diète riche en sel leur est administrée pendant 8 semaines (235). Les niveaux d'activation non-protéolytique de la prorénine, l'expression génique du (P)RR et les niveaux cardiaques d'Ang I et II augmentent également. Du côté anatomique, la masse du coeur et du ventricule gauche augmentent avec la présence de fibrose cardiaque détectée par une augmentation de l'expression génique du collagène I et III. Bien que l'administration sous-cutanée du HRP de rat (0,1 mg/kg/jour pour 8 semaines) n'ait pas d'effet sur la pression artérielle et le RAS circulant, les niveaux de prorénine activée et de l'Ang I et II cardiaques sont totalement normalisés sans modifier les autres composantes du RAS cardiaque. De plus, l'hypertrophie cardiaque, ventriculaire et la fibrose diminuent. Ces résultats suggèrent que l'activation non-protéolytique de la prorénine cardiaque par le (P)RR contribue au développement du dommage cardiaque, tel la fibrose, suite à l'hypertension.

Il semble que les effets bénéfiques du HRP ne se limitent pas uniquement aux rats SHRsp concernant l'hypertrophie et la fibrose cardiaque, puisque des résultats similaires sont obtenus chez le rat SHR traité avec la même dose de HRP (0,1 mg/kg/jour sous-cutané pour 8 semaines) sur une diète riche en sel. Ces travaux montrent de plus que la fonction diastolique est améliorée suivant le traitement au HRP (236). Les niveaux d'hydroxyproline, la composante majeure pour la stabilité du collagène, sont également réduits. Globalement, ces études démontrent que la réduction de fibrose cardiaque produite par le HRP est causée non seulement par une diminution de l'expression du collagène mais également par sa déstabilisation. De plus, les rats SHR traités avec le HRP ont une baisse des niveaux de créatinines circulantes (236). La créatinine est normalement éliminée par les reins et représente un indicateur de la fonction rénale. La réduction de ce produit dans la circulation entraînée par le HRP suppose une amélioration de la fonction rénale chez les rats SHR. Contrairement aux multiples effets du HRP observés chez les animaux avec une diète riche en

sel, le groupe de recherche rapporte dans la même étude que seule la masse du ventricule gauche est réduite chez les rats ayant une diète normale en sel. Il est possible que la durée d'administration du HRP ne soit pas suffisante dans cette étude puisque les rats sur la diète normale en sel n'ont subi que 4 semaines de traitement contrairement à 8 semaines chez ceux sur la diète riche en sel, bien que 3 semaines de traitement avec un ARB puissent réduire la masse du ventricule gauche et la fibrose dans le même modèle animal (237). Si l'activation de l'AT1R par l'Ang II est importante pour produire des dommages cardiaques, il est possible que cette courte période de traitement au HRP ne soit pas suffisante pour réduire l'Ang II à un niveau qui mène aux effets bénéfiques supplémentaires observés chez les rats ayant une diète riche en sel et traités au HRP.

De manière générale, l'administration systémique du HRP a peu d'effet sur la pression artérielle auprès d'un modèle animal hypertendu (235;236;238). Pourtant, l'administration locale du PRO20 (un autre bloqueur du (P)RR synthétisé à partir de la séquence du prosegment de la prorénine) directement dans le cerveau semble produire des effets hypotenseurs. En effet, lorsque le PRO20 de souris est administré de manière aigüe intracérébroventriculairement dans le cerveau de la souris double transgéniques pour l'AGT et la rénine humaine ou de la souris hypertendue induite par un sel d'acétate déoxycorticostérone, la pression artérielle est réduite dans ces deux modèles d'animaux (239). Une infusion chronique du PRO20 (27 µg/kg/jour pour 3 semaines) par la voie sous-cutanée intracérébroventriculairement dans le cerveau donne des résultats similaires et les niveaux d'Ang II dans le cortex et l'hypothalamus diminuent également. Toutefois, l'administration sous-cutanée du PRO20 ne modifie pas la pression artérielle chez les souris hypertendues induite par un sel d'acétate déoxycorticostérone. Ceci suggère que l'infusion sous-cutané du PRO20 ne permet pas le passage de ce peptide à travers la barrière hémato-encéphalique ou que la dose et/ou le temps de traitement ne sont pas suffisant pour avoir un effet ou avoir atteint les régions du cerveau responsables de la régulation de la pression artérielle. Puisque la séquence entre le HRP et la PRO20 est différente, l'absence d'effet du HRP sur la pression artérielle chez le modèle animal hypertendu par rapport au PRO20 pourrait être expliqué par une différence dans leur propriété pharmacologique.

4.6.2.2 Insuffisance cardiaque

La dose chronique du HRP typiquement donnée aux animaux SHR (0,1 mg/kg/jour) ne semble pas avoir d'effet sur le RAS circulant et la pression artérielle. Par conséquent, l'effet aigu d'une dose plus élevée sur les paramètres hémodynamiques a été étudié. Chez le mouton avec insuffisance cardiaque induite par stimulation du ventricule gauche, l'administration d'une dose croissante du HRP (1, 5 et 25 mg intraveineux) à chaque intervalle de 90 minutes diminue à la fois, la pression artérielle, la pression de l'oreillette gauche, la résistance périphérique et l'activité circulante de la rénine (240). Cet effet du HRP ne peut être observé qu'à partir d'une dose de 5 mg et elle persiste quelques heures après la dose de 25 mg. Comme l'activité circulante de la rénine est réduite par le HRP, il est possible que le HRP ait bloqué le s(P)RR circulant. Cette étude démontre non seulement que le (P)RR peut moduler les paramètres hémodynamiques dans la pathologie de l'insuffisance cardiaque mais soulève aussi la possibilité qu'une dose plus élevée de HRP est nécessaire pour avoir un changement sur la pression artérielle et le RAS circulant.

4.6.2.3 Néphropathie hypertensive

Lorsqu'un changement de paramètres hémodynamiques tel la hausse de pression artérielle est maintenue chroniquement, des dommages sur le système de filtration rénale peuvent avoir lieu et causer la protéinurie. Chez le rat SHRsp hypertendu, la protéinurie et la glomérulosclérose augmentent et l'administration du HRP (0,1 mg/kg/jour sous-cutané pour 8 semaines) diminue les deux (238). L'expression génique du (P)RR et les niveaux de l'Ang I et II dans le rein augmentent chez les rats hypertendus. La résultante est une activation locale du RAS rénal qui est neutralisée par le HRP chez les animaux hypertendus reflété par une diminution des niveaux d'Ang I et II. De plus, les niveaux de TGF- β 1 et du collagène IV sont également normalisés dans le rein suggérant une diminution de la fibrose rénale. Ainsi, tout comme dans le coeur, l'activation du (P)RR rénal semble être une étape clé pour initier le processus de dommage rénal.

4.6.3 Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires sont souvent utilisées pour déterminer les mécanismes impliqués lors des observations chez les modèles animaux. Elles possèdent l'avantage de créer un système isolé des autres types cellulaires et de la circulation permettant d'étudier ainsi une voie d'intérêt spécifique. Lorsque des cellules mésangiales du rat immortalisées sont traitées avec le HRP (1 μ M), la phosphorylation d'ERK1/2 diminue d'environ 60% après 1 minute et persiste jusqu'à 2 heures et ce de façon indépendante de l'Ang II puisque l'administration d'ARB n'abolit pas cet effet (241). Ceci entraîne également une réduction de l'expression génique de TGF- β 1 et de la prolifération des cellules mésangiales, cette dernière étant dépendante de la concentration du HRP. Finalement, les cellules stimulées avec le HRP présentent aussi une augmentation de l'activité de la métalloprotéinase-2. En somme, cette étude procure un élément de preuve du concept sur le principe de fonctionnement du HRP. Elle permet de démontrer que le (P)RR produit une prolifération des cellules mésangiales et une diminution de la dégradation du collagène présent dans la matrice extracellulaire indépendamment de l'Ang II. Ces mécanismes peuvent être responsables des dommages occasionnés aux organes comme c'est le cas lors de la glomérulosclérose au niveau du rein qui mène ultimement à la néphropathie.

Globalement, l'ensemble de toutes ces études *in vivo* et *in vitro* utilisant le HRP suggère que le (P)RR et la suractivation du RAS local jouent un rôle essentiel dans le développement de complications reliées au diabète et à l'hypertension.

4.6.4 - Divergences sur les effets du HRP

4.6.4.1 Modèles *in vivo*

Malgré les effets bénéfiques connus grâce à l'utilisation du HRP dans plusieurs modèles animaux de pathologie, certains ne réussissent pas à reproduire les effets bénéfiques rapportés, c'est-à-dire, n'observent pas d'effet. Par exemple, Susic *et al* sont les premiers à rapporter que le HRP de rat (0,1 mg/kg/jour sous-cutané pour 4 semaines) n'entraîne pas d'effet sur le collagène cardiaque, la fonction du ventricule gauche et l'hémodynamique rénale chez le rat SHR (**Tableau V, Page 66**) (242).

Tableau V. Divergences sur les effets *in vivo* et *in vitro* du HRP

Auteur	Source	Traitement, dose, durée	Observations majeures
Susic D <i>et al</i> 2006 (242)	Rat	HRP, 0.1 mg/kg/jour, 4 semaines	Aucun effet sur le collagène cardiaque, la fonction du ventricule gauche et l'hémodynamique rénal
Muller DN <i>et al</i> 2008 (243)	Rat	HRP, 3.6 µg/kg/jour, 2 semaines	Aucun effet sur la masse du ventricule gauche et les dommages aux reins
Feldt S <i>et al</i> 2008 (199)	Rat et cellule	HRP, 3.6 µg/kg/jour, 3 semaines HRP, 1 µM	Aucun effet sur les dommages aux reins chez le rat et sur les niveaux d'ERK1/2 dans les cellules
Gratze P <i>et al</i> 2009 (244)	Rat	HRP, 3.6 µg/kg/jour, 16 semaines	Aucun effet sur le gain de poids, la tolérance au glucose et les triglycérides circulants
van Esch JH <i>et al</i> 2011 (245)	Rat	HRP, 1 mg/kg/jour, 3 semaines + inhibiteur de la rénine	HRP n'a pas d'effet sur la pression artérielle et la taille des cardiomyocytes et la combinaison diminue les effets de l'inhibiteur de la rénine sur les mêmes paramètres
Batenburg WW <i>et al</i> 2013 (246)	Souris	HRP, 1 mg/kg/jour, + inhibiteur de la rénine, 3 semaines	La combinaison diminue les effets de l'inhibiteur de la rénine sur la fonction vasculaire
te Riet L <i>et al</i> 2014 (247)	Rat	HRP, 1 mg/kg/jour, + inhibiteur de la rénine, 3 semaines	La combinaison augmente le collagène cardiaque et diminue les effets de l'inhibiteur de la rénine sur la pression artérielle et la fonction rénale
Batenburg WW <i>et al</i> 2014 (248)	Rat	HRP, 1 mg/kg/jour, + inhibiteur de la rénine, 3 semaines	La combinaison ne produit pas d'effets additionnels sur la gliose rétinale, l'apoptose des cellules rétinales et les cytokines inflammatoires
Batenburg WW <i>et al</i> 2007 (249)	Cellule	HRP, 1 µM	Aucun effet sur la production d'Ang I et n'empêche pas la liaison de la (pro)rénine au (P)RR et l'activation de la prorénine
Feldt S <i>et al</i> 2008 (250)	Cellule	HRP, 1 µM	Aucun effet sur les niveaux d'ERK1/2 et n'empêche pas la liaison de la (pro)rénine au (P)RR
Song W <i>et al</i> 2012 (251)	Cellule	HRP, 10 µM	Aucun effet sur les niveaux d'ERK1/2 et TGF-β1

Ang, angiotensine; **ERK1/2**, kinases 1/2 régulées par signal extracellulaire; **HRP**, *handle region peptide*; **(P)RR**, récepteur à la prorénine et à la rénine; **TGF-β1**, facteur de croissance de transformation-bêta 1.

Par ailleurs, le même groupe de recherche observe aussi que l'administration du HRP de rat à la même dose mais pour une durée de 8 semaines aux rats SHR ayant une diète riche en sel, entraîne un changement des paramètres étudiés précédemment (236). Ceci suggère que la durée du traitement au HRP pourrait être un facteur important à considérer pour produire des effets avec le peptide. De façon similaire, l'administration du HRP de rat (3,6 µg/kg/jour sous-cutané pour 2 semaines) dans le modèle de rat 2K1C n'a pas d'effet sur la masse du ventricule gauche et les dommages aux reins représentés par l'infiltration des macrophages et les niveaux de collagène I (243). D'autres études similaires sur l'absence d'effet *in vivo* du HRP ont été rapportées (**Tableau V**) (199;244;245). Étrangement, la dose administrée de HRP dans la plupart de ces études était substantiellement plus faible que celle normalement utilisée dans les études rapportant des effets bénéfiques, soit 0.1 mg/kg/jour. Globalement, l'absence d'effet du HRP est probablement attribuable à une courte durée de traitement et/ou une faible dose.

Des effets inattendus sont également observés lorsque le HRP est donné en combinaison avec un inhibiteur de la rénine. Par exemple, des rats SHR recevant l'inhibiteur de la rénine ont une pression artérielle plus basse et des cardiomyocytes plus petites que les animaux témoins (**Tableau V**) (245). Lorsque le HRP (1 mg/kg/jour sous-cutané pour 3 semaines) et l'inhibiteur de la rénine sont administrés simultanément chez les rats SHR, les effets de l'inhibiteur sont réduits alors que le HRP, administré seul, n'a pas d'effet sur ces paramètres. Des études similaires sur les effets d'une combinaison entre le HRP et un inhibiteur de la rénine ont été rapportées (**Tableau V**) (246-248). La conclusion générale tirée de ces études s'avère être le fait que le HRP vient contrecarrer les effets bénéfiques de l'inhibiteur de la rénine. Ceci démontre que le HRP ne doit pas être combiné à un RASi soit parce qu'il existe des interactions neutralisantes entre eux ou soit parce qu'un mécanisme compensatoire est activé lorsque le RAS circulant et local sont ciblés simultanément par l'inhibiteur de la rénine et le HRP. Cela est similaire à ce qui a été observé avec la combinaison de deux RASi chez l'homme qui souvent ne produit pas d'effet bénéfique supplémentaires et mène à des effets secondaires tels la détérioration de la fonction rénale ou l'hypotension (252).

4.6.4.2 Modèles *in vitro*

Tout comme pour les modèles animaux, les expériences *in vitro* rapportent également des discordances sur les effets du HRP. Par exemple, les VSMC en présence de HRP (1 μ M) n'ont pas de changement dans la production d'Ang I ni dans la liaison de la (pro)rénine au (P)RR et dans l'activation de la prorénine (**Tableau V**) (249). Plusieurs études ont aussi rapporté une absence d'effet du HRP sur les niveaux d'ERK1/2 (199;250;251). Les niveaux circulants physiologiques de la prorénine et de la rénine sont d'environ 2 nM et 0,1 nM respectivement (253). *In vivo*, une dose de HRP à 0,1 mg/kg/jour équivaut à une concentration circulante d'environ 10 nM représentant 5 fois les niveaux physiologiques de la prorénine (228). Il est donc étonnant que des doses si élevées de HRP ne bloquent pas les voies du (P)RR de manière *in vitro*. Mis à part certaines expériences faites avec un nombre insuffisant d'échantillons (251), d'autres études *in vitro* rapportent que le (P)RR est majoritairement localisé à l'intérieur de la cellule plutôt qu'à la surface membranaire (151;156;172). Ceci étant dit, il est possible qu'il y ait une différence dans la localisation du (P)RR *in vivo* et *in vitro* ainsi que dans les différents type de cellules. Une plus grande abondance de (P)RR intracellulaire peut faire en sorte que les effets du HRP soient limités car peu de récepteurs sont disponibles à la surface cellulaire pour la liaison au peptide. En lien avec cette prémisse, les cellules répondent à la prorénine et la signalisation du (P)RR est activée mais uniquement avec une dose supraphysiologique de la proenzyme (248;251). Bien que l'affinité de la prorénine et du HRP soit dans l'ordre du nanomolaire, celle de la prorénine est presque 4 fois plus élevée que le HRP créant de la compétition pour un nombre restreint de (P)RR membranaire d'où l'absence d'effet du HRP (219). Ceci pourrait expliquer les fondements d'une étude sur les monocytes qui rapporte que la stimulation des cellules avec le HRP (1 μ M) n'a aucun effet sur la signalisation d'ERK1/2 et que le peptide n'empêche pas la liaison de la (pro)rénine au (P)RR (249;250).

Par ailleurs, ce groupe de recherche a généré des cellules souches embryonnaires n'exprimant pas le domaine transmembranaire du (P)RR. Par conséquent, le (P)RR n'était pas présent sur la surface des cellules. Pourtant, leurs résultats indiquent que le HRP se fixe sur ces cellules (250). Cela suggère que le HRP n'est pas uniquement spécifique au (P)RR

puisqu'il se lie sur une autre composante à la surface membranaire des cellules. Cette autre composante pourrait être le récepteur mannose-6-phosphate (M6PR). La (pro)rénine lie le M6PR et cette liaison entraîne une internalisation rapide et une dégradation des ligands (254;255). La liaison n'amène pas à la production d'Ang I et II et on lui a plutôt attribué un rôle de clairance de la (pro)rénine. Le fait que la (pro)rénine soit liée au M6PR suggère qu'il y ait probablement un site de liaison commun aux deux enzymes permettant la fixation au récepteur comme c'est le cas du (P)RR. Toutefois, nous n'avons pas la certitude pour affirmer si le prosegment de la prorénine se fixe également sur le M6PR. Si tel était le cas, il s'avèrerait possible que la fixation du HRP sur les cellules souches embryonnaires dépourvue de (P)RR membranaire soit en réalité sur le M6PR.

4.7 - Lien entre le (P)RR et l'obésité

Contrairement aux connaissances sur l'implication du (P)RR dans les complications reliées au diabète et à l'hypertension, peu de travaux ont été réalisés pour étudier le rôle du (P)RR dans l'obésité. Néanmoins, quelques observations ont été rapportées. Chez la femme, le (P)RR est exprimé en gène et en protéine dans le SCF abdominal et dans le VAT omental, rénal et mésentérique mais plus spécifiquement dans les adipocytes (116;153;256;257). Le (P)RR est davantage exprimé dans le VAT que dans le SCF (153). L'obésité entraîne également une augmentation de la densité du (P)RR dans le VAT mésentérique chez les rats ayant une diète riche en gras (257). Comme le VAT est plus dommageable que le SCF avec l'obésité (**Chapitre 2, Section 2.2, Page 7**), le (P)RR pourrait jouer un rôle crucial dans le développement de l'obésité viscérale. Dans le tissu adipeux, le (P)RR est exprimé à la surface des membranes cellulaires (153). Le (P)RR membranaire est fonctionnel dans le tissu adipeux puisqu'un traitement des adipocytes humains avec la rénine augmente son activité catalytique et la production d'Ang I. Ceci laisse croire que le (P)RR est capable d'augmenter la production d'Ang II dans le tissu adipeux et mener au gain de masse grasse (**Chapitre 3, Section 3.4, Page 24**). En lien avec ceci, les niveaux d'Ang II dans le sang veineux du SCF abdominal humain sont plus élevés que dans le sang artériel suggérant que ce tissu adipeux est une source

d'Ang II (258). De plus, il a été rapporté qu'un traitement des adipocytes 3T3-L1 avec la rénine active également ERK1/2 (153).

Les effets du HRP sont très peu connus sur le développement de l'obésité. L'administration du HRP (0,1 mg/kg/jour sous-cutané pour 4 semaines) chez le rat est suffisante pour détecter le peptide dans le tissu adipeux (238). L'étude la plus proche de cette pathologie fait appel à des rats ayant une diète riche en fructose pendant 10 semaines. Dans ce cas, ces animaux développent une résistance à l'insuline comme le démontre les tests de tolérance au glucose mais il est à noter que les rats ayant cette diète ne sont pas obèses (259). Toutefois, le gras rétro-péritonéal et le gras épидидymal sont plus abondants que chez les animaux témoins. On observe également que les TG, les acides gras libres et l'insuline circulante sont plus élevés chez les animaux sur fructose. Lorsque les rats ayant une diète riche en fructose sont traités simultanément avec le HRP (0.1 mg/kg/jour sous-cutané pour 10 semaines), le gras rétro-péritonéal, la taille des adipocytes et les métabolites circulants sont réduits. Il s'avère ainsi que le HRP normalise la tolérance au glucose ainsi que la sensibilité à l'insuline. Toutefois, on ne peut affirmer si les effets du HRP sont directement sur le tissu adipeux ou secondaire à l'amélioration de la sensibilité à l'insuline du corps entier chez les animaux traités avec le peptide. Les résultats de cette étude suggèrent que le HRP réduit la résistance à l'insuline dans le muscle puisque le peptide abaisse l'activation non-protéolytique de la pro-rénine et les niveaux de l'Ang II dans ce tissu.

Chez des rats ayant une diète normale surexprimant la rénine humaine, le gain de poids corporel, la prise alimentaire et le contenu en gras augmentent alors que la tolérance au glucose diminue (244). Premièrement, les auteurs concluent que ce phénotype n'est pas causé par une augmentation de la production d'Ang II puisqu'aucun changement sur ces paramètres n'a été observé chez les rats transgéniques recevant un inhibiteur de la rénine ou un ACEi. L'absence d'effet n'est pas étonnante puisque les rats surexprimant uniquement la rénine humaine ne peuvent pas produire de l'Ang II avec l'AGT de rat compte tenu de la conversion «espèce-spécifique» de l'AGT en Ang I par la rénine (76;77). Le fait que les auteurs n'observent aucune augmentation de la pression artérielle chez les animaux transgéniques

comparativement aux animaux témoins renforce ce point. Les auteurs suggèrent également que le (P)RR ne soit pas impliqué dans le phénotype puisque l'administration du HRP de rat et humain (3,6 µg/kg/jour sous-cutané pour 16 semaines) n'a pas d'effet sur la prise de poids corporel, la prise alimentaire et la tolérance au glucose. Toutefois, comme la dose du HRP de 0,1 mg/kg/jour est celle qui produit les effets bénéfiques chez les modèles animaux de pathologie et que dans cette étude, la dose administrée était faible, l'absence d'effet sur les paramètres étudiés n'est pas étonnante. Ainsi, ces résultats ne permettent pas de conclure que le (P)RR ne contribue pas au phénotype observé chez les rats transgéniques. Comme l'Ang II ne semble pas être impliqué dans les observations de ce modèle animal, la surexpression de la rénine humaine peut en se liant au (P)RR de rat venir expliquer en partie ces résultats car l'activation des voies du (P)RR indépendante de l'Ang II par la prorénine n'est pas une étape «espèce-spécifique» (181). Par ailleurs, les souris avec une inactivation de la rénine présentent une plus forte perte de gras fécal par rapport aux animaux sauvages et représente une des caractéristiques contribuant au phénotype de résistance au gain de poids (123). Toutefois, ceci n'est pas observé chez les souris avec une inactivation de l'AGT ou de l'ACE (118;124), suggérant ainsi une implication des voies de signalisation du (P)RR indépendantes de l'Ang II.

Les effets de l'activation d'ERK1/2 sur la différenciation des adipocytes sont souvent attribués aux deux isoformes. Pourtant, ERK1 et ERK2 ont des rôles distincts. Chez la souris, l'inactivation complète d'ERK1 diminue la masse grasse, produit une résistance à l'obésité induite par une diète riche en gras et amène une plus grande thermogénèse postprandiale (260). *In vitro*, les adipocytes des souris avec l'inactivation d'ERK1 ont une réduction de l'adipogénèse alors que l'ajout d'un inhibiteur des MAPK n'a aucun effet suggérant ainsi que l'ERK2 n'est pas impliquée. En résumé, cette étude démontre que l'ERK1 joue un rôle dans la différenciation des adipocytes alors que l'ERK2 est davantage responsable de la fonction connue d'ERK1/2, c'est-à-dire la prolifération cellulaire. Il demeure possible que le (P)RR soit un élément clé dans le développement de l'obésité en activant ERK1 de manière dépendante et indépendante de l'Ang II.

Mis à part ces travaux suggérant que le (P)RR soit impliqué dans le développement de l'obésité, aucune étude rapporte les effets de l'utilisation du HRP dans un modèle animal obèse induit par une diète riche en gras. Par conséquent, l'implication ou non du (P)RR dans cette pathologie est incertaine et cette thèse a été réalisée pour répondre à cette question.

Chapitre 5 : Mise en contexte

5.1 Problématique

La prévalence mondiale d'individu en surpoids est estimée à plus de 1,6 milliard avec plus de 400 millions d'individus obèses (2). L'Organisation Mondiale de la Santé prévoit que les statistiques augmenteront à plus de 2,3 milliards et de 700 millions respectivement en 2015. L'obésité augmente le risque de développer un diabète de type 2, un cancer et des maladies cardiovasculaires. Les traitements actuels pour cette maladie incluent avant tout un changement du mode de vie. La pharmacothérapie est initiée si ce dernier échoue et en dernier recours la chirurgie bariatrique. Toutefois, à l'exception de la chirurgie bariatrique, ceux-ci n'ont pas de succès à long terme et la plupart présentent des effets secondaires considérables. Par conséquent, il existe actuellement une forte demande pour la création d'un traitement non-invasif et efficace à long terme pour traiter l'obésité et ses complications. Afin de répondre à cette demande, cette thèse a étudié chez la souris l'effet du HRP sur le développement de l'obésité. Nous désirons vérifier l'implication du (P)RR dans le développement de l'obésité et de ses complications.

5.2 Rationnel

L'Ang II stimule la lipogenèse, inhibe la lipolyse et l'adipogenèse (91;98;100). Comme le (P)RR amplifie la production d'Ang II en augmentant l'activité enzymatique de la rénine, le récepteur dans le tissu adipeux pourrait être impliqué dans le développement de l'obésité. D'autre part, ERK1 procure un gain de masse grasse (260). La signalisation du (P)RR indépendante de l'Ang II pourrait donc être impliquée puisque la voie d'ERK1/2 est commune au (P)RR et à l'AT1R (183).

Avant d'étudier le rôle du (P)RR dans le développement, il est nécessaire de se poser une question fondamentale. Il s'agit de savoir si la rénine est présente dans le tissu adipeux chez la souris. Il existe des divergences à propos de sa présence locale là où certains investigateurs rapportent que l'enzyme est exprimée dans le tissu adipeux alors que d'autres ne réussissent pas à la détecter (89;90;92;96;153). Afin de suggérer que le (P)RR puisse mener à

l'obésité en augmentant la production de l'Ang II, il est essentiel de vérifier que la rénine est présente dans le tissu adipeux.

Malgré les effets bénéfiques des RASi, telle la diminution de la pression artérielle, elles causent toutefois une augmentation des niveaux circulants de la rénine (137-142). En tenant compte de l'existence du (P)RR et de ses propres voies de signalisations indépendantes de l'Ang II, il est possible que l'utilisation des RASi produisent des effets indésirables en raison du surplus de rénine qui se lie au (P)RR localement dans les tissus. Le point de vue sur l'utilisation du HRP dans notre modèle animal serait que le peptide diminue la production et les effets de l'Ang II puisque la rénine libre a une activité enzymatique de base. Ainsi, le HRP empêcherait l'activation des voies de signalisation du (P)RR indépendante de l'Ang II. Puisque le fonctionnement du (P)RR en tant qu'adaptateur dans la voie de Wnt/ β -caténine est indépendant de la rénine (193), l'utilisation du HRP ne devrait pas causer les mêmes effets observés dans les modèles où le (P)RR est inactivé.

5.3 Questions

La question principale de cette thèse est de savoir si le (P)RR est impliqué dans le développement de l'obésité chez la souris et par quels mécanismes. Les sous-questions sont les suivantes:

- Est-ce que la rénine est exprimée et présente dans le tissu adipeux?
- Est-ce que le (P)RR est modulé avec l'obésité dans le tissu adipeux?
- Quels sont les effets du HRP sur le poids corporel, le tissu adipeux et les adipokines chez les souris ayant une diète riche en gras et en hydrates de carbone?
- Est-ce que le HRP a un effet sur les composantes impliqués dans la lipogenèse et la lipolyse et l'adipogenèse dans le tissu adipeux?
- Est-ce que le HRP diminue les voies de signalisation dépendantes et indépendantes de l'Ang II dans le tissu adipeux?
- Est-ce que le HRP produit des effets supplémentaires en comparaison aux RASi?

5.4 Hypothèses

Les hypothèses de la thèse sont les suivantes. Nous pensons que le (P)RR est impliqué dans le développement de l'obésité chez la souris. La rénine devrait être exprimée et présente dans le tissu adipeux. Nous nous attendons à ce que le (P)RR augmente dans le tissu adipeux des souris obèses. Le gain de poids corporel et la masse de tissu adipeux devraient diminuer chez les souris traitées avec le HRP. Nous pensons que les adipokines nocives (i.e. résistine) diminuent avec le traitement alors que les bonnes adipokines (i.e. adiponectine) augmentent dans le tissu adipeux. L'administration du HRP chez la souris devrait diminuer les enzymes impliquées dans la lipogénèse et activer celles impliquées dans la lipolyse dans le tissu adipeux. Nous nous attendons à constater une diminution des voies de signalisation dépendante et indépendante de l'Ang II dans le tissu adipeux avec le traitement au HRP.

5.5 Objectifs

Cette thèse a deux objectifs principaux incluant la démonstration que le (P)RR soit impliqué dans le développement de l'obésité et en trouver les mécanismes responsables. Les sous-objectifs sont les suivants:

- Caractériser l'effet métabolique du HRP dans un modèle de souris ayant une diète normale ou ayant une diète riche en gras et en hydrates de carbone (i.e poids corporel, masse de différents types de tissu adipeux)
- Évaluer les niveaux de la rénine et du (P)RR dans le tissu adipeux
- Évaluer les niveaux de plusieurs adipokines dans le tissu adipeux (i.e. résistine, adiponectine)
- Évaluer les niveaux des enzymes impliquées dans la lipogénèse et la lipolyse et le marqueur de l'adipogénèse dans le tissu adipeux

Résultats

Chapitre 6 - Article 1

Impact of the prorenin/renin receptor on the development of obesity and associated cardiometabolic risk factors

Auteurs : Paul Tan, Zulaykho Shamansurova, Sandra Bisotto, Catherine Michel, Marie-Soleil Gauthier, Rémi Rabasa-Lhoret, Thi M.-D. Nguyen, Peter W. Schiller, Jolanta Gutkowska et Julie L. Lavoie

Revue : Obesity

Statut de publication : Article publié, *Obesity (Silver Spring)*. 2014 Oct;22(10):2201-9

Contribution des auteurs

Paul Tan : premier auteur ayant fait les expériences d'immunobuvardage, de qPCR, de mesures des adipokines circulantes et des triglycérides hépatiques, l'analyse des résultats, la préparation des figures, la rédaction et la révision du manuscrit et les corrections demandées par les évaluateurs. Les expériences faites par l'auteur ont généré la Figure 1A, 1C, 1D, 3, 4, 5, Tableau 2 (triglycérides hépatiques), Figure S1, Figure S3, Figure S4, Tableau S3 et Tableau S4. L'auteur a également préparé le Tableau S1, S2 et S6.

Zulaykho Shamansurova : co-première auteure ayant pesé le poids hebdomadaire des souris permettant de produire la Figure 1, fait les expériences de qPCR, l'analyse des résultats, la rédaction du manuscrit. Les expériences faites par l'auteure ont généré la Figure 1B et S5.

Sandra Bisotto : coauteure ayant pesé le poids hebdomadaire des souris, fait le sacrifice et la collecte de tissus permettant de produire la Figure 1 et le Tableau S7, fait les expériences de mesures des métabolites circulantes et de l'activité plasmatique de la rénine. Les expériences faites par l'auteure ont généré le Tableau 2 (à l'exception des triglycérides hépatiques) et la Figure S2.

Catherine Michel : coauteure ayant géré les colonies de souris, effectué les chirurgies et l'échocardiographie sur les souris, pris soins des animaux en protocole, pesé le poids hebdomadaire des souris, fait le sacrifice et la collecte de tissus permettant de produire la Figure 1, 6, Tableau S7 et S8.

Marie-Soleil Gauthier : coauteure ayant fait les expériences de qPCR avec les échantillons humains et la révision du manuscrit. Les expériences faites par l'auteure ont généré le Tableau 1.

Rémi Rabasa-Lhoret : co-auteur ayant recruté la cohorte humaine CAO et révisé le manuscrit.

Thi M.-D. Nguyen : coauteure ayant synthétisé le HRP.

Peter W. Schiller : coauteur ayant synthétisé le HRP.

Jolanta Gutkowska : co-directrice de recherche et co-auteure ayant révisé le manuscrit.

Julie L. Lavoie : directrice de recherche et auteure correspondante ayant conçu et supervisé la recherche, effectué les chirurgies sur les souris, pesé le poids hebdomadaire des souris, fait le sacrifice et la collecte de tissus et la révision du manuscrit. La contribution par l'auteure a permis de générer la Figure 1 et le Tableau S7.

IMPACT OF THE PRORENIN/RENIN RECEPTOR ON THE DEVELOPMENT OF OBESITY AND ASSOCIATED CARDIOMETABOLIC RISK FACTORS

Paul Tan*^{1,2,8}, Zulykho Shamansurova*^{1,3,8}, Sandra Bisotto¹, Catherine Michel¹, Marie-Soleil Gauthier^{8,9}, Rémi Rabasa-Lhoret^{1,4,8,9}, Thi M.-D. Nguyen⁸, Peter W. Schiller^{6,9}, Jolanta Gutkowska^{1,5} and Julie L. Lavoie^{1,7,8}

¹Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM)

²Department of Biochemistry and molecular medicine, ³Physiology, ⁴Nutrition, ⁵Medecine and, ⁶Pharmacology and ⁷Kinesiology of the Université de Montréal, ⁸Montreal Diabetes Research Center and ⁹Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Montréal, Québec, Canada,

*These authors contributed equally to this work

Keywords: (pro)renin receptor, handle region peptide, renin-angiotensin system, adipokines, insulin resistance, glucose homeostasis.

Short title: Preventing obesity and its risk factors

Word Count: 3419 words

Correspondence to:

Julie L. Lavoie, PhD

Centre de Recherche du CHUM (CRCHUM)

900, rue Saint-Denis, bureau R08.452

Montréal, Québec, Canada, H2X 0A9

Tel: (514) 890-8000 ext. 23612

Fax: (514) 412-7655

What is already known?

- Obesity is a world-wide growing epidemic and current treatments have limited success and are associated with important side effects
- The renin-angiotensin system has been implicated in obesity
- Few studies have investigated the implication of the prorenin/renin receptor in obesity

What this study adds?

- Prorenin/renin receptor is upregulated with obesity and insulin resistance in adipose tissue.
- We have found that obese mice treated with the handle region peptide have lower body weight and weight gain which was associated with a decrease in visceral adipose tissue weight and improved circulating metabolites such as triglycerides and insulin.
- We found that mice on normal diet also benefits from the handle region peptide treatment although there was no change in body weight.

Abstract

Objective: Obesity is a worldwide epidemic and current treatments have limited success thus, novel therapies are warranted. Our objective was to determine whether the prorenin/renin receptor [(P)RR] is implicated in obesity.

Design and Methods: Mice received a normal or high-fat/high-carbohydrate diet with the handle region peptide (HRP), a (P)RR blocker, or saline for 10 weeks. Post-menopausal non-diabetic obese women were enrolled in the Complication Associated with Obesity Study and were classified as insulin-resistant (IRO) or –sensitive (ISO) using a hyperinsulinemic-euglycemic clamp.

Results: In mice, obesity increased the (P)RR by 2-fold in adipose tissue. Likewise, renin increased by at least 2-fold. The HRP reduced weight gain in obese mice by 20% associated to a 19% decrease in visceral fat. This was accompanied by a 48% decrease in leptin mRNA in fat and 33% decrease in circulating leptin. Inflammatory markers were also decreased by the HRP treatment. HRP normalized triglyceridemia and reduced insulinemia by 34% in obese mice. Interestingly, we observed a 33% increase in (P)RR mRNA in the fat of IRO women compared to ISO.

Conclusions: This is the first report of a potential implication in obesity of the (P)RR which may be a novel therapeutic target.

Introduction

Although obesity is a major risk factor for many diseases such as cardiovascular diseases, diabetes and cancer, treatment of overweight and obese patients has had low success rate(1). In both mice and human, systemic and adipose tissue renin-angiotensin system (RAS) are upregulated with obesity(2). Moreover, angiotensin II (Ang II) increases lipid storage by reducing lipolysis and increasing lipogenesis(2).

The prorenin/renin receptor [(P)RR], an X chromosome-linked gene, binds both renin and prorenin. This increases by 3-5 fold renin's catalytic efficiency to convert angiotensinogen (AGT) into Ang I(3). It has been detected in many tissues but only two groups have reported its presence in adipose tissue in women(4;5). Interestingly, the protective effect of the handle region peptide (HRP), a (P)RR blocker, has been demonstrated in animal models of many pathologies, such as cardiac diseases(6). Although controversial data have been reported concerning these beneficial effects, this is mostly due to methodological issues such as lower doses and shorter duration of treatment(7-10). Furthermore, tissue-specific (P)RR knock-out mice have increased mortality probably due to an impaired acidification of intracellular vesicles, a process implicated in cell survival(11). Indeed, the (P)RR can act as an adaptor between the vacuolar H⁺-ATPase and the receptor for Wnt molecules in a renin independent manner(6). As such, a defect in (P)RR can impair the Wnt signalling pathway conversely to blocking the receptor using HRP which is unlikely to interfere in this process.

The aim of our study was to determine the regulation of the (P)RR and renin in adipose tissue by obesity and to assess the implication of this receptor in the development of obesity and

obesity-related risk factors. Our hypothesis was that the (P)RR and renin would both be increased with obesity and that the former contributes to the development of obesity and its associated risk factors.

Methods

Animals

All experiments were carried out on mice expressing the green fluorescent protein under the control of the renin promoter (REN-GFP)(12) (generous gift from Dr. Kenneth Gross at the Buffalo Cancer Institute). Mice were 12-15 weeks of age and were maintained on 12-h light/dark cycle with access to either normal (N) diet or high-fat/high-carbohydrate (HF/HC) diet and water *ad libitum*. All experiments were carried out in male mice. In addition, the impact of obesity on the (P)RR and renin were confirmed in females as previous studies looking at human adipose tissue (P)RR have been conducted only in women. Mice body weight (BW) and food weight were measured weekly. Care of the mice used in the experiments complied with standards for the care and use of experimental animals set by the Canadian Council for the Protection of Animals, and all procedures were approved by the University Animal Care and Use Committee at the CHUM Research Center.

HRP synthesis

The mouse peptide IPLKKMPS(13) was synthesized by the manual solid-phase technique(14). This peptide, consisting of part of the prosegment region (10P–19P) of prorenin, has been shown to bind directly to the (P)RR *in vitro* with a dissociation constant

(K_D) of 3.5 nM(15;16). Furthermore, it was confirmed that HRP could prevent binding of both renin and prorenin to the receptor with a dissociation constant (K_I) of 16.7 nM and 15.1 nM respectively(15).

HRP administration

Mice were anesthetized and implanted subcutaneously with an osmotic mini-pump (model #1004; Alzet, Cupertino, CA) filled with the HRP or saline. The peptide was administered at a published effective dose of 0.1 mg/kg/day(6;13). This procedure was repeated after 4-5 weeks to ensure constant administration of the peptide as these are 28-42 days pump (length varies according to lot). Concomitantly, the mice received either a N or HF/HC diet for 10 weeks.

Human CAO cohort study

This was a secondary analysis of samples from post-menopausal non-diabetic obese women enrolled in the Complications Associated with Obesity (CAO) Study. The inclusion/exclusion criteria of this study have been reported(17). The study was conducted according to the guidelines laid down in the Declaration of Helsinki and were approved by the University of Montreal ethics committee. All subjects gave a written informed consent before the study started. Women were subdivided into insulin-sensitive obese (ISO; N = 13) and insulin-resistant obese (IRO; N = 9), as measured by hyperinsulinemic euglycemic clamp and classified based on a cut-off proposed in a previous study(18). Before the clamp procedure, subcutaneous fat (SCF) samples were obtained from the periumbilical area by needle biopsy under local anesthesia as previously described(19).

Western Blot

Proteins were detected using a (P)RR(20), generous gift from Dr. Yumei Feng at Tulane University, renin (Molecular Innovations), GAPDH (Santa Cruz) and tubulin (Abcam) antibody. Each signal was normalized to its respective GAPDH or tubulin band.

Real-time PCR.

Gene expression was evaluated using the primer sequences and conditions provided in Tables S1 and S2.

Statistical analysis

All values are expressed as means \pm standard error (SE). A 2-way ANOVA was used to assess the effect of diet and the HRP. For parameters measured at many time points, a repeated measure 2-way ANOVA was applied. If interactions were detected, a Tukey post-hoc test was used. Differences in human gene expression were determined by non-parametric Mann–Whitney U tests. For renin mRNA in female mice, a Pearson's Chi-square was done. A $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Mouse adipose tissue (P)RR and renin

In HF/HC+Saline male mice, the (P)RR mRNA was increased by 2.1-fold in all fat pads (Figure 1A) and (P)RR protein was increased by 1.5-fold in peri-renal fat (PRF) and by 2.1-fold in abdominal SCF with a tendency in peri-gonadal fat (PGF) ($p = 0.067$, Figure 1C) while

it was unchanged in the heart, liver and kidney (Figure S1). Renin mRNA was increased by 1.7-fold in SCF and by 2.4-fold in visceral adipose tissue (VAT) (Figure 1B). The local protein produced, as assessed by the presence of GFP, was undetectable in all fat pads (data not shown) although total renin protein content was detected and was increased by 5.1-fold in PGF and decreased by 40% in SCF with obesity (Figure 1D). Likewise, circulating plasma renin activity (PRA) was increased by 1.9-fold in HF/HC+Saline mice (Figure S2). In PGF of obese mice, total renin protein was 84% of the kidney content (Figure 1D, S3 and Table S3). There was no effect of the HRP on both (P)RR and renin with the exception of the (P)RR mRNA in SCF which was decreased by 53% in obese animals (Figure 1A).

In obese female mice, the (P)RR protein increased by 1.4-fold in PGF while it tended to increase in PRF ($p = 0.084$, Figure S4). Also, the protein expression was 1.7-fold higher in PGF compared to SCF independently of the diet (Figure S4). Renin mRNA was significantly increased only in PGF and SCF with obesity (Table S4). Values presented were very small which may result from the smaller fat mass compared to males (Table S5).

RAS components in human SCF

IRO and ISO women were comparable for age, BMI, fat mass and waist to hip ratio as assessed by Dual X-Ray absorptiometry (Table S6)(17). We observed a 1.3-fold increase in (P)RR in the SCF of IRO compared to ISO subjects (Table 1). We found a 1.5-fold increase in AT1R similarly to previous reports(21). Conversely, there were no differences for ACE and AGT expression (Table 1). Moreover, renin could only be observed in 3 samples independently of insulin sensitivity (data not shown).

Mouse body and organ weight

HF/HC+Saline mice increased their BW (Figure 2A) and weight gain (Figure 2B) compared to the N+Saline group, mainly due to an increased fat mass (Figure 2C). HF/HC+HRP mice had decreased BW and weight gain by 11% and 20% respectively compared to HF/HC+Saline mice (Figure 2A-B), and both tended to be lower at week 9 ($p = 0.066$ for BW and $p = 0.073$ for weight gain). Nonetheless, these parameters were still elevated compared to the N group. Similarly to the BW, a 19% decrease in PRF was observed in HF/HC+HRP mice compared to the HF/HC+Saline group with a tendency in SCF ($p = 0.07$) while the PGF was unaffected (Figure 2C).

Conversely, no weight changes were detected in N+HRP mice although a tendency could be observed ($p = 0.08$ for BW starting at week 5 and $p = 0,064$ for a general effect on weight gain, Figure 2A-B). Interestingly, a 31% decrease in PRF mass was observed in N+HRP mice compared to the N+Saline group , while the SCF tended to decrease ($p = 0.07$) (Figure 2C).

In contrast, no impact of the HRP on heart weight was observed in mice on both diets (data not shown). Moreover, the HRP had no effect on weekly food intake. As expected, the HF/HC groups had increased caloric intake compared to those on the N diet (Table S7).

Mouse adipokines

The HF/HC+Saline mice had increased adipose tissue leptin expression compared to their N diet controls (Figure 3A). Interestingly, HRP decreased leptin expression in all adipose tissue by around 48% and 77% in HF/HC+HRP and N+HRP mice respectively (Figure 3A). Similarly, circulating leptin was 2.2-fold higher in HF/HC+Saline mice compared to controls and was decreased by 33% and 54% in HF/HC+HRP and N+HRP mice respectively (Figure

3C). In SCF, resistin mRNA was increased by 2.8-fold in HF/HC+Saline mice compared to their controls and was decreased by 53% in the HF/HC+HRP mice without any changes in VAT (Figure 3B). Conversely, circulating resistin was 1.2-fold higher in HF/HC+Saline mice compared to the N diet controls without any effect of the HRP (Figure 3C). Tumor necrosis factor alpha (TNF α) mRNA expression was increased by around 2.1-fold in PGF and PRF of HF/HC+Saline mice while the HRP decreased it by 48% and 45% only in the PGF of HF/HC+HRP and N+HRP mice respectively (Figure 4A). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) expression was increased by around 1.9-fold in PGF and PRF of HF/HC+Saline mice while the HRP decreased it by 68% and 59% only in the PGF of HF/HC+HRP and N+HRP mice respectively (Figure 4B). F4/80, a marker of macrophage, expression was increased by around 3.5-fold in PGF and PRF of HF/HC+Saline mice while the HRP decreased it by 38% and 36% only in the PGF of HF/HC+HRP and N+HRP mice respectively (Figure 4C)

Index of mouse adipocyte cell size

Mest/Peg1 mRNA, a marker of adipocyte size(22), was increased in all adipose tissue in HF/HC+Saline mice compared to their N diet controls (Figure 5). These values were decreased by around 33% and 57% in HF/HC+HRP and N+HRP mice respectively in all adipose tissue (Figure 5).

Mouse glucose and lipid homeostasis

Circulating triglycerides were increased by 1.4-fold in HF/HC+Saline mice compared to the N+Saline mice and were normalized in HF/HC+HRP mice (Table 2). Although hepatic

triglycerides were also 1.4-fold higher in HF/HC+Saline mice, the HRP had no effect on this parameter (Table 2).

HF/HC+Saline mice had a 3.5-fold increase in circulating insulin and 1.4-fold rise in circulating glucose compared to N+Saline mice. Insulinemia was decreased by 34% and 27% in HF/HC+HRP and N+HRP mice respectively compared to their respective control groups (Table 2). This was not accompanied by a decrease in glycemia in HF/HC+HRP mice although a tendency could be observed (Table 2). Moreover, the G/I ratio was decreased by 55% with obesity whereas this was increased by 1.5-fold in both HF/HC+HRP and N+HRP mice (Table 2). In line with these results, we found that the GLUT1 mRNA was increased in all adipose tissue and in SCF for GLUT4 with obesity (Figure S5A-B) as reported by others in obese rats(23;24). Conversely, GLUT1 and GLUT4 expression were decreased in SCF by 29% and 45% respectively in HF/HC+HRP mice and by 51% and 31% in N+HRP mice. In PRF, 4-56% reduction was observed only in GLUT1 independently of diet (Figure S5A-B).

Mouse heart function

Ejection fraction and fractional shortening measured by echocardiography were decreased by 23% and 26% respectively compared to baseline in HF/HC+Saline mice (Figure 6A-B) as a result of a 1.9-fold increase in systolic and 1.5-fold in diastolic left ventricular volume (LVV) (Table S8). This effect on heart function was prevented by the HRP (Table S8) with a parallel decrease in systolic and diastolic LVV by 31% and 22% respectively.

Discussion

First, we observed that adipose tissue (P)RR was significantly increased by obesity in mice, both male and female, a novel finding that supports our hypothesis that the (P)RR is associated with the development of obesity. This observation seems specific to adipose tissue as the (P)RR was unchanged in other studied tissues. Previous studies comparing lean and obese women have not reported any differences in adipose tissue (P)RR expression although Achard *et al.* suggested its implication in the pathophysiology of obesity as the (P)RR in VAT was increased compared to SCF, similarly to our data in female mice(4;5). However, those studies considered obesity as a homogenous disease when it is well established that there is a wide variation in the prevalence of cardiometabolic risk factors among obese individuals due to differences in age, lifestyle and waist circumference whereas diet induced obesity mice have tightly controlled factors which make them easily comparable(25). As such, it is possible that the reported lack of difference in the (P)RR expression was due to variations in insulin sensitivity and cardiometabolic risk factors among obese subjects. Indeed, our human adipose tissue data showed a 33% increase in the (P)RR mRNA in IRO compared to age and BMI-matched ISO women demonstrating that the (P)RR is modulated by this parameter and could thus contribute to variability.

Renin protein synthesized locally in adipose tissue, assessed indirectly by measuring GFP, was undetectable while total renin content was increased with obesity. This implies that most of the renin in adipose tissue comes from the circulation as observed previously(26). This is further supported by the comparable increases in circulating renin activity detected in obese

mice. Conversely, we found no effect of the HRP on circulating renin activity and gene expression similarly to what has been reported in other studies in different models(6). Given that renin and prorenin bind the (P)RR with a K_D in the nanomolar range, it is unclear whether adipose tissue renin levels are sufficient to induce physiological effects through the (P)RR. However, we have found that renin levels in PGF from obese animals increase to as much as 84% of the renal renin content suggesting that sufficient amounts are present to activate the (P)RR.

The effects of the HRP on BW in mice receiving the HF/HC diet are in contrast to a study in rats showing that a lower HRP dose did not affect the BW of obese transgenic rats overexpressing human renin even after 10 weeks of treatment on a standard chow(10). These divergent results may suggest that the BW phenotype may be specific to obesity induced by HF/HC feeding or that it requires the HRP dose used in our study. Similarly, no effect of the HRP on BW was reported in models of type 1 diabetic rats or in high-energy diet fed non-obese rats, again suggesting that diet-induced obesity is key to the phenotype we are reporting(27;28). Other *in vivo* studies have also questioned the beneficial effect of the HRP on different pathologies(6;7;29) although this may be due to methodological issues as lower doses of the peptide were administered and a shorter duration treatment was used compared to the studies reporting protective effects(6). The most convincing published data regarding the importance of treatment duration comes from 2 studies by the same group showing that a 4 weeks HRP treatment had no effect on cardiovascular damage in spontaneously hypertensive rats whereas 8 weeks of treatment improved cardiac function in the same animal model(6). In

line with these results, a 20% reduction in weight gain in HF/HC+HRP mice could only be observed after 10 weeks of treatment in our study.

Interestingly, studies in obese rodents have shown that ACE inhibitors (ACEi) or Ang II receptor blockers (ARBs) decrease BW by 8 to 32% compared to non-treated groups(30-33). Given that the HRP only reduces local Ang II production without completely blocking its synthesis, the milder effects reported in our study suggest an important role of Ang II production in the HRP effect on BW. However, in contrast to studies with ACEi or ARBs which only observed a reduction in circulating triglycerides(31-33), we have noted a complete normalization implying that Ang II-independent pathways of the (P)RR are also involved in the beneficial effects of the HRP.

Alternatively, it is possible that the HRP reduced intestinal fat absorption. Although inactivation of RAS components such as AGT, renin and ACE in mice increases energy expenditure(34-36), only mice lacking renin have been reported to have decreased intestinal fat absorption(35). Conversely, this was not observed in AGT(34) and ACE(36) knock-out mice, suggesting that this renin effect may be Ang II-independent, potentially through an interaction with the (P)RR.

Similarly to the HRP effects on fat mass, leptin was decreased by the HRP in all adipose tissue and in the circulation independently of the diet. Given that leptin is known to correlate positively with adipose tissue mass(37), our data suggest that the HRP targets fat mass probably due to higher expression of the (P)RR with obesity in adipose tissue. More specifically, it may decrease adipocyte cell size as we found that Mest/Peg, a marker of

adipocytes cell size independently of obesity or diabetes(22), was also decreased in all adipose tissue by the HRP. Moreover, the HRP decreased inflammation and macrophage infiltration in VAT.

In addition, the HRP seems to improve insulin sensitivity as it decreased insulinemia and improved G/I ratio independently of the diet. In agreement with these results, we found an improved GLUT1 and GLUT4 expression pattern in adipose tissue with the administration of the HRP. We also found that the obesity-related increase in SCF resistin mRNA was decreased by the HRP although this was not paralleled by lower circulating levels. This supports the hypothesis that the correlation between insulin resistance and resistin may be due to an effect on the insulin signalling pathways specifically in adipocytes(38) and that regional differences exists between adipose tissue depots(39).

This improved glucose homeostasis is also in line with clinical trials which have reported that administration of ACEi or ARBs seems to reduce the risk of type 2 diabetes compared to other antihypertensive treatments(2). While HRP may have effects in skeletal muscle, as the (P)RR is also expressed in this tissue(3), given that others using type 1 diabetes rodent models do not see any changes in glucose homeostasis with the HRP(6), it is tempting to speculate that the observed effect is due to an action in adipose tissue and may be specific to obesity. Moreover, this hypothesis is further supported by the association we found between insulin sensitivity and human (P)RR where IRO women had increased (P)RR expression in their SCF.

Interestingly, the HRP had a similar effect on mice fed a N diet to those on HF/HC diet for PRF mass, leptin, Mest/Peg1, inflammation markers, circulating insulin levels and G/I ratio although no changes in BW or weight gain were observed. This suggests that metabolic effects

might come before those on the BW and that insulin sensitivity might be improved by the HRP as a result of having less VAT coupled to potentially smaller adipocyte cell size.

Finally, we found that the HRP prevented the fall in cardiac function which is typically associated with the development of obesity(40). This is in line with other studies which have reported similar effects of the HRP on cardiac pathology related to hypertension without any effect on blood pressure(6). This suggests that in addition to improving metabolic status of these animals, the HRP also ameliorates cardiovascular health.

Our data highlights the potential beneficial effects of (P)RR blockade on obesity and its related-cardiometabolic complications. As such, it suggests that it may be a novel preventive and therapeutic avenue for the metabolic syndrome in the future.

Conflict(s) of Interest/Disclosure

None.

Acknowledgments

We thank patients for their involvement in the study as well as Jennifer Levasseur CAO study coordinator. We thank Sonia Kajla for her technical assistance in the animal facility. This research was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research, Heart and Stroke foundation of Canada, Canadian Diabetes Association (CDA) and an unrestricted grant from Merck Frosst Canada. CAO cohort study was funded by Génome Québec. RRL and JLL are supported by scholarships from the Fonds de Recherche du Québec-Santé and RRL holds

the J-A De Sève chair in clinical research. MSG is supported by a CDA fellowship. PT is supported by a Quebec Society of Hypertension scholarship.

References

- (1) Holes-Lewis KA, Malcolm R, O'Neil PM. Pharmacotherapy of obesity: clinical treatments and considerations. *Am J Med Sci.* 2013; **345/4**:284-288.
- (2) Kalupahana NS, Moustaid-Moussa N. The renin-angiotensin system: a link between obesity, inflammation and insulin resistance. *Obes Rev.* 2012; **13/2**:136-149.
- (3) Nguyen G, Delarue F, Burckle C, Bouzahir L, Giller T, Sraer JD. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest.* 2002; **109/11**:1417-1427.
- (4) Engeli S, Bohnke J, Gorzelniak K, Janke J, Schling P, Bader M, Luft FC, Sharma AM. Weight loss and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Hypertension.* 2005; **45/3**:356-362.
- (5) Achard V, Boullu-Ciocca S, Desbriere R, Nguyen G, Grino M. Renin receptor expression in human adipose tissue. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007; **292/1**:R274-R282.

- (6) Ahmed BA, Seda O, Lavoie JL. (Pro)renin receptor as a new drug target. *Curr Pharm Des.* 2011; **17/33**:3611-3621.
- (7) Wilkinson-Berka JL, Heine R, Tan G, Cooper ME, Hatzopoulos KM, Fletcher EL, Binger KJ, Campbell DJ, Miller AG. RILLKKMPSV influences the vasculature, neurons and glia, and (pro)renin receptor expression in the retina. *Hypertension.* 2010; **55/6**:1454-1460.
- (8) Susic D, Lipton H, Knight M, Frohlich ED. Cardiovascular effects of nonproteolytic activation of prorenin. *Hypertension.* 2006; **48/6**:e113.
- (9) Muller DN, Klanke B, Feldt S, Cordasic N, Hartner A, Schmieder RE, Luft FC, Hilgers KF. (Pro)renin receptor peptide inhibitor "handle-region" peptide does not affect hypertensive nephrosclerosis in Goldblatt rats. *Hypertension.* 2008; **51/3**:676-681.
- (10) Gratz P, Boschmann M, Dechend R, Qadri F, Malchow J, Graeske S, Engeli S, Janke J, Springer J, Contrepas A, Plehm R, Klaus S, Nguyen G, Luft FC, Muller DN. Energy metabolism in human renin-gene transgenic rats: does renin contribute to obesity? *Hypertension.* 2009; **53/3**:516-523.
- (11) Krop M, Lu X, Danser AH, Meima ME. The (pro)renin receptor. A decade of research: what have we learned? *Pflugers Arch.* 2013; **465/1**:87-97.

- (12) Jones CA, Hurley MI, Black TA, Kane CM, Pan L, Pruitt SC, Gross KW. Expression of a renin-green fluorescent protein transgene in mouse embryonic, extra-embryonic and adult tissues. *Physiol Genomics*. 2000; **4**:75-81.
- (13) Ichihara A, Suzuki F, Nakagawa T, Kaneshiro Y, Takemitsu T, Sakoda M, Nabi AH, Nishiyama A, Sugaya T, Hayashi M, Inagami T. Prorenin receptor blockade inhibits development of glomerulosclerosis in diabetic angiotensin II type 1a receptor-deficient mice. *J Am Soc Nephrol*. 2006; **17**:1950-1961.
- (14) Schiller PW, Nguyen TM, Berezowska I, Dupuis S, Weltrowska G, Chung NN, Lemieux C. Synthesis and in vitro opioid activity profiles of DALDA analogues. *Eur J Med Chem*. 2000; **35**:895-901.
- (15) Nabi AH, Biswas KB, Nakagawa T, Ichihara A, Inagami T, Suzuki F. Prorenin has high affinity multiple binding sites for (pro)renin receptor. *Biochim Biophys Acta*. 2009; **1794**:1838-1847.
- (16) Nabi AH, Biswas KB, Nakagawa T, Ichihara A, Inagami T, Suzuki F. 'Decoy peptide' region (RIFLKRMPST) of prorenin prosegment plays a crucial role in prorenin binding to the (pro)renin receptor. *Int J Mol Med*. 2009; **24**:83-89.
- (17) Lavoie ME, Rabasa-Lhoret R, Doucet E, Mignault D, Messier L, Bastard JP, Faraj M. Association between physical activity energy expenditure and inflammatory markers in sedentary overweight and obese women. *Int J Obes (Lond)*. 2010; **34**:1387-1395.

- (18) Karelis AD, Faraj M, Bastard JP, St-Pierre DH, Brochu M, Prud'homme D, Rabasa-Lhoret R. The metabolically healthy but obese individual presents a favorable inflammation profile. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; **90**/7:4145-4150.
- (19) Bouchard L, Rabasa-Lhoret R, Faraj M, Lavoie ME, Mill J, Perusse L, Vohl MC. Differential epigenomic and transcriptomic responses in subcutaneous adipose tissue between low and high responders to caloric restriction. *Am J Clin Nutr.* 2010; **91**/2:309-320.
- (20) Li W, Peng H, Cao T, Sato R, McDaniels SJ, Kobori H, Navar LG, Feng Y. Brain-targeted (pro)renin receptor knockdown attenuates angiotensin II-dependent hypertension. *Hypertension.* 2012; **59**/6:1188-1194.
- (21) Giacchetti G, Sechi LA, Griffin CA, Don BR, Mantero F, Schambelan M. The tissue renin-angiotensin system in rats with fructose-induced hypertension: overexpression of type 1 angiotensin II receptor in adipose tissue. *J Hypertens.* 2000; **18**/6:695-702.
- (22) Takahashi M, Kamei Y, Ezaki O. Mest/Peg1 imprinted gene enlarges adipocytes and is a marker of adipocyte size. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005; **288**/1:E117-E124.
- (23) Pedersen O, Kahn CR, Kahn BB. Divergent regulation of the Glut 1 and Glut 4 glucose transporters in isolated adipocytes from Zucker rats. *J Clin Invest.* 1992; **89**/6:1964-1973.

- (24) Hainault I, Guerre-Millo M, Guichard C, Lavau M. Differential regulation of adipose tissue glucose transporters in genetic obesity (fatty rat). Selective increase in the adipose cell/muscle glucose transporter (GLUT 4) expression. *J Clin Invest.* 1991; **87/3**:1127-1131.
- (25) Wildman RP, Muntner P, Reynolds K, McGinn AP, Rajpathak S, Wylie-Rosett J, Sowers MR. The obese without cardiometabolic risk factor clustering and the normal weight with cardiometabolic risk factor clustering: prevalence and correlates of 2 phenotypes among the US population (NHANES 1999-2004). *Arch Intern Med.* 2008; **168/15**:1617-1624.
- (26) Muller DN, Luft FC. The renin-angiotensin system in the vessel wall. *Basic Research in Cardiology.* 1998; **93**:7-14.
- (27) Ichihara A, Hayashi M, Kaneshiro Y, Suzuki F, Nakagawa T, Tada Y, Koura Y, Nishiyama A, Okada H, Uddin MN, Nabi AH, Ishida Y, Inagami T, Saruta T. Inhibition of diabetic nephropathy by a decoy peptide corresponding to the "handle" region for nonproteolytic activation of prorenin. *J Clin Invest.* 2004; **114/8**:1128-1135.
- (28) Yin GS, Lin SD, Xu DC, Sun RQ, Lin K, Lin CJ. Handle Region Peptide Ameliorating Insulin Resistance but Not beta Cell Functions in Male Rats Neonatally Treated with Sodium L-Glutamate. *Int J Endocrinol.* 2013; **2013**:493828.

- (29) Batenburg WW, van den Heuvel M, van Esch JH, van VR, Garrelds IM, Leijten F, Danser AH. The (pro)renin receptor blocker handle region peptide upregulates endothelium-derived contractile factors in aliskiren-treated diabetic transgenic (mREN2)7 rats. *J Hypertens*. 2013; **31/2**:292-302.
- (30) Zhao Y, Zhao S, Kuge Y, Tamaki N. Elevated 18F-FDG levels in blood and organs after angiotensin II receptor blocker administration: experiment in mice administered telmisartan. *J Nucl Med*. 2013; **54/8**:1384-1388.
- (31) Renaud IM, Chainey A, Belair MF, Mandet C, Michel O, Myara I, Chevalier J, Plante GE. Long-term protection of obese Zucker rat kidneys from fibrosis and renal failure with an angiotensin-converting enzyme inhibitor/diuretic combination. *Fundam Clin Pharmacol*. 2004; **18/4**:437-447.
- (32) Blanco S, Vaquero M, Gomez-Guerrero C, Lopez D, Egido J, Romero R. Potential role of angiotensin-converting enzyme inhibitors and statins on early podocyte damage in a model of type 2 diabetes mellitus, obesity, and mild hypertension. *Am J Hypertens*. 2005; **18/4 Pt 1**:557-565.
- (33) Araki K, Masaki T, Katsuragi I, Tanaka K, Kakuma T, Yoshimatsu H. Telmisartan prevents obesity and increases the expression of uncoupling protein 1 in diet-induced obese mice. *Hypertension*. 2006; **48/1**:51-57.

- (34) Massiera F, Seydoux J, Geloën A, Quignard-Boulangé A, Turban S, Saint-Marc P, Fukamizu A, Negrel R, Ailhaud G, Teboul M. Angiotensinogen-deficient mice exhibit impairment of diet-induced weight gain with alteration in adipose tissue development and increased locomotor activity. *Endocrinology*. 2001; **142/12**:5220-5225.
- (35) Takahashi N, Li F, Hua K, Deng J, Wang CH, Bowers RR, Bartness TJ, Kim HS, Harp JB. Increased energy expenditure, dietary fat wasting, and resistance to diet-induced obesity in mice lacking renin. *Cell Metab*. 2007; **6/6**:506-512.
- (36) Jayasooriya AP, Mathai ML, Walker LL, Begg DP, Denton DA, Cameron-Smith D, Egan GF, McKinley MJ, Rodger PD, Sinclair AJ, Wark JD, Weisinger HS, Jois M, Weisinger RS. Mice lacking angiotensin-converting enzyme have increased energy expenditure, with reduced fat mass and improved glucose clearance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; **105/18**:6531-6536.
- (37) Yiannikouris F, Gupte M, Putnam K, Cassis L. Adipokines and blood pressure control. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2010; **19/2**:195-200.
- (38) Stepan CM, Wang J, Whiteman EL, Birnbaum MJ, Lazar MA. Activation of SOCS-3 by resistin. *Mol Cell Biol*. 2005; **25/4**:1569-1575.
- (39) Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev*. 2000; **21/6**:697-738.

- (40) Aurigemma GP, de SG, Fitzgibbons TP. Cardiac remodeling in obesity. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2013; **6/1**:142-152.

Table 1. Renin-angiotensin system components mRNA expression in human subcutaneous adipose tissue

	ISO	IRO
	(N = 13)	(N = 9)
h(P)RR/18s	1.00 ± 0.08	1.33 ± 0.12*
hAT1R/18s	1.00 ± 0.11	1.49 ± 0.16*
hAGT/18s	1.00 ± 0.16	1.40 ± 0.28
hACE/18s	1.00 ± 0.09	1.27 ± 0.15

Values are normalized to 18s expression and are expressed as means ± SE of fold difference in IRO vs ISO group. * p < 0.05 compared to ISO. ISO, insulin-sensitive obese; IRO, insulin-resistant obese; h(P)RR, human (pro)renin receptor; hAT1R, human angiotensin II type 1 receptor; hAGT, human angiotensinogen; hACE, human angiotensin-converting enzyme.

Table 2. Effect of the HRP on mouse hepatic and circulating metabolites

	Normal diet		HF/HC diet	
	Saline	HRP	Saline	HRP
Hepatic triglycerides (mg/g liver)	65.48 ± 12.62	64.73 ± 16.06	89.44 ± 7.09*	82.55 ± 9.22*
Triglycerides (mmol/L)	2.43 ± 0.08	2.55 ± 0.16	3.48 ± 0.41*	2.22 ± 0.12†
Glucose (mmol/L)	13.33 ± 1.71	13.02 ± 1.34	18.00 ± 1.11*	15.37 ± 1.08*
Insulin (pmol/L)	42.96 ± 3.97	31.24 ± 6.41†	150.26 ± 20.19*	99.69 ± 18.01*†
Glucose/Insulin ratio	0.29 ± 0.03	0.42 ± 0.10†	0.13 ± 0.01*	0.20 ± 0.04*†

Concentrations are expressed as means ± SE. * p < 0.05 compared to N diet; † p < 0.05 compared to saline. N+Saline (N = 7), N+HRP (N = 7), HF/HC+Saline (N = 7) and HF/HC+HRP (N = 9) for triglycerides, glucose, insulin, Glucose/Insulin ratio. N+Saline (N = 11), N+HRP (N = 8), HF/HC+Saline (N = 10) and HF/HC+HRP (N = 10) for hepatic triglycerides.

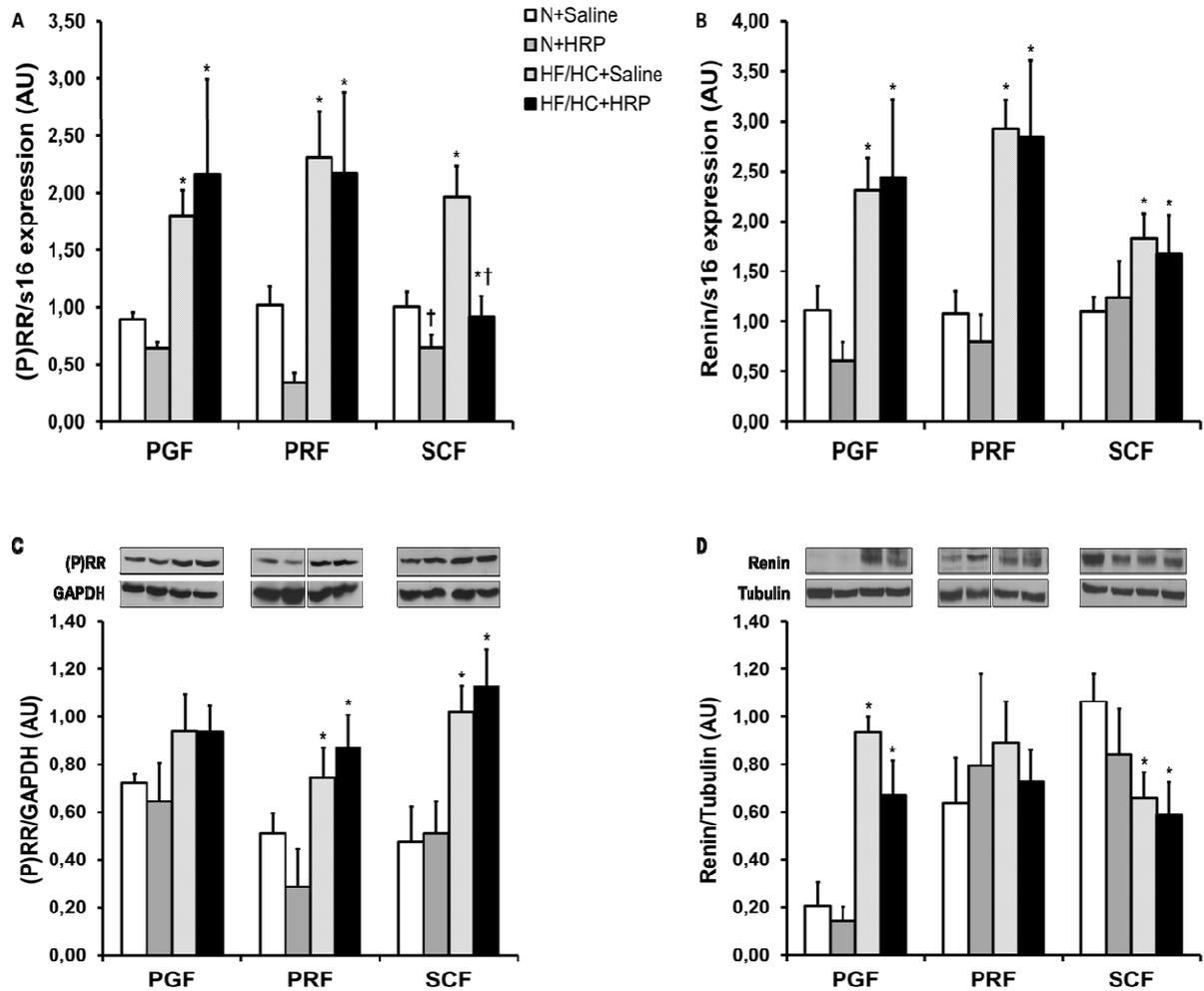


Figure 1. Effect of the HRP on mouse (P)RR and renin mRNA and protein in adipose tissues. (P)RR (A) and renin (B) mRNA data are presented as a ratio to s16 expression. (P)RR (C) and renin (D) protein data are expressed as a ratio to GAPDH and tubulin respectively. Images shown for (P)RR and renin in each tissues are from the same blot. Protein from the kidney (25 μ g) was used as a positive control for (D). Values are expressed as means \pm SE. * $p < 0.05$ compared to N diet; † $p < 0.05$ compared to saline. mRNA expression: N+Saline (N = 12), N+HRP (N = 10), HF/HC+Saline (N = 13) and HF/HC+HRP (N = 9). Protein expression: N+Saline (N = 4-5), N+HRP (N = 4-5), HF/HC+Saline (N = 6-7) and HF/HC+HRP (N = 6-7). PGF, peri-gonadal fat; PRF, peri-renal fat; SCF, abdominal subcutaneous fat.

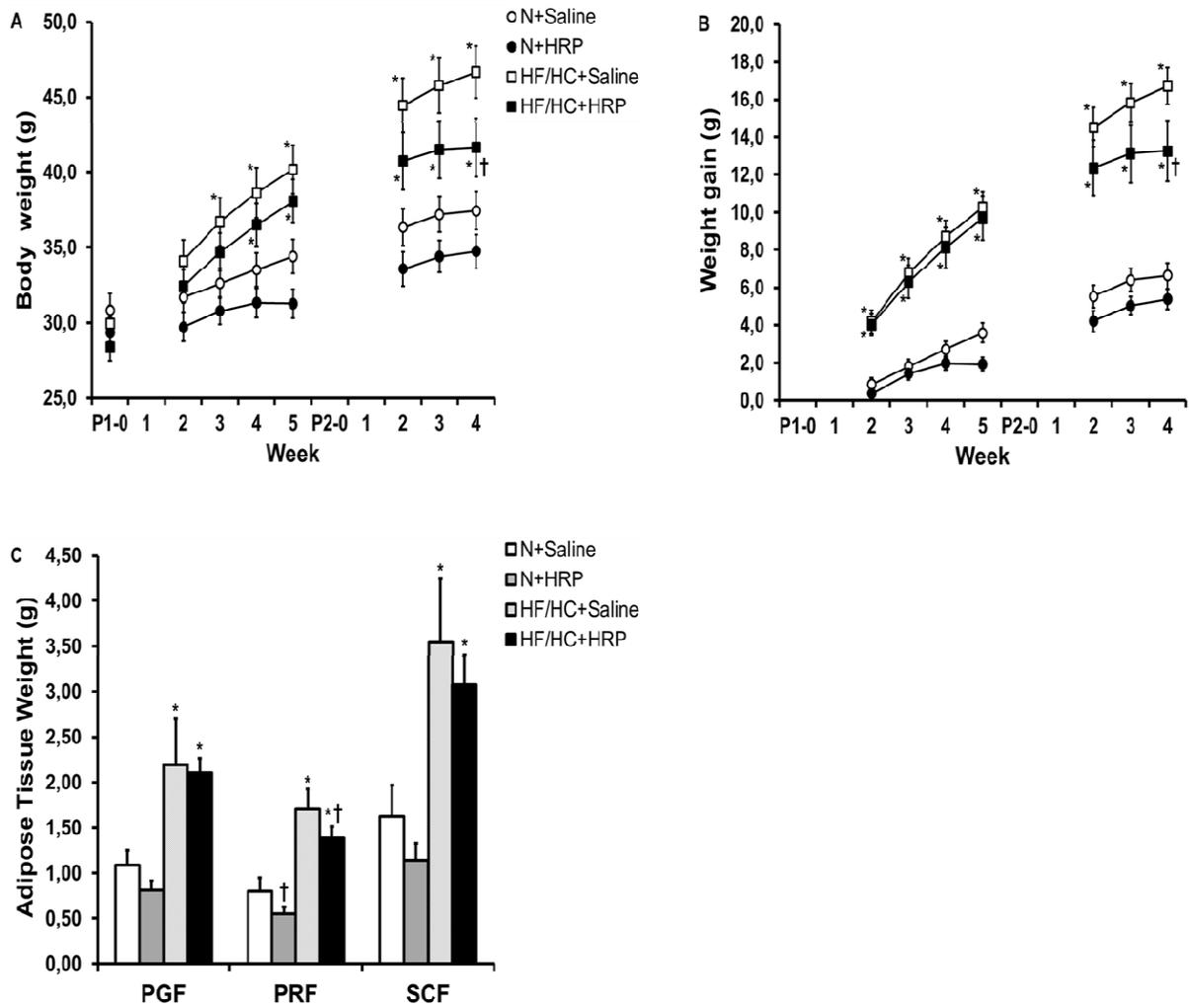


Figure 2. Effect of the HRP on mouse body weight, weight gain and adipose tissue weight. Body weight (A), weight gain (B) and adipose tissue weight (C) are presented. Values are expressed as means \pm SE. * $p < 0.05$ compared to N diet; † $p < 0.05$ compared to saline. N+Saline (N = 15), N+HRP (N = 10), HF/HC+Saline (N = 14) and HF/HC+HRP (N = 13). P1-0, pump 1-week 0; P2-0, pump 2-week 0. PGF, peri-gonadal fat; PRF, peri-renal fat; SCF, abdominal subcutaneous fat.

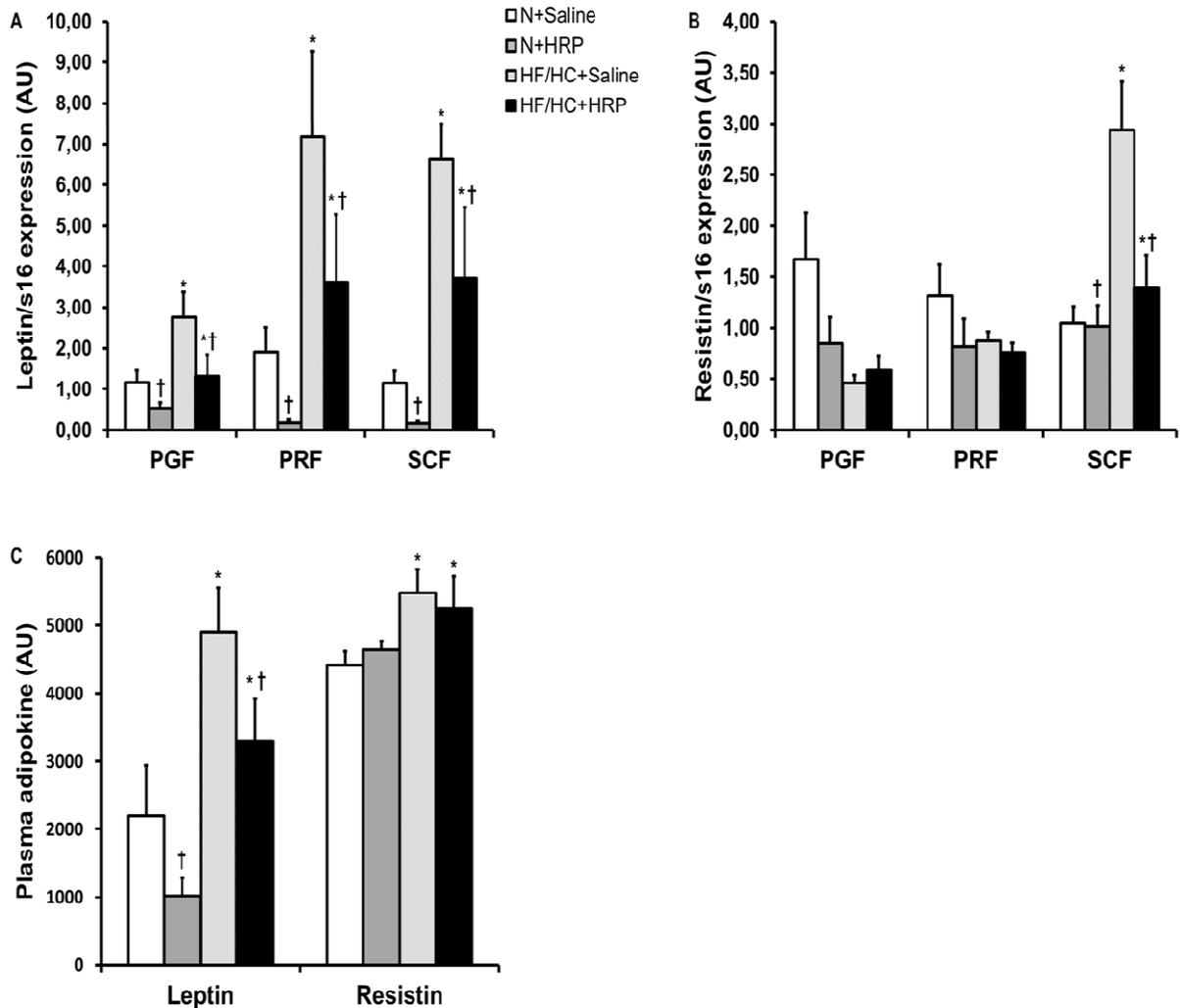


Figure 3. Effect of the HRP on mouse adipokine mRNA in adipose tissues and circulating levels. Leptin (A), resistin (B) mRNA and circulating levels (C). Expression data are presented as a ratio to s16 expression. Values are expressed as means \pm SE. * $p < 0.05$ compared to N diet; † $p < 0.05$ compared to saline. mRNA expression : N+Saline (N = 12), N+HRP (N = 10), HF/HC+Saline (N = 13) and HF/HC+HRP (N = 9). Circulating levels: N+Saline (N = 4), N+HRP (N = 4), HF/HC+Saline (N = 4) and HF/HC+HRP (N = 4). PGF, peri-gonadal fat; PRF, peri-renal fat; SCF, abdominal subcutaneous fat.

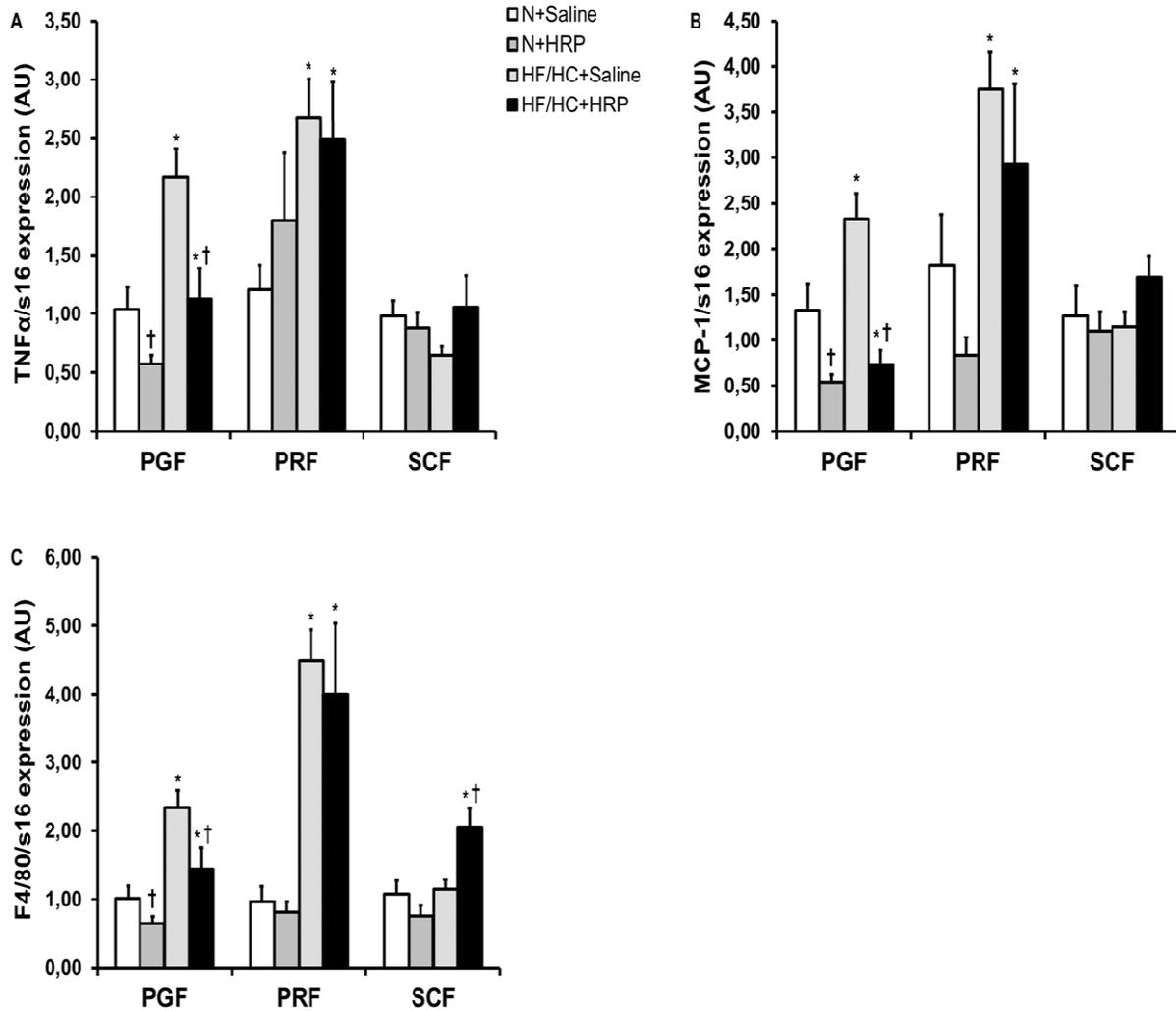


Figure 4. Effect of the HRP on mouse inflammation markers mRNA in adipose tissues.

TNF α (A), MCP-1 (B) and F4/80 (C) mRNA. Expression data are presented as a ratio to s16 expression. Values are expressed as means \pm SE. * $p < 0.05$ compared to N diet; † $p < 0.05$ compared to saline. N+Saline (N = 12), N+HRP (N = 10), HF/HC+Saline (N = 13) and HF/HC+HRP (N = 9). PGF, peri-gonadal fat; PRF, peri-renal fat; SCF, abdominal subcutaneous fat.

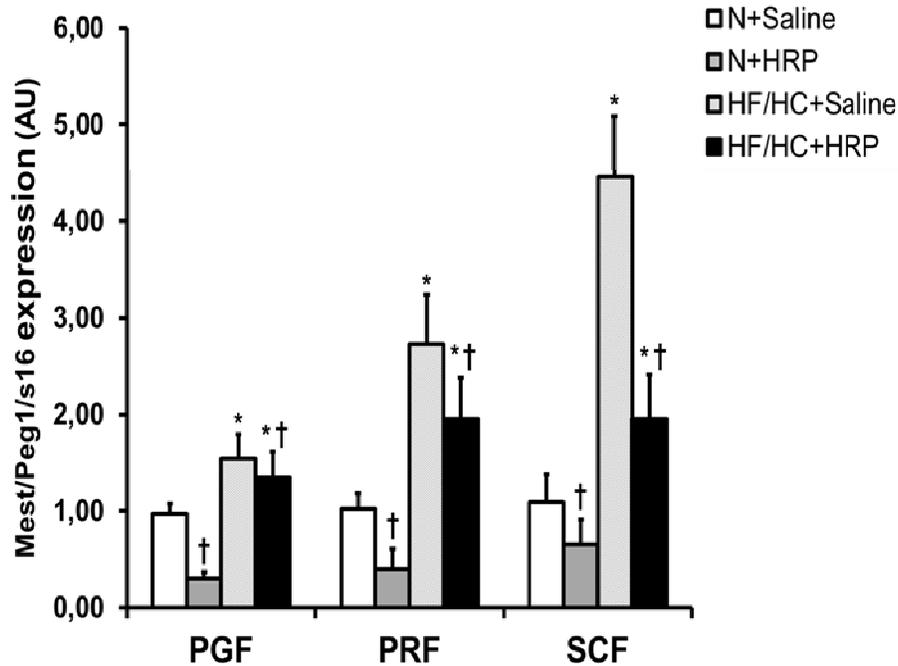


Figure 5. Effect of the HRP on mouse Mest/Peg1 mRNA in adipose tissues. Mest/Peg1 data are presented as a ratio s16 expression. Values are expressed as means \pm SE. * $p < 0.05$ compared to N diet; † $p < 0.05$ compared to saline. N+Saline (N = 12), N+HRP (N = 10), HF/HC+Saline (N = 13) and HF/HC+HRP (N = 9). PGF, peri-gonadal fat; PRF, peri-renal fat; SCF, abdominal subcutaneous fat.

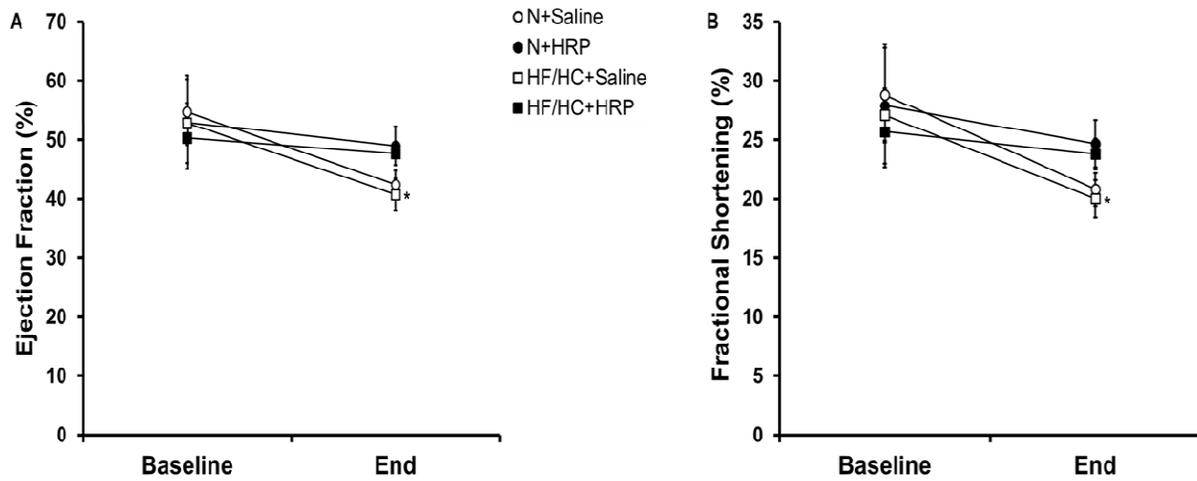


Figure 6. Effect of the HRP on mouse heart function. Ejection fraction (A) and fractional shortening (B). Values are expressed as means \pm SE. * $p < 0.05$ compared to baseline. N+Saline (N = 6), N+HRP (N = 5), HF/HC+Saline (N = 7) and HF/HC+HRP (N = 8).

ONLINE SUPPORTING INFORMATION

IMPACT OF THE (PRO)RENIN RECEPTOR ON THE DEVELOPMENT OF OBESITY AND ASSOCIATED CARDIOMETABOLIC RISK FACTORS

Paul Tan*^{1,2,8}, Zulaykho Shamansurova*^{1,3,8}, Sandra Bisotto¹, Catherine Michel¹, Marie-Soleil Gauthier^{8,9}, Rémi Rabasa-Lhoret^{1,4,8,9}, Thi M.-D. Nguyen⁸, Peter W. Schiller^{6,9}, Jolanta Gutkowska^{1,5} and Julie L. Lavoie^{1,7,8}

¹Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM)

²Department of Biochemistry and molecular medicine, ³Physiology, ⁴Nutrition, ⁵Medecine and, ⁶Pharmacology and ⁷Kinesiology of the Université de Montréal, ⁸Montreal Diabetes Research Center and ⁹Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Montréal, Québec, Canada,

*These authors contributed equally to this work

Correspondence to:

Julie L. Lavoie, PhD

Centre de Recherche du CHUM (CRCHUM)

900, rue Saint-Denis, bureau R08.452

Montréal, Québec, Canada, H2X 0A9

Tel: (514) 890-8000 ext. 23612

Fax: (514) 412-7655

Expanded material and methods

Animals. All experiments were carried out on mice expressing green fluorescent protein under the control of the renin promoter (REN-GFP)(1) (generous gift from Dr. Kenneth Gross at the Buffalo Cancer Institute). Mice were maintained by backcross breeding to C57BL/6 (Charles River, St-Constant, QC, Canada). Mice were 12-15 weeks of age and were maintained on 12-h light/dark cycle with access to either normal (N) diet (2018; Harlan Laboratories, Madison, WI) or high-fat/high-carbohydrate (HF/HC) diet (F3282; Bio-Serv, Frenchtown, NJ) and water *ad libitum*. All experiments were carried out in male mice. In addition, the impact of obesity on the (P)RR and renin were confirmed in female mice as previous studies looking at human adipose tissue (P)RR have been conducted only in women. Mice body weight (BW) and food weight were measured weekly. Care of the mice used in the experiments complied with standards for the care and use of experimental animals set by the Canadian Council for the Protection of Animals, and all procedures were approved by the University Animal Care and Use Committee at the CHUM Research Center.

Handle region peptide (HRP) synthesis. The mouse peptide IPLKKMPS(2) was synthesized by the manual solid-phase technique(3). Its purity was established by thin-layer chromatography and analytical RP-HPLC. The structural identity was established by electrospray mass spectrometry: ES-MS [M+H]⁺ 913.49. This peptide, consisting of part of the prosegment region (10P–19P) of prorenin, has been shown to bind directly to the (P)RR *in vitro* with a dissociation constant (K_D) of 3.5 nM(4,5). Furthermore, it was confirmed that HRP could prevent binding of both renin and prorenin to the receptor with a dissociation constant (K_I) of 16.7 nM and 15.1 nM respectively(4).

HRP administration. To assess the impact of the (P)RR on obesity development, mice were anesthetized and implanted subcutaneously, under isoflurane anesthesia (induction at 4% and maintained at 2% in oxygen), with an osmotic mini-pump (model #1004; Alzet, Cupertino, CA) filled with either the HRP or saline. The peptide was administered at a published effective dose of 0.1 mg/kg/day(2,6). This procedure was repeated after 4-5 weeks to ensure constant

administration of the peptide as these are 28-42 days pump (length varies according to lot). Concomitantly, the mice received either a N or HF/HC diet for 10 weeks.

Mouse tissue collection. Mice were sacrificed by CO₂ asphyxiation and multiple tissues (visceral adipose tissue (VAT) from whole peri-renal (PRF), peri-gonadal (PGF), and abdominal subcutaneous fat (SCF), heart, liver and kidney) were collected, weighed and snap-frozen in liquid nitrogen until assayed. N varies for experiments with fat pads due to limited amount of adipose tissue. Blood was collected by intrathoracic cardiac puncture and placed in a chilled 1.5 ml tube containing 15µl of 500 mM EDTA (pH8.0) (EMD, Gibbstown, NJ, USA). Plasma was separated by centrifugation and samples were snap frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until assayed. For measurement of circulating glucose and insulin, mice were fasted overnight before tissue collection whereas triglycerides were assessed in non-fasted animals.

Human CAO cohort study. The cohort used to obtain the samples analysed in this study were from post-menopausal non-diabetic obese women enrolled from 2006 to 2007 in the Complications Associated with Obesity (CAO) Study. The study was conducted according to the guidelines laid down in the Declaration of Helsinki and both studies were approved by the University of Montreal ethics committee. All subjects gave a written informed consent before the study started. The main objective of this study is to understand susceptibility to cardiometabolic complication in obese women. The inclusion/exclusion criteria of this study were reported(7). Briefly, post-menopausal women were included in the study if they 1) were obese with a body mass index (BMI) between 30 to 40 kg/m², 2) were aged between 55 to 70 years old, 3) had biological confirmation of the menopause status without taking hormone replacement therapy, 4) were non diabetic (fasting glucose <7.1 mmol*l⁻¹ or 2-h plasma glucose <11.1 mmol*l⁻¹ after a 75g OGTT), 5) non-smokers, and 6) were not taking medications known to interfere with metabolism except stable hypothyroidism replacement therapy. All participants were free of chronic or inflammatory diseases and no history of alcohol or drug abuse. Women were then subdivided into 2 groups, insulin-sensitive obese (ISO) and insulin-resistant obese (IRO), based on their insulin sensitivity as measured using

by the 3-hour hyperinsulinemic euglycemic clamp and classified based on a cut-off proposed in a previous study(8). More specifically, patients who had a steady-state glucose disposal rate (GDR) ≤ 9.5 mg/min/kg fat free mass (FFM) were classified as IRO and ≥ 12.0 mg/min/kg FFM as ISO. Before the clamp procedure subcutaneous adipose tissue biopsy samples were obtained after an overnight fast from the periumbilical level at both side of the body by needle biopsy under local anesthesia (20 mg xylocaine/mL) as previously described(9). Biopsy samples were washed from excess blood in saline, quickly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis. 59 subjects were included in the CAO study out of which 26 accepted the adipose tissue sub-study. For the present work adipose tissue biopsy samples were available for 22 patients (ISO: N = 13 and IRO: N = 9) for gene expression analysis.

Insulin sensitivity in human cohort. The study began at 07-30 h after a 12-h overnight fast. An antecubital vein was cannulated for the infusion of 20% dextrose and insulin (Actrapid, Novo-Nordisk, Toronto, Canada). The other arm was cannulated for sampling of blood. Plasma glucose was measured every 10 min with a glucose analyzer (Beckman Instruments, Fullerton, CA) and maintained at fasting level with a variable infusion rate of 20% dextrose. Insulin infusion was initiated at the rate of $75 \text{ mU/m}^2 \cdot \text{min}$ for 180 min. GDR was calculated as the mean rate of glucose infusion measured during the last 30 min of the clamp (steady state).

Real-time PCR. Gene expression was evaluated for (P)RR, renin, leptin, resistin, mesoderm-specific transcript/paternally expressed gene 1 (Mest/Peg1), glucose transporter 1 (GLUT1), GLUT4, $\text{TNF}\alpha$, MCP-1 and F4/80 in mouse and for (P)RR, Ang II type 1 receptor (AT1R), AGT and angiotensin converting enzyme (ACE) in human using the primer sequences and conditions provided in Table S1 and S2. RNA was extracted from mouse tissues using Trizol (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) and from human tissue with RNeasy total RNA Mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. To remove genomic DNA, RNA samples were incubated with 2 U deoxyribonuclease I (DNase I; Invitrogen)/ μg RNA for 30 min at 37°C . Single-stranded cDNA was synthesized by reverse-transcriptase reaction using SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). The real-time PCR final volume was $10 \mu\text{l}$ and contained $0.3 \mu\text{mol/l}$ of the specific forward (F) and reverse (R) primers

as well as 2.5 µl of single-stranded cDNA template in Rotor-Gene SYBR PCR Mastermix (Qiagen) a 1X final concentration. Primer sequences and Real Time PCR conditions for each gene are provided in Table S1 and S2, respectively. Real-time PCR for human renin and human angiotensinogen was done with TaqMan Gene Expression Assay (Hs00982550_m1 and Hs01586213_m1; Applied Biosystems, Foster City, CA) with 2 µl of single-stranded cDNA template in a total volume of 20 µl. Each sample was run and analyzed in duplicate. Expression levels are expressed as relative values to s16 for mouse. In human, samples were normalized to 18s and are expressed as fold difference relative to gene expression in the ISO group.

Western Blot. Proteins were extracted from adipose tissues with lysis buffer and quantified by Bradford assay (Bio-Rad). Protein (50 µg) were separated by electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes (Amersham, Baie d'Urfe, QC). Membrane were blocked followed by overnight incubation at 4°C with primary antibody for (P)RR (1:750, generous gift from Dr. Yumei Feng at Tulane University), GFP (1:200, Chemicon International), renin (0,75µg/mL, Molecular Innovations), GAPDH (1:2000, Santa Cruz), β-actin (Abcam) and tubulin (1:30000, Abcam). Goat anti-rabbit (Santa Cruz, sc-2004) was used as secondary secondary. Bands were revealed using the ECL West Pico kit (Pierce, Rockford, IL). Each protein signal was normalized to its respective GAPDH or tubulin.

Metabolism. Mouse plasma was tested for quantitative determination of triglycerides (Sigma, Oakville, Canada), glucose (Wako) and insulin (Millipore [Linco]) according to the manufacturer's protocol. Insulin sensitivity was estimated by calculating the ratio of fasting blood glucose to insulin (G/I).

Circulating adipokines. 50 µl of plasma was used to measure the relative circulating adipokine level using the mouse adipokine array (R&D systems, Minneapolis, USA) following the manufacturer's protocol.

Renin activity measurement. RIA was performed on plasma with the Ang-I I¹²⁵-labeled RIA kit (Diasorin, Stillwater, MN) to assess mouse renin activity according to manufacturer's instructions as done previously(10,11).

Echocardiography. Transthoracic echocardiographic studies were performed before and at the end of treatment by high-resolution ultrasound biomicroscopy (Vevo660; Visualsonics, Toronto, ON, Canada) equipped with 25-55 MHz probes that allow tracings of time-varying M-mode dimensions of the left ventricle (LV) as done previously(12).

Statistical analysis. All values are expressed as means \pm standard error (SE). A 2-way ANOVA was used to assess the effect of diet and the HRP. For parameters measured at many time points, a repeated measure 2-way ANOVA was applied. If interactions were detected for these analyses, a Tukey post-hoc test was used. Differences in human gene expression were determined by non-parametric Mann–Whitney U tests. For renin mRNA in female mice, a Pearson's Chi-square was done. A $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Supplementary Figures

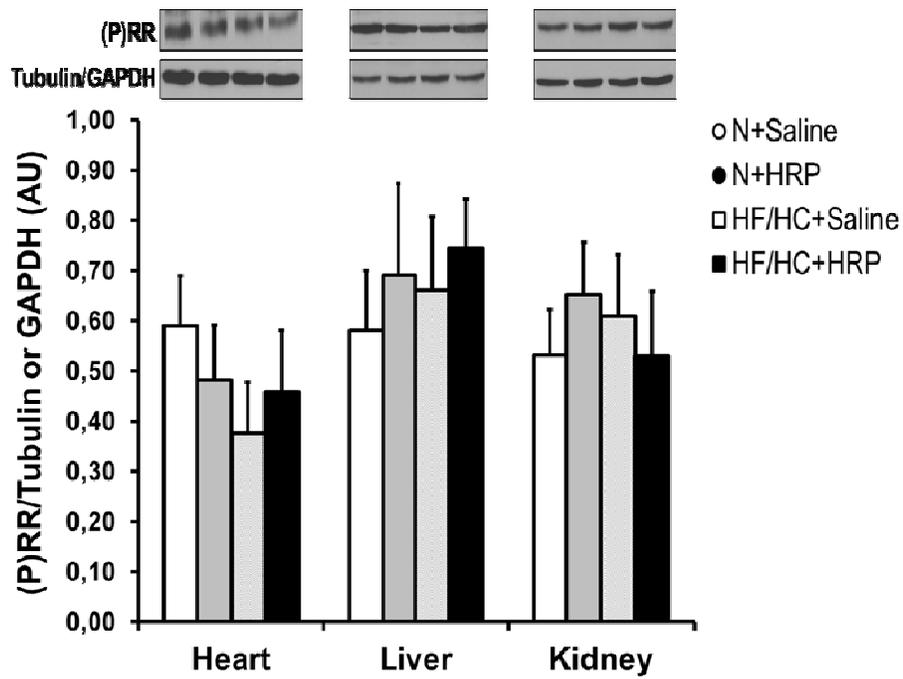


Figure S1. (P)RR protein in the heart, liver and kidney is not modified by diet and treatment. (P)RR protein data are expressed as a ratio to tubulin or GAPDH. Values are expressed as means \pm SE. N+Saline (N = 6), N+HRP (N = 6), HF/HC+Saline (N = 6) and HF/HC+HRP (N = 6).

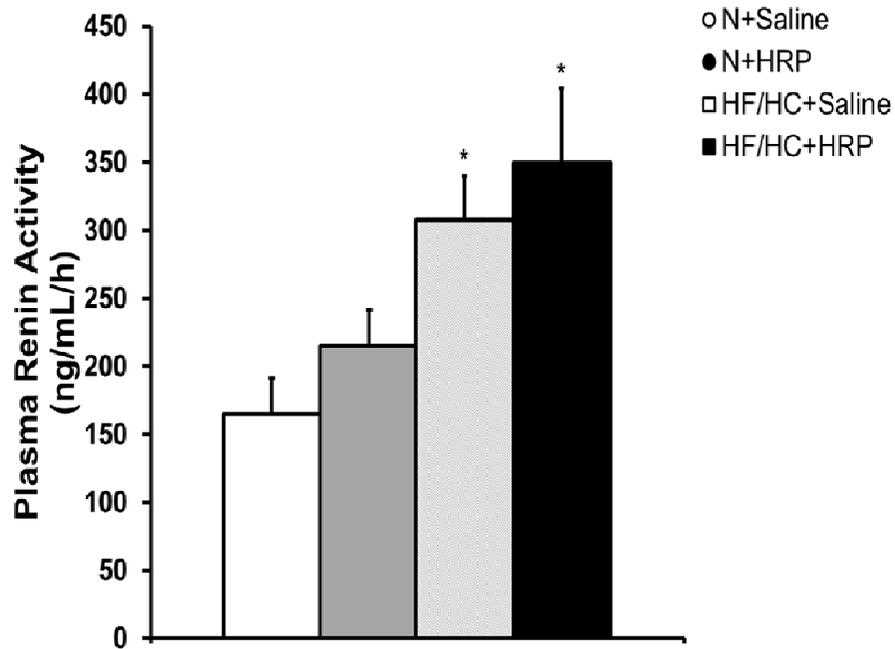


Figure S2. Effect of the HRP on mouse plasma renin activity. Values are expressed as means \pm SE. * $p < 0.05$ compared to N diet group. N+Saline (N = 6), N+HRP (N = 11), HF/HC+Saline (N = 9) and HF/HC+HRP (N = 10).

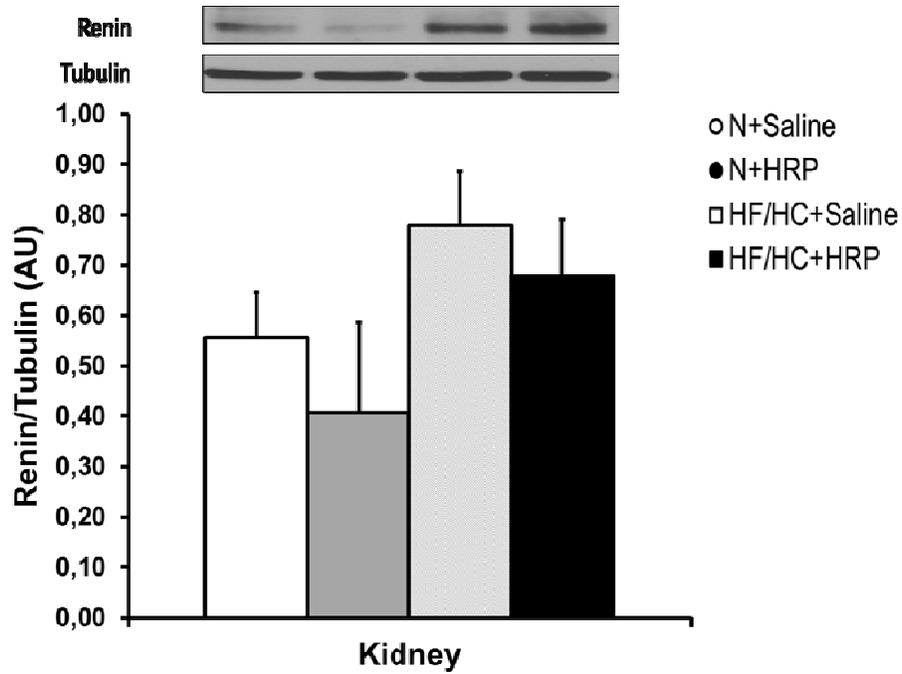


Figure S3. Renin protein in the kidney. Renin protein data are expressed as a ratio to tubulin. Values are expressed as means \pm SE. N+Saline (N = 7), N+HRP (N = 7), HF/HC+Saline (N = 7) and HF/HC+HRP (N = 7).

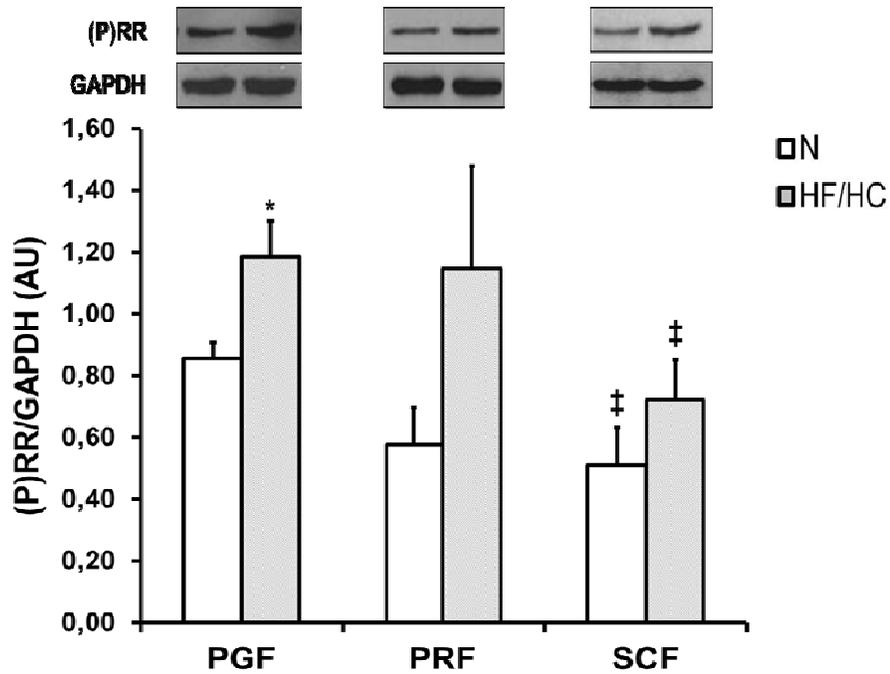


Figure S4. Effect of HF/HC diet on female mice (P)RR protein in adipose tissue. (P)RR protein data are expressed as a ratio to GAPDH. Values are expressed as means \pm SE. * $p < 0.05$ compared to N diet; ‡ $p < 0.05$ compared to PGF. N diet (N = 8) and HF/HC diet (N = 8). PGF, peri-gonadal fat; PRF, peri-renal fat; SCF, abdominal subcutaneous fat.

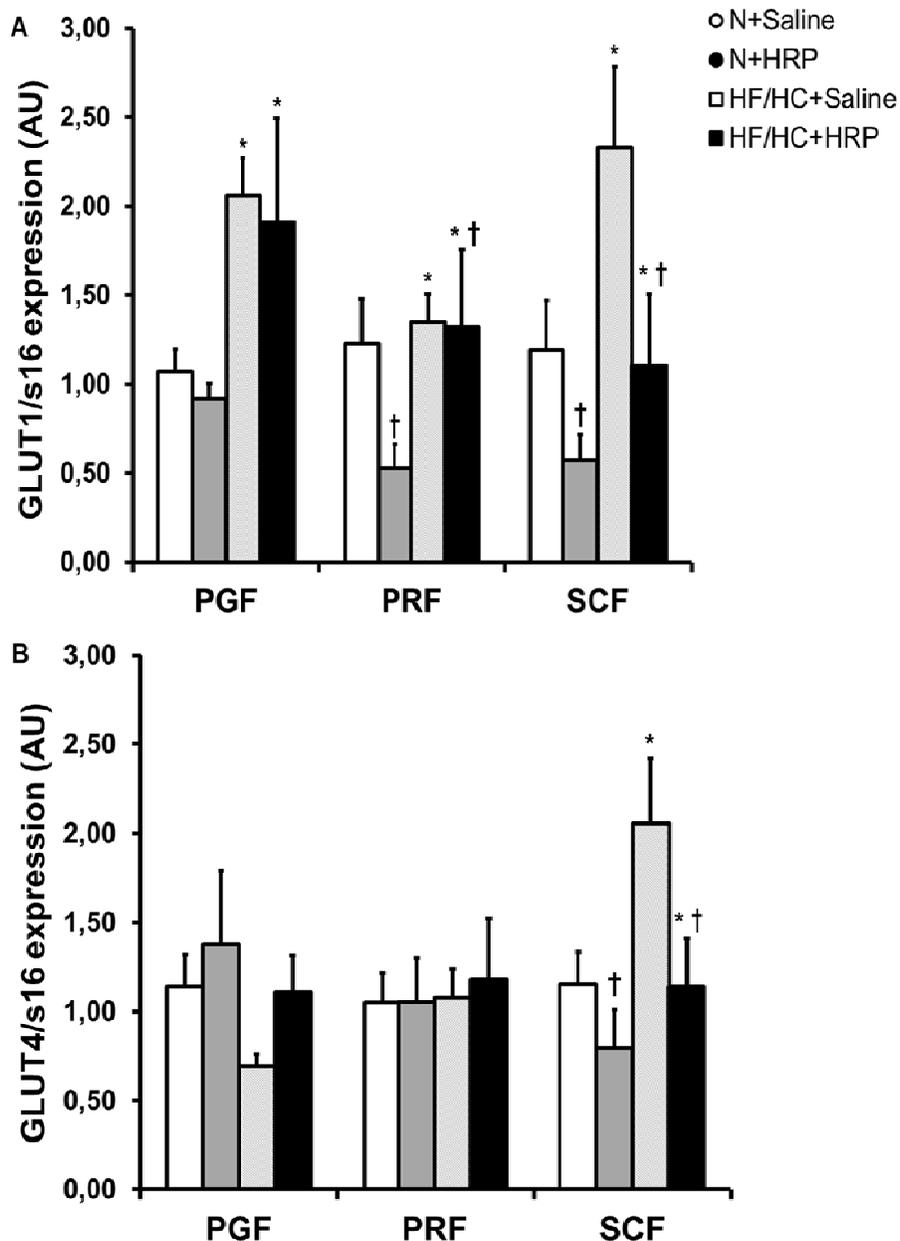


Figure S5. Effect of the HRP on mouse GLUT1 and GLUT4 mRNA expression in adipose tissues. GLUT1 (A) and GLUT4 (B) expression data are presented as a ratio to s16 expression. Values are expressed as means \pm SE. * $p < 0.05$ compared to the N diet group; † $p < 0.05$ compared to saline. N+Saline (N = 12), N+HRP (N = 10), HF/HC+Saline (N = 13) and HF/HC+HRP (N = 9). PGF, peri-gonadal fat; PRF, peri-renal fat; SCF, abdominal subcutaneous fat.

Supplementary Tables

Table S1. Primer sequences for mice (m) and human (h) mRNA expression

Gene	Gene name	Forward primer sequence (5' → 3')	Reverse primer sequence (5' → 3')
m(P)RR	(pro)renin receptor	TTTGGATGAACTTGGGAAGC	CACAAGGGATGTGTCGAATG
mRen	Renin	AGCAAGGGCGAGGAACTGTTCAGT	GGTGGACAGGTAATGGTTGTCTGGG
mLep(13)	Leptin	GGGCTTCACCCCATCTGA	GGCTATCTGCAGCACATTTTG
mRes(14)	Resistin	TCACTTTTCACCTCTGTGGATATGAT	TGCCCCAGGTGGTGTAAA
mMest/Peg1(15)	Mesoderm-specific transcript/paternally expressed gene 1	GTTTTTCACCTACAAAGGCCTACG	CACACCGACAGAATCTTGGTAGAA
mGlut1(16)	Glucose transporter 1	GCTGTGCTTATGGGCTTCTC	CACATACATGGGCACAAAGC
mGlut4(16)	Glucose transporter 4	ACATACCTGACAGGGCAAGG	CGCCCTTAGTTGGTCAGAAG
mTNF α	Tumor necrosis factor alpha	CACGCTCTTCTGTCTACTG	AAGATGATCTGAGTGTGAGG
mMCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1	ATTGGGATCATCTTGCTGGT	CCTGCTGTTACAGTTGCC
mF4/80	-	TGACAACCAGACGGCTTGTG	GCAGGCGAGGAAAAGATAGTGT
ms16(17)	40S ribosomal protein s16	ATCTCAAAGGCCCTGGTAGC	ACAAAGGTAAACCCCGATCG
hACE	Angiotensin converting enzyme	TGTGGAACGAGTATGCCGAGGC	GTGCCGTACTIONCAGGGTGTGGTTG
hAT1R(18)	Angiotensin II type 1 receptor	ATGATTCCACCAGCGCCTGAC	GGTCCAGACGTCCTGCTGCTACT
h(P)RR	(pro)renin receptor	GCTCCCAGTGAGGAAAGAGTGTATAT	GCGCAAGGTGACTGAAAGG
h18s	40S ribosomal protein 18s	CTGAGAAACGGCTACACATC	GGCCTCGAAAGAGTCCTGTAT

Table S2. Real Time PCR conditions for mice (m) and human (h) mRNA expression

Gene	Hold	Denaturation	Annealation	Elongation
m(P)RR, mRen	94°C 15 min	94°C 15 s	60°C 30 s	72°C 30 s
mLep	94°C 15 min	94°C 15 s	55°C 30 s	72°C 30 s
mRes	94°C 15 min	94°C 15 s	55°C 30 s	72°C 30 s
mGlut1, mGlut4	94°C 15 min	94°C 15 s	55°C 30 s	72°C 30 s
mMest/Peg1, ms16	95°C 5 min	95°C 5 s	60°C 10 s	-
mTNF α , mF4/80	95°C 10 min	95°C 15 s	58°C 30 s	72°C 30 s
mMCP-1	95°C 10 min	95°C 15 s	60°C 30 s	72°C 30 s
hREN, hAGT	50°C 2 min; 95°C 10 min	95°C 15 s	60°C 60 s	-
hACE, hAT1R and h(P)RR	94°C 15 min	94°C 15 s	60°C 30 s	72°C 30 s
h18s	94°C 15 min	94°C 15 s	59°C 30 s	72°C 30 s

Table S3. Renin level in adipose tissue compared to the kidney

	Normal diet		HF/HC diet	
	Saline	HRP	Saline	HRP
Ratio PGF/Kidney (%)	19 ± 9	13 ± 5	84 ± 6*	60 ± 13*
Ratio PRF/Kidney (%)	41 ± 16	50 ± 14	45 ± 8	31 ± 9
Ratio SCF/Kidney (%)	96 ± 11	75 ± 17	59 ± 10*	53 ± 12*

Values are expressed as means ± SE. * $p < 0.05$ compared to N diet. PGF, peri-gonadal fat; PRF, peri-renal fat; SCF, abdominal subcutaneous fat.

Table S4. Effect of HF/HC diet on female mice renin mRNA in adipose tissues.

	Normal diet	HF/HC diet
	(N = 8)	(N = 8)
PGF (AU)	0.00 ± 0.00	2.32x10 ⁻¹ ± 1.06x10 ⁻¹ *
PRF (AU)	1.42x10 ⁻¹ ± 1.42x10 ⁻¹	2.51x10 ⁻¹ ± 1.04x10 ⁻¹
SCF (AU)	0.00 ± 0.00	5.04x10 ⁻¹⁰ ± 3.37x10 ⁻¹⁰ *

Values are expressed as means ± SE. * p < 0.05 compared to N diet. PGF, peri-gonadal fat; PRF, peri-renal fat; SCF, abdominal subcutaneous fat.

Table S5. Female mice body and adipose tissue weight.

	Normal diet	HF/HC diet
	(N = 8)	(N = 8)
Initial body weight (g)	21.7 ± 0.6	21.5 ± 0.5
Final body weight (g)	25.2 ± 0.8†	34.2 ± 2.1§†
PGF (g)	0.76 ± 0.10	2.46 ± 0.40*
PRF (g)	0.43 ± 0.06	1.28 ± 0.16*
SCF (g)	0.57 ± 0.07	1.98 ± 0.17*

Values are expressed as means ± SE. * p < 0.05 compared to N diet; † p < 0.05 compared to initial weight. PGF, peri-gonadal fat; PRF, peri-renal fat; SCF, abdominal subcutaneous fat.

Table S6. Characteristics in human subjects for the CAO cohort study.

	IRO	ISO
	(N = 13)	(N = 9)
Age (years)	56.0 ± 1.30	59.5 ± 0.94
BMI (kg/m ²)	34.06 ± 1.26	33.54 ± 0.69
Fat mass (g)	48.07 ± 0.71	47.06 ± 0.80
Waist to hip ratio	0.893 ± 0.020	0.870 ± 0.012

Values are expressed as means ± SE. BMI, body mass index; IRO, insulin-resistant obese; ISO, insulin-sensitive obese.

Table S7. Weekly food consumption

Week	Normal Diet (kcal/week)		HF/HC Diet (kcal/week)	
	Saline (N = 8)	HRP (N = 5)	Saline (N = 6)	HRP (N = 8)
P-1-2	13.3 ± 0.8	12.2 ± 1.5	13.3 ± 1.5*	14.2 ± 0.6*
P-1-3	13.8 ± 0.7	13.7 ± 1.5	16.3 ± 1.3*	17.1 ± 0.5*
P-1-4	13.5 ± 0.9	13.0 ± 0.8	15.0 ± 1.2*	14.5 ± 0.4*
P-1-5	12.4 ± 0.5	13.5 ± 0.6	15.1 ± 1.1*	14.1 ± 0.4*
P-2-2	11.7 ± 1.5	11.7 ± 2.9	16.0 ± 1.4*	14.8 ± 0.5*
P-2-3	16.0 ± 1.3	16.5 ± 1.6	15.9 ± 1.1*	14.9 ± 0.4*
P-2-4	13.7 ± 0.7	13.1 ± 0.6	15.6 ± 1.4*	14.3 ± 0.5*
Total (kcal)	123.3 ± 3.8	121.0 ± 5.5	148.9 ± 9.9*	142.2 ± 3.8*

Values are expressed as means ± SE. * p < 0.05 compared to N diet.

Table S8. Effect of the HRP on left ventricular volume

Timeline	Normal Diet				HF/HC Diet			
	Saline (N = 6)		HRP (N = 5)		Saline (N = 7)		HRP (N = 8)	
	Baseline	End	Baseline	End	Baseline	End	Baseline	End
LVV;d (μl)	76.5 ± 5.3	87.4 ± 7.7	69.7 ± 10.7	89.3 ± 8.3	68.7 ± 3.8	102.4 ± 9.2*	70.7 ± 5.9	80.0 ± 7.3†
LVV;s (μl)	35.8 ± 6.0	50.3 ± 5.3*	33.2 ± 8.6	45.9 ± 5.8*	32.2 ± 2.5	60.1 ± 4.8*	35.2 ± 5.0	41.2 ± 3.2

Values are expressed as means ± SE. * p < 0.05 compared to Baseline; † p < 0.05 compared to saline. LVV, Left ventricular volume; d, diastole; s, systole.

Reference List

1. Jones CA, Hurley MI, Black TA et al. Expression of a renin-green fluorescent protein transgene in mouse embryonic, extra-embryonic and adult tissues. *Physiol Genomics*. 2000;4:75-81.
2. Ichihara A, Suzuki F, Nakagawa T et al. Prorenin receptor blockade inhibits development of glomerulosclerosis in diabetic angiotensin II type 1a receptor-deficient mice. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(7):1950-61.
3. Schiller PW, Nguyen TM, Berezowska I et al. Synthesis and in vitro opioid activity profiles of DALDA analogues. *Eur J Med Chem*. 2000;35(10):895-901.
4. Nabi AH, Biswas KB, Nakagawa T, Ichihara A, Inagami T, Suzuki F. Prorenin has high affinity multiple binding sites for (pro)renin receptor. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1794(12):1838-47.
5. Nabi AH, Biswas KB, Nakagawa T, Ichihara A, Inagami T, Suzuki F. 'Decoy peptide' region (RIFLKRMPSI) of prorenin prosegment plays a crucial role in prorenin binding to the (pro)renin receptor. *Int J Mol Med*. 2009;24(1):83-9.
6. Ahmed BA, Seda O, Lavoie JL. (Pro)renin receptor as a new drug target. *Curr Pharm Des*. 2011;17(33):3611-21.

7. Lavoie ME, Rabasa-Lhoret R, Doucet E et al. Association between physical activity energy expenditure and inflammatory markers in sedentary overweight and obese women. *Int J Obes (Lond)*. 2010;34(9):1387-95.
8. Karelis AD, Faraj M, Bastard JP et al. The metabolically healthy but obese individual presents a favorable inflammation profile. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(7):4145-50.
9. Bouchard L, Rabasa-Lhoret R, Faraj M et al. Differential epigenomic and transcriptomic responses in subcutaneous adipose tissue between low and high responders to caloric restriction. *Am J Clin Nutr*. 2010;91(2):309-20.
10. Lavoie JL, Lake-Bruse KD, Sigmund CD. Increased blood pressure in transgenic mice expressing both human renin and angiotensinogen in the renal proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004;286(5):F965-F971.
11. Lavoie JL, Liu X, Bianco RA, Beltz TG, Johnson AK, Sigmund CD. Evidence supporting a functional role for intracellular renin in the brain. *Hypertension*. 2006;47(3):461-6.
12. Falcao S, Stoyanova E, Cloutier G, Maurice RL, Gutkowska J, Lavoie JL. Mice overexpressing both human angiotensinogen and human renin as a model of superimposed preeclampsia on chronic hypertension. *Hypertension*. 2009;54(6):1401-7.

13. Dusaulcy R, Rancoule C, Gres S et al. Adipose-specific disruption of autotaxin enhances nutritional fattening and reduces plasma lysophosphatidic acid. *J Lipid Res.* 2011;52(6):1247-55.
14. Ikeda Y, Hama S, Kajimoto K, Okuno T, Tsuchiya H, Kogure K. Quantitative comparison of adipocytokine gene expression during adipocyte maturation in non-obese and obese rats. *Biol Pharm Bull.* 2011;34(6):865-70.
15. Nukitrangsan N, Okabe T, Toda T, Inafuku M, Iwasaki H, Oku H. Effect of Peucedanum japonicum Thunb extract on high-fat diet-induced obesity and gene expression in mice. *J Oleo Sci.* 2012;61(2):89-101.
16. Montel-Hagen A, Blanc L, Boyer-Clavel M et al. The Glut1 and Glut4 glucose transporters are differentially expressed during perinatal and postnatal erythropoiesis. *Blood.* 2008;112(12):4729-38.
17. Mercure C, Prescott G, Lacombe MJ, Silversides DW, Reudelhuber TL. Chronic increases in circulating prorenin are not associated with renal or cardiac pathologies. *Hypertension.* 2009;53(6):1062-9.
18. Dolley-Hitze T, Jouan F, Martin B et al. Angiotensin-2 receptors (AT1-R and AT2-R), new prognostic factors for renal clear-cell carcinoma? *Br J Cancer.* 2010;103(11):1698-705.

Chapitre 7 - Article 2

Prorenin/renin blockade implication in triglyceride/free fatty acid cycling and beiging in subcutaneous adipose tissue of obese mice

Auteurs : Paul Tan, Carolane Blais, Thi M.-D. Nguyen, Peter W. Schiller, Jolanta Gutkowska et Julie L. Lavoie

Revue: American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism

Statut de publication : Article soumis le 9 septembre 2015

Contribution des auteurs

Paul Tan : premier auteur ayant fait les expériences d'immunobuvardage et de qPCR, l'analyse des résultats, la préparation des figures, la rédaction et la révision du manuscrit et les corrections demandées par les évaluateurs. Les expériences faites par l'auteur ont généré la Figure 3B et 5-10. L'auteur a également conçu et préparé la Figure 1, 2 et 11.

Carolane Blais : coauteure ayant fait les expériences de qPCR et l'analyse des résultats. Les expériences faites par l'auteure ont généré la Figure 3A, 3C, et 4.

Thi M.-D. Nguyen : coauteure ayant synthétisé le HRP.

Peter W. Schiller : coauteur ayant synthétisé le HRP.

Jolanta Gutkowska : co-directrice de recherche et co-auteure ayant révisé le manuscrit.

Julie L. Lavoie : directrice de recherche et auteure correspondante ayant conçu et supervisé la recherche, effectué les chirurgies sur les souris, mesuré le poids

hebdomadaire des souris, le sacrifice et la collecte de tissus et la révision du manuscrit.

Prorenin/Renin Blockade Implication in Triglyceride/Free Fatty Acid Cycling and Beiging in Subcutaneous Adipose Tissue of Obese Mice

Paul Tan^{1,2,6}, Carolane Blais^{2*}, Thi M.-D. Nguyen⁷, Peter W. Schiller^{4,7}, Jolanta Gutkowska^{1,3} and Julie L. Lavoie^{1,5,6}

Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM)¹, Department of Biochemistry and Molecular Medicine², Medicine³, Pharmacology⁴ and Kinesiology of the Université de Montréal⁵, Montreal Diabetes Research Center⁶ and Institut de Recherches Cliniques de Montréal⁷, Montréal, Québec, Canada.

J.L.L. and J.G. conception and design of research. P.T., C.B., T. M.-D. and P.W.S performed experiments. P.T and C.B. analyzed data. P.T. interpreted results of experiments. P.T. prepared figures. P.T. drafted manuscript. P.T, C.B., T. M.-D. and P.W.S, J.G. and J.L.L. edited and revised manuscript.

Key words: obesity; prorenin and renin receptor; handle region peptide; lipid metabolism; fat beiging

Running title: HRP treatment improves metabolic health in obese mice

Correspondence to: Julie L. Lavoie, PhD, Centre de Recherche du CHUM (CRCHUM), 900 rue Saint-Denis, bureau R08.452, Montréal, Québec, Canada, H2X 0A9, Tel: (514) 890-8000 ext. 23612, Fax: (514) 412-7655

ABSTRACT

We have recently shown that administration of the handle region peptide (HRP), a (pro)renin receptor ((P)RR) blocker, decreased body weight gain, visceral adipose tissue (VAT) weight and potentially improved insulin sensitivity in mice fed a high-fat/high-carbohydrate diet (HF/HC). This study was performed to elucidate potential mechanisms leading to these observations. We show here in mice fed a HF/HC diet that administration of HRP increased the expression of several enzymes implicated in lipogenesis and lipolysis in subcutaneous fat (SCF) while the expression for the enzyme implicated in the last step of lipogenesis decreased in VAT. Reduced circulating free fatty acid levels were also observed in the same animals. "Beiging" is defined as the presence of brown-like adipocytes in white fat which is characterized by increased mitochondrial density and thermogenesis. HRP increased PR domain containing 16 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha coactivator 1-alpha expression in SCF of mice fed a HF/HC diet suggesting that "beiging" may be activated in this fat pad. Put together, a possible mechanism could be that HRP favours healthy storage of circulating free fatty acids within healthy SCF vs. unhealthy VAT and that HRP may activate the triglyceride/free fatty acid cycling in SCF as suggested by increased lipogenesis and lipolysis enzymes expression.

INTRODUCTION

The renin-angiotensin system (RAS) is important in the development of obesity. Excessive calorie intake and sedentary lifestyle lead to increased weight gain and obesity, as reviewed in (7). Obesity is associated with complications such as type 2 diabetes, cardiovascular disease and cancer (for review see (18)). The systemic RAS is well known for its regulation of blood pressure and fluid homeostasis (30). Both humans and rodents have similar types of white adipose tissue that stores fat which include subcutaneous fat (SCF) and visceral adipose tissue (VAT) in which VAT is further subdivided into organ-specific fat depots, including gonadal and retroperitoneal fat (64). On the other hand, brown adipose tissue has been known to dissipate energy as heat, as reviewed in (4). In 2001, a local RAS in adipose tissue from lean mice was described and found to contribute approximately 30% to the systemic RAS (28). The local RAS in adipose tissue (also present in many other tissues) could be very important in obesity, where increased fat mass may further contribute to the local and systemic RAS, as this may be implicated in the development of its associated complications.

The local RAS in adipose tissue modulates lipogenesis, lipolysis and adipogenesis. In both obese humans and rodents, components of the RAS are upregulated in adipose tissue (3; 13; 44; 60). The rate limiting step in the RAS is the conversion of angiotensinogen to angiotensin (Ang) I by renin (Fig. 1A). Ang I is ultimately converted to Ang II by the angiotensin converting enzyme. Ang II is the main effector of the RAS and its effects are mediated by binding to Ang II receptor type 1 (AT1R) and/or type 2 (AT2R) (Fig. 1A). It has been shown that Ang II is able to dose-dependently increase triglyceride (TG) content in 3T3-L1 adipocytes and human subcutaneous adipocytes by upregulating key enzymes implicated in

lipogenesis (TG synthesis) such as fatty acid synthase (FAS) and glycerol-3-phosphate dehydrogenase via AT2R (Fig. 1A) (25). Ang II also inhibits lipolysis (TG breakdown) and adipogenesis (*de novo* formation of small adipocyte) in human subcutaneous adipose tissue via AT1R (14; 15; 24) (Fig. 1A). Altogether, this suggests that binding of Ang II to AT1R and AT2R favours weight gain due to increased lipogenesis, decreased lipolysis and reduced adipogenesis (Fig 1A). Thus, there is a clear link between increased local RAS in adipose tissue, its contribution to the systemic RAS and the development of obesity, as reviewed in (16).

(Pro)renin receptor amplifies local RAS in adipose tissue. Both prorenin and renin (collectively known as (pro)renin) are present in blood and tissues where they bind to the (pro)renin receptor, (P)RR, which is present on the cell membrane as a component of the local RAS in adipose tissue ((P)RR is also present in many other tissues) (Fig. 1A). When (pro)renin binds to the (P)RR, renin activity increases 4-fold while prorenin is rendered non-proteolytically active. As a result, Ang II production increases and activation of Ang II dependent pathways increase (34). Binding to (P)RR also activates several Ang II independent pathways which are at present only partly understood, but have been implicated in diabetes complications that affect the kidney and the eyes (2). As shown in Fig. 1A, these intracellular signalling pathways include the extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2), p38 kinase and c-Jun N-terminal kinase (JNK) (2). These 3 kinases are members of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) family and are also activated through AT1R signalling by Ang II, as reviewed in (8). Last but not least, a negative feedback loop exists to downregulate (P)RR gene expression when (pro)renin binds to the receptor (Fig. 1A) (47; 48). This binding causes

translocation of the promyelocytic leukaemia zinc finger (PLZF) protein, from the cytoplasm to the nucleus, and act as a transcription factor to repress the expression of the receptor. It was previously reported that (P)RR expression is similar in SCF and VAT from lean and obese women (1; 9). In contrast, we have recently shown that (P)RR mRNA and protein are increased in both visceral and subcutaneous fat from obese mice (57). We also demonstrated that (P)RR mRNA is increased in SCF of insulin resistant vs. insulin sensitive obese non-diabetic women (63). The discrepancy between the human and our mouse studies is probably due to differences in insulin sensitivity and cardiometabolic risk factors which were not controlled sufficiently in the human studies. (P)RR may thus be a key factor involved in obesity because it amplifies local RAS and leads to increased intracellular pathways which modulate lipogenesis, lipolysis and adipogenesis.

Handle region peptide (HRP). The handle region peptide (HRP), a (P)RR blocker, is part of the prosegment from prorenin. Competitive binding of HRP to the receptor has been shown *in vitro* (32; 33). In contrast to the renin inhibitor aliskiren which binds to renin and potently blocks Ang II production, when HRP binds to the (P)RR, it only partly decreases Ang II production (Fig 1B). This is because soluble renin which is not bound to the (P)RR is able to produce Ang I. Thus, HRP binding will reduce the Ang II dependent and block the Ang II independent pathways although its effect on PLZF is unclear (Fig 1B). Beneficial effects (some controversial) have been attributed to HRP administered at a dose of 0.1 mg/kg/day in animal models of different pathologies, such as diabetic nephropathy and diabetic retinopathy, as reviewed in (2). Compared to the initial studies, the controversy generated by the later studies may be due to the lower HRP doses and shorter duration times used (10; 31; 55). To

our knowledge, our group is the first to study the effect of HRP in a mouse model of diet-induced obesity (57).

Rational and hypothesis. We have previously reported that the (P)RR is increased specifically in adipose tissue of mice rendered obese by a high-fat/high-carbohydrate diet (57). We showed that concomitant treatment with HRP led to beneficial effects, including: 1) reduced body weight; 2) decreased VAT weight; 3) reduced levels of inflammation markers; 4) normalized plasma TGs; 5) reduced plasma insulin levels and, 6) potential improvement in insulin sensitivity (57). The mechanisms underlying the beneficial effects of HRP that we observed in our mouse model of obesity are currently unknown. We hypothesize here that HRP binding to (P)RR will modulate components implicated in lipogenesis (e.g. fatty acid synthase and diglyceride acyltransferase 1), in lipolysis (e.g. adipose triglyceride lipase and hormone sensitive lipase) and adipogenesis (e.g. peroxisome proliferator-activated receptor gamma PPAR γ) (26; 41) as a result of its Ang II dependent and independent pathways (Fig. 1B). We therefore aimed in the present study to elucidate the mechanisms by which HRP reduces body weight and potentially improves insulin sensitivity in obese mice.

Beige adipocytes are characterized as brown-like cells accompanied by increased mitochondrial biogenesis and fat thermogenesis, as reviewed in (21). "Beiging" in white adipose tissue containing mainly white adipocytes is typically elucidated by evaluating gene expression of brown fat specific markers, including PR domain containing 16 and PPAR γ coactivator 1-alpha (21). Based on the work described here, our hypothesis has been expanded

to include the idea that HRP may also activate "beiging" in white adipose tissue in our mouse model of diet-induced obesity.

MATERIALS AND METHODS

The present report is a continuation of a study described in our previous publication (57) and focuses on elucidating the mechanisms involved in HRP's effects on obesity using the same mouse model.

Animals. C57BL/6 male mice were used in this study as illustrated schematically in Fig. 2, and as previously described by our team (57). Briefly, mice ($n = 10-15/\text{group}$) were fed a normal (N) diet (2018; Harlan Laboratories, Madison, WI) until 12-15 weeks of age. Half the group were then kept on the N diet and were concomitantly treated either with saline or with the handle region peptide (HRP; 0.1 mg/kg/day) using mini osmotic pumps placed subcutaneously (model #1004; Alzet, Cupertino, CA) for 10 weeks. The other half switched from N diet to HF/HC diet (F3282; Bio-Serv, Frenchtown, NJ) to induce obesity (20) and was concomitantly treated with saline or HRP (same dose) as described for the N diet group. All groups of mice received a second pump 5 weeks after starting the treatment to ensure constant administration of HRP. The 4 groups of mice were named as follows: 1) N diet treated with saline (N+Saline); 2) N diet treated with HRP (N+HRP); 3) HF/HC diet treated with saline (HF/HC+Saline); and, 4) HF/HC diet treated with HRP (HF/HC+HRP). Mice had free access to food and water *ad libitum*. Mice were sacrificed at 22-25 weeks of age and visceral adipose tissue (VAT), including peri-gonadal fat (PGF) and peri-renal fat (PRF), as well as abdominal subcutaneous fat (SCF) were collected and snap frozen in liquid nitrogen for molecular

analysis. As fat pads have fewer materials to work with compared to other tissues, the *n*/group for experiments on fat is different. Blood was also collected by heart puncture, and plasma was then prepared by centrifugation and frozen in liquid nitrogen. Care of the mice used in the experiments complied with standards for the care and use of experimental animals set by the Canadian Council for the Protection of Animals, and all procedures were approved by the University Animal Care and Use Committee at the CHUM Research Center.

Real-time PCR. Frozen fat samples were pulverized into powder and RNA was extracted with Trizol (15596-018; Life Technologies), treated with DNase I (EN0521; Thermo Scientific) and reverse-transcribed into cDNA using random primer (48190-011; Invitrogen), RiboLock RNase Inhibitor (EN0381; Thermo Scientific) and Maxima Reverse Transcriptase (EN0742; Thermo Scientific), according to the manufacturer's protocol. Gene expression was evaluated using quantitative PCR (Rotor Gene RG-3000; Corbett Research) using Faststart SYBR Green Master fluorescent dye (04 673 492 001; ROCHE). Details of the primers are listed in Table 1.

Western Blot (denatured). Western Blotting was done as described previously (27). Briefly, proteins were extracted from pulverized adipose tissue with RIPA lysis buffer containing 50 mM HEPES pH 7.5, 137 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 2 mM Na₃VO₄, 10 mM Na₄P₂O₇, 10 mM NaF, 2 mM EDTA, 1% NP-40, 34µg/mL PMSF, and protease inhibitor cocktail tablets (11 836 153001; ROCHE). Protein concentrations were assessed by the Bradford method (500-0006; Bio-Rad) and 20-50 µg of denatured protein was separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (162-0115; Bio-Rad). Membranes

were blocked with 5% milk or BSA in tris buffered saline-tween (TBS-T) for 1 h at room temperature. Details of the antibodies used are shown in Table 2. Membranes were incubated with primary antibodies (diluted in 5% milk or BSA with TBS-T) overnight at 4°C on a rocking platform, and then with secondary antibodies (see Table 2) diluted in the same buffer for 1 h at RT, and washed with TBS-T between incubations. Signals were revealed with SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (34080; Thermo Scientific). Band density was quantified with ImageJ software (49). All bands were normalized to tubulin protein levels (Table 2). To detect total protein levels, primary phospho protein antibodies were stripped from the membranes with Re-Blot Plus (2502; Millipore) as per the manufacturer's protocol, and membranes were subsequently reblotted with the corresponding anti-total endogenous protein (Table 2). Phospho protein levels were normalized to their corresponding total endogenous protein levels, unless the latter were modulated by diet or HRP treatment, in which case the data was normalized to tubulin protein levels.

Western Blot (non-denatured). Mouse plasma high molecular weight adiponectin complexes were evaluated using the antibody described in Table 2. Mouse plasma samples were thawed and diluted 1:5 in sterile phosphate buffered saline (10010-023; Life Technology), while non-denatured proteins (10 µL) were resolved by native PAGE and transferred to nitrocellulose membranes as described previously (27). Membranes were blocked and incubated with primary anti-adiponectin followed by secondary antibody (Table 2) and signals were detected as described above.

Plasma metabolites. Quantitative determination of plasma metabolites was performed according to the manufacturers' protocols as follows: free fatty acids (FFA) (994-75409 ;Wako), and glycerol (TR0100; Sigma), by colorimetric assay.

Statistical analysis. Data were expressed as the means \pm standard error (SE) and analysed by 2-way ANOVA to assess the effect of diet and treatment. A *post-hoc* Tukey analysis was done if an interaction was significant. For the correlation analysis, slopes were compared using Prism 6.0. A $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

HRP treatment may not have an effect on generating substrates for lipogenesis in VAT.

Fatty acid synthase (FAS) is a key enzyme involved in generating the substrate fatty acid CoA (FACoA) for lipogenesis from free fatty acid (FFA), as reviewed in (41). FAS mRNA levels were found to be similar in VAT (PGF and PRF) of all groups of mice tested (Fig. 3A), as previously reported in other animal models of obesity (52). Glycerol kinase (GyK) is an enzyme involved in generating the substrate glycerol-3-phosphate (G3P) for lipogenesis from glycerol, as reviewed in (41). GyK mRNA levels were not modified by diet or by HRP treatment in PGF, whereas it was increased 1.3-fold in PRF of both groups of obese mice (Fig. 3B). These results suggest that the production of both substrates needed for lipogenesis in VAT is probably not affected by HRP treatment, suggesting that (P)RR may not be involved in generating substrates for TG synthesis in VAT.

HRP treatment may decrease the final step of lipogenesis in VAT. Diglyceride acyltransferase 1 (DGAT1) is the enzyme that catalyzes the final step of lipogenesis, as reviewed in (41). DGAT1 mRNA levels in PGF of mice, both on N and HF/HC diet, treated with HRP were decreased by 20% and 60% respectively (Fig. 3C). DGAT1 mRNA levels were reduced by 60% in PRF only in HF/HC fed mice (Fig. 3C). These results suggest that HRP treatment in VAT might decrease the final step of TG synthesis.

HRP treatment may favour lipogenesis only in SCF of obese mice. FAS mRNA levels were increased 2.2-fold in SCF with HRP treatment in HF/HC fed mice (Fig. 3A), suggesting that FAcCoA synthesis is increased. Moreover, GyK mRNA levels were elevated 1.8-fold in these same mice (Fig. 3B), suggesting that G3P synthesis is also increased. In addition, HRP treatment greatly increased DGAT1 mRNA levels by 6.5-fold in obese mice (Fig. 3C). These results suggest that HRP treatment preferentially may increase both substrates needed as well as the last step of lipogenesis in SCF of obese animals.

HRP treatment has no effect on lipolytic enzymes in VAT. Adipose triglyceride lipase (ATGL) and hormone sensitive lipase (HSL) are enzymes involved in lipolysis, as reviewed in (41). ATGL mRNA levels were unchanged by diet or HRP treatment in VAT (Fig. 4A). HSL mRNA levels were decreased 30% by the HF/HC diet in PGF with no effect of HRP while no differences were observed in PRF of any groups of mice (Fig. 4B). These results suggest that HRP does not modulate lipolytic enzymes in VAT while obesity produces a decrease specifically in PGF.

HRP treatment increases lipolysis enzymes only in SCF of obese mice. HRP treatment increased ATGL mRNA levels 3.1-fold (Fig. 4A) and HSL mRNA levels 2.8-fold (Fig. 4B) in mice fed a HF/HC diet while no changes were observed in lean mice. Moreover, we measured no effect of diet for these enzymes in SCF. This suggests that HRP preferentially increases lipolytic enzymes in SCF of obese mice.

HRP treatment decreases plasma FFA levels in obese mice. Although not statistically significant, there was a trend toward a 1.2-fold increase in plasma FFA in obese mice (Fig. 5A). In contrast, HRP treatment significantly reduced plasma FFA levels by 20% in obese mice (Fig. 5A). As expected, plasma glycerol was increased 1.1-fold with obesity, as previously reported (19) while HRP treatment had no significant effect on plasma glycerol, although a strong tendency was observed (Fig. 5B).

HRP treatment normalizes an adipogenesis marker in VAT and increases it in SCF of obese mice. PPAR γ 1 and PPAR γ 2 are transcriptional factors that induce adipogenesis in adipose tissue, as reviewed in (26). Diet and HRP treatment had no effect on PPAR γ 1 protein levels in all adipose tissue tested, and on PPAR γ 2 protein levels in PGF (Fig. 6, A and B). Obesity decreased PPAR γ 2 protein levels in PRF by 60% and this was normalized by HRP treatment (Fig. 6B). HRP treatment increased PPAR γ 2 levels 1.7-fold in lean mice and 2.1 fold in SCF of obese mice (Fig. 6B). This suggests that HRP may normalize adipogenesis in VAT which was depressed by obesity while increasing adipogenesis in SCF.

HRP treatment increases an angiogenic marker only in SCF of obese mice. Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) is a factor that promotes angiogenesis (reviewed in (23)). Obesity decreased VEGF-A mRNA levels by 40% and 60% in PGF and SCF respectively while it had no effect in PRF (Fig. 7). Interestingly HRP treatment greatly increased VEGF-A mRNA by 4.0-fold (Fig. 7) in SCF specifically in obese mice. This data suggest that HRP treatment may increase angiogenesis in SCF but not in VAT of obese mice.

HRP treatment increases "beiging" markers only in SCF of obese mice. We observed a 50% and 30% decrease in PRDM16 and PPAR γ coactivator 1-alpha (PGC1 α) mRNA levels respectively in PGF (but not in PRF) with obesity (Fig. 8, *A* and *B*). In contrast, HRP treatment increased PRDM16 and PGC1 α mRNA levels 2.0-fold and 3.4-fold respectively in SCF from obese mice while it had no effect in VAT (Fig. 8, *A* and *B*). Put together these results suggest that HRP may increase beiging in SCF (but not in VAT) from obese mice, and as such, may potentially increase fat thermogenesis.

HRP treatment increases adiponectin mRNA expression only in SCF and modifies the correlation between body weight and circulating high molecular weight levels in obese mice. Adiponectin is a well-known insulin sensitizer (59). We previously suggested that HRP may improve insulin sensitivity both in lean and obese mice (57). In this study, obesity decreased adiponectin mRNA levels by 50% in PGF (but not in PRF) while we found no effect of HRP treatment in VAT (Fig. 9*A*). Conversely, HRP did increase adiponectin mRNA levels 3.2-fold in SCF from obese mice suggesting increased production in this fat pad (Fig. 9*A*).

Plasma high molecular weight adiponectin (adipoH) levels, rather than total plasma adiponectin levels, are known to be positively correlated with insulin sensitivity and inversely correlated with body weight (12; 38). The relation between body weight and circulating adipoH levels was similar in mice on N diet independently of the treatment (Fig. 9B). Surprisingly, the correlation was modified in mice on HF/HC diet between those treated with saline and those treated with HRP as their slopes were significantly different (Fig. 9C). These results suggest that HRP treatment modified the inverse correlation between body weight and circulating adipoH levels only in mice on HF/HC diet.

HRP treatment may increase insulin signalling in VAT but not in SCF. Once insulin activates its signalling cascade, Akt becomes phosphorylated (p-Akt) and subsequent glucose uptake into the cells follows, as reviewed in (5). When normalized to tubulin, obesity decreased Akt protein levels in PRF and SCF, but had no effect on PGF (Fig. 9E). As Akt was modulated by the diet, p-Akt data were normalized to tubulin. When normalized to tubulin, obesity decreased p-Akt protein levels by 20% in both PGF and PRF, but had no effect in SCF (Fig. 9D). HRP increased p-Akt levels similarly (1.4-1.5-fold) in PGF of both lean and obese mice (Fig. 9D). The data suggest that HRP treatment may improve insulin signalling in PGF but not in SCF.

Obesity may increase (P)RR expression by decreasing PLZF protein. PLZF is an intracellular transcription factor that negatively regulates (P)RR mRNA expression (47; 48). We previously showed that obesity increases (P)RR levels in VAT and SCF (57). We show here that PLZF protein levels are decreased by 40% with obesity in PGF (and tended to do so

in PRF), but not in SCF whereas there was no effect of HRP (Fig. 10A). The data suggest that (P)RR increase by obesity may be modulated by reduced PLZF protein levels only in PGF while other mechanisms may be implicated in PRF and SCF.

HRP treatment may decrease MAPK signalling only in SCF. To verify whether HRP is able to decrease MAPK signalling in adipose tissue (Fig. 1B), we measured protein levels of a member of MAPK family, phospho-p38 (p-p38). Diet and HRP treatment had no effect on p-p38 levels in VAT (Fig. 10B). Conversely, obesity increased p-p38 levels by 1.3-fold in SCF, while HRP treatment decreased p-p38 levels by 25% in both lean and obese mice (Fig. 10B). These results provide support for our working model showing that when HRP blocks the (P)RR, MAPK signalling may decrease (Fig. 1, A and B).

DISCUSSION

We previously reported that mice fed a HF/HC diet which are treated with HRP have reduced plasma insulin levels, suggesting improved insulin sensitivity (57). We also reported that these mice have reduced VAT weight, but not SCF weight, and reduced body weight. In the present study, we sought to find potential mechanism(s) by which HRP may produce these beneficial effects. We found that several enzymes implicated in lipogenesis and in lipolysis were increased in SCF of mice on HF/HC diet treated with HRP. In the same fat pad of these animals, we observed that PPAR γ 2 levels, expression for markers of "beiging" and adiponectin expression were increased with HRP. In VAT of mice on HF/HC diet, HRP decreased DGAT1 expression, normalized PPAR γ 2 levels and increased p-Akt levels. In the circulation, FFA was

reduced in mice on a HF/HC diet treated with HRP and the correlation between body weight and circulating adipoH was modified.

Lipid metabolism in VAT. Ang II has been shown to dose-dependently increase lipogenesis in human subcutaneous adipocytes by binding to the AT2R (25). We discovered that fatty acid CoA and glycerol-3-phosphate (FACoA and G3P) levels in VAT may be unaffected by both diet and HRP as represented by FAS and GyK mRNA levels. Conversely, HRP was found to probably decrease the last step of lipogenesis (DGAT1 mRNA expression) in VAT from obese mice, similarly to what is reported in VAT of renin KO mice (56). We also found that HRP had no effect on the expression of lipolytic enzymes in VAT. We hypothesize that HRP may reduce lipid accumulation in VAT through modulation of lipogenesis. Further work is required to confirm these observations and to elucidate the details of molecular mechanisms by which this may occur.

Lipid metabolism and futile cycling in SCF. Interestingly, HRP was found to increase FAS, GyK and DGAT1 mRNA levels in SCF only in the context of obesity which are enzyme implicated in lipogenesis. Curiously, we found that the expression levels for the enzymes implicated in lipolysis, adipose triglyceride lipase and hormone sensitive lipase, were also increased. Put together, our results suggest that HRP may upregulate both lipogenesis and lipolysis, similarly to what was reported previously in rats treated with Ang converting enzyme inhibitor or AT1R blocker (46; 67). As such, the potential effects on lipid metabolism reported in our study may result from a decrease Ang II production through HRP's effect on (pro)renin activity (Fig. 1B). Consequently, HRP may increase futile cycling (TG/FFA

cycling) in SCF of obese mice. The release of FFA and glycerol (resulting from lipolysis) into the bloodstream may be reduced due to their reconversion into FFA-CoA and G3P. Indeed, plasma FFA was found to be reduced and plasma glycerol levels tended to decrease in HRP treated mice fed a HF/HC diet. Our data are similar to a study reporting that thiazolidinedione, another PPAR γ activator, increases GlyK levels in both adipocytes and adipose tissue, leading to glycerol integration into TG and reduced FFA secretion (17). This TG/FFA cycling would consume energy of the cell and possibly be accompanied with heat production (thermogenesis), because each lipogenesis and lipolysis cycle consumes 4 ATPs and 7 ATPs respectively, as reviewed in (41). Altogether, our results suggest that HRP treatment may activate TG/FFA cycling in SCF of obese mice which may contribute to the decrease in weight gain observed in these animals (57).

Adipogenesis and changes in cellular composition. We have previously showed that a marker of adipocyte size, Mest/Peg1, was decreased in adipose tissue from HRP treated mice independently of diet (HF/HC or N diet) (57). In the present study, we showed that this may be coupled to increase adipocyte number as adipogenesis in both VAT and SCF from mice fed a HF/HC diet and treated with HRP is probably activated. Indeed we found that PPAR γ 2, which is the isoform that stimulates adipogenesis (45), was increased in these fat pads. Ang II has been shown to inhibit adipogenesis in human subcutaneous adipocytes via AT1R signalling (24). These results suggest that HRP treatment may shift the cellular composition of VAT and SCF from obese fat phenotype (fewer numbers of large cells) to the normal fat phenotype (a larger number of small cells) in obese mice.

Although it appears counter-intuitive that formation of new adipocytes is considered "normal", a larger population of adipocytes may maintain or increase storage capacity for plasma FFAs as well as improve insulin sensitivity compared to fewer adipocytes that have less capacity to store them, as reviewed in (26). In support of this view, HRP treatment did indeed reduce plasma FFA levels in mice fed a HF/HC diet. HRP treatment may increase the efficiency of FFA uptake from plasma in obese mice. FFA storage in SCF is considered healthier compared to storage in VAT because it avoids deposition around visceral organs, which cause insulin resistance, as reviewed in (64).

Adipose tissue "beiging". Beige adipocytes are a third type of adipocytes present in white fat, which occur in larger numbers in SCF than VAT, as reviewed in (21). PRDM16 is a marker for brown and beige adipocytes (50; 51). PRDM16 induces PGC1 α mRNA expression, which is a positive regulator of mitochondrial biogenesis in brown fat, and is negligibly expressed in white adipocytes (11; 42). Increased thermogenesis is one of the characteristics of adipocytes associated with "beiging" (65). The suggestion of increased TG/FFA cycling in SCF observed with HRP treatment in mice fed a HF/HC diet prompted us to consider that "beiging" might be occurring in SCF. We observed that PRDM16 and PGC1 α mRNA levels were both increased in SCF of HRP treated mice on a HF/HC diet, suggesting that "beiging" may be activated while no changes were observed in VAT. Mice that specifically overexpress PRDM16 in adipose tissue show increased PGC1 α expression, only in SCF and not VAT (50). The same mice resisted diet-induced obesity accompanied with higher energy expenditure, probably through increased SCF thermogenesis. In contrast, specifically inactivating PRDM16 in adipose tissue led to decreased expression of thermogenic genes such as PGC1 α in SCF, and

the mice develop obesity when fed a HF diet (6). We hypothesize that presence of beige adipocytes in SCF may contribute to an increase in energy expenditure and as such to the decrease in weight gain observed in mice fed a HF/HC diet and treated with HRP (57).

Angiogenesis. VEGF mRNA levels are decreased in SCF of obese compared to lean subjects which has been proposed to reduce angiogenesis and cause hypoxia (36). Hypoxia-induced adipose tissue dysfunction is well-known (58), and inhibition of the hypoxia inducible factor- (HIF) 1 α , a process induced by hypoxia, has been shown to improve glucose tolerance in obese mice (53). In our study, VEGF-A mRNA levels was decreased with obesity in both VAT and SCF suggesting that angiogenesis may be decreased. Conversely, HRP increased VEGF-A mRNA levels in SCF specifically in obese mice while VAT levels were unaffected. Thus, HRP appears to stimulate angiogenesis and specifically in SCF of obese mice, which might be due to different characteristics between SCF and VAT (64). As such, this may improve adipose tissue function by improving tissue vascularisation and oxygenation. Interestingly, overexpression of VEGF-A specifically in white adipose tissue of mice was associated with resistance to obesity and "beiging" in SCF (54). Thus HRP treatment, via increased levels of VEGF-A mRNA, may similarly be turning on genes involved in resistance to obesity and "beiging" specifically in SCF only in obese mice.

Adiponectin expression and insulin signalling. Adiponectin is produced and secreted into the blood from white adipose tissue (39). There are many forms of adiponectin and plasma adipoH (vs. total plasma adiponectin) is the protein that correlates most strongly with insulin sensitivity (12). Once the different forms of adiponectin are produced by adipocytes and

secreted into the blood, it is unlikely that they interchange (35). Given that we observed increased adiponectin mRNA levels only in SCF from these mice, this suggests that SCF may contribute more to plasma total adiponectin levels than VAT. Similar conclusions were reported by others who treated human SCF explants with PPAR γ activator (40). Our data showed that the correlation between body weight and circulating adipoH was altered by HRP only in mice on HF/HC diet. Altogether, our data suggest that SCF may produce and secrete more adiponectin into the bloodstream compared to VAT which may be a reflection of improved insulin sensitivity observed previously in HF/HC+HRP mice (57). Furthermore, it suggests that, for a similar body weight in obese mice, circulating adipoH in those treated with HRP may be shifted to a higher level compared to those treated with saline.

As expected, we found decreased p-Akt protein levels in VAT with obesity, suggesting decreased insulin signalling. Interestingly, we found that HRP increased p-Akt protein levels, independently of diet while we found no changes with either diet or HRP in SCF. This suggests that HRP treatment may improve insulin sensitivity in VAT in obese mice while the mechanism involved in lean mice remains to be elucidated. HRP may be useful in patients who have insulin resistance whether they are lean or obese, to improve insulin signalling, as we previously reported in mice (57).

PLZF modulation of (P)RR in obesity. We have previously reported that adipose tissue renin and (P)RR levels were increased in all adipose tissue (PGF, PRF and SCF) with obesity (57). Our model (Fig. 1A) suggests that increased (pro)renin binding to (P)RR leads to increased PLZF translocation into the cell nucleus (Fig. 1A), and subsequent downregulation

of (P)RR mRNA expression via a negative feedback loop (47; 48). PLZF protein levels were found to be decreased in PGF of obese mice. This brought us to consider that (P)RR upregulation previously observed with obesity in this fat pad (57) may result from decreased levels of PLZF. In line with our previous data where we had reported no effect of HRP on (P)RR protein, in this study we also observed that HRP treatment did not alter PLZF protein levels. This is the first report linking increased adipose tissue (P)RR with obesity to decreased PLZF levels.

Surprisingly, we did not observe changes in PLZF protein levels with obesity in both PRF and SCF. This suggest that (P)RR is not downregulated by PLZF in these fat pads, although (P)RR is upregulated, as observed in our previous study in the same set of obese mice (57). As such, unlike what we observed in PGF, there may be another non-PLZF pathway in PRF and SCF that modulates (P)RR expression which is unknown.

p38 MAPK signalling in VAT. Numerous signals upstream of p38, a MAPK, controls its regulation which are also cell specific, as reviewed in (66). Stimulation of (P)RR by (pro)renin activates several MAPKs such as phosphorylation of p38 (p-p38) (2). We have previously observed an increase in renin levels in VAT and SCF of obese mice (57). Binding of (pro)renin to (P)RR would increase p-p38 protein levels by increasing both Ang II dependent and independent pathways (Fig 1A). According to our working model (Fig. 1, A and B), MAPKs activation should decrease following the binding of HRP to the (P)RR, because Ang II independent pathways are blocked and Ang II dependent pathway is reduced. However, we observed that p-p38 protein levels were unaltered in VAT by HF diet or HRP treatment in lean and obese mice. Therefore, we propose that non RAS pathway(s) exist in VAT and its

contribution to the total levels of p-p38 exceeds RAS's contribution which may explain the lack of differences in p-p38 protein levels by HF/HC diet or HRP treatment.

p38 MAPK signalling in SCF. Increased cardiac p-p38 levels in obese mice contribute to the development of cardiac insulin resistance (43). Indeed, the authors proposed that hyperinsulinemia probably leads to p38 activation which contributed to the degradation of insulin receptor substrate thus impairing insulin signaling. In contrast, reduced aortic p-p38 levels were associated with improved insulin sensitivity in mice with myocardial infarction (62). Previously, we suggested that HRP may improve insulin sensitivity in obese mice (57). We suggest that p38 activation may play a role in promoting local tissue insulin resistance. In the present study, we found that p-p38 levels were increased in SCF with obesity, while it was decreased in HF/HC+HRP mice, confirming that (P)RR activation can contribute to MAPK levels, as shown in our working model (Fig. 1, *A* and *B*). We propose that the improvement in insulin sensitivity observed previously in the same set of HF/HC+HRP mice may be partially due to decreased p38 activation in SCF (57). In contrast to VAT, the non RAS pathway(s), as mentioned above, may be less prevalent than (P)RR signals in SCF which may explain why this fat responds to HF diet and HRP treatment on p-p38 protein levels.

Closing remarks. Overall, our study suggests that 10 weeks of HRP treatment may change the phenotype of SCF adipocytes from an obese to a normal phenotype. In lean mice, we propose that HRP treatment may only increase adipogenesis, which would result in a larger number of cold white adipocytes in SCF which may contribute to the improved insulin profile previously reported in these mice (57) (Fig. 11A). In obese mice, we propose that HRP may

increase lipogenesis, lipolysis, adipogenesis, mitochondrial biogenesis, angiogenesis and "beiging" in SCF, which could produce an expansion of warm beige adipocytes in SCF (Fig. 11B). Our data also suggest that HRP treatment in mice fed a HF/HC diet may result in preferential deposition of lipids in SCF, rather than in VAT which is associated with multiple cardiometabolic diseases (64).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ann-Michele Francoeur for her help with editing this manuscript. We also thank Catherine Michel (CRCHUM, Quebec, Canada) for excellent technical assistance in all the mice studies.

GRANTS

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research, Heart and Stroke foundation of Canada, Canadian Diabetes Association and an unrestricted grant from Merck Frosst Canada. Julie Lavoie was supported by a FRQ-S scholarship. Paul Tan was supported by Diabète Québec and Université de Montréal scholarships.

DISCLOSURES

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ABBREVIATIONS

AdipoH, high molecular weight adiponectin; Ang, angiotensin; AT1R, angiotensin II receptor type 1; AT2R, angiotensin II receptor type 2; DGAT1, diglyceride acyltransferase 1; ERK1/2,

extracellular signal-regulated kinase; FACoA, fatty acid CoA; FAS, fatty acid synthase; FFA, free fatty acids; G3P, glycerol-3-phosphate; GyK, glycerol kinase; HF/HC, high-fat/high-carbohydrate; HMW, high molecular weight; HRP, handle region peptide; HSL, hormone sensitive lipase; JNK, c-Jun N-terminal kinase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MMW, medium molecular weight; N, normal; PGC1 α , peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha; PGF, peri-gonadal fat; PLZF, promyelocytic leukaemia zinc finger; PPAR γ , peroxisome proliferator-activated receptor gamma; PRDM16, PR domain containing 16; PRF, peri-renal fat; (P)RR, prorenin and renin receptor; RAS, renin angiotensin system; SCF, abdominal subcutaneous fat; TG, triglyceride; VAT, visceral adipose tissue; VEGF, vascular endothelial growth factor A.

REFERENCES

1. **Achard V, Boullu-Ciocca S, Desbriere R, Nguyen G and Grino M.** Renin receptor expression in human adipose tissue. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292: R274-R282, 2007.
2. **Ahmed BA, Seda O and Lavoie JL.** (Pro)renin receptor as a new drug target. *Curr Pharm Des* 17: 3611-3621, 2011.
3. **Boustany CM, Bharadwaj K, Daugherty A, Brown DR, Randall DC and Cassis LA.** Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-

induced obesity and hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287: R943-R949, 2004.

4. **Cannon B and Nedergaard J.** Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84: 277-359, 2004.
5. **Chang L, Chiang SH and Saltiel AR.** Insulin signaling and the regulation of glucose transport. *Mol Med* 10: 65-71, 2004.
6. **Cohen P, Levy JD, Zhang Y, Frontini A, Kolodin DP, Svensson KJ, Lo JC, Zeng X, Ye L, Khandekar MJ, Wu J, Gunawardana SC, Banks AS, Camporez JP, Jurczak MJ, Kajimura S, Piston DW, Mathis D, Cinti S, Shulman GI, Seale P and Spiegelman BM.** Ablation of PRDM16 and beige adipose causes metabolic dysfunction and a subcutaneous to visceral fat switch. *Cell* 156: 304-316, 2014.
7. **Economos CD, Hatfield DP, King AC, Ayala GX and Ann PM.** Food and physical activity environments: an energy balance approach for research and practice. *Am J Prev Med* 48: 620-629, 2015.
8. **Eguchi S and Inagami T.** Signal transduction of angiotensin II type 1 receptor through receptor tyrosine kinase. *Regul Pept* 91: 13-20, 2000.

9. **Engeli S, Bohnke J, Gorzelniak K, Janke J, Schling P, Bader M, Luft FC and Sharma AM.** Weight loss and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Hypertension* 45: 356-362, 2005.
10. **Feldt S, Maschke U, Dechend R, Luft FC and Muller DN.** The putative (pro)renin receptor blocker HRP fails to prevent (pro)renin signaling. *J Am Soc Nephrol* 19: 743-748, 2008.
11. **Fernandez-Marcos PJ and Auwerx J.** Regulation of PGC-1alpha, a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *Am J Clin Nutr* 93: 884S-8890, 2011.
12. **Fisher FM, Trujillo ME, Hanif W, Barnett AH, McTernan PG, Scherer PE and Kumar S.** Serum high molecular weight complex of adiponectin correlates better with glucose tolerance than total serum adiponectin in Indo-Asian males. *Diabetologia* 48: 1084-1087, 2005.
13. **Giacchetti G, Faloia E, Mariniello B, Sardu C, Gatti C, Camilloni MA, Guerrieri M and Mantero F.** Overexpression of the renin-angiotensin system in human visceral adipose tissue in normal and overweight subjects. *Am J Hypertens* 15: 381-388, 2002.
14. **Goossens GH, Blaak EE, Arner P, Saris WHM and van Baak MA.** Angiotensin II: a hormone that affects lipid metabolism in adipose tissue. *International Journal of Obesity* 31: 382-384, 2007.

15. **Goossens GH, Blaak EE, Saris WHM and van Baak MA.** Angiotensin II-Induced effects on adipose and skeletal muscle tissue blood flow and lipolysis in normal-weight and obese subjects. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89: 2690-2696, 2004.
16. **Goossens GH, Blaak EE and van Baak MA.** Possible involvement of the adipose tissue renin-angiotensin system in the pathophysiology of obesity and obesity-related disorders. *Obes Rev* 4: 43-55, 2003.
17. **Guan HP, Li Y, Jensen MV, Newgard CB, Steppan CM and Lazar MA.** A futile metabolic cycle activated in adipocytes by antidiabetic agents. *Nat Med* 8: 1122-1128, 2002.
18. **Guh DP, Zhang W, Bansback N, Amarsi Z, Birmingham CL and Anis AH.** The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health* 9: 88, 2009.
19. **Hancock CR, Han DH, Chen M, Terada S, Yasuda T, Wright DC and Holloszy JO.** High-fat diets cause insulin resistance despite an increase in muscle mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 7815-7820, 2008.
20. **Hariri N and Thibault L.** High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr Res Rev* 23: 270-299, 2010.

21. **Harms M and Seale P.** Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med* 19: 1252-1263, 2013.
22. **Harms MJ, Ishibashi J, Wang W, Lim HW, Goyama S, Sato T, Kurokawa M, Won KJ and Seale P.** Prdm16 is required for the maintenance of brown adipocyte identity and function in adult mice. *Cell Metab* 19: 593-604, 2014.
23. **Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT and De Bruijn EA.** Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev* 56: 549-580, 2004.
24. **Janke J, Engeli S, Gorzelniak K, Luft FC and Sharma AM.** Mature adipocytes inhibit in vitro differentiation of human preadipocytes via angiotensin type 1 receptors. *Diabetes* 51: 1699-1707, 2002.
25. **Jones BH, Standridge MK and Moustaid N.** Angiotensin II increases lipogenesis in 3T3-L1 and human adipose cells. *Endocrinology* 138: 1512-1519, 1997.
26. **Leonardini A, Laviola L, Perrini S, Natalicchio A and Giorgino F.** Cross-Talk between PPAR gamma and Insulin Signaling and Modulation of Insulin Sensitivity. *Ppar Research* 2009.
27. **Mahmood T and Yang PC.** Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci* 4: 429-434, 2012.

28. **Massiera F, Bloch-Faure M, Ceiler D, Murakami K, Fukamizu A, Gasc JM, Quignard-Boulangue A, Negrel R, Ailhaud G, Seydoux J, Meneton P and Teboul M.** Adipose angiotensinogen is involved in adipose tissue growth and blood pressure regulation. *FASEB J* 15: 2727-2729, 2001.
29. **Mercure C, Prescott G, Lacombe MJ, Silversides DW and Reudelhuber TL.** Chronic increases in circulating prorenin are not associated with renal or cardiac pathologies. *Hypertension* 53: 1062-1069, 2009.
30. **Montani JP and Van Vliet BN.** General Physiology and Pathophysiology of the Renin-Angiotensin System. In: *Angiotensin Vol. I*, Handb Exp Pharmacol, 2004.
31. **Muller DN, Klanke B, Feldt S, Cordasic N, Hartner A, Schmieder RE, Luft FC and Hilgers KF.** (Pro)renin receptor peptide inhibitor "handle-region" peptide does not affect hypertensive nephrosclerosis in Goldblatt rats. *Hypertension* 51: 676-681, 2008.
32. **Nabi AH, Biswas KB, Nakagawa T, Ichihara A, Inagami T and Suzuki F.** 'Decoy peptide' region (RIFLKRMPST) of prorenin prosegment plays a crucial role in prorenin binding to the (pro)renin receptor. *Int J Mol Med* 24: 83-89, 2009.

33. **Nabi AH, Biswas KB, Nakagawa T, Ichihara A, Inagami T and Suzuki F.** Prorenin has high affinity multiple binding sites for (pro)renin receptor. *Biochim Biophys Acta* 1794: 1838-1847, 2009.
34. **Nguyen G, Delarue F, Burckle C, Bouzahir L, Giller T and Sraer JD.** Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest* 109: 1417-1427, 2002.
35. **Pajvani UB, Du X, Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Schulthess T, Engel J, Brownlee M and Scherer PE.** Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. *J Biol Chem* 278: 9073-9085, 2003.
36. **Pasarica M, Sereda OR, Redman LM, Albarado DC, Hymel DT, Roan LE, Rood JC, Burk DH and Smith SR.** Reduced adipose tissue oxygenation in human obesity: evidence for rarefaction, macrophage chemotaxis, and inflammation without an angiogenic response. *Diabetes* 58: 718-725, 2009.
37. **Patsouris D, Mandard S, Voshol PJ, Escher P, Tan NS, Havekes LM, Koenig W, Marz W, Tafuri S, Wahli W, Muller M and Kersten S.** PPARalpha governs glycerol metabolism. *J Clin Invest* 114: 94-103, 2004.

38. **Peterson RM, Beeson L, Shulz E, Firek A, De LM, Balcazar H, Tonstad S and Cordero-Macintyre ZR.** Impacting obesity and glycemic control using a culturally-sensitive diabetes education program in Hispanic patients with type 2 diabetes. *Int J Body Compos Res* 8: 85-94, 2010.
39. **Phillips SA, Ciaraldi TP, Kong AP, Bandukwala R, Aroda V, Carter L, Baxi S, Mudaliar SR and Henry RR.** Modulation of circulating and adipose tissue adiponectin levels by antidiabetic therapy. *Diabetes* 52: 667-674, 2003.
40. **Phillips SA, Ciaraldi TP, Oh DK, Savu MK and Henry RR.** Adiponectin secretion and response to pioglitazone is depot dependent in cultured human adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295: E842-E850, 2008.
41. **Prentki M and Madiraju SR.** Glycerolipid metabolism and signaling in health and disease. *Endocr Rev* 29: 647-676, 2008.
42. **Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M and Spiegelman BM.** A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92: 829-839, 1998.
43. **Qi Y, Xu Z, Zhu Q, Thomas C, Kumar R, Feng H, Dostal DE, White MF, Baker KM and Guo S.** Myocardial loss of IRS1 and IRS2 causes heart failure and is

controlled by p38alpha MAPK during insulin resistance. *Diabetes* 62: 3887-3900, 2013.

44. **Rahmouni K, Mark AL, Haynes WG and Sigmund CD.** Adipose depot-specific modulation of angiotensinogen gene expression in diet-induced obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286: E891-E895, 2004.
45. **Ren DL, Collingwood TN, Rebar EJ, Wolffe AP and Camp HS.** PPAR gamma knockdown by engineered transcription factors: exogenous PPAR gamma 2 but not PPAR gamma 1 reactivates adipogenesis. *Genes & Development* 16: 27-32, 2002.
46. **Santos EL, de Picoli SK, da Silva ED, Batista EC, Martins PJ, D'Almeida V and Pesquero JB.** Long term treatment with ACE inhibitor enalapril decreases body weight gain and increases life span in rats. *Biochem Pharmacol* 78: 951-958, 2009.
47. **Scheffe JH, Menk M, Reinemund J, Effertz K, Hobbs RM, Pandolfi PP, Ruiz P, Unger T and Funke-Kaiser H.** A novel signal transduction cascade involving direct physical interaction of the renin/prorenin receptor with the transcription factor promyelocytic zinc finger protein. *Circ Res* 99: 1355-1366, 2006.
48. **Scheffe JH, Neumann C, Goebel M, Danser J, Kirsch S, Gust R, Kintscher U, Unger T and Funke-Kaiser H.** Prorenin engages the (pro)renin receptor like renin

and both ligand activities are unopposed by aliskiren. *J Hypertens* 26: 1787-1794, 2008.

49. **Schneider CA, Rasband WS and Eliceiri KW.** NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9: 671-675, 2012.
50. **Seale P, Conroe HM, Estall J, Kajimura S, Frontini A, Ishibashi J, Cohen P, Cinti S and Spiegelman BM.** Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J Clin Invest* 121: 96-105, 2011.
51. **Seale P, Kajimura S, Yang W, Chin S, Rohas LM, Uldry M, Tavernier G, Langin D and Spiegelman BM.** Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell Metab* 6: 38-54, 2007.
52. **Shillabeer G, Hornford J, Forden JM, Wong NC, Russell JC and Lau DC.** Fatty acid synthase and adipin mRNA levels in obese and lean JCR:LA-cp rats: effect of diet. *J Lipid Res* 33: 31-39, 1992.
53. **Sun K, Halberg N, Khan M, Magalang UJ and Scherer PE.** Selective inhibition of hypoxia-inducible factor 1alpha ameliorates adipose tissue dysfunction. *Mol Cell Biol* 33: 904-917, 2013.

54. **Sun K, Wernstedt A, I, Kusminski CM, Bueno AC, Wang ZV, Pollard JW, Brekken RA and Scherer PE.** Dichotomous effects of VEGF-A on adipose tissue dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 5874-5879, 2012.
55. **Susic D, Lipton H, Knight M and Frohlich ED.** Cardiovascular effects of nonproteolytic activation of prorenin. *Hypertension* 48: e113, 2006.
56. **Takahashi N, Li F, Hua K, Deng J, Wang CH, Bowers RR, Bartness TJ, Kim HS and Harp JB.** Increased energy expenditure, dietary fat wasting, and resistance to diet-induced obesity in mice lacking renin. *Cell Metab* 6: 506-512, 2007.
57. **Tan P, Shamansurova Z, Bisotto S, Michel C, Gauthier MS, Rabasa-Lhoret R, Nguyen TM, Schiller PW, Gutkowska J and Lavoie JL.** Impact of the prorenin/renin receptor on the development of obesity and associated cardiometabolic risk factors. *Obesity (Silver Spring)* 22: 2201-2209, 2014.
58. **Trayhurn P.** Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity. *Physiol Rev* 93: 1-21, 2013.
59. **Tschritter O, Fritsche A, Thamer C, Haap M, Shirkavand F, Rahe S, Staiger H, Maerker E, Haring H and Stumvoll M.** Plasma adiponectin concentrations predict insulin sensitivity of both glucose and lipid metabolism. *Diabetes* 52: 239-243, 2003.

60. **van Harmelen V, Ariapart P, Hoffstedt J, Lundkvist I, Bringman S and Arner P.** Increased adipose angiotensinogen gene expression in human obesity. *Obes Res* 8: 337-341, 2000.
61. **Villanueva CJ, Vergnes L, Wang J, Drew BG, Hong C, Tu Y, Hu Y, Peng X, Xu F, Saez E, Wroblewski K, Hevener AL, Reue K, Fong LG, Young SG and Tontonoz P.** Adipose subtype-selective recruitment of TLE3 or Prdm16 by PPARgamma specifies lipid storage versus thermogenic gene programs. *Cell Metab* 17: 423-435, 2013.
62. **Wang Y, Tian Z, Zang W, Jiang H, Li Y, Wang S and Chen S.** Exercise training reduces insulin resistance in postmyocardial infarction rats. *Physiol Rep* 3: 2015.
63. **Wildman RP, Muntner P, Reynolds K, McGinn AP, Rajpathak S, Wylie-Rosett J and Sowers MR.** The obese without cardiometabolic risk factor clustering and the normal weight with cardiometabolic risk factor clustering: prevalence and correlates of 2 phenotypes among the US population (NHANES 1999-2004). *Arch Intern Med* 168: 1617-1624, 2008.
64. **Wronska A and Kmiec Z.** Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. *Acta Physiol (Oxf)* 205: 194-208, 2012.

65. **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 and Spiegelman BM.** Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 150: 366-376, 2012.
66. **Zarubin T and Han J.** Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res* 15: 11-18, 2005.
67. **Zorad S, Dou JT, Benicky J, Hutanu D, Tybitanclova K, Zhou J and Saavedra JM.** Long-term angiotensin II AT1 receptor inhibition produces adipose tissue hypotrophy accompanied by increased expression of adiponectin and PPARgamma. *Eur J Pharmacol* 552: 112-122, 2006.

Table 1. Primer sequences used for Real-time PCR.

Gene	Function	Forward (5'→ 3')	Reverse (5'→ 3')
FAS	Lipogenesis	CACAGATGATGACAGGAGATGG	TCGGAGTGAGGCTGGGTTGAT
GyK (37)	Lipogenesis	ATCCGCTGGCTAAGAGACAACC	TGCACTGGGCTCCCAATAAGG
DGAT1	Lipogenesis	GAGCTATCCAGACAACCTGACC	AGCATCTCAAGAACTCGTCGT
ATGL	Lipolysis	TCCCACCTTTAGCTCCAAGGAT	AGCTTCCTCTGCATCCTCTTC
HSL	Lipolysis	GGCTCACAGTTACCATCTCACC	GAGTACCTTGCTGTCCTGTCC
VEGF-A	Angiogenesis	CAGGCTGCTGTAACGATGAA	GCATTCACATCTGCTGTGCT
PRDM16 (61)	"Beiging"	GCCATGTGTCAGATCAACGA	CCTTCTTTTACATGCACCAA
PGC1 α (22)	"Beiging"	CCCTGCCATTGTAAAGACC	TGCTGCTGTTCTGTTTTC
Adiponectin	Insulin sensitivity	TGGAATGACAGGAGCTGAAGG	TATAAGCGGCTTCTCCAGGCT
s16 (29)	Reference gene	ATCTCAAAGGCCCTGGTAGC	ACAAAGGTAAACCCCGATCG

ATGL, adipose triglyceride lipase; DGAT1, diglyceride acyltransferase 1; FAS, fatty acid synthase; GyK, glycerol kinase; HSL, hormone sensitive lipase; PGC1 α , peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha; PRDM16, PR domain containing 16; VEGF-A, vascular endothelial growth factor A.

Table 2. Details of the primary and secondary antibodies used in Western Blotting.

Primary antibody	Cat# and dilution	Function	Supplier
Rabbit anti-PPAR γ	#2443; 1:1000	Adipogenesis	Cell Signaling
Rabbit anti-adiponectin	ab3455; 1:5000	Insulin sensitivity	Abcam
Rabbit anti-phospho-Akt Ser 473	#9271; 1:1000	Insulin signaling	Cell Signalling
Rabbit anti-Akt	#4685; 1:5000	Insulin signaling	Cell Signaling
Mouse anti-PLZF	sc-28319; 1:500	(P)RR downregulation	Santa Cruz
Mouse anti-phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)	#9216; 1:2500	MAPK signalling	Cell Signaling
Rabbit anti-p38 MAPK	#9212; 1:5000	MAPK signalling	Cell Signaling
Rabbit anti-tubulin	ab4074; 1:50000	Loading control	Abcam
Secondary antibody	Details	Purpose	Supplier
Goat anti-rabbit	sc-2004; Santa Cruz	Secondary antibody	Santa Cruz
Goat anti-mouse	sc-2005; Santa Cruz	Secondary antibody	Santa Cruz

MAPK, mitogen-activated protein kinase; PLZF, promyelocytic leukaemia zinc finger; PPAR γ , peroxisome proliferator-activated receptor gamma; (P)RR, prorenin and renin receptor.

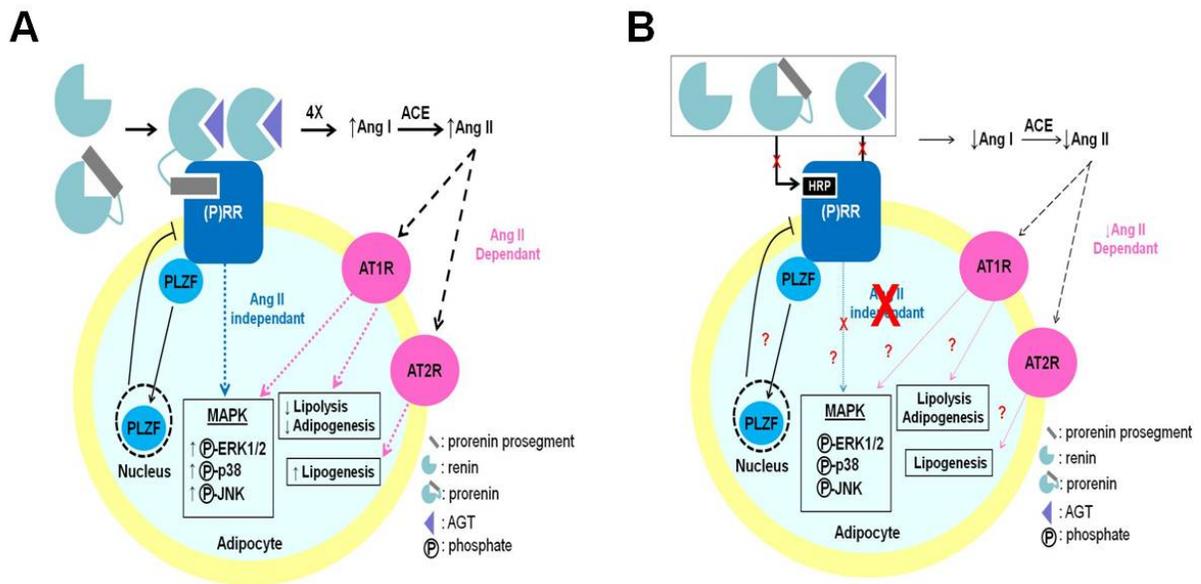


Fig. 1. Effect of (P)RR on local RAS and intracellular pathway in adipocytes. (A) Binding of prorenin and renin to (P)RR. **(B)** Binding of HRP to (P)RR. Solid arrows represent a step. Dashed arrows represent binding to a receptor. Square dotted arrows represent activation of intracellular pathways. T-shaped arrow represents downregulation. Ang, angiotensin; ACE, angiotensin converting enzyme; AGT, angiotensinogen; AT1R, angiotensin II receptor type 1; AT2R, angiotensin II receptor type 2; ERK, extracellular signal-regulated kinase; HRP, handle region peptide; JNK, c-Jun N-terminal kinase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; PLZF, promyelocytic leukaemia zinc finger; (P)RR, prorenin and renin receptor.

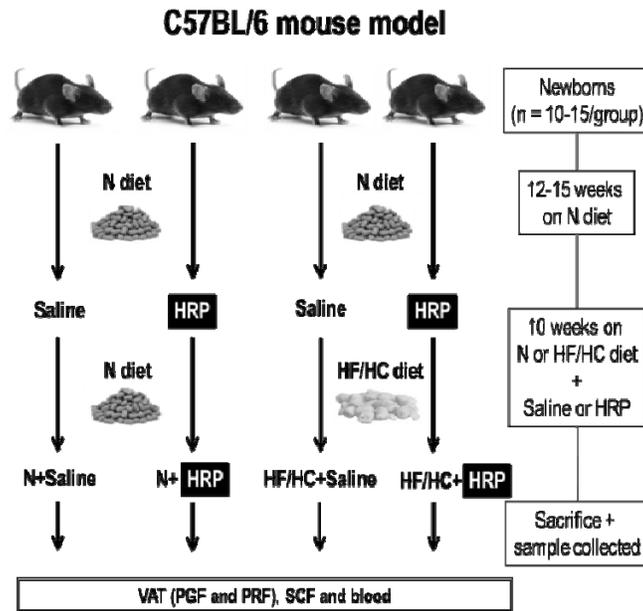


Fig. 2. Lean and diet-induced obese C57BL/6 mouse model. HF/HC, high-fat/high-carbohydrate diet; HRP, handle region peptide; N, normal; PGF, peri-gonadal fat; PRF, peri-renal fat; SCF, abdominal subcutaneous fat; VAT, visceral adipose tissue.

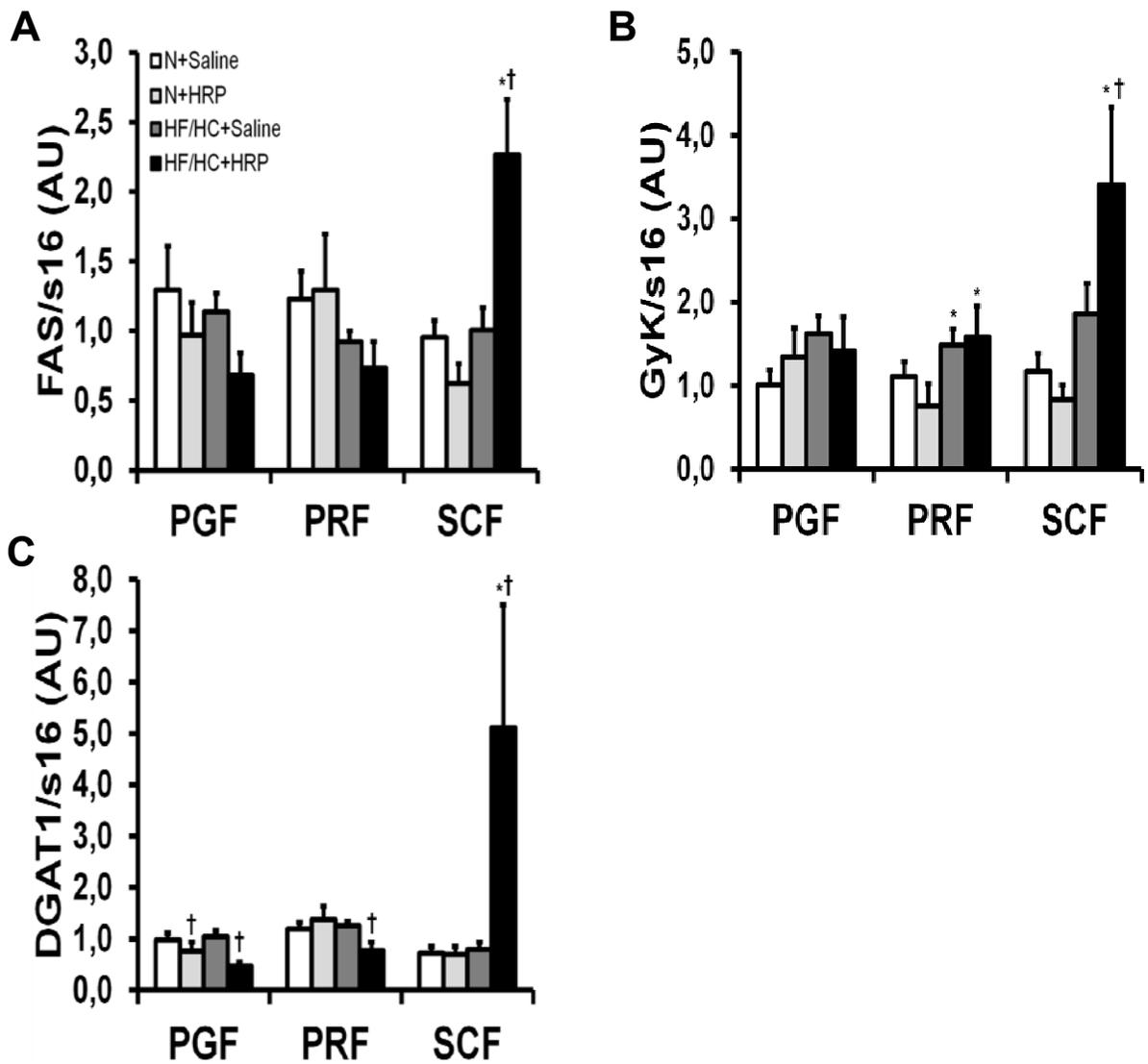


Fig. 3. HRP treatment increases enzymes implicated in lipogenesis in SCF of obese mice.

(A-C) FAS, GyK and DGAT1 mRNA levels in adipose tissue. Data are normalized to s16 mRNA levels and are presented as means \pm SE with $n = 9-13$ per group. * $p < 0.05$ compared to N diet; † $p < 0.05$ compared to saline. DGAT1, diglyceride acyltransferase 1; FAS, fatty acid synthase; GyK, glycerol kinase; HF/HC, high-fat/high-carbohydrate diet; HRP, handle region peptide; N, normal; PGF, peri-gonadal fat; PRF, peri-renal fat; SCF, abdominal subcutaneous fat.

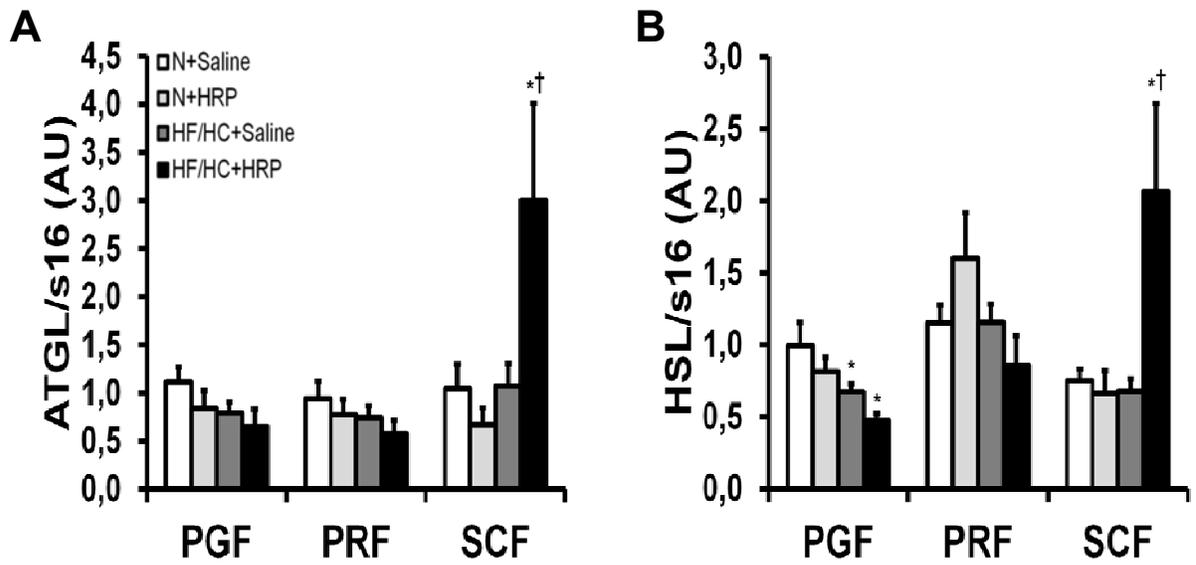


Fig. 4. HRP treatment increases enzymes implicated in lipolysis in SCF of obese mice. (A and B) ATGL and HSL mRNA levels in adipose tissue. Data are normalized to s16 mRNA levels and are presented as means \pm SE with $n = 9-13$ per group. * $p < 0.05$ compared to N diet; † $p < 0.05$ compared to saline. ATGL, adipose triglyceride lipase; HF/HC, high-fat/high-carbohydrate diet; HRP, handle region peptide; HSL, hormone sensitive lipase; N, normal; PGF, peri-gonadal fat; PRF, peri-renal fat; SCF, abdominal subcutaneous fat.

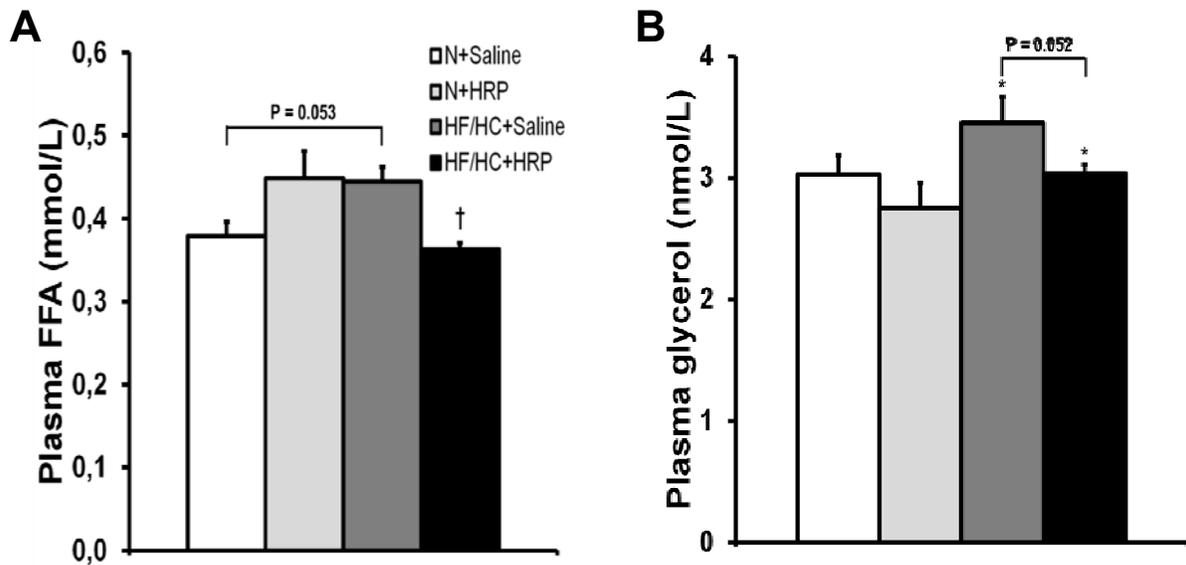


Fig. 5. HRP treatment decreases plasma FFA levels in obese mice. (A and B) Plasma FFA levels and plasma glycerol levels. Data are presented as means \pm SE with $n = 7-9$ per group for plasma FFA and $n = 12-15$ per group for plasma glycerol. * $p < 0.05$ compared to N diet; † $p < 0.05$ compared to saline. FFA, free fatty acid; HF/HC, high-fat/high-carbohydrate diet; HRP, handle region peptide; N, normal; PGF, peri-gonadal fat; PRF, peri-renal fat; SCF, abdominal subcutaneous fat.

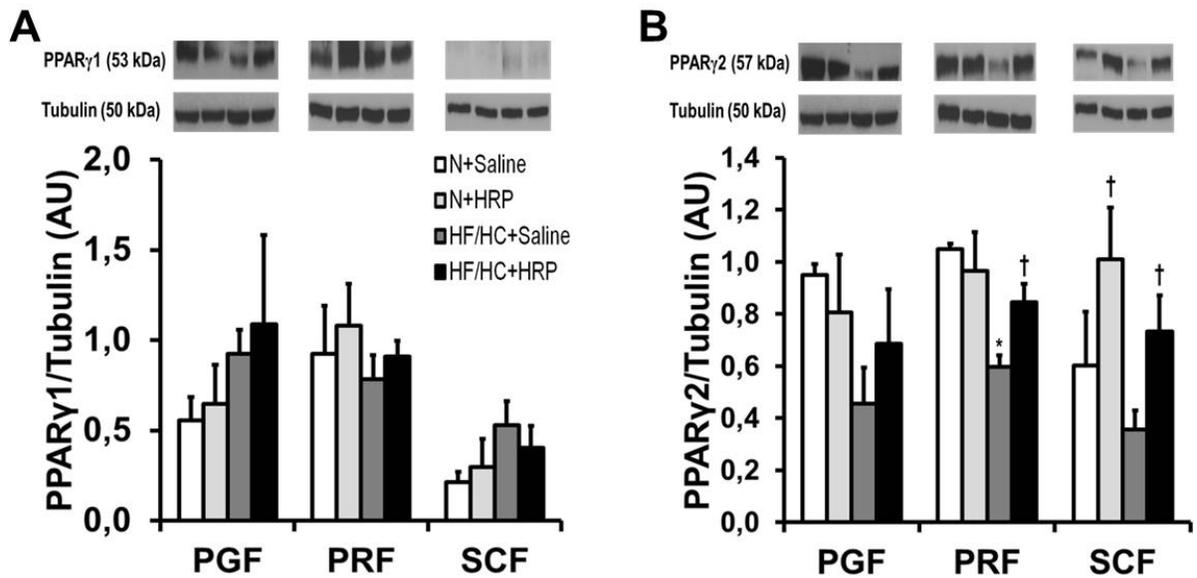


Fig. 6. HRP treatment increases a marker for adipogenesis in SCF of obese mice. (A and B) PPAR γ 1 and PPAR γ 2 protein levels in adipose tissue. Equal loading of 30 μ g of proteins were done in each well for Western Blot. Data are normalized to tubulin protein levels and are presented as means \pm SE with $n = 4-7$ per group for PPAR γ 1 and PPAR γ 2 protein levels. * $p < 0.05$ compared to N diet; † $p < 0.05$ compared to saline. HF/HC, high-fat/high-carbohydrate diet; HRP, handle region peptide; N, normal; PGF, peri-gonadal fat; PPAR γ , peroxisome proliferator-activated receptor gamma; PRF, peri-renal fat; SCF, abdominal subcutaneous fat.

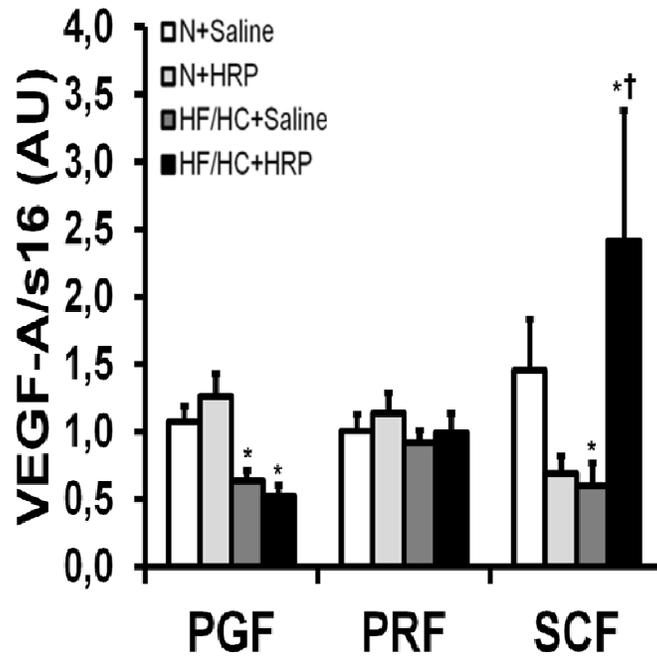


Fig. 7. HRP treatment increases a marker angiogenesis in SCF of obese mice. VEGF-A mRNA levels in adipose tissue. Data are normalized to s16 mRNA levels and are presented as means \pm SE with $n = 9-13$ per group for VEGF-A mRNA levels. * $p < 0.05$ compared to N diet; † $p < 0.05$ compared to saline. HF/HC, high-fat/high-carbohydrate diet; HRP, handle region peptide; N, normal; PGF, peri-gonadal fat; PRF, peri-renal fat; SCF, abdominal subcutaneous fat; VEGF-A, vascular endothelial growth factor A.

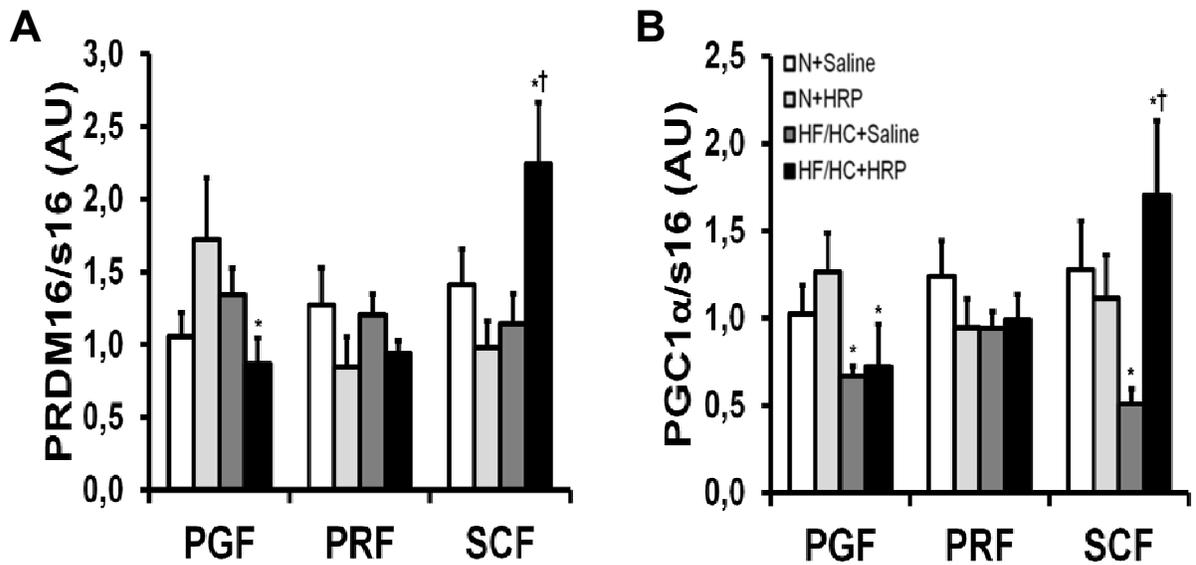


Fig. 8. HRP treatment increases markers for "beiging" in SCF of obese mice. (A and B) PRDM16 and PGC1 α mRNA levels in adipose tissue. Data are normalized to s16 mRNA levels and are presented as means \pm SE with $n = 9-13$ per group. * $p < 0.05$ compared to N diet; † $p < 0.05$ compared to saline. HF/HC, high-fat/high-carbohydrate diet; HRP, handle region peptide; N, normal; PGC1 α , peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha; PGF, peri-gonadal fat; PRDM16, PR domain containing 16; PRF, peri-renal fat; SCF, abdominal subcutaneous fat.

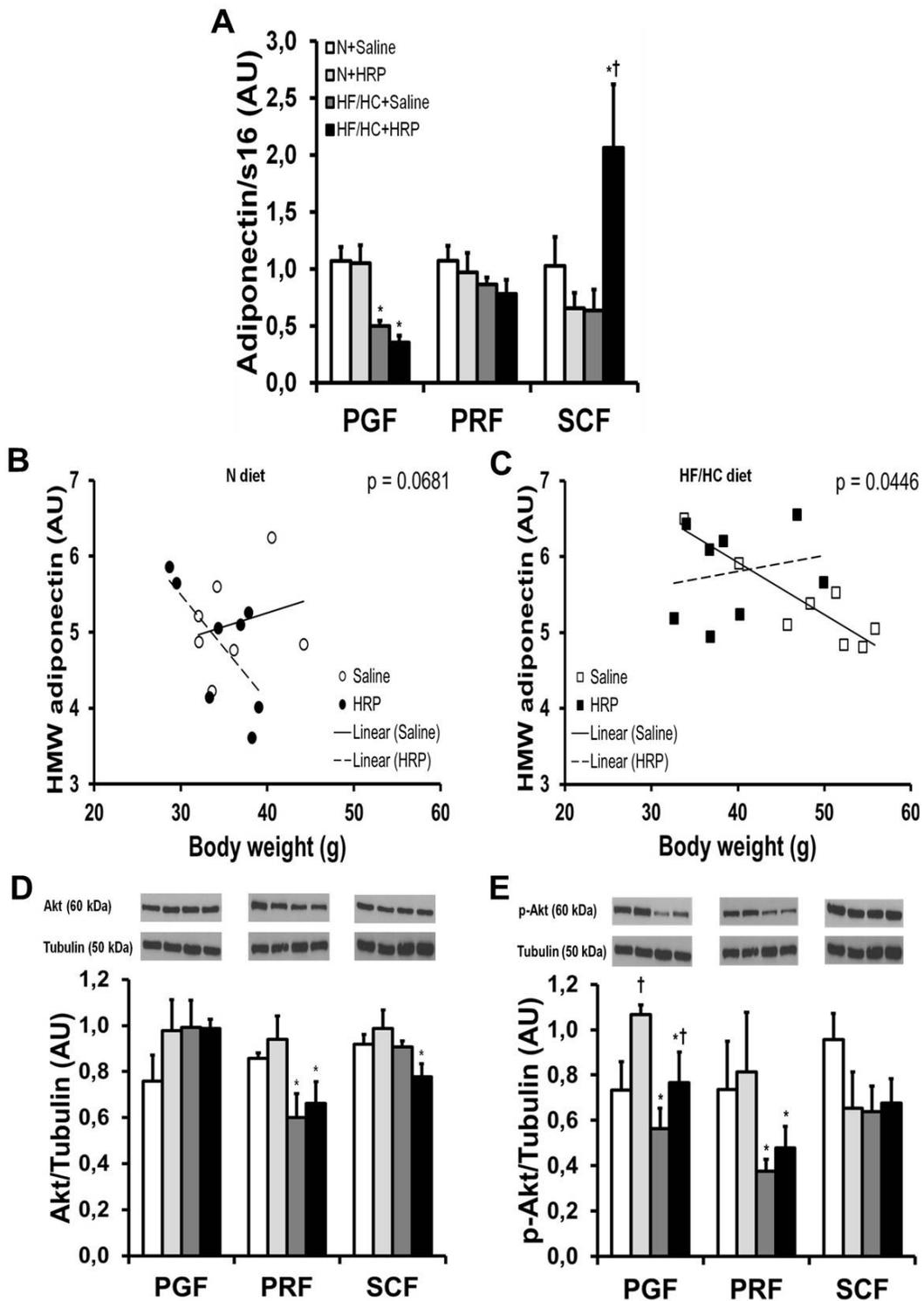


Fig. 9. HRP treatment may increase adiponectin and insulin signalling in obese mice. (A) Adiponectin mRNA levels in adipose tissue. **(B and C)** Correlation between plasma HMW and

body weight in mice on N or HF/HC diet. (*D* and *E*) p-Akt and Akt protein levels in adipose tissue. Equal loading of 10 μ L of plasma or 20 μ g of proteins were done in each well. Data are normalized to s16 mRNA levels and are presented as means \pm SE with $n = 9-13$ per group for adiponectin mRNA. $n = 8$ per group for the correlation analysis between plasma HMW adiponectin and body weight. Data are normalized to total Akt or tubulin protein levels and are presented as means \pm SE with $n = 4-7$ per group for p-Akt. * $p < 0.05$ compared to N diet; † $p < 0.05$ compared to saline. BW, body weight; HF/HC, high-fat/high-carbohydrate diet; HMW, high molecular weight; HRP, handle region peptide; MMW, medium molecular weight; N, normal; PGF, peri-gonadal fat; PRF, peri-renal fat; SCF, abdominal subcutaneous fat.

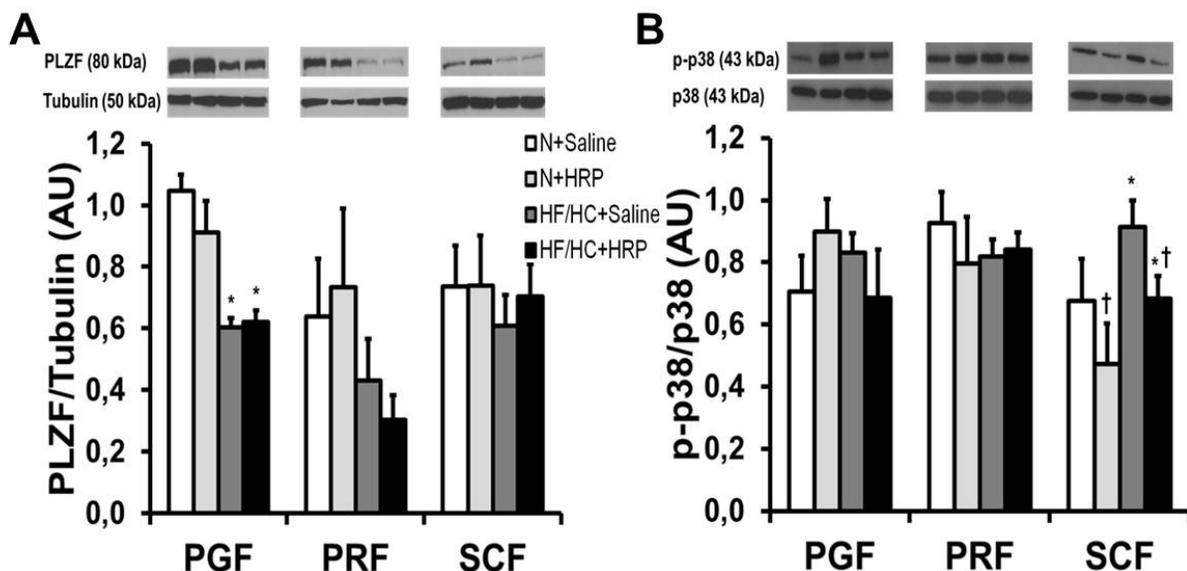


Fig. 10. PLZF is decreased in PGF and HRP treatment decreases p38 MAPK signalling in SCF of obese mice. (A and B) PLZF and p-p38 protein levels in adipose tissue. Equal loading of 20 or 50 μ g of proteins were done in each well. Data are normalized to tubulin protein levels for PLZF and to total p38 MAPK protein levels for p-p38 and are presented as means \pm SE with $n = 4-7$ per group. * $p < 0.05$ compared to N diet; † $p < 0.05$ compared to saline. HF/HC, high-fat/high-carbohydrate diet; HRP, handle region peptide; MAPK, mitogen-activated protein kinase; N, normal; PGF, peri-gonadal fat; PLZF, promyelocytic leukaemia zinc finger; PRF, peri-renal fat; SCF, abdominal subcutaneous fat.

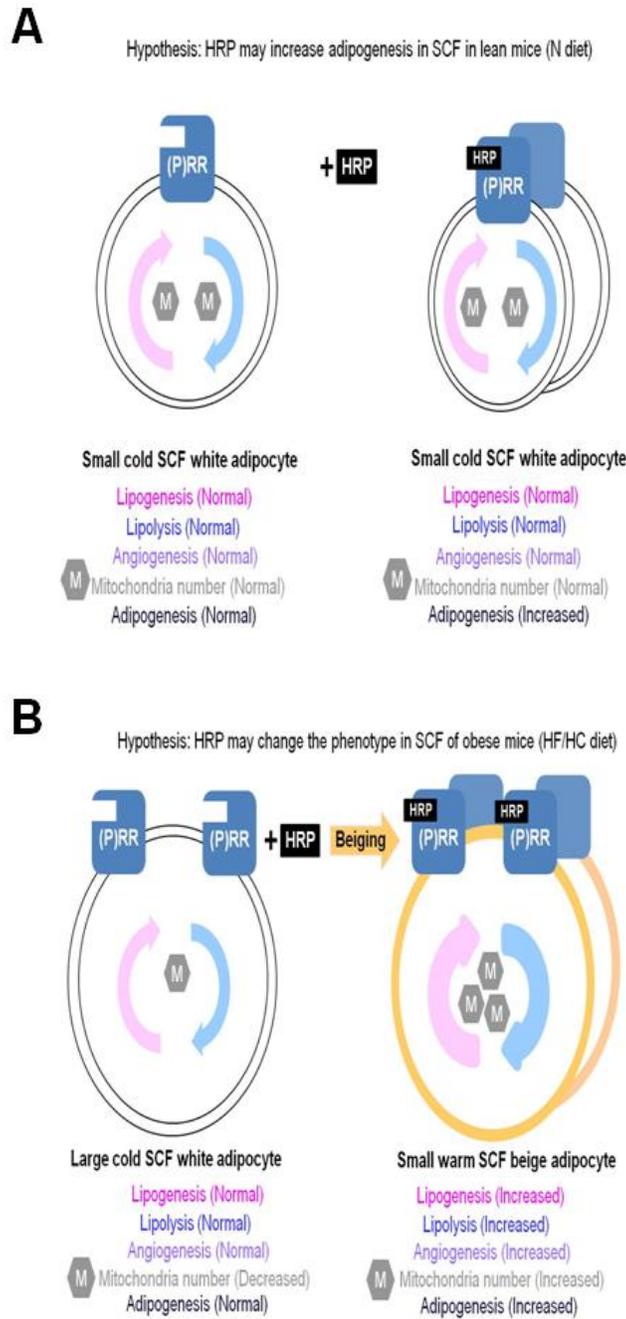


Fig. 11. Proposed model for the effects of HRP treatment on the phenotype of SCF adipocytes. (A and B) HRP effects on adipocyte in lean and obese mice. HF/HC, high-fat/high-carbohydrate diet; HRP, handle region peptide; N, normal; (P)RR, prorenin and renin receptor; SCF, abdominal subcutaneous fat.

Chapitre 8 - Discussion

8.1 Résumé des travaux

Le rôle du (P)RR dans le développement des complications du diabète et de l'hypertension est bien établi (**Chapitre 4, Section 4.4 et 4.6, Page 46 et 53**) alors que celui dans le développement de l'obésité a été soulevé à quelques reprises (153;257). Toutefois, peu d'attention a été accordée pour le mettre en évidence. La question principale menant à cette thèse est de savoir si le (P)RR est impliqué dans le développement de cette maladie chez la souris. Nos travaux ont permis de répondre à cette question ainsi qu'aux sous-questions (**Chapitre 5, Section 5.3, Page 74**).

Le premier manuscrit rapporte pour la première fois que le (P)RR est impliqué dans le développement de l'obésité chez un modèle de souris obèse induite par une diète HF/HC (261) (**Chapitre 6, Page 76**). Nous avons utilisé le HRP, un bloqueur du (P)RR, à titre de traitement préventif en l'administrant à des souris normales simultanément avec une diète HF/HC. À la fin du traitement, nous avons observé que la rénine et le (P)RR sont présents dans le tissu adipeux des souris et augmentent avec l'obésité. Les animaux HF/HC+HRP avaient une réduction de gain de poids corporel associée à une diminution de la masse du VAT sans changement dans la consommation alimentaire. De plus, la réduction de l'expression de plusieurs adipokines dans le SCF et le VAT suggère une diminution de la résistance à l'insuline, de l'inflammation et de l'infiltration des macrophages. Chez ces animaux, la baisse d'insuline circulante avec des niveaux de glucose similaire suggère aussi une augmentation de la sensibilité à l'insuline. D'autre part, l'expression génique du (P)RR est augmentée dans le SCF chez la femme obèse résistante à l'insuline.

Ces travaux ont soulevé une autre question importante afin de comprendre comment le HRP produit ces effets chez la souris. Le deuxième manuscrit cherche à trouver quelques mécanismes potentiels en utilisant le même ensemble de souris (**Chapitre 7, Page 132**). Nous avons trouvé que l'expression de l'enzyme responsable de la dernière étape de la lipogenèse est diminuée dans le VAT des souris HF/HC traitées avec le HRP ce qui pourrait peut-être expliquer la réduction de la masse viscérale observée dans le premier manuscrit. Nos résultats

suggèrent également que le HRP pourrait augmenter l'adipogenèse ce qui donnerait un plus grand nombre d'adipocytes pour entreposer plus de gras dans le tissu adipeux des souris HF/HC afin d'éviter un dépôt ectopique. Cela semble être appuyé par l'augmentation de l'expression de plusieurs enzymes impliquées dans la lipogenèse et la lipolyse uniquement dans le SCF des souris HF/HC et ce dernier soulève l'hypothèse qu'un cycle futile pourrait être activé. Le "brunissement" du tissu adipeux est la présence de cellules similaires aux adipocytes bruns dans le tissu adipeux qui sont caractérisés par une grande densité mitochondriale et la thermogenèse. Les résultats d'expression de quelques marqueurs laissent également croire qu'il pourrait avoir un "brunissement" du SCF, un effet non-rapporté par les RASi. L'augmentation de l'expression de l'adiponectine dans le SCF, mises ensembles avec les résultats du premier manuscrit sur l'insuline et le glucose, pourrait refléter une meilleure sensibilité à l'insuline chez les souris HF/HC+HRP. Ainsi, la réduction de gain de poids observée chez les souris HF/HC+HRP pourrait être occasionnée par une diminution de la lipogenèse dans le VAT, l'activation d'un cycle futile et le "brunissement" du SCF permettant de maintenir la distribution et l'utilisation saine du gras. Finalement, nous avons démontré que l'augmentation du (P)RR dans le tissu adipeux est probablement dû à une réduction de PLZF.

8.2 - Similarités avec la littérature

8.2.1 Dose et durée du traitement au HRP

Le scepticisme entourant les effets *in vivo* du HRP résulte de la divergence des observations rapportées dans nombreuses recherches. Par conséquent, deux écoles de pensée existent sur l'utilisation du HRP qui pour certains démontrent des effets physiologiques bénéfiques (**Chapitre 4, Section 4.6, Page 53**) et qui pour d'autres rapportent l'absence d'effets physiologiques, un effet dommageable ou un effet neutralisant lorsque combiné avec un autre traitement (**Chapitre 4, Section 4.6.4, Page 65**). Pour les raisons soulevées précédemment, la dose employée et la durée du traitement au HRP sont les différences les plus communes et sont probablement à l'origine de la plupart des divergences. Nous avons choisi la dose (0,1 mg/kg/jour) et le temps de traitement (10 semaines) pour le HRP de souris en se basant sur les travaux d'Ichihara *et al* qui avait conçu et démontré que le peptide prévient le

développement de la néphropathie diabétique chez un modèle de rat diabétique de type 1 induit par la STZ (169). Nos travaux confirment que la dose de HRP utilisée et la période allouée au traitement permet d'observer des effets bénéfiques chez notre modèle de souris. Ceci révèle que ces deux paramètres sont des facteurs à considérer pour les études *in vivo* subséquentes impliquant le HRP considérant que pour notre étude, les effets sur le poids ne peuvent être observables qu'à partir de 9 semaines de traitement.

8.2.2 Expression et présence de la rénine dans le tissu adipeux

Un de nos sous-objectifs était de vérifier la présence de la rénine dans le tissu adipeux puisque certain ne détecte pas cette enzyme (89;90;92;96;153). Ce point est crucial du point de vue rationnel de cette thèse puisque nous suggérons que le (P)RR mène à l'obésité en raison de l'augmentation de l'activité catalytique de la rénine ce qui entraîne une amplification de la production d'Ang II (**Chapitre 4, Figure 7, Page 39**). Par la méthode de qPCR et de Western Blot, nous avons découvert que la rénine est exprimée et présente dans les 3 tissus adipeux étudiés tant chez les souris ayant une diète normale que sur celles ayant une diète HF/HC (**Chapitre 6, Figure 1, Page 104**) (261). Il est connu que l'expression de la rénine est indétectable dans le PGF des rats ayant une diète normale lorsque la méthode de RT-PCR est employée (97). Lorsque ce groupe de recherche a repris l'expérience par qPCR, la présence de la rénine dans le même gras a été confirmée. Il s'avère ainsi possible que les divergences soient attribuables aux différences dans la sensibilité de la technique utilisée. La présence de la rénine nous permet de sous-entendre qu'il y ait un RAS fonctionnel dans le tissu adipeux (**Chapitre 4, Figure 7, Page 39**).

8.3 - Raffinement des observations par les RASi

À notre connaissance, aucune observation n'a été rapportée lors de l'administration du HRP sur un modèle animal d'obésité. La plupart de nos observations sont similaires à celles connues sur l'utilisation des RASi chez le rongeur obèse induit par une diète riche en gras (125;130;131;262-267). Toutefois, nous avons des résultats additionnels qui élargissent les études actuelles sur les RASi ainsi que des observations non- rapportées à ce jour.

8.3.1 PPAR γ et ses deux isoformes

Nous n'avons pas seulement trouvé que le HRP augmente PPAR γ dans le tissu adipeux comme pour la plupart des RASi puisque nous avons regardé la modulation de chacune des deux isoformes (**Chapitre 7, Figure 6, Page 177**). Cela est important car il est reconnu *in vitro* que seul PPAR γ 2 active l'adipogenèse (formation *de novo* d'adipocytes) dans les adipocytes 3T3-L1 (268). PPAR γ 2 demeure présent dans le tissu adipeux de manière prédominante (269). De la sorte, PPAR γ 2 est modulé par l'obésité et le changement nutritionnel tant chez le rongeur que chez l'homme (270;271). Nous avons découvert que PPAR γ 2 est l'isoforme spécifiquement modulée par la diète HF/HC et par le traitement du HRP dans le tissu adipeux de nos souris. Nos résultats confirment les observations précédentes et viennent appuyer que PPAR γ 2 a probablement un rôle plus important que PPAR γ 1 dans l'adipogenèse.

8.3.2 Adiponectine et ses différentes formes circulantes

Nous avons suggéré que l'amélioration probable de la sensibilité à l'insuline par le HRP pourrait être reflétée par une augmentation de l'expression et de la sécrétion de l'adiponectine par le SCF (**Chapitre 7, Figure 9, Page 180**). Il est connu qu'il y a une corrélation inverse entre le poids corporel et les niveaux de l'adiponectine circulante, c'est-à-dire que les niveaux d'adiponectine circulante diminuent avec l'augmentation du poids corporel (272). Chez nos souris obèses, nous avons observé un changement dans cette relation entre les deux paramètres uniquement chez les souris obèses dépendamment du traitement. Pour un même poids corporel

chez les animaux obèses, les souris traitées avec le HRP semble avoir plus d'adiponectine HMW circulante que celles traitées au salin (**Chapitre 7, Figure 9, Page 180**). Cela est une observation qui n'a pas été rapportée par les études administrant un RASi chez le rongeur (130;134;267). *In vitro* et *in vivo*, il est connu que les différentes formes circulantes de l'adiponectine ne s'interchangent pas durant un défi métabolique même avec une injection d'insuline (273). Par conséquent, une modification de cette corrélation chez les souris HF/HC+HRP pourrait partiellement être due à une plus grande sécrétion d'adiponectine HMW par le SCF comme le suggère les résultats d'expression.

8.4 - Voies responsables des effets du HRP

Une des actions du HRP est la réduction des niveaux d'Ang II alors que les RASi inhibent sa production ou ses effets via l'AT1R. Par conséquent, les observations dans nos études devraient être de moindre ampleur que celles observées avec l'utilisation des RASi si les effets du HRP le sont principalement via une réduction de la production d'Ang II. Pourtant, certaines de nos observations sont similaires voir supérieures (i.e. TG circulants) à celles rapportées par l'administration d'un RASi chez le rongeur suggérant qu'une réduction de la voie dépendante de l'Ang II ne peut entièrement expliquer nos résultats. Nous pensons ainsi que l'obstruction des voies de signalisation du (P)RR indépendantes de l'Ang II par le HRP y contribueraient également comme le suggère la réduction de phosphorylation de p38 MAPK dans le SCF des souris (**Chapitre 7, Figure 10, Page 182**).

8.5 - Nouvelles observations avec le HRP par rapport aux RASi

8.5.1 Cycle futile des triglycérides/acide gras libres

Nous avons observé quelques paramètres métaboliques circulants normalisés chez les souris HF/HC+HRP. Toutefois, ces souris ont un poids corporel plus élevé que celui des souris témoins ayant une diète normale (**Chapitre 6, Figure 2, Page 105**) (261). Ceci suggère que le phénotype observé chez nos souris obèses est plus qu'un simple effet du HRP sur le poids corporel et qu'il le serait aussi probablement via un effet sur le métabolisme des lipides. Une

étude rapporte que l'administration d'un ACEi chez le rat ayant une diète normale augmente les niveaux d'expression de la FAS et HSL dans le PGF suggérant une augmentation de la lipogenèse et de la lipolyse (263). Nous avons observé la modulation d'un plus grand nombre d'enzymes impliquées dans les deux processus dans différents tissus adipeux. En plus d'un effet sur la FAS et la HSL, nous avons remarqué une augmentation de l'expression génique de GyK et DGAT1 (deux enzymes lipogéniques) et de l'ATGL (une enzyme lipolytique) uniquement dans le SCF des souris HF/HC+HRP (**Chapitre 7, Figure 3 et 4, Page 174 et 175**). Contrairement à l'étude administrant le RASi chez le rat, nous suggérons que l'administration du HRP pourrait activer un cycle futile des triglycérides/acides gras libres puisque l'augmentation de FAS et de GyK favoriserait le recyclage des acides gras et du glycérol pour redémarrer continuellement la lipogenèse et la lipolyse (**Figure 10, Page 190**).

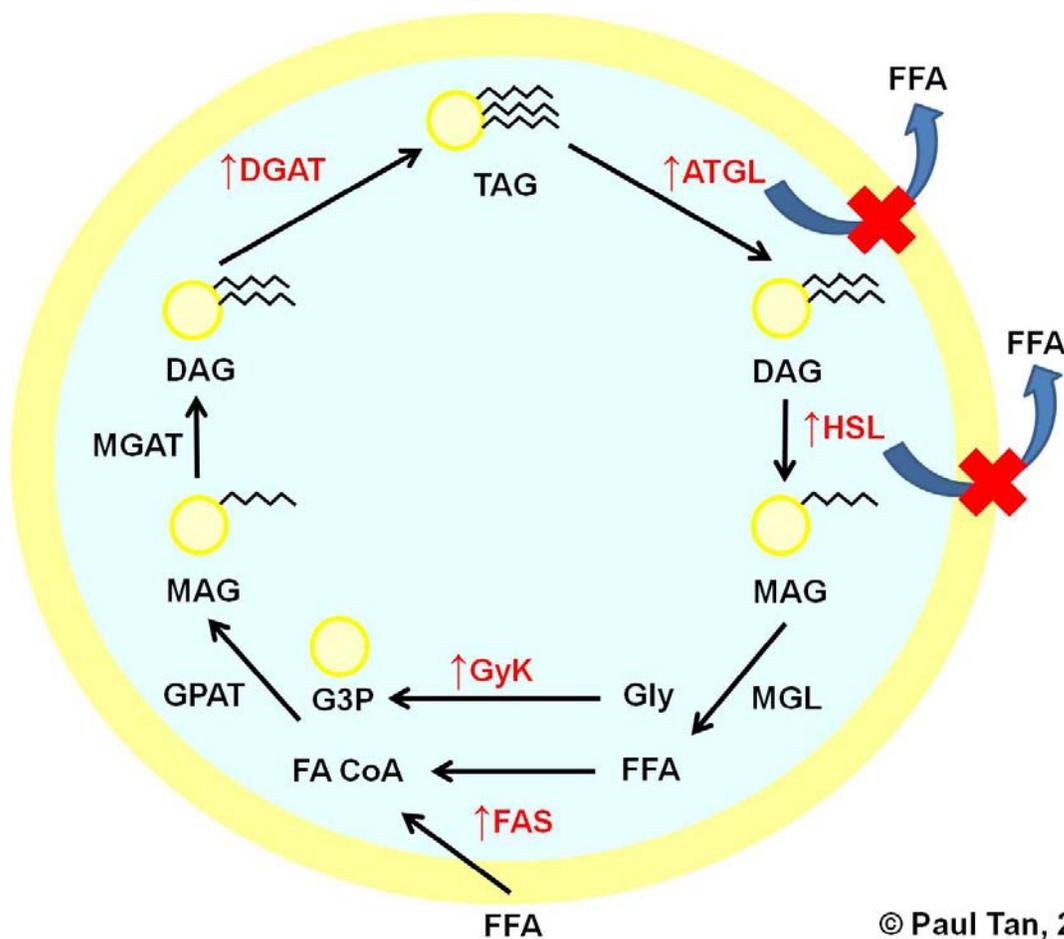


Figure 10. Modèle du cycle triglycérides/acides gras dans le SCF des souris HF/HC+HRP.

Nos travaux laissent croire qu'il y a une activation potentielle d'un cycle futile dans le SCF des souris sur une diète HF/HC puisque l'expression de plusieurs enzymes impliquées dans la lipogénèse et la lipolyse sont augmentées (mots en rouge). Les autres enzymes (mots en noir au milieu des flèches) n'ont pas été évaluées dans nos études. Par conséquent, il est possible que les FFA ne soient pas relâchés par les adipocytes après la lipolyse (flèches courbées) et sont recyclés dans une réserve permettant une réutilisation répétitive. **ATGL**, lipase de triglycéride du tissu adipeux; **DAG**, diacylglycérol; **DGAT**, diglycéride acyltransférase; **FAS**, synthase des acides gras; **FA CoA**, acide gras coenzyme A; **FFA**, acide gras libre; **G3P**, glycérol-3-phosphate; **Gly**, glycérol; **GPAT**, glycérol-3-phosphate acyltransférase; **GyK**, glycérol kinase; **HSL**, lipase sensible à l'hormone; **MAG**, monoacylglycérol; **MGAT**, monoacylglycérol acyltransférase; **TAG**, triacylglycérol; **MGL**, lipase de monoacylglycérol.

8.5.2 "Brunissement" du SCF

Nous sommes les premiers à suggérer que le HRP pourrait induire la formation d'adipocyte beige dans le SCF des souris ayant une diète HF/HC car aucune étude administrant des RASi ne rapporte un tel effet (**Chapitre 7, Figure 8, Page 179**). Ce tissu adipeux pourrait être caractérisé par un plus grand nombre de mitochondries ce qui favoriserait la thermogénèse. La question est maintenant de savoir comment le (P)RR pourrait être impliqué dans ce processus. Chez la souris, il est connu qu'une inactivation spécifique du récepteur Notch dans le tissu adipeux entraîne un "brunissement" du SCF caractérisé par une augmentation de l'expression génique de PRDM16 et PGC1 α alors qu'une surexpression de Notch mène à des observations opposées (274). La liaison du ligand *Jagged* au récepteur Notch active sa signalisation qui consiste à cliver le récepteur par la γ -sécrétase (275). Ceci relâche le domaine intracellulaire de Notch qui se déplace vers le noyau et initie la transcription des gènes impliqués soit par exemple dans le développement, la prolifération et l'inhibition de l'apoptose et les effets classiques de l'activation de la signalisation de Notch (276;277).

In vitro, l'Ang II augmente l'activité catalytique de la γ -sécrétase via l'AT1R entraînant une hausse du domaine intracellulaire de Notch (278). Cela suggère que le RAS stimule la signalisation de Notch. En effet, les souris diabétiques traitées avec un ARB ont une réduction du domaine intracellulaire de Notch et des niveaux de TGF- β 1 dans les cellules glomérulaires (279). Puisque TGF- β 1 stimule la signalisation de Notch (280), les observations suggèrent que l'Ang II active Notch en augmentant TGF- β 1. Ainsi, le RAS pourrait être impliqué dans le "brunissement" du tissu adipeux via la signalisation de Notch. De plus, il a été rapporté que le récepteur de Notch est augmenté chez la souris obèse (274). L'augmentation du (P)RR et de la rénine chez nos souris obèses activeraient ainsi davantage la signalisation de Notch via l'AT1R. Ceci entraînerait une diminution de PRDM16 et PGC1 α qui sont des marqueurs clé de l'activation du programme de "brunissement" du tissu adipeux. L'administration du HRP chez nos souris ayant une diète HF/HC diminuerait probablement la signalisation de Notch après avoir réduit les niveaux d'Ang II dans le SCF. Nous ne sommes pas en mesure de confirmer si la voie de signalisation du (P)RR indépendante de l'Ang II en serait également responsable.

Toutefois, TGF- β 1 est aussi une composante de la voie de signalisation du (P)RR indépendante de l'Ang II (140). Par conséquent, il est possible que cette dernière soit également impliquée.

8.6 - Différences avec la littérature

8.6.1 Leptine et son effet sur la prise alimentaire

La leptine est un marqueur du tissu adipeux réduisant également la consommation alimentaire via son action sur l'hypothalamus au niveau du cerveau (**Chapitre 2, Section 2.6, Page 16**) (59). Chez nos souris ayant une diète HF/HC, le HRP réduit l'expression génique de la leptine dans le tissu adipeux ainsi que ses niveaux circulants (**Chapitre 6, Figure 3, Page 106**) (261). Par conséquent, nous nous attendons à ce que la consommation alimentaire augmente chez ces animaux. Pourtant, ce paramètre demeure inchangé suggérant ainsi que ces souris mangent autant que leurs confrères. Il est bien établi que l'obésité mène à une résistance à la leptine, c'est-à-dire que l'hypothalamus ne répond plus à la leptine, le tissu adipeux en sécrète davantage et une hyperphagie s'ensuit (281). Toutefois, la résistance à la leptine causée par une obésité induite par une diète riche en gras est réversible (282). Nos souris HF/HC consomment plus de calories malgré une augmentation de la leptine par rapport aux souris témoins ayant une diète normale suggérant ainsi qu'elles sont peut-être résistantes à la leptine. La réduction de la leptine chez les souris HF/HC+HRP pourrait suggérer une amélioration de la sensibilité à la leptine et les souris semblent y répondre parce qu'elles mangent autant que les souris HF/HC.

8.6.2 Utilisation du glucose par le muscle et le tissu adipeux

Le transport du glucose dans les cellules se fait par le transporteur de glucose 4. Cette étape est précédée d'une translocation de ces transporteurs de l'intérieur de la cellule vers la membrane plasmique après l'activation de la voie de signalisation de l'insuline menant à la phosphorylation d'Akt (p-Akt) (283). Chez nos souris, l'obésité diminue p-Akt dans le PGF et le traitement au HRP l'augmente (**Chapitre 7, Figure 9, Page 180**). Ces résultats sous-

entendent que l'obésité pourrait diminuer le transport du glucose dans le tissu adipeux alors que le HRP l'augmenterait. Il est largement accepté que le muscle consomme plus de glucose que le tissu adipeux chez un individu sain et que l'obésité entraîne généralement une diminution dans le transport du glucose des deux tissus (284-287). Chez des sujets sains, l'absorption musculaire de glucose représente 40% des hydrates de carbone ingérés lors d'un repas alors que celle du tissu adipeux est de 10% lorsque les mesures sont exprimées par unité de tissu suggérant que le gras n'est pas l'utilisateur principal du glucose (286). Pourtant, l'absorption de glucose postprandiale dans le muscle (20%) et dans le tissu adipeux (20%) est similaire chez les sujets obèses lorsque les mesures sont ajustées par la masse totale de chacun des tissus. De plus, la contribution du tissu adipeux dans l'absorption corporelle entière du glucose (ajustée par la masse totale de graisse) augmente de 40% chez les individus obèses comparativement aux individus sains (288). Ceci laisse entendre que l'absorption du glucose (ajustée par la masse totale de graisse) dans le tissu adipeux chez nos souris obèses est possiblement similaire à celle dans le muscle (ajustée par la masse totale de muscle) puisque ces animaux ont plus de masse grasse (**Chapitre 6, Figure 2, Page 105**). Le gras est un tissu dynamique qui se développe/atrophie continuellement suggérant que l'augmentation du tissu adipeux avec l'obésité peut procurer un endroit alternatif pour l'absorption du glucose postprandial lorsque la capacité du muscle est saturée. Nos résultats sur les niveaux de p-Akt dans le PGF des souris HF/HC+HRP suggère qu'il pourrait avoir augmentation du transport du glucose vers le PGF comparativement aux animaux témoins.

8.7 - Effet du HRP sur la fonction cardiaque

Nous avons découvert que l'obésité entraîne une augmentation du (P)RR spécifiquement dans le tissu adipeux des souris obèses puisque les niveaux du récepteur sont similaires dans plusieurs autres tissus tels le coeur, le foie et les reins (**Chapitre 6, Figure S1, Page 116**) (261). Cela suppose un rôle pour le (P)RR dans le tissu adipeux au sein du développement de l'obésité chez nos souris. Nous avons aussi découvert une réduction de l'expression génique de plusieurs adipokines dans le tissu adipeux des souris HF/HC+HRP suggérant une diminution de la résistance à l'insuline, de l'inflammation et de l'infiltration de

macrophages (**Chapitre 6, Figure 3 et 4, Page 106 et 107**). Par conséquent, l'ensemble de ces observations laisse croire que l'effet du HRP est plus prononcé dans le gras. Nous nous sommes ainsi concentrés sur ce tissu pour trouver les mécanismes d'actions du HRP. Toutefois, l'absence de modulation du (P)RR avec l'obésité dans un tissu quelconque ne signifie pas que le HRP n'aura pas d'effet sur celui-ci puisque l'administration du peptide est systémique dans notre étude. Par exemple, le HRP empêche la détérioration de la fonction cardiaque indépendamment de la diète malgré que les niveaux du (P)RR cardiaque soient similaire aux souris témoins (261) (**Chapitre 6, Figure 6 et Tableau S8, Page 109 et 128**). Ce résultat ne devrait pas être attribuable à une diminution du RAS systémique puisque d'autres études ainsi que la nôtre ont démontré que le HRP ne modifie pas les niveaux et/ou l'activité des composantes circulantes du RAS (**Chapitre 6, Figure S2, Page 117**) (169;224;226;227;235;238;245;261).

8.8 - Limitations

8.8.1 HRP modifie-t-il le type de macrophages présent dans le tissu adipeux?

Nous avons montré que l'expression génique de F4/80 (marqueur des macrophages) augmente dans le VAT de nos souris HF/HC+Saline comparativement aux animaux témoins (**Chapitre 6, Figure 4, Page 107**) (261). Le HRP réduit son expression dans le PGF (un VAT) indépendamment de la diète. Toutefois, nous avons aussi remarqué une augmentation de l'expression de F4/80 dans le SCF des souris HF/HC+HRP comparativement aux animaux témoins HF/HC. Ceci sous-entend que le HRP réduirait les niveaux de macrophages dans le VAT alors qu'il les augmenterait dans le SCF des animaux obèses. Cette observation divergente nous amène à considérer la présence d'une population de macrophages différents entre le VAT et le SCF.

Il existe deux sous-ensembles de macrophages soit les macrophages M1 activés de manière classique et les macrophages M2 activés de manière alternative. Les macrophages M1 sécrètent des molécules pro-inflammatoires telles le TNF α et l'IL-6 alors que les macrophages M2 sécrètent des molécules anti-inflammatoires comme l'IL-10 (289). Nos résultats sur

l'expression de F4/80 possèdent une limitation, c'est-à-dire que les données ne permettent pas de distinguer les macrophages activés M1 et M2 car ce marqueur est commun aux deux (290). Par conséquent, il est difficile de conclure si l'augmentation de l'expression de F4/80 observée dans le SCF des souris HF/HC+HRP est causée par les macrophages M1 et/ou M2. Néanmoins, la quasi-totalité des macrophages du tissu adipeux sont de type M1 et sont davantage présents dans le VAT que dans le SCF, à proximité des adipocytes morts formant des structures ressemblant à des couronnes (291;292). En raison de cette différence dans la localisation des macrophages, il est possible que l'effet du HRP sur l'expression de F4/80 dans le VAT de nos souris soit plus représentatif d'une diminution des macrophages M1 alors que celui dans le SCF pourrait être représenté par une plus grande population de macrophages M2. Il est possible que ceci soit la résultante d'un effet quelconque du HRP sur les cytokines présentes dans le SCF qui favoriserait une polarisation vers les macrophages M2. Chez la souris, l'administration d'un ARB réduit l'expression des marqueurs de macrophages M1 et augmente ceux des macrophages M2 dans le VAT (266). Il serait intéressant de regarder chez nos souris la modulation de ces marqueurs permettant de différencier les deux types de macrophages. Par exemple, il est possible de mesurer dans les différents tissus adipeux les niveaux de CD11c, un marqueur des macrophages M1, et les niveaux de CD206, un marqueur des macrophages M2 (293). Le RAS est impliqué dans l'inflammation du tissu adipeux puisque que l'Ang II stimule l'expression des marqueurs pro-inflammatoires via AT1R de manière *in vitro* et *in vivo* (294-296). En réduisant la production d'Ang II, le HRP pourrait avoir diminué l'inflammation dans le tissu adipeux de nos souris ayant la diète HF/HC. Ceci est pertinent puisque l'inflammation dans le tissu adipeux entraîne la résistance à l'insuline, la lipolyse et une diminution de l'adipogenèse (297-299).

8.8.2 Laquelle des deux voies du (P)RR contribue le plus?

Bien que le HRP amène plusieurs effets bénéfiques chez nos souris ayant une diète HF/HC, la conception de notre modèle animal possède une limitation. Nous ne sommes pas en mesure d'isoler séparément les effets du HRP sur la voie du (P)RR dépendante et indépendante de l'Ang II car *in vivo* le peptide a un impact simultané sur les deux voies (**Chapitre 4, Figure**

9, Page 54). Toutefois, plusieurs études et les nôtres suggèrent que le HRP produit des effets bénéfiques supplémentaires en comparaison aux RASi et ce, probablement via une interférence avec la signalisation du (P)RR indépendante de l'Ang II (169;224;261). Dans les années à venir, il sera important de déterminer dans le tissu adipeux si cette voie contribue plus ou moins aux observations de notre modèle animal. Ceci peut être réalisé en inactivant l'AT1R et/ou l'AT2R spécifiquement dans le tissu adipeux de la souris afin d'inhiber la voie dépendante de l'Ang II. Nous pourrions donc comparer les effets de ce modèle animal avec la nôtre afin d'évaluer l'importance de chacune des voies. Pour identifier les voies responsables, la culture primaire d'adipocyte de souris provenant des différents tissus adipeux peut aussi être utilisée conjointement avec les composantes du RAS, les RASi et le HRP. À cet effet, les études de stimulation d'adipocyte *in vitro* nous procurent un avantage. Nous pouvons contrôler plus précisément les voies de signalisation que nous activons/bloquons (i.e. celles du (P)RR) sans la contribution des composantes circulantes et des composantes de voies de signalisation différentes comme c'est le cas dans tout modèle animal *in vivo*.

8.8.3 HRP active-t-il un cycle futile des triglycérides/acide gras libres et le "brunissement"?

Nos résultats d'expressions géniques des enzymes impliquées dans la lipogenèse et la lipolyse indiquent que le cycle futile des triglycérides/acide gras libres pourrait être activé dans le SCF des souris HF/HC traitées avec le HRP (**Chapitre 7, Figure 3 et 4, Page 174 et 175**). Pour confirmer ceci, les tissus adipeux des 4 groupes de souris peuvent être isolés et chaque dépôt de gras peut être mis en présence de palmitate radioactif avec la prorénine ou le HRP. La mesure de la concentration de radio-isotope et de métabolites dans le milieu et dans le tissu adipeux indiquera si le HRP augmente la lipogenèse et la lipolyse. Nous avons également des résultats suggérant que le HRP pourrait brunir le SCF et que les adipocytes pourraient avoir plus de mitochondries (**Chapitre 7, Figure 8, Page 179**). Pour vérifier que le HRP induit un "brunissement", les tissus adipeux isolés de souris peuvent être traités avec la prorénine ou le HRP afin d'évaluer le taux de consommation d'oxygène. Des analyses

histologiques sur le tissu adipeux permettront également d'évaluer le nombre et la taille des adipocytes et l'abondance des mitochondries.

8.8.4 (P)RR est-t-il modulé avec l'obésité et après une perte de poids corporel chez l'homme?

Nos résultats sur l'expression génique du (P)RR chez la femme obèse (**Chapitre 6, Tableau 1, Page 102**) étaient limités par l'absence de donnée sur les femmes non-obèses de telle sorte que nous avons uniquement observé un changement des niveaux de (P)RR avec la résistance à l'insuline. Par conséquent, la modulation du (P)RR dans le tissu adipeux avec l'obésité et après une perte de poids corporel n'a pu être étudiée. Pour vérifier si la modulation du (P)RR avec l'obésité est similaire chez le rongeur et l'homme, il demeure essentiel de comparer l'expression génique et protéique du (P)RR dans le SCF et le VAT entre les sujets hommes et femmes (normal, obèse sensible ou résistante à l'insuline et diabétique de type 2). Afin d'étudier les modulations du (P)RR après une perte de poids importante (i.e. chirurgie bariatrique), les tissus adipeux provenant de sujets ayant eu une perte de poids peuvent être prélevés et refaire des analyses similaires.

8.9 - Impact clinique du (P)RR et du HRP sur le développement de l'obésité

Nous sommes les premiers à avoir observé que l'expression génique du (P)RR augmente dans le SCF chez la femme obèse résistante à l'insuline comparativement à la femme obèse sensible à l'insuline (**Chapitre 6, Tableau 1, Page 102**) (261). Nous avons également observé une augmentation des niveaux d'insulines circulantes chez les souris HF/HC+HRP suggérant que le HRP augmente la sensibilité à l'insuline (**Chapitre 6, Tableau 2, Page 103**). Mises ensemble, les résultats laissent croire que le (P)RR pourrait contribuer à la résistance à l'insuline. L'obésité est souvent associée à une résistance à l'insuline (300) et nos résultats pourraient avoir un impact clinique déterminant sur le développement de l'obésité et de ses complications. À ce jour, aucune étude sur les effets de l'administration du HRP n'a été effectuée chez des sujets humains. Néanmoins, plusieurs études rapportent des évidences sur

les effets de l'administration de différents RASi (ACEi, ARB et inhibiteur de la rénine) chez des patients obèses associés à une complication telle que l'hypertension. Plusieurs des observations découlant de ces essais cliniques sont similaires à celles de nos études chez la souris.

Après 3 mois de traitement, l'administration d'un ACEi diminue la pression artérielle, l'insulinémie à jeun et augmente la sensibilité à l'insuline chez des patients obèses hypertendus (301). Chez des sujets obèses intolérants au glucose, l'administration d'un ARB durant 1 mois semble réduire les marqueurs de l'inflammation en circulation et augmente les niveaux circulants d'adiponectine (302). Dans une autre cohorte de patients obèses hypertendus, un traitement à l'ARB diminue les niveaux circulants de glucose, d'insuline, de cholestérol et de leptine après 3 mois de traitement (303). Une analyse sur des biopsies de SCF provenant de sujets obèses nous amène également à observer qu'un ARB réduit la taille des adipocytes et l'infiltration des macrophages après 26 semaines de traitement (304).

Dans l'ensemble, ces études cliniques suggèrent que les RASi réduisent les complications associées à l'obésité. Toutefois, quelques points doivent être soulevés. L'utilisation des RASi présente des effets secondaires tels la toux, l'angioedème et des décès causés par des complications cardiovasculaires (305-307). Un ACEi empêche la conversion de l'Ang I en Ang II mais une chymase peut contourner l'inhibition en générant de l'Ang II indépendamment de l'ACE qui peut représenter jusqu'à 20% de la production (**Figure 11A, Page 200**) (308). Un ARB bloque la liaison de l'Ang II sur l'AT1R mais n'empêche pas l'Ang II et l'Ang IV de se fixer respectivement sur l'AT2R et l'AT4R/IRAP, ceci pouvant être néfaste car l'Ang II stimule la lipogenèse via l'AT2R (**Figure 11B**) (91). De plus, un ARB produit une augmentation des niveaux de la rénine puisque le mécanisme de rétro-inhibition sur la sécrétion de cette enzyme est diminué (143). Cela occasionnera à une hausse des niveaux d'Ang II qui lieront l'AT2R ou l'AT4R/IRAP et stimuleront davantage la lipogenèse. Finalement, un inhibiteur de la rénine empêche la production d'Ang II mais l'enzyme peut toutefois se fixer sur le (P)RR (**Figure 11C**). Le dénominateur commun entre ces 3 inhibiteurs est l'augmentation des niveaux de la rénine puisqu'ils finissent par diminuer le mécanisme de

rétro-inhibition sur la sécrétion de l'enzyme (137-142). Cela rend l'enzyme accessible au (P)RR et mène à l'activation des voies de signalisations indépendantes de l'Ang II. Comparativement à ces inhibiteurs, le HRP bloque les voies du (P)RR indépendantes de l'Ang II et diminue les voies dépendantes de l'Ang II (**Chapitre 4, Figure 9, Page 54**). Par conséquent, le système ne devrait pas être en mesure de contourner les effets du HRP car l'activation du RAS n'est pas bloquée. D'autre part, le HRP ne module pas l'activité de la rénine circulante ni les niveaux de l'enzyme dans le tissu adipeux et les reins chez nos souris suggérant que la boucle de rétro-inhibition demeure intacte (261). En résumé, le (P)RR a potentiellement un impact clinique dans le développement de l'obésité et le HRP pourrait être une alternative aux RASi pour le traitement cette maladie.

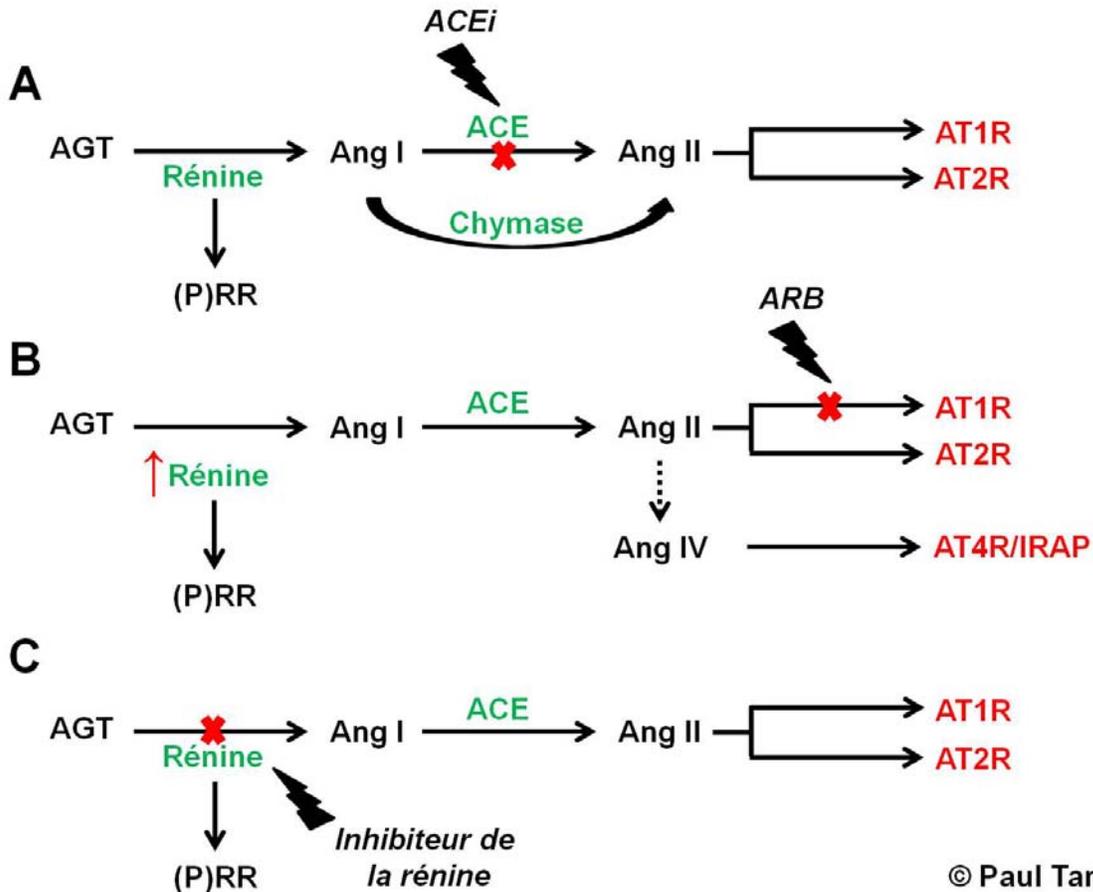


Figure 11. Effet des RASi sur le système rénine-angiotensine.

(A) Un ACEi inhibe la conversion de l'Ang I en Ang II mais la chymase peut contourner cette inhibition (~20%). (B) Un ARB bloque la liaison de l'Ang II sur l'AT1R mais ne prévient pas la liaison de l'Ang II sur l'AT2R ni celle de l'Ang IV sur AT4R/IRAP. Ainsi, l'ARB augmente les niveaux de la rénine. (C) Un inhibiteur de la rénine inhibe la conversion de l'AGT en Ang I mais ne prévient pas la liaison de la rénine sur le (P)RR. Les mots en vert représentent les enzymes et ceux en rouge représentent les récepteurs. La flèche pointillée représente plusieurs étapes de conversion de l'Ang II par des aminopeptidases. **ACE**, enzyme de conversion de l'angiotensine; **ACEi**, inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine; **AGT**, angiotensinogène; **Ang**, angiotensine; **ARB**, bloqueur du récepteur d'angiotensine; **AT1R**, récepteur type 1 de l'angiotensine II; **AT2R**, récepteur type 2 de l'angiotensine II; **AT4R**, récepteur type 4 de l'angiotensine IV; **IRAP**, aminopeptidase régulé par l'insuline; **(P)RR**, récepteur à la prorénine et à la rénine.

8.10 - Perspectives et conclusions

Il est essentiel de rappeler que nos études sont réalisées dans une perspective de prévention du développement de l'obésité et de ses complications puisque le HRP a été administré simultanément sur une diète HF/HC chez nos souris. Toutefois, il faut se rappeler que les patients sont souvent en surpoids ou obèses lorsqu'ils se présentent en clinique. Par conséquent, il sera important d'également évaluer l'utilité du HRP sur des souris devenues préalablement obèses avec une diète HF/HC et de leur administrer la même dose de HRP pendant la même durée du traitement. Nous pensons que l'utilisation du HRP après l'établissement de l'obésité pourrait produire des effets bénéfiques similaires à nos études de prévention car il a été rapporté que le HRP inhibe la néphropathie diabétique chez des rats devenus préalablement diabétique de type I par la STZ (227). Comme le traitement au HRP produit plusieurs phénotypes intéressants dans le tissu adipeux de nos souris ayant une diète HF/HC, une étude où le (P)RR est spécifiquement inactivé dans le tissu adipeux de la souris pourrait élargir notre compréhension sur le rôle du récepteur dans le développement de l'obésité.

Lorsque le rôle du (P)RR et les mécanismes d'actions du HRP sont bien établis chez la souris, il est possible d'évaluer le potentiel thérapeutique du peptide équivalent chez l'homme. Cela est important car il est essentiel de rappeler que l'obésité est associée à de nombreuses complications. La prévalence mondiale d'individus obèses est actuellement évaluée aux alentours de 2,3 milliards et les dépenses médicales associés étaient de 123 milliards de dollars aux États-Unis en 2001 (2;24). Un traitement pour l'obésité efficace et sécuritaire à long terme sera non seulement bénéfique pour les patients, mais représenterait également un allègement du fardeau budgétaire au sein du système actuel de santé.

Bibliographie

1. Wang Y, Beydoun MA. The obesity epidemic in the United States--gender, age, socioeconomic, racial/ethnic, and geographic characteristics: a systematic review and meta-regression analysis. *Epidemiol Rev* 2007; 29:6-28.
2. Nguyen N, Champion JK, Ponce J et al. A review of unmet needs in obesity management. *Obes Surg* 2012; 22(6):956-966.
3. Bell AC, Ge K, Popkin BM. Weight gain and its predictors in Chinese adults. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; 25(7):1079-1086.
4. Bell AC, Ge K, Popkin BM. The road to obesity or the path to prevention: motorized transportation and obesity in China. *Obes Res* 2002; 10(4):277-283.
5. Monda KL, Adair LS, Zhai F, Popkin BM. Longitudinal relationships between occupational and domestic physical activity patterns and body weight in China. *Eur J Clin Nutr* 2008; 62(11):1318-1325.
6. Wallingford JC, Yuhas R, Du S, Zhai F, Popkin BM. Fatty acids in Chinese edible oils: value of direct analysis as a basis for labeling. *Food Nutr Bull* 2004; 25(4):330-336.
7. Duffey KJ, Popkin BM. High-fructose corn syrup: is this what's for dinner? *Am J Clin Nutr* 2008; 88(6):1722S-1732S.
8. Sinha R, Cross AJ, Graubard BI, Leitzmann MF, Schatzkin A. Meat intake and mortality: a prospective study of over half a million people. *Arch Intern Med* 2009; 169(6):562-571.
9. Du S, Lu B, Zhai F, Popkin BM. A new stage of the nutrition transition in China. *Public Health Nutr* 2002; 5(1A):169-174.
10. Jones-Smith JC, Gordon-Larsen P, Siddiqi A, Popkin BM. Emerging disparities in overweight by educational attainment in Chinese adults (1989-2006). *Int J Obes (Lond)* 2012; 36(6):866-875.
11. Lamon-Fava S, Wilson PW, Schaefer EJ. Impact of body mass index on coronary heart disease risk factors in men and women. The Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16(12):1509-1515.
12. Deurenberg-Yap M, Schmidt G, van Staveren WA, Deurenberg P. The paradox of low body mass index and high body fat percentage among Chinese, Malays and Indians in Singapore. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24(8):1011-1017.

13. Deurenberg-Yap M, Chew SK, Lin VF, Tan BY, van Staveren WA, Deurenberg P. Relationships between indices of obesity and its co-morbidities in multi-ethnic Singapore. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; 25(10):1554-1562.
14. Appropriate body-mass index for Asian populations and its implications for policy and intervention strategies. *Lancet* 2004; 363(9403):157-163.
15. de Koning L, Merchant AT, Pogue J, Anand SS. Waist circumference and waist-to-hip ratio as predictors of cardiovascular events: meta-regression analysis of prospective studies. *Eur HeartJ* 2007; 28(7):850-856.
16. Huxley R, Mendis S, Zheleznyakov E, Reddy S, Chan J. Body mass index, waist circumference and waist:hip ratio as predictors of cardiovascular risk--a review of the literature. *Eur J Clin Nutr* 2010; 64(1):16-22.
17. Deitel M. Overweight and obesity worldwide now estimated to involve 1.7 billion people. *Obes Surg* 2003; 13(3):329-330.
18. Haslam DW, James WP. Obesity. *Lancet* 2005; 366(9492):1197-1209.
19. Henry SL, Barzel B, Wood-Bradley RJ, Burke SL, Head GA, Armitage JA. Developmental origins of obesity-related hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2012; 39(9):799-806.
20. Willett WC, Manson JE, Stampfer MJ et al. Weight, weight change, and coronary heart disease in women. Risk within the 'normal' weight range. *JAMA* 1995; 273(6):461-465.
21. Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA et al. Diabetes trends in the U.S.: 1990-1998. *Diabetes Care* 2000; 23(9):1278-1283.
22. Wannamethee SG, Shaper AG. Weight change and duration of overweight and obesity in the incidence of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 1999; 22(8):1266-1272.
23. Shukla A, Kumar K, Singh A. Association between obesity and selected morbidities: a study of BRICS countries. *PLoS One* 2014; 9(4):e94433.
24. Hossain P, Kavar B, El NM. Obesity and diabetes in the developing world--a growing challenge. *N Engl J Med* 2007; 356(3):213-215.
25. Astrup A. Dietary management of obesity. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2008; 32(5):575-577.
26. Deitel M. How much weight loss is sufficient to overcome major co-morbidities? *Obes Surg* 2001; 11(6):659.

27. Hvizdos KM, Markham A. Orlistat: a review of its use in the management of obesity. *Drugs* 1999; 58(4):743-760.
28. Martin M, Beekley A, Kjorstad R, Sebesta J. Socioeconomic disparities in eligibility and access to bariatric surgery: a national population-based analysis. *Surg Obes Relat Dis* 2010; 6(1):8-15.
29. Karlsson J, Taft C, Ryden A, Sjostrom L, Sullivan M. Ten-year trends in health-related quality of life after surgical and conventional treatment for severe obesity: the SOS intervention study. *Int J Obes (Lond)* 2007; 31(8):1248-1261.
30. Buchwald H, Avidor Y, BRAUNWALD E et al. Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2004; 292(14):1724-1737.
31. Chang SH, Stoll CR, Song J, Varela JE, Eagon CJ, Colditz GA. The effectiveness and risks of bariatric surgery: an updated systematic review and meta-analysis, 2003-2012. *JAMA Surg* 2014; 149(3):275-287.
32. Spalding KL, Arner E, Westermark PO et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 2008; 453(7196):783-787.
33. Ibrahim MM. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev* 2010; 11(1):11-18.
34. Arner P. Regional adiposity in man. *J Endocrinol* 1997; 155(2):191-192.
35. Miyazawa-Hoshimoto S, Takahashi K, Bujo H, Hashimoto N, Yagui K, Saito Y. Roles of degree of fat deposition and its localization on VEGF expression in adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288(6):E1128-E1136.
36. Hellmer J, Marcus C, Sonnenfeld T, Arner P. Mechanisms for differences in lipolysis between human subcutaneous and omental fat cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75(1):15-20.
37. Arner P, Hellstrom L, Wahrenberg H, Bronnegard M. Beta-adrenoceptor expression in human fat cells from different regions. *J Clin Invest* 1990; 86(5):1595-1600.
38. Tchkonina T, Giorgadze N, Pirtskhalava T et al. Fat depot origin affects adipogenesis in primary cultured and cloned human preadipocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; 282(5):R1286-R1296.
39. Korsic M, Gotovac K, Nikolac M et al. Gene expression in visceral and subcutaneous adipose tissue in overweight women. *Front Biosci (Elite Ed)* 2012; 4:2834-2844.
40. Tran TT, Yamamoto Y, Gesta S, Kahn CR. Beneficial effects of subcutaneous fat transplantation on metabolism. *Cell Metabolism* 2008; 7(5):410-420.

41. Satoor SN, Puranik AS, Kumar S et al. Location, location, location: Beneficial effects of autologous fat transplantation. *Sci Rep* 2011; 1:81.
42. Cannon B, Nedergaard J. Yes, even human brown fat is on fire! *J Clin Invest* 2012; 122(2):486-489.
43. Enerback S, Jacobsson A, Simpson EM et al. Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature* 1997; 387(6628):90-94.
44. Saito M. Brown adipose tissue as a regulator of energy expenditure and body fat in humans. *Diabetes Metab J* 2013; 37(1):22-29.
45. Dalgaard LT, Pedersen O. Uncoupling proteins: functional characteristics and role in the pathogenesis of obesity and Type II diabetes. *Diabetologia* 2001; 44(8):946-965.
46. Brondani LA, Assmann TS, Duarte GC, Gross JL, Canani LH, Crispim D. The role of the uncoupling protein 1 (UCP1) on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2012; 56(4):215-225.
47. Seale P, Bjork B, Yang W et al. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* 2008; 454(7207):961-967.
48. Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med* 2013; 19(10):1252-1263.
49. Seale P, Conroe HM, Estall J et al. Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J Clin Invest* 2011; 121(1):96-105.
50. Seale P, Kajimura S, Yang W et al. Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell Metab* 2007; 6(1):38-54.
51. Wu J, Bostrom P, Sparks LM et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 2012; 150(2):366-376.
52. Ha J, Kim KH. Inhibition of fatty acid synthesis by expression of an acetyl-CoA carboxylase-specific ribozyme gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(21):9951-9955.
53. Ahmadian M, Duncan RE, Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Sul HS. Triacylglycerol metabolism in adipose tissue. *Future Lipidol* 2007; 2(2):229-237.
54. Assimacopoulos-Jeannet F, Brichard S, Rencurel F, Cusin I, Jeanrenaud B. In vivo effects of hyperinsulinemia on lipogenic enzymes and glucose transporter expression in rat liver and adipose tissues. *Metabolism* 1995; 44(2):228-233.

55. Bai Y, Zhang S, Kim KS, Lee JK, Kim KH. Obese gene expression alters the ability of 30A5 preadipocytes to respond to lipogenic hormones. *J Biol Chem* 1996; 271(24):13939-13942.
56. Khan M, Joseph F. Adipose tissue and adipokines: the association with and application of adipokines in obesity. *Scientifica (Cairo)* 2014; 2014:328592.
57. Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(3):1023-1033.
58. Maffei M, Halaas J, Ravussin E et al. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1995; 1(11):1155-1161.
59. Jequier E. Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 967:379-388.
60. Scarpace PJ, Matheny M, Tumer N, Cheng KY, Zhang Y. Leptin resistance exacerbates diet-induced obesity and is associated with diminished maximal leptin signalling capacity in rats. *Diabetologia* 2005; 48(6):1075-1083.
61. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001; 409(6818):307-312.
62. Moon B, Kwan JJ, Duddy N, Sweeney G, Begum N. Resistin inhibits glucose uptake in L6 cells independently of changes in insulin signaling and GLUT4 translocation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285(1):E106-E115.
63. Maeda N, Shimomura I, Kishida K et al. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med* 2002; 8(7):731-737.
64. Arita Y, Kihara S, Ouchi N et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257(1):79-83.
65. Waki H, Yamauchi T, Kamon J et al. Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *J Biol Chem* 2003; 278(41):40352-40363.
66. Pajvani UB, Hawkins M, Combs TP et al. Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. *J Biol Chem* 2004; 279(13):12152-12162.
67. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993; 259(5091):87-91.

68. Hotamisligil GS, Budavari A, Murray D, Spiegelman BM. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor-alpha. *J Clin Invest* 1994; 94(4):1543-1549.
69. Zhang HH, Halbleib M, Ahmad F, Manganiello VC, Greenberg AS. Tumor necrosis factor-alpha stimulates lipolysis in differentiated human adipocytes through activation of extracellular signal-related kinase and elevation of intracellular cAMP. *Diabetes* 2002; 51(10):2929-2935.
70. Ruan H, Hachohen N, Golub TR, Van PL, Lodish HF. 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* 2002; 51(5):1319-1336.
71. Kanda H, Tateya S, Tamori Y et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* 2006; 116(6):1494-1505.
72. Sartipy P, Loskutoff DJ. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(12):7265-7270.
73. Tigersted R, Bergman PD. Niere und Kreislauf. *Skand Arch Physiol* 1898; 8:223-271.
74. Kohlstaedt KG, Helmer OM, Page IH. Activation of renin by blood colloids. *Proc Soc Exp Biol Med* 1938;214-215.
75. Page IH, Helmer OM. A CRYSTALLINE PRESSOR SUBSTANCE (ANGIOTONIN) RESULTING FROM THE REACTION BETWEEN RENIN AND RENIN-ACTIVATOR. *J Exp Med* 1940; 71(1):29-42.
76. Takahashi S, Fukamizu A, Hatae T et al. Species-specific kinetics of mouse renin contribute to maintenance of normal blood pressure in transgenic mice with overexpressed human angiotensinogen. *J Vet Med Sci* 1992; 54(6):1191-1193.
77. Ganten D, Wagner J, Zeh K et al. Species-specificity of renin kinetics in transgenic rats harboring the human renin and angiotensinogen genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:7806-7810.
78. Wang PH, Do YS, Macaulay L et al. Identification of renal cathepsin B as a human prorenin-processing enzyme. *J Biol Chem* 1991; 266:12633-12638.
79. Montani JP, Van Vliet BN. General Physiology and Pathophysiology of the Renin-Angiotensin System. *Angiotensin Vol. I. Handb Exp Pharmacol*, 2004: 3-29.
80. De Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 2000; 52(3):415-472.

81. Chauvel EN, Llorens-Cortes C, Coric P, Wilk S, Roques BP, Fournie-Zaluski MC. Differential inhibition of aminopeptidase A and aminopeptidase N by new beta-amino thiols. *J Med Chem* 1994; 37(18):2950-2957.
82. Ahmad S, Ward PE. Role of aminopeptidase activity in the regulation of the pressor activity of circulating angiotensins. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 252(2):643-650.
83. Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem* 2000; 275(43):33238-33243.
84. Ferrario CM. Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7): an evolving story in cardiovascular regulation. *Hypertension* 2006; 47(3):515-521.
85. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res* 2000; 87(5):E1-E9.
86. Peach MJ. Renin-Angiotensin System - Biochemistry and Mechanisms of Action. *Physiol Rev* 1977; 57(2):313-370.
87. Paul M, Poyan MA, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* 2006; 86(3):747-803.
88. Pinterova L, Krizanova O, Zorad S. Rat epididymal fat tissue express all components of the renin-angiotensin system. *Gen Physiol Biophys* 2000; 19(3):329-334.
89. Engeli S, Gorzelniak K, Kreutz R, Runkel N, Distler A, Sharma AM. Co-expression of renin-angiotensin system genes in human adipose tissue. *J Hypertens* 1999; 17(4):555-560.
90. Karlsson C, Lindell K, Ottosson M, Sjostrom L, Carlsson B, Carlsson LM. Human adipose tissue expresses angiotensinogen and enzymes required for its conversion to angiotensin II. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83(11):3925-3929.
91. Jones BH, Standridge MK, Moustaid N. Angiotensin II increases lipogenesis in 3T3-L1 and human adipose cells. *Endocrinology* 1997; 138(4):1512-1519.
92. Giacchetti G, Faloia E, Mariniello B et al. Overexpression of the renin-angiotensin system in human visceral adipose tissue in normal and overweight subjects. *Am J Hypertens* 2002; 15(5):381-388.
93. Galvez-Prieto B, Bolbrinker J, Stucchi P et al. Comparative expression analysis of the renin-angiotensin system components between white and brown perivascular adipose tissue. *J Endocrinol* 2008; 197(1):55-64.

94. Harp JB, DiGirolamo M. Components of the renin-angiotensin system in adipose tissue: Changes with maturation and adipose mass enlargement. *J Gerontol [A]* 1995; 50A(5):B270-B276.
95. Shenoy U, Cassis L. Characterization of renin activity in brown adipose tissue. *Am J Physiol* 1997; 272(3 Pt 1):C989-C999.
96. Schling P, Mallow H, Trindl A, Loffler G. Evidence for a local renin angiotensin system in primary cultured human preadipocytes. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999; 23(4):336-341.
97. Zorad S, Dou JT, Benicky J et al. Long-term angiotensin II AT1 receptor inhibition produces adipose tissue hypotrophy accompanied by increased expression of adiponectin and PPARgamma. *Eur J Pharmacol* 2006; 552(1-3):112-122.
98. Goossens GH, Blaak EE, Saris WHM, van Baak MA. Angiotensin II-Induced effects on adipose and skeletal muscle tissue blood flow and lipolysis in normal-weight and obese subjects. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2004; 89(6):2690-2696.
99. Goossens GH, Blaak EE, Arner P, Saris WHM, van Baak MA. Angiotensin II: a hormone that affects lipid metabolism in adipose tissue. *International Journal of Obesity* 2007; 31(2):382-384.
100. Janke J, Engeli S, Gorzelniak K, Luft FC, Sharma AM. Mature adipocytes inhibit in vitro differentiation of human preadipocytes via angiotensin type 1 receptors. *Diabetes* 2002; 51(6):1699-1707.
101. Picard F, Auwerx J. PPAR(gamma) and glucose homeostasis. *Annu Rev Nutr* 2002; 22:167-197.
102. Cooper R, Forrester T, Ogunbiyi O, Muffinda J. Angiotensinogen levels and obesity in four black populations. ICSHIB Investigators. *J Hypertens* 1998; 16(5):571-575.
103. Umemura S, Nyui N, Tamura K et al. Plasma angiotensinogen concentrations in obese patients. *Am J Hypertens* 1997; 10(6):629-633.
104. van Harmelen V, Ariapart P, Hoffstedt J, Lundkvist I, Bringman S, Arner P. Increased adipose angiotensinogen gene expression in human obesity. *Obes Res* 2000; 8(4):337-341.
105. van Harmelen V, Elizalde M, Ariapart P et al. The association of human adipose angiotensinogen gene expression with abdominal fat distribution in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24(6):673-678.
106. Giacchetti G, Faloia E, Sardu C et al. Gene expression of angiotensinogen in adipose tissue of obese patients. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24 Suppl 2:S142-S143.

107. Strazzullo P, Iacone R, Iacoviello L et al. Genetic variation in the renin-angiotensin system and abdominal adiposity in men: the Olivetti Prospective Heart Study. *Ann Intern Med* 2003; 138(1):17-23.
108. Rahmouni K, Mark AL, Haynes WG, Sigmund CD. Adipose depot-specific modulation of angiotensinogen gene expression in diet-induced obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 286(6):E891-E895.
109. Boustany CM, Bharadwaj K, Daugherty A, Brown DR, Randall DC, Cassis LA. Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 287(4):R943-R949.
110. Hainault I, Nebout G, Turban S, Ardouin B, Ferre P, Quignard-Boulange A. Adipose tissue-specific increase in angiotensinogen expression and secretion in the obese (fa/fa) Zucker rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 282(1):E59-E66.
111. Yasue S, Masuzaki H, Okada S et al. Adipose tissue-specific regulation of angiotensinogen in obese humans and mice: impact of nutritional status and adipocyte hypertrophy. *Am J Hypertens* 2010; 23(4):425-431.
112. Massiera F, Bloch-Faure M, Ceiler D et al. Adipose angiotensinogen is involved in adipose tissue growth and blood pressure regulation. *FASEB J* 2001; 15(14):2727-2729.
113. Yiannikouris F, Karounos M, Charnigo R et al. Adipocyte-specific deficiency of angiotensinogen decreases plasma angiotensinogen concentration and systolic blood pressure in mice. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 2012; 302(2):R244-R251.
114. Frederich RC, Jr., Kahn BB, Peach MJ, Flier JS. Tissue-specific nutritional regulation of angiotensinogen in adipose tissue. *Hypertension* 1992; 19(4):339-344.
115. Alligier M, Meugnier E, Debard C et al. Subcutaneous adipose tissue remodeling during the initial phase of weight gain induced by overfeeding in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97(2):E183-E192.
116. Engeli S, Bohnke J, Gorzelniak K et al. Weight loss and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Hypertension* 2005; 45(3):356-362.
117. Kim S, Urs S, Massiera F et al. Effects of high-fat diet, angiotensinogen (agt) gene inactivation, and targeted expression to adipose tissue on lipid metabolism and renal gene expression. *Horm Metab Res* 2002; 34(11-12):721-725.

118. Massiera F, Seydoux J, Geloën A et al. Angiotensinogen-deficient mice exhibit impairment of diet-induced weight gain with alteration in adipose tissue development and increased locomotor activity. *Endocrinology* 2001; 142(12):5220-5225.
119. Kim S, Soltani-Bejnood M, Quignard-Boulangé A et al. The adipose renin-angiotensin system modulates systemic markers of insulin sensitivity and activates the intrarenal renin-angiotensin system. *J Biomed Biotechnol* 2006; 2006(5):27012.
120. Kouyama R, Suganami T, Nishida J et al. Attenuation of diet-induced weight gain and adiposity through increased energy expenditure in mice lacking angiotensin II type 1a receptor. *Endocrinology* 2005; 146(8):3481-3489.
121. Tomono Y, Iwai M, Inaba S, Mogi M, Horiuchi M. Blockade of AT1 receptor improves adipocyte differentiation in atherosclerotic and diabetic models. *Am J Hypertens* 2008; 21(2):206-212.
122. Yvan-Charvet L, Even P, Bloch-Faure M et al. Deletion of the angiotensin type 2 receptor (AT2R) reduces adipose cell size and protects from diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2005; 54(4):991-999.
123. Takahashi N, Li F, Hua K et al. Increased energy expenditure, dietary fat wasting, and resistance to diet-induced obesity in mice lacking renin. *Cell Metab* 2007; 6(6):506-512.
124. Jayasooriya AP, Mathai ML, Walker LL et al. Mice lacking angiotensin-converting enzyme have increased energy expenditure, with reduced fat mass and improved glucose clearance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(18):6531-6536.
125. Stucchi P, Cano V, Ruiz-Gayo M, Fernandez-Alfonso MS. Aliskiren reduces body-weight gain, adiposity and plasma leptin during diet-induced obesity. *Br J Pharmacol* 2009; 158(3):771-778.
126. Marchionne EM, Diamond-Stanic MK, Prasonnarong M, Henriksen EJ. Chronic renin inhibition with aliskiren improves glucose tolerance, insulin sensitivity, and skeletal muscle glucose transport activity in obese Zucker rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2012; 302(1):R137-R142.
127. Furuhashi M, Ura N, Takizawa H et al. Blockade of the renin-angiotensin system decreases adipocyte size with improvement in insulin sensitivity. *J Hypertens* 2004; 22(10):1977-1982.
128. Weisinger HS, Begg DP, Egan GF et al. Angiotensin converting enzyme inhibition from birth reduces body weight and body fat in Sprague-Dawley rats. *Physiol Behav* 2008; 93(4-5):820-825.

129. Mathai ML, Naik S, Sinclair AJ, Weisinger HS, Weisinger RS. Selective reduction in body fat mass and plasma leptin induced by angiotensin-converting enzyme inhibition in rats. *Int J Obes (Lond)* 2008; 32(10):1576-1584.
130. Weisinger RS, Stanley TK, Begg DP, Weisinger HS, Spark KJ, Jois M. Angiotensin converting enzyme inhibition lowers body weight and improves glucose tolerance in C57BL/6J mice maintained on a high fat diet. *Physiol Behav* 2009; 98(1-2):192-197.
131. de Kloet AD, Krause EG, Kim DH, Sakai RR, Seeley RJ, Woods SC. The effect of angiotensin-converting enzyme inhibition using captopril on energy balance and glucose homeostasis. *Endocrinology* 2009; 150(9):4114-4123.
132. Kurata A, Nishizawa H, Kihara S et al. Blockade of Angiotensin II type-1 receptor reduces oxidative stress in adipose tissue and ameliorates adipocytokine dysregulation. *Kidney Int* 2006; 70(10):1717-1724.
133. Mori Y, Itoh Y, Tajima N. Angiotensin II receptor blockers downsize adipocytes in spontaneously type 2 diabetic rats with visceral fat obesity. *Am J Hypertens* 2007; 20(4):431-436.
134. Lee MH, Song HK, Ko GJ et al. Angiotensin receptor blockers improve insulin resistance in type 2 diabetic rats by modulating adipose tissue. *Kidney Int* 2008; 74(7):890-900.
135. Munoz MC, Giani JF, Dominici FP, Turyn D, Toblli JE. Long-term treatment with an angiotensin II receptor blocker decreases adipocyte size and improves insulin signaling in obese Zucker rats. *J Hypertens* 2009; 27(12):2409-2420.
136. Schupp M, Janke J, Clasen R, Unger T, Kintscher U. Angiotensin type 1 receptor blockers induce peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity. *Circulation* 2004; 109(17):2054-2057.
137. Azizi M, Bissery A, Lamarre-Cliche M, Menard J. Integrating drug pharmacokinetics for phenotyping individual renin response to angiotensin II blockade in humans. *Hypertension* 2004; 43(4):785-790.
138. Kramer BK, Ritthaler T, Schweda F et al. Effects of the angiotensin II type-1 receptor antagonist ZD7155 on angiotensin II-mediated regulation of renin secretion and renal renin gene expression, renal vasoconstriction, and blood pressure in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 31(5):700-705.
139. Wagner C, Kurtz A. Effects of candesartan on the renin system in conscious rats. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10 Suppl 11:S169-S171.

140. Huang Y, Wongamorntham S, Kasting J et al. Renin increases mesangial cell transforming growth factor-beta1 and matrix proteins through receptor-mediated, angiotensin II-independent mechanisms. *Kidney Int* 2006; 69(1):105-113.
141. Sealey JE, Laragh JH. Aliskiren, the first renin inhibitor for treating hypertension: reactive renin secretion may limit its effectiveness. *Am J Hypertens* 2007; 20(5):587-597.
142. Nussberger J, Wuerzner G, Jensen C, Brunner HR. Angiotensin II suppression in humans by the orally active renin inhibitor Aliskiren (SPP100): comparison with enalapril. *Hypertension* 2002; 39(1):E1-E8.
143. Kurtz A, Wagner C. Regulation of renin secretion by angiotensin II-AT1 receptors. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10 Suppl 11:S162-S168.
144. Nguyen G, Delarue F, Berrou J, Rondeau E, Sraer JD. Specific receptor binding of renin on human mesangial cells in culture increases plasminogen activator inhibitor-1 antigen. *Kidney Int* 1996; 50(6):1897-1903.
145. Ghosh AK, Vaughan DE. PAI-1 in tissue fibrosis. *J Cell Physiol* 2012; 227(2):493-507.
146. Correia ML, Haynes WG. A role for plasminogen activator inhibitor-1 in obesity: from pie to PAI? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26(10):2183-2185.
147. Nguyen G, Delarue F, Burckle C, Bouzahir L, Giller T, Sraer JD. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest* 2002; 109(11):1417-1427.
148. Sanchez-Guerrero E, Hernandez-Campos ME, Correa-Basurto J, Lopez-Sanchez P, Tolentino-Lopez LE. Three-dimensional structure and molecular dynamics studies of prorenin/renin receptor: description of the active site. *Mol Biosyst* 2015; 11(9):2520-2528.
149. Burckle C, Bader M. Prorenin and its ancient receptor. *Hypertension* 2006; 48(4):549-551.
150. Nguyen G, Muller DN. The biology of the (pro)renin receptor. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21(1):18-23.
151. Cousin C, Bracquart D, Contrepas A, Corvol P, Muller L, Nguyen G. Soluble form of the (pro)renin receptor generated by intracellular cleavage by furin is secreted in plasma. *Hypertension* 2009; 53(6):1077-1082.
152. Schafer W, Stroh A, Berghofer S et al. Two independent targeting signals in the cytoplasmic domain determine trans-Golgi network localization and endosomal trafficking of the proprotein convertase furin. *EMBO J* 1995; 14(11):2424-2435.

153. Achard V, Boullu-Ciocca S, Desbriere R, Nguyen G, Grino M. Renin receptor expression in human adipose tissue. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 292(1):R274-R282.
154. Contrepas A, Walker J, Koulakoff A et al. A role of the (pro)renin receptor in neuronal cell differentiation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009; 297(2):R250-R257.
155. Saris JJ, 't Hoen PA, Garrelds IM et al. Prorenin induces intracellular signaling in cardiomyocytes independently of angiotensin II. *Hypertension* 2006; 48(4):564-571.
156. Schefe JH, Menk M, Reinemund J et al. A novel signal transduction cascade involving direct physical interaction of the renin/prorenin receptor with the transcription factor promyelocytic zinc finger protein. *Circ Res* 2006; 99(12):1355-1366.
157. Advani A, Kelly DJ, Cox AJ et al. The (Pro)renin receptor: site-specific and functional linkage to the vacuolar H⁺-ATPase in the kidney. *Hypertension* 2009; 54(2):261-269.
158. Alcazar O, Cousins SW, Striker GE, Marin-Castano ME. (Pro)renin receptor is expressed in human retinal pigment epithelium and participates in extracellular matrix remodeling. *Exp Eye Res* 2009; 89(5):638-647.
159. Hirose T, Mori N, Totsune K et al. Gene expression of (pro)renin receptor is upregulated in hearts and kidneys of rats with congestive heart failure. *Peptides* 2009; 30(12):2316-2322.
160. Shan Z, Shi P, Cuadra AE et al. Involvement of the brain (pro)renin receptor in cardiovascular homeostasis. *Circ Res* 2010; 107(7):934-938.
161. Hsueh WA, Baxter JD. Human prorenin. *Hypertension* 1991; 17:469-479.
162. Hsueh WA, Carlson EJ, Israel-Hagman M. Mechanism of acid-activation of renin: role of kallikrein in renin activation. *Hypertension* 1981; 3(3 Pt 2):I22-I29.
163. Pitarresi TM, Rubattu S, Heinrikson R, Sealey JE. Reversible cryoactivation of recombinant human prorenin. *J Biol Chem* 1992; 267(17):11753-11759.
164. Suzuki F, Hayakawa M, Nakagawa T et al. Human prorenin has "gate and handle" regions for its non-proteolytic activation. *J Biol Chem* 2003; 278(25):22217-22222.
165. Suzuki F, Hatano Y, Nakagawa T et al. Non-proteolytic activation of human prorenin by anti-prorenin prosegment (pf#1: 1P-15P) antiserum. *Biosci Biotechnol Biochem* 1999; 63(3):550-554.
166. Heinrikson RL, Hui J, Zurcher-Neely H, Poorman RA. A structural model to explain the partial catalytic activity of human prorenin. *Am J Hypertens* 1989; 2(5 Pt 1):367-380.

167. Deinum J, Ronn B, Mathiesen E, Derkx FH, Hop WC, Schalekamp MA. Increase in serum prorenin precedes onset of microalbuminuria in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetologia* 1999; 42(8):1006-1010.
168. Wilson DM, Luetscher JA. Plasma prorenin activity and complications in children with insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1990; 323(16):1101-1106.
169. Ichihara A, Hayashi M, Kaneshiro Y et al. Inhibition of diabetic nephropathy by a decoy peptide corresponding to the "handle" region for nonproteolytic activation of prorenin. *J Clin Invest* 2004; 114(8):1128-1135.
170. Nabi AH, Kageshima A, Uddin MN, Nakagawa T, Park EY, Suzuki F. Binding properties of rat prorenin and renin to the recombinant rat renin/prorenin receptor prepared by a baculovirus expression system. *Int J Mol Med* 2006; 18(3):483-488.
171. Nabi AH, Biswas KB, Nakagawa T, Ichihara A, Inagami T, Suzuki F. Prorenin has high affinity multiple binding sites for (pro)renin receptor. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1794(12):1838-1847.
172. Yoshikawa A, Aizaki Y, Kusano KI et al. The (pro)renin receptor is cleaved by ADAM19 in the Golgi leading to its secretion into extracellular space. *Hypertens Res* 2011.
173. Gonzalez AA, Lara LS, Luffman C, Seth DM, Prieto MC. Soluble Form of the (Pro)Renin Receptor Is Augmented in the Collecting Duct and Urine of Chronic Angiotensin II-Dependent Hypertensive Rats. *Hypertension* 2011; 57(4):859-864.
174. Nguyen G, Bouzahir L, Delarue F, Rondeau E, Sraer JD. [Evidence of a renin receptor on human mesangial cells: effects on PAI1 and cGMP]. *Nephrologie* 1998; 19(7):411-416.
175. Zhang J, Noble NA, Border WA, Owens RT, Huang Y. Receptor-dependent prorenin activation and induction of PAI-1 expression in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 295(4):E810-E819.
176. Sakoda M, Ichihara A, Kaneshiro Y et al. (Pro)renin receptor-mediated activation of mitogen-activated protein kinases in human vascular smooth muscle cells. *Hypertens Res* 2007; 30(11):1139-1146.
177. Chen RH, Sarnecki C, Blenis J. Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol Cell Biol* 1992; 12(3):915-927.
178. Huang Y, Noble NA, Zhang J, Xu C, Border WA. Renin-stimulated TGF-beta1 expression is regulated by a mitogen-activated protein kinase in mesangial cells. *Kidney Int* 2007; 72(1):45-52.

179. Huang J, Matavelli LC, Siragy HM. Renal (pro)renin receptor contributes to development of diabetic kidney disease through transforming growth factor-beta1 - connective tissue growth factor signalling cascade. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2011; 38(4):215-221.
180. Guay J, Lambert H, Gingras-Breton G, Lavoie JN, Huot J, Landry J. Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. *J Cell Sci* 1997; 110 (Pt 3):357-368.
181. Kaneshiro Y, Ichihara A, Sakoda M et al. Slowly Progressive, Angiotensin II-Independent Glomerulosclerosis in Human (Pro)renin Receptor-Transgenic Rats. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18(6):1789-1795.
182. Vlahopoulos S, Zoumpourlis VC. JNK: a key modulator of intracellular signaling. *Biochemistry (Mosc)* 2004; 69(8):844-854.
183. Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292(1):C82-C97.
184. Schefe JH, Neumann C, Goebel M et al. Prorenin engages the (pro)renin receptor like renin and both ligand activities are unopposed by aliskiren. *J Hypertens* 2008; 26(9):1787-1794.
185. Batenburg WW, de Bruin RJ, van Gool JM et al. Aliskiren-binding increases the half life of renin and prorenin in rat aortic vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28(6):1151-1157.
186. Akbarzadeh A, Norouzi D, Mehrabi MR et al. Induction of diabetes by Streptozotocin in rats. *Indian J Clin Biochem* 2007; 22(2):60-64.
187. Siragy HM, Huang J. Renal (pro)renin receptor upregulation in diabetic rats through enhanced angiotensin AT1 receptor and NADPH oxidase activity. *Exp Physiol* 2008; 93(5):709-714.
188. Kang SI, Chang WJ, Cho SG, Kim IY. Modification of promyelocytic leukemia zinc finger protein (PLZF) by SUMO-1 conjugation regulates its transcriptional repressor activity. *J Biol Chem* 2003; 278(51):51479-51483.
189. Kang SI, Choi HW, Kim IY. Redox-mediated modification of PLZF by SUMO-1 and ubiquitin. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 369(4):1209-1214.
190. Forgac M. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(11):917-929.

191. Ludwig J, Kerscher S, Brandt U et al. Identification and characterization of a novel 9.2-kDa membrane sector-associated protein of vacuolar proton-ATPase from chromaffin granules. *J Biol Chem* 1998; 273(18):10939-10947.
192. Strausberg RL, Feingold EA, Grouse LH et al. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(26):16899-16903.
193. Cruciat CM, Ohkawara B, Acebron SP et al. Requirement of prorenin receptor and vacuolar H⁺-ATPase-mediated acidification for Wnt signaling. *Science* 2010; 327(5964):459-463.
194. Kinouchi K, Ichihara A, Sano M et al. The role of individual domains and the significance of shedding of ATP6AP2/(pro)renin receptor in vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase biogenesis. *PLoS One* 2013; 8(11):e78603.
195. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 2009; 17(1):9-26.
196. Danser AH. The Role of the (Pro)renin Receptor in Hypertensive Disease. *Am J Hypertens* 2015; 28(10):1187-1196.
197. Buechling T, Bartscherer K, Ohkawara B et al. Wnt/Frizzled signaling requires dPRR, the *Drosophila* homolog of the prorenin receptor. *Curr Biol* 2010; 20(14):1263-1268.
198. Takemitsu T, Ichihara A, Kaneshiro Y et al. Association of (pro)renin receptor mRNA expression with angiotensin-converting enzyme mRNA expression in human artery. *Am J Nephrol* 2009; 30(4):361-370.
199. Feldt S, Maschke U, Dechend R, Luft FC, Muller DN. The putative (pro)renin receptor blocker HRP fails to prevent (pro)renin signaling. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19(4):743-748.
200. Kaneshiro Y, Ichihara A, Takemitsu T et al. Increased expression of cyclooxygenase-2 in the renal cortex of human prorenin receptor gene-transgenic rats. *Kidney Int* 2006; 70(4):641-646.
201. Kinouchi K, Ichihara A, Sano M et al. The (pro)renin receptor/ATP6AP2 is essential for vacuolar H⁺-ATPase assembly in murine cardiomyocytes. *Circ Res* 2010; 107(1):30-34.
202. Oshima Y, Kinouchi K, Ichihara A et al. Prorenin receptor is essential for normal podocyte structure and function. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22(12):2203-2212.
203. Song R, Preston G, Ichihara A, Yosypiv IV. Deletion of the prorenin receptor from the ureteric bud causes renal hypodysplasia. *PLoS One* 2013; 8(5):e63835.

204. Riediger F, Quack I, Qadri F et al. Prorenin receptor is essential for podocyte autophagy and survival. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22(12):2193-2202.
205. Krebs C, Hamming I, Sadaghiani S et al. Antihypertensive therapy upregulates renin and (pro)renin receptor in the clipped kidney of Goldblatt hypertensive rats. *Kidney Int* 2007; 72(6):725-730.
206. Perola M, Kainulainen K, Pajukanta P et al. Genome-wide scan of predisposing loci for increased diastolic blood pressure in Finnish siblings. *J Hypertens* 2000; 18(11):1579-1585.
207. Hirose T, Hashimoto M, Totsune K et al. Association of (pro)renin receptor gene polymorphism with blood pressure in Japanese men: the Ohasama study. *Am J Hypertens* 2009; 22(3):294-299.
208. Ott C, Schneider MP, Delles C, Schlaich MP, Hilgers KF, Schmieder RE. Association of (pro)renin receptor gene polymorphism with blood pressure in Caucasian men. *Pharmacogenet Genomics* 2011.
209. Connell JM, Davies E. The new biology of aldosterone. *J Endocrinol* 2005; 186(1):1-20.
210. Hirose T, Hashimoto M, Totsune K et al. Association of (pro)renin receptor gene polymorphisms with lacunar infarction and left ventricular hypertrophy in Japanese women: the Ohasama study. *Hypertens Res* 2011; 34(4):530-535.
211. Burckle CA, Jan Danser AH, Muller DN et al. Elevated blood pressure and heart rate in human renin receptor transgenic rats. *Hypertension* 2006; 47(3):552-556.
212. Aoyagi T, Koshimizu TA, Tanoue A. Vasopressin regulation of blood pressure and volume: findings from V1a receptor-deficient mice. *Kidney Int* 2009; 76(10):1035-1039.
213. Li W, Peng H, Cao T et al. Brain-targeted (pro)renin receptor knockdown attenuates angiotensin II-dependent hypertension. *Hypertension* 2012; 59(6):1188-1194.
214. Ramser J, Abidi FE, Burckle CA et al. A unique exonic splice enhancer mutation in a family with X-linked mental retardation and epilepsy points to a novel role of the renin receptor. *Hum Mol Genet* 2005; 14(8):1019-1027.
215. Korvatska O, Strand NS, Berndt JD et al. Altered splicing of ATP6AP2 causes X-linked parkinsonism with spasticity (XPDS). *Hum Mol Genet* 2013; 22(16):3259-3268.
216. Yoshimori T, Yamamoto A, Moriyama Y, Futai M, Tashiro Y. Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *J Biol Chem* 1991; 266(26):17707-17712.

217. Xu J, Feng HT, Wang C et al. Effects of Bafilomycin A1: an inhibitor of vacuolar H (+)-ATPases on endocytosis and apoptosis in RAW cells and RAW cell-derived osteoclasts. *J Cell Biochem* 2003; 88(6):1256-1264.
218. Amsterdam A, Nissen RM, Sun Z, Swindell EC, Farrington S, Hopkins N. Identification of 315 genes essential for early zebrafish development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(35):12792-12797.
219. Nurun NA, Uddin NM, Nakagawa T et al. Role of "handle" region of prorenin prosegment in the non-proteolytic activation of prorenin by binding to membrane anchored (pro)renin receptor. *Front Biosci* 2007; 12:4810-4817.
220. Nabi AH, Biswas KB, Nakagawa T, Ichihara A, Inagami T, Suzuki F. 'Decoy peptide' region (RIFLKRMPSI) of prorenin prosegment plays a crucial role in prorenin binding to the (pro)renin receptor. *Int J Mol Med* 2009; 24(1):83-89.
221. Rask-Madsen C, King GL. Vascular complications of diabetes: mechanisms of injury and protective factors. *Cell Metab* 2013; 17(1):20-33.
222. Matavelli LC, Huang J, Siragy HM. (Pro)renin receptor contributes to diabetic nephropathy by enhancing renal inflammation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2010; 37(3):277-282.
223. de Cavanagh EM, Inserra F, Toblli J, Stella I, Fraga CG, Ferder L. Enalapril attenuates oxidative stress in diabetic rats. *Hypertension* 2001; 38(5):1130-1136.
224. Ichihara A, Suzuki F, Nakagawa T et al. Prorenin receptor blockade inhibits development of glomerulosclerosis in diabetic angiotensin II type 1a receptor-deficient mice. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17(7):1950-1961.
225. Sharma K, McCue P, Dunn SR. Diabetic kidney disease in the db/db mouse. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 284(6):F1138-F1144.
226. Ichihara A, Sakoda M, Kurauchi-Mito A, Nishiyama A, Itoh H. Involvement of receptor-bound prorenin in development of nephropathy in diabetic db/db mice. *J Am Soc Hypertens* 2008; 2(5):332-340.
227. Takahashi H, Ichihara A, Kaneshiro Y et al. Regression of nephropathy developed in diabetes by (Pro)renin receptor blockade. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18(7):2054-2061.
228. Satofuka S, Ichihara A, Nagai N et al. (Pro)renin receptor-mediated signal transduction and tissue renin-angiotensin system contribute to diabetes-induced retinal inflammation. *Diabetes* 2009; 58(7):1625-1633.
229. Nagai N, Oike Y, Noda K et al. Suppression of ocular inflammation in endotoxin-induced uveitis by blocking the angiotensin II type 1 receptor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46(8):2925-2931.

230. Satofuka S, Ichihara A, Nagai N et al. Suppression of ocular inflammation in endotoxin-induced uveitis by inhibiting nonproteolytic activation of prorenin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47(6):2686-2692.
231. Nagai N, Noda K, Urano T et al. Selective suppression of pathologic, but not physiologic, retinal neovascularization by blocking the angiotensin II type 1 receptor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46(3):1078-1084.
232. Satofuka S, Ichihara A, Nagai N et al. Role of nonproteolytically activated prorenin in pathologic, but not physiologic, retinal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48(1):422-429.
233. Ishida S, Usui T, Yamashiro K et al. VEGF164-mediated inflammation is required for pathological, but not physiological, ischemia-induced retinal neovascularization. *J Exp Med* 2003; 198(3):483-489.
234. Satofuka S, Ichihara A, Nagai N et al. (Pro)renin receptor promotes choroidal neovascularization by activating its signal transduction and tissue renin-angiotensin system. *Am J Pathol* 2008; 173(6):1911-1918.
235. Ichihara A, Kaneshiro Y, Takemitsu T et al. Nonproteolytic activation of prorenin contributes to development of cardiac fibrosis in genetic hypertension. *Hypertension* 2006; 47(5):894-900.
236. Susic D, Zhou X, Frohlich ED, Lipton H, Knight M. Cardiovascular effects of prorenin blockade in genetically spontaneously hypertensive rats on normal and high-salt diet. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 295(3):H1117-H1121.
237. Kaneko K, Susic D, Nunez E, Frohlich ED. Losartan reduces cardiac mass and improves coronary flow reserve in the spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens* 1996; 14(5):645-653.
238. Ichihara A, Kaneshiro Y, Takemitsu T et al. Contribution of nonproteolytically activated prorenin in glomeruli to hypertensive renal damage. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17(9):2495-2503.
239. Li W, Sullivan MN, Zhang S et al. Intracerebroventricular Infusion of the (Pro)renin Receptor Antagonist PRO20 Attenuates Deoxycorticosterone Acetate-Salt-Induced Hypertension. *Hypertension* 2015; 65(2):352-361.
240. Rademaker MT, Yandle TG, Ellmers LJ, Charles CJ, Nicholls MG, Richards AM. Hemodynamic, hormonal, and renal effects of (pro)renin receptor blockade in experimental heart failure. *Circ Heart Fail* 2012; 5(5):645-652.

241. He M, Zhang L, Shao Y et al. Inhibition of renin/prorenin receptor attenuated mesangial cell proliferation and reduced associated fibrotic factor release. *Eur J Pharmacol* 2009; 606(1-3):155-161.
242. Susic D, Lipperton H, Knight M, Frohlich ED. Cardiovascular effects of nonproteolytic activation of prorenin. *Hypertension* 2006; 48(6):e113.
243. Muller DN, Klanke B, Feldt S et al. (Pro)renin receptor peptide inhibitor "handle-region" peptide does not affect hypertensive nephrosclerosis in Goldblatt rats. *Hypertension* 2008; 51(3):676-681.
244. Gratze P, Boschmann M, Dechend R et al. Energy metabolism in human renin-gene transgenic rats: does renin contribute to obesity? *Hypertension* 2009; 53(3):516-523.
245. van Esch JH, van VR, Garrelds IM, Leijten F, Bouhuizen AM, Danser AH. Handle region peptide counteracts the beneficial effects of the Renin inhibitor aliskiren in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2011; 57(4):852-858.
246. Batenburg WW, van den Heuvel M, van Esch JH et al. The (pro)renin receptor blocker handle region peptide upregulates endothelium-derived contractile factors in aliskiren-treated diabetic transgenic (mREN2)27 rats. *J Hypertens* 2013; 31(2):292-302.
247. te RL, van den Heuvel M, Peutz-Kootstra CJ et al. Deterioration of kidney function by the (pro)renin receptor blocker handle region peptide in aliskiren-treated diabetic transgenic (mRen2)27 rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2014; 306(10):F1179-F1189.
248. Batenburg WW, Verma A, Wang Y et al. Combined renin inhibition/(pro)renin receptor blockade in diabetic retinopathy--a study in transgenic (mREN2)27 rats. *PLoS One* 2014; 9(6):e100954.
249. Batenburg WW, Krop M, Garrelds IM et al. Prorenin is the endogenous agonist of the (pro)renin receptor. Binding kinetics of renin and prorenin in rat vascular smooth muscle cells overexpressing the human (pro)renin receptor. *J Hypertens* 2007; 25(12):2441-2453.
250. Feldt S, Batenburg WW, Mazak I et al. Prorenin and renin-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in monocytes is not blocked by aliskiren or the handle-region peptide. *Hypertension* 2008; 51(3):682-688.
251. Song W, Zhang Y, Jia C et al. Up-regulation of TGF-beta via the activation of extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 induced by prorenin in human renal mesangial cells. *Mol Med Report* 2012; 5(1):223-227.
252. Chrysant SG. Current status of dual Renin Angiotensin aldosterone system blockade for the treatment of cardiovascular diseases. *Am J Cardiol* 2010; 105(6):849-852.

253. Danser AH, Derkx FH, Schalekamp MA, Hense HW, Riegger GA, Schunkert H. Determinants of interindividual variation of renin and prorenin concentrations: evidence for a sexual dimorphism of (pro)renin levels in humans. *J Hypertens* 1998; 16(6):853-862.
254. van Kesteren CA, Danser AH, Derkx FH et al. Mannose 6-phosphate receptor-mediated internalization and activation of prorenin by cardiac cells. *Hypertension* 1997; 30(6):1389-1396.
255. van den Eijnden MM, Saris JJ, de Bruin RJ et al. Prorenin accumulation and activation in human endothelial cells: importance of mannose 6-phosphate receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21(6):911-916.
256. Takahashi K, Yamamoto H, Hirose T et al. Expression of (pro)renin receptor in human kidneys with end-stage kidney disease due to diabetic nephropathy. *Peptides* 2010; 31(7):1405-1408.
257. Achard V, Tassistro V, Boullu-Ciocca S, Grino M. Expression and nutritional regulation of the (pro)renin receptor in rat visceral adipose tissue. *J Endocrinol Invest* 2011; 34(11):840-846.
258. Harte A, McTernan P, Chetty R et al. Insulin-mediated upregulation of the renin angiotensin system in human subcutaneous adipocytes is reduced by rosiglitazone. *Circulation* 2005; 111(15):1954-1961.
259. Nagai Y, Ichihara A, Nakano D et al. Possible contribution of the non-proteolytic activation of prorenin to the development of insulin resistance in fructose-fed rats. *Exp Physiol* 2009; 94(9):1016-1023.
260. Bost F, Aouadi M, Caron L et al. The extracellular signal-regulated kinase isoform ERK1 is specifically required for in vitro and in vivo adipogenesis. *Diabetes* 2005; 54(2):402-411.
261. Tan P, Shamansurova Z, Bisotto S et al. Impact of the prorenin/renin receptor on the development of obesity and associated cardiometabolic risk factors. *Obesity (Silver Spring)* 2014; 22(10):2201-2209.
262. Santos EL, de Picoli SK, Guimaraes PB et al. Effect of angiotensin converting enzyme inhibitor enalapril on body weight and composition in young rats. *Int Immunopharmacol* 2008; 8(2):247-253.
263. Santos EL, de Picoli SK, da Silva ED et al. Long term treatment with ACE inhibitor enalapril decreases body weight gain and increases life span in rats. *Biochem Pharmacol* 2009; 78(8):951-958.

264. Frantz ED, Crespo-Mascarenhas C, Barreto-Vianna AR, Aguila MB, Mandarin-de-Lacerda CA. Renin-angiotensin system blockers protect pancreatic islets against diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *PLoS One* 2013; 8(7):e67192.
265. Sugimoto K, Qi NR, Kazdova L, Pravenec M, Ogihara T, Kurtz TW. Telmisartan but not valsartan increases caloric expenditure and protects against weight gain and hepatic steatosis. *Hypertension* 2006; 47(5):1003-1009.
266. Fujisaka S, Usui I, Kanatani Y et al. Telmisartan improves insulin resistance and modulates adipose tissue macrophage polarization in high-fat-fed mice. *Endocrinology* 2011; 152(5):1789-1799.
267. Araki K, Masaki T, Katsuragi I, Tanaka K, Kakuma T, Yoshimatsu H. Telmisartan prevents obesity and increases the expression of uncoupling protein 1 in diet-induced obese mice. *Hypertension* 2006; 48(1):51-57.
268. Ren DL, Collingwood TN, Rebar EJ, Wolffe AP, Camp HS. PPAR gamma knockdown by engineered transcription factors: exogenous PPAR gamma 2 but not PPAR gamma 1 reactivates adipogenesis. *Genes & Development* 2002; 16(1):27-32.
269. Zieleniak A, Wojcik M, Wozniak LA. Structure and physiological functions of the human peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 2008; 56(5):331-345.
270. Vidal-Puig A, Jimenez-Linan M, Lowell BB et al. Regulation of PPAR gamma gene expression by nutrition and obesity in rodents. *J Clin Invest* 1996; 97(11):2553-2561.
271. Vidal-Puig AJ, Considine RV, Jimenez-Linan M et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J Clin Invest* 1997; 99(10):2416-2422.
272. Peterson RM, Beeson L, Shulz E et al. Impacting obesity and glycemic control using a culturally-sensitive diabetes education program in Hispanic patients with type 2 diabetes. *Int J Body Compos Res* 2010; 8(3):85-94.
273. Pajvani UB, Du X, Combs TP et al. Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. *J Biol Chem* 2003; 278(11):9073-9085.
274. Bi P, Shan T, Liu W et al. Inhibition of Notch signaling promotes browning of white adipose tissue and ameliorates obesity. *Nat Med* 2014; 20(8):911-918.
275. Kopan R, Ilagan MX. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* 2009; 137(2):216-233.
276. Go MJ, Eastman DS, Artavanis-Tsakonas S. Cell proliferation control by Notch signaling in *Drosophila* development. *Development* 1998; 125(11):2031-2040.

277. Shelly LL, Fuchs C, Miele L. Notch-1 inhibits apoptosis in murine erythroleukemia cells and is necessary for differentiation induced by hybrid polar compounds. *J Cell Biochem* 1999; 73(2):164-175.
278. Ozasa Y, Akazawa H, Qin Y et al. Notch activation mediates angiotensin II-induced vascular remodeling by promoting the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Hypertens Res* 2013; 36(10):859-865.
279. Koshizaka M, Takemoto M, Sato S et al. An angiotensin II type 1 receptor blocker prevents renal injury via inhibition of the Notch pathway in Ins2 Akita diabetic mice. *Exp Diabetes Res* 2012; 2012:159874.
280. Zavadil J, Cermak L, Soto-Nieves N, Bottinger EP. Integration of TGF-beta/Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition. *EMBO J* 2004; 23(5):1155-1165.
281. Lin S, Thomas TC, Storlien LH, Huang XF. Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24(5):639-646.
282. Enriori PJ, Evans AE, Sinnayah P et al. Diet-induced obesity causes severe but reversible leptin resistance in arcuate melanocortin neurons. *Cell Metab* 2007; 5(3):181-194.
283. Chang L, Chiang SH, Saltiel AR. Insulin signaling and the regulation of glucose transport. *Mol Med* 2004; 10(7-12):65-71.
284. Coppack SW, Fisher RM, Humphreys SM, Clark ML, Pointon JJ, Frayn KN. Carbohydrate metabolism in insulin resistance: glucose uptake and lactate production by adipose and forearm tissues in vivo before and after a mixed meal. *Clin Sci (Lond)* 1996; 90(5):409-415.
285. Friedman JE, Dohm GL, Leggett-Frazier N et al. Restoration of insulin responsiveness in skeletal muscle of morbidly obese patients after weight loss. Effect on muscle glucose transport and glucose transporter GLUT4. *J Clin Invest* 1992; 89(2):701-705.
286. Mitrou P, Boutati E, Lambadiari V et al. Rates of glucose uptake in adipose tissue and muscle in vivo after a mixed meal in women with morbid obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94(8):2958-2961.
287. Virtanen KA, Lonroth P, Parkkola R et al. Glucose uptake and perfusion in subcutaneous and visceral adipose tissue during insulin stimulation in nonobese and obese humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(8):3902-3910.

288. Virtanen KA, Iozzo P, Hallsten K et al. Increased fat mass compensates for insulin resistance in abdominal obesity and type 2 diabetes: a positron-emitting tomography study. *Diabetes* 2005; 54(9):2720-2726.
289. Das A, Sinha M, Datta S et al. Monocyte and Macrophage Plasticity in Tissue Repair and Regeneration. *Am J Pathol* 2015.
290. Red EA, Chawla A. In obesity and weight loss, all roads lead to the mighty macrophage. *J Clin Invest* 2010; 120(10):3437-3440.
291. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* 2005; 46(11):2347-2355.
292. Murano I, Barbatelli G, Parisani V et al. Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. *J Lipid Res* 2008; 49(7):1562-1568.
293. Fujisaka S, Usui I, Bukhari A et al. Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. *Diabetes* 2009; 58(11):2574-2582.
294. Tsuchiya K, Yoshimoto T, Hirono Y, Tateno T, Sugiyama T, Hirata Y. Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 expression via a nuclear factor-kappaB-dependent pathway in rat preadipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 291(4):E771-E778.
295. Asamizu S, Urakaze M, Kobashi C et al. Angiotensin II enhances the increase in monocyte chemoattractant protein-1 production induced by tumor necrosis factor- α from 3T3-L1 preadipocytes. *J Endocrinol* 2009; 202(2):199-205.
296. Skurk T, van H, V, Hauner H. Angiotensin II stimulates the release of interleukin-6 and interleukin-8 from cultured human adipocytes by activation of NF-kappaB. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24(7):1199-1203.
297. Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(11):4854-4858.
298. Feingold KR, Doerrler W, Dinarello CA, Fiers W, Grunfeld C. Stimulation of lipolysis in cultured fat cells by tumor necrosis factor, interleukin-1, and the interferons is blocked by inhibition of prostaglandin synthesis. *Endocrinology* 1992; 130(1):10-16.
299. Pape ME, Kim KH. Effect of tumor necrosis factor on acetyl-coenzyme A carboxylase gene expression and preadipocyte differentiation. *Mol Endocrinol* 1988; 2(5):395-403.
300. Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 2000; 106(4):473-481.

301. Morel Y, Gadiant A, Keller U, Vadas L, Golay A. Insulin sensitivity in obese hypertensive dyslipidemic patients treated with enalapril or atenolol. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 26(2):306-311.
302. Pscherer S, Heemann U, Frank H. Effect of Renin-Angiotensin system blockade on insulin resistance and inflammatory parameters in patients with impaired glucose tolerance. *Diabetes Care* 2010; 33(4):914-919.
303. de Luis DA, Conde R, Gonzalez-Sagrado M et al. Effects of telmisartan vs olmesartan on metabolic parameters, insulin resistance and adipocytokines in hypertensive obese patients. *Nutr Hosp* 2010; 25(2):275-279.
304. Goossens GH, Moors CC, van der Zijl NJ et al. Valsartan improves adipose tissue function in humans with impaired glucose metabolism: a randomized placebo-controlled double-blind trial. *PLoS One* 2012; 7(6):e39930.
305. Simon SR, Black HR, Moser M, Berland WE. Cough and ACE inhibitors. *Arch Intern Med* 1992; 152(8):1698-1700.
306. Prisant LM. Angioneurotic edema. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2001; 3(4):262-263.
307. Lithell H, Hansson L, Skoog I et al. The Study on Cognition and Prognosis in the Elderly (SCOPE): principal results of a randomized double-blind intervention trial. *J Hypertens* 2003; 21(5):875-886.
308. Murakami M, Matsuda H, Kubota E et al. Role of angiotensin II generated by angiotensin converting enzyme-independent pathways in canine kidney. *Kidney Int Suppl* 1997; 63:S132-S135.